



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Aitor  
Álvarez Lorenzo

Tesis doctoral

Nanocomposites plasmónicos  
para manipulación de  
moléculas en célula viva

Santiago de Compostela, 2023

**Programa de doctorado en Ciencia de Materiales**





TESIS DE DOCTORADO

**NANOCOMPOSITOS PLASMÓNICOS PARA  
MANIPULACIÓN DE MOLÉCULAS EN CÉLULA  
VIVA**

Aitor Álvarez Lorenzo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE  
COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA DE MATERIALES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

AÑO 2023





D./Dña. **Aitor Álvarez Lorenzo**

Título de la tesis: **Nanocomposites plasmónicos para manipulación de moléculas en célula viva**

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) Confirmando 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, 20 de junio de 2023.**

**Firma electrónica**



**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS**  
**Nanocomposites plasmónicos para manipulación de moléculas**  
**en célula viva**

D. Pablo Alfonso del Pino González de la Higuera

D. Pablo Taboada Antelo

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Aitor Álvarez Lorenzo, bajo nuestra dirección, y autorizamos su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores 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, declararamos también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 20 de julio de 2023



## TABLA DE CONTENIDOS

Lista de figuras .....	13
Lista de tablas.....	21
LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES .....	24
Lista de publicaciones .....	27
Agradecimientos.....	30
Resumen .....	32
Resumo.....	38
Abstract .....	44
Objetivos .....	50
1. Introducción y estado del arte .....	54
1.1. Conceptos generales .....	54
1.1.1. Los inicios de la nanotecnología .....	54
1.1.2. Clasificación de los NMs.....	55
1.1.3. Proceso de crecimiento de las NPs inorgánicas .....	56
1.1.4. Síntesis y caracterización de NPs inorgánicas.....	58
1.1.5. Funcionalización y estabilidad coloidal de las NPs inorgánicas .....	59
1.1.5.a. Funcionalización con PEG .....	59
1.1.5.b. Funcionalización recubriendo con polímeros anfifílicos .....	61
1.1.6. Caracterización de NPs.....	61
1.1.7. Propiedades y bioaplicaciones de NPs inorgánicas.....	63
1.1.8. Toxicidad de las NPs inorgánicas.....	64
1.2. NPs plasmónicas.....	65
1.2.1. La teoría de Mie.....	66
1.2.2. Aplicaciones de las NPs plasmónicas.....	67
1.3. Marcos organometálicos.....	68
1.4. NPs magnéticas .....	72
1.4.1. Magnetismo .....	72
1.4.2. Histéresis .....	73
1.4.3. Magnetismo a escala nano.....	73
1.4.4. Hipertermia.....	74
1.5. NPs de paladio .....	76
2. Métodos y materiales .....	80

2.1. Reactivos .....	80
2.2. Métodos .....	80
2.2.1. Consideraciones generales.....	80
2.2.2. Síntesis de AuNPs .....	81
2.2.3. Síntesis de AuNRs.....	81
2.2.4. Determinación de la concentración de AuNRs por ICP.....	82
2.2.5. Cálculo del coeficiente de extinción de los AuNRs .....	82
2.2.6. Recubrimiento de los AuNRs con BSA .....	83
2.2.7. Experimento de irradiación láser de los AuNR@BSA .....	83
2.2.8. Síntesis de AuNSs .....	83
2.2.9. Síntesis de NPs de plata (AgNPs) en medio acuoso.....	84
2.2.10. Síntesis de NPs de plata (AgNPs) en medio orgánico.....	84
2.2.11. Síntesis de NPs de cobre (CuNPs).....	84
2.2.12. Síntesis de MNPs de óxido de hierro .....	85
2.2.13. Síntesis de PdNCs.....	86
2.2.14. Síntesis de PdNDs .....	87
2.2.14.a. Síntesis de PdND1 .....	87
2.2.14.b. Síntesis de PdND2.....	87
2.2.15. Determinación de las constantes de reacción.....	87
2.2.16. Síntesis de ZIF-8.....	87
2.2.17. Síntesis del nanocompuesto (NC) formados por NP recubiertas de ZIF-8 (NP@ZIF-8) .....	88
2.2.18. Síntesis de NP@ZIF-8 cargado con CV.....	88
2.2.19. Síntesis del nanocompuesto NP agregadas@ZIF-8.....	89
2.2.20. Medidas SERS con los NP agregados@ZIF-8.....	89
2.2.21. Transferencia de MNPs estabilizadas en medio orgánico a agua mediante el uso de CTAB .....	89
2.2.22. Evaluación de la degradación de NP mediante ICP.....	89
2.2.23. Recubrimiento con polímeros anfifílicos .....	90
2.2.23.a. Síntesis de PMA .....	90
2.2.23.b. Modificación del PMA.....	90
2.2.23.c. Purificación del PMA .....	90
2.2.23.d. Recubrimiento con PMA.....	91
2.2.23.e. Recubrimiento de los AuNRs con PEG y marcado con rodamina .....	92

2.2.23.f. Recubrimiento de los PdNC y PdND con PEG .....	93
2.2.23.g. Recubrimiento de los PdNC y PdND con MC .....	94
2.2.23.h. Transferencia de las AuNP a medio orgánico .....	94
2.3. Rectas de calibrado.....	95
2.4. Instrumentos y técnicas .....	96
3. NPs plasmónicas y su funcionalización .....	101
3.1. Introducción.....	101
3.2. Síntesis, funcionalización y caracterización de AuNP, plata, cobre y sus mezclas .....	102
3.2.1. Estudio de la degradación de NPs metálicas y sus mezclas. ....	105
3.3. Síntesis, funcionalización y caracterización de NPs plasmónicas anisotrópicas .	110
3.3.1. Síntesis, funcionalización con PEG y caracterización de los AuNRs .....	110
3.3.2. Encapsulado en ZIF-8 de AuNR (AuNR@ZIF-8) .....	116
3.3.3. Síntesis y encapsulación en ZIF-8 de AuNS .....	122
3.3.4. Desarrollo de un nanocompuesto AuNS@ZIF-8 como sustrato SERS .....	128
4. MNPs y su funcionalización .....	136
4.1. Introducción.....	136
4.2. Síntesis, funcionalización y caracterización de las MNPs .....	137
4.2.1. Funcionalización y estabilidad de las MNPs en medio acuoso con PMA ...	141
4.2.2. Influencia sobre las propiedades magnéticas del dopado con cobalto de NPs de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	144
4.2.3. Estabilización de las MNPs en medios acuosos con CTAB.....	149
4.3. Síntesis, caracterización y aplicaciones de NCs MNPs@ZIF-8.....	152
4.3.1. Encapsulación de colorantes en nanocompuestos MNP@ZIF-8 .....	157
4.3.2. Funcionalización y estabilidad coloidal de los MNP@ZIF8 .....	160
5. NPs de paladio, derivados PdNP@zif-8 y su funcionalización .....	169
5.1. Introducción.....	169
5.2. Síntesis y caracterización de PdNCs y PdNDs.....	170
5.2.1. Reacciones catalizadas por PdNP.....	173
5.2.2. Propiedades catalíticas.....	175
5.2.3. Síntesis de nanocompuestos PdNC@ZIF-8 .....	181
6. Conclusions .....	189
7. ANEXOS.....	194
8. Referencias .....	202

9. Conflictos de interés, derechos y permisos ..... 216



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática de los mecanismos principales de crecimiento de NP.....	57
Figura 2: Esquema representativo de los dos principales enfoques en la síntesis de NPs con algunos métodos de ejemplo. ....	59
Figura 3: Hidrofobización de NPs de Au mediante su funcionalización en dos etapas: (1) PEGilación en agua (panel superior) mediante el desplazamiento de ligandos hidrofílicos (representados en azul) por moléculas de PEG-SH (representadas en rojo claro), seguido de la transferencia de fase a una solución de cloroformo que contiene alquilaminas (representadas en rojo oscuro). (Adaptado con permiso de la referencia <sup>26</sup> ).....	60
Figura 4: Los núcleos de las NPs (representados en gris), que están cubiertos con ligandos hidrofóbicos (representados en rojo), son modificados con un polímero anfifílico (el esqueleto hidrofílico dibujado en azul y las cadenas laterales hidrofóbicas dibujadas en rojo). El núcleo de la NP se incrusta en la micela de polímero resultante, lo que da como resultado una superficie de NP hidrofílica. (Adaptado con permiso de la referencia <sup>26</sup> ). ....	61
Figura 5: Representación esquemática de los MOF, mostrando algunas de las Unidades de Construcción Secundaria y conectores representativos (Adaptado con permiso de la referencia 76).....	68
Figura 6: Comparación entre la estructura formada por la unión del imidazolato con los centros metálicos del ZIF con la de la unión del oxígeno-silicio de las zeolitas (a). Diferentes ligandos que pueden presentar los ZIFs (b). Estructura representativa del Zn tetracoordinado con ligandos imidazolato del ZIF-8 (c). Red tridimensional representativa del ZIF-8 (d). ....	71
Figura 7: Rotación de Néel vs. rotación browniana. (A) Rotación de Néel: el momento magnético rota mientras la partícula permanece fija. (B) Rotación Browniana: el momento magnético permanece fijo con respecto a los ejes cristalinos mientras la partícula rota.(Adaptado con permiso de la referencia <sup>104</sup> ) .....	76
Figura 8: Esquema de la preparación del oleato de hierro. Montaje del sistema de reflujo para la síntesis (izquierda) y representación de la coordinación de cationes de Fe <sup>2+</sup> y Fe <sup>3+</sup> con aniones oleato (derecha). ....	85
Figura 9: Esquema del montaje para la síntesis de MNPs.....	86
Figura 10: Correlación entre la concentración de AuNRs determinada por ICP-MS y la absorción UV-VIS ( $\lambda = 450$ nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 6 \times 10^8 x + 0,00727$ , $r^2 = 0,999$ ).....	95
Figura 11: Correlación entre la concentración de AuNP determinada por ICP-MS y la absorción UV-VIS ( $\lambda = 450$ nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 1.75 \times 10^8 x + 0,00018$ , $r^2 = 0,999$ ).....	95
Figura 12: Correlación entre la concentración de CV y la intensidad de emisión de fluorescencia ( $\lambda = 621$ nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal en H <sub>2</sub> O ( $y = 4.38 \times 10^9 x + 5.01 \times 10^5$ , $r^2 = 0,967$ ) (A) y en MeOH ( $y = 2.60 \times 10^9 x + 1.43E \times 10^6$ , $r^2 = 0,994$ ) (B). ....	96

Figura 13: Correlación entre la concentración de 6-AF en MeOH y la intensidad de emisión de fluorescencia ( $\lambda = 518$  nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 212.2 x + 582.2$ ,  $r^2 = 0,999$ )..... 96

Figura 14: Imagen de TEM representativa de las AuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica N (N = 300) del diámetro de los AuNP ( $d_c$ ) según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 524$  nm (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las AuNPs@PMA (D). ..... 103

Figura 15: Imagen de TEM representativa de los AgNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica N (N = 300) del diámetro de los AgNP según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AgNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 402$  nm (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las AgNPs@PMA (D). ..... 104

Figura 16: Imagen de SEM representativa de los CuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes de la distribución numérica N (N = 300) del diámetro de las CuNPs según lo determinado a partir del análisis de imágenes SEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las CuNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 578$  nm (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las CuNPs@PMA (D)..... 105

Figura 17: Espectros de absorción UV-Vis de AuNPs (A), AgNPs (B), CuNPs (C), AuNPs-AgNPs (D), AuNPs-CuNPs (E), AgNPs-CuNPs (F), AuNPs-AgNPs-CuNPs (G)..... 106

Figura 18: Evaluación de la degradación a 37 °C a lo largo de 72 h, dada como el porcentaje de metal determinado por ICP en el sobrenadante de AuNPs (A), AgNPs (B), CuNPs (C), AuNPs-AgNPs (D), AuNPs-CuNPs (E), AgNPs-CuNPs (F), AuNPs-AgNPs-CuNPs (G)... 108

Figura 19: Ensayo de viabilidad celular en células A549 incubadas con diferentes concentraciones de NPs de Au, Ag, Cu y sus combinaciones..... 110

Figura 20: Imagen de SEM representativa de los AuNRs obtenidos junto con la representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes de la distribución numérica N (N = 300) del largo ( $L = 33,5 \pm 4,1$  nm) y ancho ( $A = 9,5 \pm 1,1$  nm) de los AuNRs, según lo determinado a partir del análisis de imágenes SEM. .... 111

Figura 21: Representación esquemática representativa de los AuNRs PEGilados. .... 111

Figura 22: Espectros de absorción UV-Vis de AuNRs-CTAB (línea verde), AuNRs@PEG<sup>+</sup> (línea roja), AuNRs@PEG<sup>-</sup> (línea azul) y AuNRs@PEG<sup>0</sup> (línea negra) que muestra el pico de resonancia de plasmón superficial localidad (LSPR) en  $\lambda \approx 780$  nm (A). Potenciales  $\zeta$  de los AuNRs: AuNRs@PEG<sup>+</sup> ( $\zeta = 19,9 \pm 5,3$  mV) (B); AuNRs@PEG<sup>-</sup> ( $\zeta = -21,1 \pm 9,1$  mV) (C); AuNRs@PEG<sup>0</sup> ( $\zeta = 3,6 \pm 4,0$  mV) (D). Comparación del potencial  $\zeta$  de diferentes muestras AuNRs@PEG@BSA, PEG<sup>+</sup> (rojo), PEG<sup>-</sup> (azul) y PEG<sup>0</sup> (negro) normalizados a la unidad (E). Comparación del potencial  $\zeta$  de los AuNRs@PEG<sup>+</sup> (rojo), AuNRs@PEG<sup>-</sup> (azul) y AuNRs@PEG<sup>0</sup> (negro), en presencia (barras sin relleno) y ausencia de BSA (barras con relleno) (F). ..... 112

Figura 23: Representación esquemática de la estructura de BSA con los residuos de aminoácidos cargados positivamente coloreados en azul y los residuos de aminoácidos cargados

negativamente coloreados en rojo (software Pymol®)<sup>139</sup> (A). Migración de los AuNRs PEGilados con diferentes cantidades de BSA adsorbidas en su superficie. La movilidad electroforética relativa del complejo AuNRs@BSA se calcula como la distancia que ha migrado cada banda correspondiente de AuNRs@BSA normalizada por la distancia del control AuNRs (sin proteína) (B) ..... 113

Figura 24: Interacciones de los AuNRs@BSA PEGilados con células: Internalización celular de AuNRs@BSA en células HeLa después de 3 h de incubación analizada por citometría de flujo. El incremento en la intensidad de fluorescencia media (IFM) para la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína (FITC) demuestra la internalización de los AuNRs debido al marcado de la BSA con la sonda fluorescente (A). Internalización celular de AuNRs y AuNRs@BSA en células HeLa después de 18 h de incubación analizada por citometría de flujo. El incremento de IFM de la fluorescencia de la rodamina, demuestra la internalización de los AuNRs marcados con rodamina (B). Experimentos en tubo de ensayo de liberación de BSA desde la superficie de los AuNRs en diferentes medios (tampón PBS y medios de células completas) desencadenada por la irradiación con un láser de 805 nm de longitud de onda, durante 3 min y una potencia de 4 W/cm<sup>2</sup> (C). Internalización celular de AuNRs@BSA en células HeLa después de 3 h de incubación analizada por citometría de flujo. Aumento de la IFM de la internalización de AuNRs en células HeLa antes y después de la irradiación con láser. Las barras de error representan la desviación estándar entre tres réplicas. En todos los datos, la significación estadística se evaluó mediante la prueba t: cada muestra se comparó con la muestra sin tratamiento (ns, no significativa; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001)..... 115

Figura 25: Esquema representativo de la síntesis de AuNR@ZIF-8..... 116

Figura 26: Imágenes de SEM con detector InLens a 5 kV, representativa de las AuNR@ZIF-8 utilizando diferentes concentraciones de CTAB durante la síntesis: 0,2 g.l<sup>-1</sup>(A), 0,4 g.l<sup>-1</sup>(D); 0,6 g.l<sup>-1</sup> (G) y 0,8 g.l<sup>-1</sup> (H). imágenes de SEM obtenidas con detector As y representaciones correspondientes de los histogramas de frecuencia del tamaño del diámetro medio del círculo que rodea una partícula AuNR@ZIF-8, obtenidos a partir de la medida de 50 AuNR@ZIF-8, utilizando diferentes concentraciones de CTAB: 0,16 g.l<sup>-1</sup> (B,C) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (E,F). ..... 117

Figura 27: Tamaño hidrodinámico promediado en número medido a lo largo de 144 h (escala Log<sub>2</sub>) con DLS de los AuNR@ZIF-8 utilizando diferentes lavados y sintetizados en presencia de 0,2 g.l<sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l<sup>-1</sup>(B) de CTAB. Los lavados marcados (\*) indica que en la siguiente medida los AuNR@ZIF-8 se agregaron..... 118

Figura 28: Imágenes de SEM con detector SE2 a 5 kV, representativas de las AuNR@ZIF-8 redispersados en PSF y lavados con MeOH (A), H<sub>2</sub>O (B) y PSF (C); redispersados en H<sub>2</sub>O y lavados con H<sub>2</sub>O (D) y MeOH (E); lavados y redispersados en MeOH (F). ..... 120

Figura 29: Esquema representativo de la reacción de 20 mmoles de poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido) y 15 mmoles de MeOH dando lugar al PMA, polímero anfifílico formado por un esqueleto hidrofílico (rojo) al que se anclan cadenas hidrofóbicas de MeOH (azul). 121

Figura 30: Esquema representativo de la funcionalización de los AuNR@ZIF-8 con PMA. .... 121

Figura 31: Imágenes de SEM a diferentes magnificaciones representativas de los: AuNR@ZIF-8@PMA tras 144 h dispersos en agua con detectores InLens (A); AsB (B) a 20 kV y detector SE2 a 3 kV (C). Tamaño hidrodinámico en número medio medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8@PMA (D). Potencial zeta tras la funcionalización con

PMA (E). Espectro normalizado de los AuNR@ZIF-8 con el pico del LSPR centrado a 782 nm, y espectro de los AuNR con el LSPR centrado a 768 nm (F). ..... 122

Figura 32: Imagen de TEM representativa de las AuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica N (N = 300) del diámetro de las AuNPs según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs, que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 515$  nm (C). Micrografía SEM representativa de las AuNSs, detector InLens a 3 kV(D). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNSs que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 725$  nm. .... 124

Figura 33: Esquema representativo de la síntesis de AuNS@ZIF-8 ..... 124

Figura 34: Imagen de SEM con detector AsB a 30 kV, representativa de los AuNS@ZIF-8 y las correspondientes representaciones de los histogramas de frecuencia del tamaño del diámetro medio (obtenidos a partir de la medida de 50 AuNS@ZIF-8), calculados mediante la envolvente formada por un círculo que rodea un AuNS@ZIF-8 a diferentes concentraciones de AuNSs: 1 nM (A, B), 2 nM (C, D), 3 nM (E, F), 4 nM (G, H), 5 nM (I, J) y 6 nM (K, L). .. 127

Figura 35: Relación entre el tamaño de los AuNS@ZIF-8 y la concentración de AuNSs utilizadas para sintetizar los NCs. Espectro de absorción UV-Vis de los AuNS@ZIF-8 que muestra su pico de LSPR en torno a  $\lambda = 743$  nm ..... 127

Figura 36: Imagen de SEM a 20 kV, representativa de las AuNS@ZIF-8 con detector SE2 (A) y AsB (B). Estructura del 4-MBA y sus señales Raman más intensas (C). Estructura de RoB y sus señales Raman más intensas (D). ..... 128

Figura 37: Espectros Raman del 4-MBA medido en una dispersión acuosa de NC a 0,1 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M comparado con el espectro del 4-MBA en agua y el tapón de polipropileno sobre el que se realizan las medidas (A). Espectro Raman de la RoB medido en una dispersión acuosa de NC a 0,1 nM y una concentración de RoB de  $10^{-3}$  M comparado con el espectro de la RoB en agua junto con el tapón de sobre el que se realizan las medidas (B). Espectros Raman del 4-MBA medidos en dispersiones acuosa de NC: a 0,1 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M a diferentes números de adquisiciones (C), a diferentes concentraciones de NC y 30 acumulaciones (D). Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia láser de 60 mW y 0,5 s de tiempo de integración. .... 129

Figura 38: Espectros Raman del 4-MBA medidos en dispersiones acuosas de NC a 0,25 nM a diferentes concentraciones de 4-MBA (A) y detalle del espectro de la sonda entre 1040 y 1110  $\text{cm}^{-1}$  (B). Correlación entre la concentración de 4-MBA y la intensidad de la señal Raman a 1074  $\text{cm}^{-1}$ ). Los puntos se ajustaron mediante un análisis de regresión lineal ( $y = 6,2 \times 10^7 x + 98,3$ ,  $r^2 = 0,999$ ) (C). Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia de 60 mW, 10 acumulaciones y 0,5 s de tiempo de integración. .... 132

Figura 39: Evolución de los espectros Raman de 4-MBA en función del tiempo de encapsulación medidos en una dispersión acuosa de NC a 0,25 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M. Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia de 60 mW, 10 acumulaciones y 0,5 s de tiempo de integración. .... 133

Figura 40: Imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de MNPs calentadas a 305 (A), 310 (B) y 315 °C (C), con tamaños medios de  $12,2 \pm 0,9$ ,  $15,5 \pm 1,1$  y

17,8 ± 1,8 nm, respectivamente, y las correspondientes distribuciones del diámetro de, al menos, 300 NPs. ....	138
Figura 41: Curvas de magnetización de una muestra de MNPs medidas a temperatura ambiente antes y después del tratamiento térmico (A). Valores de SAR de las MNPs antes y después de dicho tratamiento (B). ....	140
Figura 42: Imágenes de SEM de las MNPs sin tratar (A) y después del tratamiento térmico (B). Barra de escala de 50 nm. Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS (C). ....	141
Figura 43: Representación del protocolo de funcionalización de las MNPs con PMA (arriba). Representación de la apertura de un anillo anhídrido maleico del PMA por un grupo amino (abajo). ....	142
Figura 44: Curva de calibrado de la intensidad de fluorescencia del 6-AF6 en agua en función de su concentración medido bajo una excitación de 490 nm (A). Intensidad de fluorescencia frente a la inversa del factor de dilución (1/dilución) de diferentes concentraciones de MNPs recubiertas con PMA-6-AF en agua (B). ....	143
Figura 45: Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número, medido con DLS (A) y potencial ζ (B) de las MNPs-PMA-6-AF. ....	144
Figura 46: Evolución de las curvas de histéresis obtenidas mediante magnetometría a temperatura ambiente a diferentes tiempos de recocido de una muestra dopada con un 20 % de Co <sup>2+</sup> respecto al Fe <sup>2+</sup> (A). Curvas de histéresis medidas a diferentes campos magnéticos aplicados (B). ....	145
Figura 47: Curvas de magnetización de una muestra de MNPs dopada con Co (en proporción 0,1) medidas a temperatura ambiente con un magnetómetro a 300 kHz y 24 kA.m <sup>-1</sup> en agua y tolueno. En la tabla se recogen los valores de la magnetización de saturación, coercividad y SAR para cada caso. ....	146
Figura 48: Curvas de magnetización medidas a 300 KHz y 24 kA.m <sup>-1</sup> de muestras de MNPs dopadas con diferentes proporciones de Co normalizado entre 0 y 1 medidas con magnetometría a temperatura ambiente. La tabla recoge medidas de tamaño hidrodinámico promediado en número y medido a partir de la medida de al menos 300 MNPs en imágenes de SEM. ....	147
Figura 49: Curvas de histéresis obtenidas a partir de las medidas de SQUID de las MNPs con diferentes grados de dopaje de Co de 0, 0,03, 0,08, 0,11 y 0,30, donde M se encuentra normalizada entre 1 y -1, a 10 (A) y 295 K (B), y una ampliación de la medida a 295 K entre -0,02 y 0,02 T (C) para facilitar la visualización de la histéresis. La tabla muestra los datos de H <sub>c</sub> y M <sub>r</sub> correspondientes a las diferentes sustituciones de Co en medidas realizadas a 295 K. ....	148
Figura 50: Imagen de TEM de las MNPs utilizadas para las pruebas de transferencia de fase y su correspondiente distribución de tamaños (tamaño medio de 20,7 ± 1,9 nm .....)	149
Figura 51: Tamaño hidrodinámico promediado en número (A) obtenido por DLS, e imagen de STEM (barra de escala 50 nm) de las MNPs-CTAB transferidas a agua (B). ....	151
Figura 52: Esquema representativo de la síntesis de MNP@ZIF-8 y tamaño hidrodinámico promediado en número de los MNP@ZIF8. ....	153

- Figura 53: Imágenes SEM con detectores SE2 (izquierda) y AsB a 20 kV (izquierda) representativas y la correspondiente distribución de tamaño (T) de MNP@ZIF-8 preparados a partir de MNPs a concentraciones de 24 nM (A, B y E) y 12 nM (C, D y F). ..... 154
- Figura 54: MNP@ZIF-8 sintetizados en presencia de diferentes concentraciones de MNPs, 2, 4, 6 y 8 nM (A, C, E y G respectivamente), con sus correspondientes distribuciones de tamaño (B, D, F y H). Relación entre la concentración de MNPs y tamaño final de los MNP@ZIF-8 (I). ..... 157
- Figura 55: Espectros normalizados de absorción UV-Vis (negro) y de fluorescencia (rojo) del CV ..... 158
- Figura 56: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV) recopiladas con detector InLens a 3 kV (A) y detector AsB a 20 kV (B). Distribución en número del diámetro hidrodinámico de las muestras de MNP@ZIF-8(CV) medidos por DLS (C). Espectro UV-Vis de los MNP@ZIF-8, MNP@ZIF-8(CV) y CV (D). Distribución de tamaño de los MNP@ZIF-8 determinados a partir de la medida del diámetro de, al menos 50 NPs en el software ImageJ (medido de vértice a vértice)(E). ..... 160
- Figura 57: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV) redispersadas en agua (A). Correlación entre la concentración de MNP@ZIF-8(CV) determinada por DLS y el factor de dilución. Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 1,82 x - 2,066 x 10^{-4}$ ,  $r^2 = 0,995$ ) (B). ..... 161
- Figura 58: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF recopiladas con un detector InLens a 20 kV (A) y 3 kV (C), y detector AsB a 20 kV (B) e imagen STEM (D). ..... 162
- Figura 59: Viabilidad celular usando el ensayo de resazurina de células HeLa expuestas a concentraciones crecientes de MNP, MNP@ZIF-8 y MNP@ZIF-8(CV) recubiertos con PMA. ..... 164
- Figura 60: Análisis TGA (A) e Isotermas BET (B) de los MNP@ZIF-8. Análisis WAXS MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF medido a una distancia de muestra a detector de 200 mm en comparación con un patrón de referencia de ZIF8 ("FAWCEN") (C). Caracterización FTIR de los MNP@ZIF-8 y CV (D). Cada muestra se corresponde con los siguientes colores: CV (azul), ZIF-8 (negro), MNP@ZIF-8 (violeta), MNP@ZIF-8(CV) (verde), MNP@ZIF-8-PMA-6-AF (amarillo) y MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (rojo). ..... 165
- Figura 61: Distribuciones NTA del diámetro hidrodinámico de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (A) y MNP@ZIF-8-PMA-6-AF (C). Correlación entre la concentración de MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (B) y MNP@ZIF-8-PMA-6-AF determinada por NTA y el factor de dilución. Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 3,63 x + 7,6 x 10^{-5}$ ,  $r^2 = 0,993$ ) (B) y ( $y = 3,03 x + 1,8 x 10^{-4}$ ,  $r^2 = 0,993$ ) (D). ..... 166
- Figura 62: Representación de las diferentes moléculas de PEG utilizadas. COOH-PEG-NH<sub>2</sub> de 5 kDa (A), COOH-PEG-HS de 5 kDa (B) y MeO-PEG-SH de 2 kDa (C). ..... 169
- Figura 63: Caracterización de PdNPs: Imagen SEM representativa recogida con detector InLens a 3 kV (A). Distribución de tamaño determinada a partir de la medida del lado de al menos 300 NC con el software ImageJ (medida de vértice a vértice). Imagen TEM de PdNCs (C). Distribuciones promediadas en número del diámetro hidrodinámico de las muestras obtenidas por DLS (D). Imagen TEM de alta resolución (HRTEM) de un PdNC. Detalle de la imagen HRTEM con la medida de un plano cristalográfico expuesto (F). ..... 171

Figura 64: Caracterización de PdND: Imágenes SEM representativas de PdND1s (A) y PdND2s (E). Imágenes TEM representativas de PdND1s (B) y PdND2 (F). Distribución de tamaño determinada a partir de la medida en imágenes de TEM del diámetro de al menos 100 PdNDs con el software ImageJ de los PdND1s (C) y PdND2s (G). Distribuciones promediadas en número del diámetro hidrodinámico obtenidas por DLS de los PdND1 (D) y PdND2 (H). .....	173
Figura 65: Distribuciones promediadas en número del tamaño hidrodinámico medidas por DLS de los PdNC con diferentes recubrimientos (A). Potenciales $\zeta$ de los PdNC con diferentes recubrimientos (B). .....	175
Figura 66: Representación de una molécula de PEI. .....	175
Figura 67: Representación de la reacción de reducción del AM a leucometileno. La forma oxidada presenta coloración azul, mientras que la reducida es incolora. .....	176
Figura 68: Representación de la absorbancia a 664 nm frente al tiempo para igual masa de Pd de las PdNCs (A), PdNCs@PEG (B), PdNCs@MC (C) y PdNDs (D). $A_0$ es la absorción a 664 nm en el tiempo 0 s. .....	179
Figura 69: Ajuste cinético (primer orden) de las PdNCs (A), PdNCs@PEG (B), PdNCs@MC (C) y PdNDs (D). .....	179
Figura 70: Representación de la síntesis de los PdNC@ZIF-8. .....	182
Figura 71: Caracterización de PdNC@ZIF-8. Imágenes representativas de SEM con detectores SE2 a 3 kV (A) y AsB a 30 kV (B) e imagen de TEM (C). Distribución de tamaño determinada (tamaño medio = $149 \pm 19$ nm) a partir de la medida de imágenes de TEM, midiendo el lado de al menos 50 PdNC@ZIF-8 con el software ImageJ (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número de la muestra realizada con DLS, $d_h = 232 \pm 3$ nm y PDI=0,02 (D). .....	183
Figura 72: Imágenes de SEM representativas de PdNC@ZIF-8 utilizando diferentes condiciones sintéticas. 0,4 mg.l <sup>-1</sup> de CTAB con diferentes tiempos de síntesis: 30 (A), 60 (B), 90 (C), 180 (D) y 360 min (E). 60 min de tiempo de síntesis a diferentes concentraciones de CTAB: 0,4 (F), 0,5 (G), 0,6 (H), y 0,7 mg.l <sup>-1</sup> (I). Refrigerando la muestra con CTAB 0,4 mg.l <sup>-1</sup> y 60 min de tiempo de síntesis (J). .....	184
Figura 73: Relación entre el tamaño de los NC con el tiempo (A) y con la concentración de CTAB (B) .....	186
Figura 74: Ciclo de histéresis de las MNPs y los NC recubiertos con PMA medido con magnetómetro de muestra vibrante (A). Áreas correspondientes a los valores SAR de las MNP-6-AF obtenidas mediante medidas calorimétricas usando una frecuencia de 90 kHz (B). ....	197
Figura 75: Cinética de captación de los MNP@ZIF-8-PMA-AF a través de la cuantificación de la fluorescencia de CV en células MiaPaCa-2 (A). Viabilidad celular en MiaPaCa-2 incubadas con diferentes concentraciones de MNP@ZIF-8-PMA-AF a 24, 48 y 72 h. .....	198
Figura 76: Proliferación celular mediante el recuento de células después de la exposición a AFM (A) y RMF (B) durante 7 días. Comparativa de la proliferación celular a los 7 días (C). .....	199



**LISTA DE TABLAS**

Tabla 1: Ejemplos de técnicas que se emplean en la caracterización de las NPs y los parámetros obtenidos con cada técnica. ....	62
Tabla 2: Ejemplos de algunos de los MOFs más utilizados con sus correspondientes centros metálicos, ligandos y topología. ....	70
Tabla 3: Tamaño de las MNPs en función de la temperatura final de la reacción. ....	86
Tabla 4: Diferentes combinaciones de agentes dispersantes probados para el lavado de los NC.....	88
Tabla 5: Parámetros termodinámicos de la interacción entre BSA-AuNR PEGilados a 25 °C calculados a partir del ajuste de los datos de calorimetría de valorización isotérmica utilizando un modelo basado en un único conjunto de sitios de unión de proteínas idénticos. ....	114
Tabla 6: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con diferentes fases dispersantes y redispersados en H <sub>2</sub> O, sintetizados con 0,2 g.l <sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l <sup>-1</sup> (B) de CTAB.....	119
Tabla 7: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con diferentes fases dispersantes y redispersados en PSF, sintetizados con 0,2 g.l <sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l <sup>-1</sup> (B) de CTAB. ....	119
Tabla 8: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con MeOH y redispersados en MeOH, sintetizados con 0,2 g.l <sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l <sup>-1</sup> (B) de CTAB. ....	119
Tabla 9: Tamaño hidrodinámico en número medio obtenido por DLS y tamaño obtenido a partir de las imágenes de SEM, respectivamente, de los AuNS@ZIF-8 utilizando diferentes concentraciones de AuNSs en su síntesis.....	127
Tabla 10: Fluorescencia medida de diferentes concentraciones de MNPs-PMA-6-AF y la relación calculada de moléculas de 6-AF.MNP <sup>-1</sup> . ....	143
Tabla 11: Relación máxima de moléculas de 6-AF por cada MNP. ....	143
Tabla 12: Correspondencia de los moles de Co (x) añadidos con relación a los de Fe y los moles de Co determinados por ICP. ....	145
Tabla 13: Tamaño hidrodinámico promediado en número de las MNPs transferidas a agua mediante recubrimiento con CTAB siguiendo diferentes condiciones del protocolo 1.....	150
Tabla 14: Tamaño hidrodinámico en número medio de las MNPs transferidas a agua medido con DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 2, precipitados a 15000 rcf. ....	150
Tabla 15: Tamaño hidrodinámico promediado en número de las MNPs transferidas a agua medido obtenido mediante DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 2, precipitados a 20000 rcf.....	150
Tabla 16: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido por DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 3. ....	151

Tabla 17: Concentración de CV encapsulado en MNP@ZIF-8.....	158
Tabla 18: Diámetros hidrodinámicos promediados en número (valor medio numérico $\pm$ SD) obtenidos a partir de medidas de DLS de los MNP@ZIF-8(CV) con y sin PMA en diferentes medios (agua, tampón de solución salina de fosfato, medio celular DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), PSF) y NC en agua. ....	163
Tabla 19: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido con DLS de los PdNC funcionalizados a una densidad de 100 monómeros/nm <sup>2</sup> con diferentes PEG. ....	174
Tabla 20: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido con DLS y potencial $\zeta$ de los PdNC sin funcionalizar y funcionalizados con HS-PEG-COOH y MC. ....	174
Tabla 21: Cantidad de Pd en moles añadido para cada sistema. ....	177
Tabla 22: Comparación de los nanocatalizadores de PdNC y PdND en la reducción de MB usando NaBH <sub>4</sub> con otros nanocatalizadores. ....	178
Tabla 23: Valores de la constante de reacción para cada sistema. ....	180
Tabla 24: Valores de la k normalizados en función de los moles de Pd ( $k_{norm}=K/moles_{Pd}$ ) ..... .....	181
Tabla 25: Tamaño hidrodinámico de los PdNC@ZIF-8 promediado en número variando las condiciones de síntesis. Todas ellas se llevan a cabo a temperatura ambiente a excepción de la indicada, que se sintetiza a 4°C. ....	185



## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

<b>4-MBA</b>	ácido 4-mercaptobenzoico
<b>6-AF</b>	6-aminofluoresceína
<b>AA</b>	Ácido ascórbico
<b>AM</b>	Azul de metileno
<b>AMF</b>	Campo magnético alterno
<b>AO</b>	Ácido oléico
<b>AuNP</b>	Nanoesfera de oro
<b>AuNR</b>	nanovarilla de oro
<b>AuNS</b>	Nanoestrella de oro
<b>BSA</b>	albúmina de suero bovino
<b>COOH-PEG-NH<sub>2</sub></b>	carboxi-PEG-amina
<b>CTAB</b>	bromuro de cetiltrimetilamonio
<b>CV</b>	Violeta de cresilo
<b>DDA</b>	Dodecilamina
<b>DEG</b>	Dietilenglicol
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>HAuCl<sub>4</sub></b>	ácido tetracloroáurico (III)
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente
<b>LSPR</b>	resonancia de plasmón superficial localizado
<b>MC</b>	Mucina
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MeO-PEG-SH</b>	mercaptopolietilenglicol monometilo

## LISTA DE ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

<b>MI</b>	2-metilimidazol
<b>NC</b>	Nanocompuesto
<b>NIR</b>	Infrarrojo cercano
<b>NM</b>	Nanomaterial
<b>NP</b>	Nanopartícula
<b>ODE</b>	1-octadeceno
<b>OLAM</b>	Oleilamina
<b>PBS</b>	Tampón fosfato alcalino
<b>PdNC</b>	Nanocubo de paladio
<b>PdND</b>	Nanodendrita de paladio
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEI</b>	polietilenimina
<b>PMA</b>	poli (isobutileno-alt-anhídrido maleico) -dodecilo
<b>PSF</b>	fluido simulador fagolisosomal
<b>PSS</b>	poliestireno sulfonato de sodio
<b>PVP</b>	polivinilpirrolidona
<b>RCF</b>	Fuerza Centrífuga Relativa
<b>RMF</b>	Campo rotativo magnético
<b>RoB</b>	Rodamina B
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAR</b>	Tasa de absorción específica
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía ultravioleta visible



## LISTA DE PUBLICACIONES

**Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:**

1. Ahmed Abdelhamid, **Aitor Álvarez**, Loubna Laib, Pascal Clerc, Manuel Ceballos, Corinne Bousquet, Beatriz Pelaz, Pablo del Pino, Julian Carrey, Véronique Gigoux. Magnetic field-induced drug release from magnetic nanoparticles@metal-organic frameworks nanocomposites through heating or mechanical stress (in preparatio).

A continuación, se indica la principal contribución del autor de la tesis a este estudio:

Experimental: Síntesis, funcionalización y caracterización de las MNP y MNP@ZIF-8.

Nota: Esta publicación se emplea en el capítulo 4. La caracterización magnética y experimentos en células fueron llevados a cabo por colaboradores (INSA-Toulouse)

2. Ester Polo, Vida Araban, Beatriz Pelaz, **Aitor Alvarez**, Pablo Taboada, Morteza Mahmoudi, Pablo del Pino. Photothermal effects on protein adsorption dynamics of PEGylated gold nanorods. Applied Materials Today, Volume 15, Pages 599-604 (2019).

A continuación, se indica la principal contribución del autor de la tesis a este estudio:

Experimental: Síntesis, funcionalización y caracterización de los AuNRs.

Nota: Esta publicación se emplea en el capítulo 3 (apartado 3.3.1).

**Nota: la primera publicación** (Magnetic field-induced drug release from magnetic nanoparticles@metal-organic frameworks nanocomposites through heating or mechanical stress ) **está en proceso de escritura.**



## AGRADECIMIENTOS

Primero y ante todo, quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, los Drs. Pablo del Pino y Pablo Taboada. Su orientación, ayuda, correcciones y apoyo han sido invaluable en cada paso de este largo camino.

Me gustaría agradecer de manera especial a las Dras. Beatriz Pélaz y Ester Polo por su invaluable apoyo, sus conocimientos, dedicación y compromiso, los cuales fueron fundamentales para el logro de este trabajo.

A las Dras. Lorena y Sara, del INL, les agradezco profundamente por brindarme la oportunidad de integrarme a su grupo durante mi estancia doctoral. Valoraré siempre el trato amable que me ofrecieron y los conocimientos que adquirí a lo largo de ese periodo.

Agradezco sinceramente a todos los técnicos de la Unidad de Microscopía, Rayos X, IR-Raman y RMN de RIAIDT por realizar las diversas mediciones, que han sido esenciales para la elaboración de esta tesis.

Quiero expresar un reconocimiento especial al personal del CIQUS: conserjes, técnicos, equipo de limpieza e informático, quienes consistentemente facilitaron mi día a día, mostrando casi siempre la mejor de las actitudes.

A todos mis colegas con los que compartí laboratorio tanto en el Ciqus como en el INL, gracias por su compañerismo, inspiración y momentos de diversión en medio del arduo trabajo. Sus ideas y entusiasmo han enriquecido mi experiencia de aprendizaje y han hecho de este viaje una experiencia verdaderamente memorable.

Mi más profundo agradecimiento a mis padres por su apoyo inquebrantable en cada etapa de mi vida, especialmente durante este desafío académico. A Montse, te agradezco por estar siempre presente, por tu comprensión, paciencia y amor incesante. A mi hermano y a Teresa, a quienes agradezco por brindarme esa motivación final con la llegada de mi sobrino Nico. Mi reconocimiento también se extiende a mis abuelas, tíos, primos y al resto de la familia, de la cual me siento enormemente orgulloso.

Finalmente, a todas las personas que han hecho posible esta tesis, a aquellos que han contribuido de forma visible y a aquellos que han trabajado entre bastidores, les agradezco desde lo más profundo de mi corazón. Este logro es tan mío como suyo.



## RESUMEN

Las NPs, debido a su dimensión, forma y composición, manifiestan una serie de propiedades idiosincrásicas que no se observan en moléculas individuales ni en materiales macroscópicos. Estas particularidades abarcan comportamientos mecánicos, térmicos, magnéticos, electrónicos, ópticos y catalíticos específicos. En el proceso de miniaturización de las NPs a una escala nanométrica, se observa un incremento en la relación superficie-volumen, induciendo transformaciones significativas en sus estructuras atómicas y en sus propiedades fisicoquímicas comparadas con las correspondientes a los materiales macroscópicos. Adicionalmente, la morfología de las NPs juega un rol determinante en sus propiedades, tales como la anisotropía en las propiedades ópticas, magnéticas y catalíticas. Todas estas características posicionan a las NPs como actores potenciales en disciplinas como la biomedicina, la electrónica y la catálisis.

Es relevante considerar, sin embargo, las cuestiones emergentes relacionadas con la toxicidad y la seguridad de las NPs, que pueden verse influidas por aspectos como el tamaño, la forma, la composición química, la carga superficial, la actividad catalítica, la dosis y la superficie de las partículas. Adicionalmente, otro desafío inherente a estas es su tendencia a la agregación, la cual puede resultar en la pérdida progresiva de sus propiedades. Específicamente en el contexto biológico, es necesario tener en cuenta fenómenos como la formación de una corona proteica alrededor de las NPs, que puede modificar su interacción con barreras biológicas y células. Se recurre a menudo a ligandos, como el PEG, para estabilizar las NPs y reducir la adsorción inespecífica de proteínas.

Una estrategia alternativa para la estabilización de las NPs y la prevención de su agregación consiste en la funcionalización de estas, particularmente a través de su encapsulación en MOFs como el ZIF-8. Los MOFs son materiales porosos que se componen de iones metálicos o conglomerados de metales unidos a moléculas orgánicas, conformando estructuras tridimensionales. La alta porosidad y diversidad química de los MOFs son sus atributos más destacables.

Entre las aplicaciones potenciales de las NPs, su uso como vehículos para la administración de fármacos es una innovación relevante en la farmacología. La encapsulación de agentes farmacológicos en nanocompuestos, derivados de la combinación de NPs plasmónicas y ZIF-8, permite la liberación controlada de estos compuestos en objetivos terapéuticos específicos mediante la activación con un láser NIR. No obstante, la limitada capacidad de penetración de la luz en los tejidos es un obstáculo de estos sistemas, el cual puede ser superado mediante el uso de MNPs que generan calor en respuesta a campos magnéticos alternos o rotatorios.

Una bioaplicación adicional es el empleo de PdNPs en química bioortogonal para promover la conversión localizada de moléculas terapéuticamente inactivas (profármacos) en agentes citotóxicos, en el interior de células. Este procedimiento requiere la funcionalización con agentes biocompatibles que estabilicen y protejan estas nanopartículas en medios biológicos.

Esta tesis doctoral se enfoca en la síntesis, caracterización, funcionalización y aplicaciones de distintos tipos de NPs.

En el tercer capítulo, se analizan diversos aspectos cruciales de las NPs plasmónicas que se organizan en dos subsecciones: i) la síntesis, funcionalización y el impacto de la co-exposición de NPs plasmónicas en su degradación, ii) el influjo de la funcionalización de las

AuNRs con PEG en la dinámica de las proteínas en la biocorona, y la encapsulación de las AuNRs y AuNSs en ZIF-8 para su empleo en aplicaciones como sustratos SERS.

En un análisis más detallado, en la primera subsección se sintetizaron AuNPs, AgNPs y CuNPs, estables en  $\text{CHCl}_3$ , de aproximadamente 15 nm de diámetro y se transfirieron a agua mediante un recubrimiento con PMA. Se investigó la estabilidad y degradación de las NPs, tanto individualmente como en combinaciones, así como su potencial citotoxicidad. A través de la espectroscopía UV-Vis y las mediciones de concentración mediante ICP, se encontró que las AuNPs y AgNPs preservan su estabilidad a 37 °C en agua durante, al menos, 72 horas, mientras que las CuNPs mostraron indicios de degradación, reflejados en un desplazamiento al rojo del LSPR y un incremento del  $\text{Cu}^{2+}$  disuelto en dispersiones de CuNPs, a medida que discurría el tiempo. Las dispersiones de AuNPs-AgNPs combinadas demostraron estabilidad. No obstante, las mezclas que incluían CuNPs (AuNPs-CuNPs, AgNPs-CuNPs, AuNPs-AgNPs-CuNPs) evidenciaron la degradación de las CuNPs, similar al comportamiento de las CuNPs individuales. Dicha degradación fue más notable durante las primeras horas y luego se estabilizó.

Por medio del ensayo de viabilidad con resazurina, se estudió la citotoxicidad de las NPs y sus combinaciones en los cultivos celulares A549. Las NPs de Au y Ag manifestaron una toxicidad baja, manteniendo alta la viabilidad celular en todas las concentraciones analizadas. Sin embargo, las CuNPs mostraron una disminución en la viabilidad celular a la concentración más alta de 5 nM, probablemente a causa de la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  tóxicos. Con respecto a las combinaciones de NPs, se detectó una leve reducción en la viabilidad celular a 5 nM para las combinaciones AgNPs-CuNPs y AuNPs-AgNPs-CuNPs, lo que podría indicar un efecto sinérgico de las AgNPs en el aumento de la toxicidad de las CuNPs.

Estos descubrimientos iniciales sugieren la necesidad de realizar investigaciones más profundas para entender mejor la interacción entre distintas NPs, su degradación y la citotoxicidad resultante. Este estudio podría expandirse para incluir diferentes tipos de cultivos celulares y una gama más extensa de concentraciones de NPs, proporcionando una perspectiva más detallada del impacto de la co-exposición a distintas NPs.

En el siguiente subapartado, describe la síntesis de AuNRs que fueron posteriormente sometidos a un proceso de PEGilación para manipular su carga superficial. Las cargas superficiales fueron modificadas a positivas, negativas o neutras utilizando diferentes PEGs tiolados. Nuestra caracterización detallada de las partículas resultantes indicó que tales modificaciones no provocaron alteraciones significativas en la LSPR.

Los AuNRs funcionalizados se emplearon para investigar las interacciones con la BSA como un modelo de biocorona protéica. Encontramos que la magnitud de la interacción y la constante de disociación eran dependientes de la carga superficial de las NPs. Además, se investigó la internalización de las AuNRs en células HeLa, y se evaluó cómo la formación de biocorona y el tratamiento fototérmico influían en este proceso. Aunque la PEGilación y la formación de la corona de proteínas atenuaban la internalización celular, la adsorción de BSA disminuía notablemente después del tratamiento fototérmico, especialmente en las muestras con carga positiva. Sin embargo, la internalización de las AuNRs tras este tratamiento sólo disminuyó significativamente en las muestras no PEGiladas, lo que sugiere que las cargas superficiales no influyeron de manera notable en la captación celular.

Seguidamente, se procedió con el encapsulamiento de AuNRs en ZIF-8, generando así un nanocompuesto de estructura núcleo-caparazón. Los AuNRs se estabilizaron con CTAB, y se estudió el impacto del empleo de diferentes concentraciones de CTAB durante la síntesis en la morfología de los NCs, comprobando que el tamaño de los NCs disminuyó al aumentar la concentración de CTAB. Los tamaños promedio de los NCs se obtuvieron utilizando el software ImageJ, dando como resultado, por ejemplo,  $169 \pm 13$  nm y  $160 \pm 8$  nm para las concentraciones de 0,2 y 0,4 g.l<sup>-1</sup> de CTAB, respectivamente.

Asimismo, se evaluó la estabilidad de los NCs en varios medios, utilizando DLS para rastrear las variaciones de tamaño hidrodinámico en el tiempo. Observamos que los NCs de AuNR@ZIF-8 redispersados en agua presentaban una disminución significativa de tamaño. Se encontraron resultados similares para los NCs redispersados en PSF. Para proteger los NCs de la degradación en medios acuosos, se recubrieron con PMA. Tras el procedimiento de recubrimiento, los NCs conservaron su morfología y el análisis de DLS indicó que eran estables en agua.

Finalmente, se abordó la síntesis y la aplicación de NCs basados en AuNSs y ZIF-8 como sustratos para SERS. Este enfoque capitalizó la sinergia entre las características distintivas de los AuNSs y el ZIF-8, en particular, las propiedades plasmónicas de los AuNSs y la porosidad junto con la amplia superficie de la ZIF-8.

Para los ensayos de SERS, se eligieron dos compuestos, 4-MBA y RoB. Las pruebas iniciales sugieren que las moléculas pueden difundirse a través de los poros del ZIF-8 hasta alcanzar las AuNSs alojadas en el núcleo del nanocompuesto, permitiendo así la detección de estas moléculas mediante SERS. Se observó una relación lineal entre la intensidad del pico Raman a 1074 cm<sup>-1</sup> y la concentración de 4-MBA en el rango de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-5</sup> M, lo que sugiere la aplicabilidad de este sistema para la cuantificación de analitos.

El capítulo 4 se divide en dos subapartados, i) la síntesis, funcionalización y caracterización de las MNPs, estudió la influencia del dopaje con Co sobre las propiedades magnéticas de las MNPs y el proceso de transferencia a un medio acuoso y ii) la elaboración de nanocompuestos estables.

En el primer subapartado, se describe el proceso de síntesis de las MNPs mediante un método de descomposición térmica de un precursor metálico. Con este método se obtuvieron MNPs esféricas de diferentes tamaños y baja polidispersidad. Se encontró que estas MNPs exhibían propiedades magnéticas, insuficientes para generar calor, que fueron mejoradas al someter a las MNPs a un proceso de recocido.

A continuación, se aborda la funcionalización y estabilidad de las MNPs en un medio acuoso utilizando PMA. Las MNPs fueron recubiertas con PMA para mejorar su estabilidad en soluciones acuosas y permitir su funcionalización con moléculas que presenten un grupo amino terminal. Un ejemplo de dicha funcionalización implicó el uso de 6-AF. Sin embargo, solo una pequeña fracción de la cantidad total de 6-AF añadida se adhirió a las MNPs, probablemente debido al exceso de PMA que se eliminó durante el lavado posterior al recubrimiento polimérico.

Se examinó la influencia del dopado con Co en las propiedades magnéticas de las MNPs. Se sintetizaron MNPs-Co reemplazando parcialmente los iones Fe<sup>2+</sup> en las posiciones octaédricas de la estructura de la magnetita con iones Co<sup>2+</sup> en varias proporciones. Las MNPs se transfirieron a agua mediante un recubrimiento con PMA y se caracterizaron las propiedades magnéticas por medio del SQUID. Las mediciones realizadas a diferentes temperaturas

mostraron que la concentración de Co tuvo un impacto significativo en las propiedades magnéticas de las MNPs. A una temperatura de 10 K, las MNPs con mayor concentración de Co presentan una mayor magnetización remanente. A 295 K, se observó un comportamiento inusual en las propiedades magnéticas de las nanopartículas dopadas con cobalto. A medida que aumentaba la concentración de dopado de  $\text{Co}^{2+}$ , se produjo una transición de una anisotropía magnética negativa a una positiva. Además, las nanopartículas dopadas con un 0,08 de Co mostraron un comportamiento superparamagnético. Estos hallazgos indican la complejidad de las interacciones magnéticas en los materiales dopados

Se estudió la transferencia de MNPs a medios acuosos mediante la utilización de CTAB. Las MNPs recubiertas de AO fueron transferidas a un medio acuoso empleando un protocolo basado en la formación de una bicapa AO-CTAB. A través de las mediciones de tamaño hidrodinámico usando DLS, se buscó un procedimiento eficiente para transferir MNPs al medio acuoso minimizando la agregación.

Posteriormente, con las MNPs estabilizadas en agua, se sintetizaron nanocompuestos de MNP recubierto con ZIF-8, con el objetivo final de diseñar un sistema capaz de lograr la liberación controlada de moléculas en el interior de las células mediante estímulos externos como AMF o RMF. La eficiencia de encapsulamiento de MNPs y el control sobre su tamaño se demostraron mediante la medición de los tamaños hidrodinámicos y la caracterización morfológica a través de SEM. Los resultados revelaron que al aumentar la concentración de MNPs en la síntesis, disminuyó el tamaño de los nanocompuestos de ZIF-8, lo que sugiere una alta eficiencia de encapsulamiento y un cierto grado de control sobre su tamaño.

Se estudió la encapsulación de CV en MNPs recubiertas de MNP@ZIF-8 para su aplicación en la entrega controlada de medicamentos. Los resultados mostraron que la encapsulación del CV no afectó la morfología, tamaño, o radio hidrodinámico de los NCs.

Para evitar la degradación de ZIF-8 en medios acuosos y asegurar la estabilidad de los MNP@ZIF-8(CV), se llevó a cabo un recubrimiento con PMA, lo que permitió la estabilidad coloidal en medios acuosos. La evaluación de la estabilidad térmica y la porosidad de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF mediante análisis termogravimétrico y BET, respectivamente, indicó una buena estabilidad térmica hasta 400°C y confirmó la microporosidad de los NCs.

Además, se empleó WAXS para evaluar la cristalinidad de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF, los resultados confirmaron la alta cristalinidad y que la funcionalización con PMA no afectó la estructura cristalina de los MNP@ZIF-8.

El capítulo 5 abarca la síntesis y caracterización y funcionalización de PdNPs, el estudio de su eficiencia como catalizadores y el encapsulado en ZIF-8.

En primer lugar, se sintetizaron y caracterizaron PdNCs y PdNDs debido a su desempeño catalítico prometedor debido a su tamaño y forma. Las PdNDs, por su morfología amorfa, presentan una mayor superficie específica, lo que se debería traducir en mejores propiedades catalíticas.

Las PdNCs estabilizadas en agua mediante CTAB presentan citotoxicidad por lo que se estudió la posibilidad de reemplazar el CTAB por moléculas no citotóxicas que pudiesen estabilizar las NPs en medios acuosos. Se investigó la estabilización de las PdNPs con PEG y MC, y se examinó el impacto de estos recubrimientos en las propiedades catalíticas de las NPs. Se utilizaron PEG y MC. Se utilizaron tres tipos de PEG, el metoxi-polietilenglicol-tiol (MeO-PEG-SH) que se une a la superficie del Pd a través del grupo tiol, estabilizando las nanopartículas por impedimento estérico. El carboxi-polietilenglicol-tiol (COOH-PEG-HS) y

el carboxi-poli(etilenglicol)-amino (COOH-PEG-NH<sub>2</sub>) que también se unen mediante sus grupos tiol y amino respectivamente, con la estabilización lograda a través de la repulsión electrostática y el impedimento estérico. La interacción entre las NPs y las MCs se produce principalmente a través de interacciones hidrofóbicas, la adsorción de diferentes aminoácidos a la superficie de las NPs, y enlaces S-Pd con el aminoácido cisteína.

Las mediciones del tamaño hidrodinámico de las PdNCs funcionalizadas mostraron que COOH-PEG-HS era más estable que NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, que mostraron un considerable aumento en el tamaño hidrodinámico después de 24 horas. Esto puede deberse a la debilidad del enlace entre el grupo amino y el Pd en comparación con el enlace formado por el grupo tiol y el Pd. En el caso de las PdNDs, no fue posible la funcionalización siguiendo el mismo protocolo. Estas PdNDs se estabilizan con PEI, la estructura altamente ramificada de este polímero, junto con su abundancia de grupos amino, proporciona múltiples puntos de anclaje en la superficie de Pd, lo cual dificulta el reemplazo de PEI por otro polímero.

Para estudiar las propiedades catalíticas de las PdNPs funcionalizadas, se utilizó la reducción del AM con NaBH<sub>4</sub> en agua como reacción modelo. La evaluación se realizó mediante espectroscopía UV-Vis, siguiendo la progresiva decoloración de la solución. Se recurrió al modelo de Langmuir-Hinshelwood para describir la cinética de la reacción, postulando que los reactivos se adsorben primero en la superficie del catalizador antes de reaccionar. La *k* para cada sistema catalítico basado en Pd se determinó considerando una cinética de primer orden. Los resultados revelaron que los sistemas evaluados presentaban valores de *k* superiores a los reportados en la literatura para la reducción del AM con catalizadores basados en NPs de Pd. Se encontró que los sistemas que utilizan PdNC y PdNCs@PEG presentaron las mejores constantes cinéticas. En contraposición, se observó que la funcionalización con PEG o MC no disminuyó significativamente la constante cinética. También se investigó la reutilización de los sistemas catalíticos a través de tres reacciones consecutivas, aunque no fue eficiente para todos los sistemas, el sistema con MC mostró los resultados más favorables.

Finalmente, se examinó el encapsulamiento de PdNC en corazas de ZIF-8 de distintos grosores como estrategia para lograr la estabilización de los PdNC en entornos fisiológicos. Además de proporcionar protección a las NPs, el ZIF-8 permite el flujo controlado de los reactivos hacia el núcleo catalizador del nanocompuesto debido a sus propiedades porosas. Se estudiaron diversas variables en la síntesis de los NCs, como la concentración de CTAB, el tiempo de síntesis y la temperatura, en el efecto en el tamaño final de los nanocompuestos. Se observó que el tiempo de exposición afectó el tamaño de los nanocompuestos, aunque no su forma. A medida que se aumentaba el tiempo de síntesis, el tamaño de los nanocompuestos también aumentaba hasta alcanzar un tamaño estable después de 3 horas. Además, se encontró que la concentración de CTAB influía en el tamaño de los nanocompuestos, con un tamaño menor a medida que se aumentaba la concentración de CTAB. La temperatura también tuvo un efecto en el tamaño de los nanocompuestos, con un tamaño más pequeño cuando la síntesis se realizaba a bajas temperaturas. En general, se observó una relación exponencial entre el diámetro hidrodinámico y el tiempo de síntesis, así como una relación lineal entre el diámetro hidrodinámico y la concentración de CTAB. La reducción en el tamaño de los nanocompuestos a medida que se aumentaba la concentración de CTAB se atribuyó al efecto de las moléculas de CTAB en la cinética de crecimiento del ZIF-8.



## RESUMO

As NPs, debido á súa dimensión, forma e composición, manifestan un conxunto de propiedades idiosincrásicas que non se observan en moléculas individuais nin en materiais macroscópicos. Estas peculiaridades abranguen comportamentos mecánicos, térmicos, magnéticos, electrónicos, ópticos e catalíticos específicos. No proceso de miniaturización das NPs a unha escala nanométrica, obsérvase un incremento na relación superficie-volume, inducendo transformacións significativas nas súas estruturas atómicas e nas súas propiedades fisicoquímicas en comparación cos materiais macroscópicos correspondentes. Adicionalmente, a morfoloxía das NPs xoga un papel determinante nas súas propiedades, tales como a anisotropía nas propiedades ópticas, magnéticas e catalíticas. Todas estas características posicionan ás NPs como actores potenciais en disciplinas como a biomedicina, a electrónica e a catálise.

É relevante considerar, sen embargo, as cuestións emerxentes relacionadas coa toxicidade e a seguridade das NPs, que poden verse influídas por aspectos como o tamaño, a forma, a composición química, a carga superficial, a actividade catalítica, a dose e a superficie das partículas. Adicionalmente, outro desafío inherente a estas é a súa tendencia á agregación, a cal pode resultar na perda progresiva das súas propiedades. Especificamente no contexto biolóxico, é necesario ter en conta fenómenos como a formación dunha coroa proteica ao redor das NPs, que pode modificar a súa interacción con barreiras biolóxicas e células. Recórrese ás veces a ligandos, como o PEG, para estabilizar as NPs e reducir a adsorción inespecífica de proteínas.

Unha estratexia alternativa para a estabilización das NPs e a prevención da súa agregación consiste na funcionalización destas, particularmente a través da súa encapsulación en MOFs como o ZIF-8. Os MOFs son materiais porosos que se compoñen de iones metálicos ou conxuntos de metais unidos a moléculas orgánicas, conformando estruturas tridimensionais. A alta porosidade e diversidade química dos MOFs son os seus atributos máis destacables.

Entre as aplicacións potenciais das NPs, o seu uso como vehículos para a administración de fármacos é unha innovación relevante na farmacoloxía. A encapsulación de axentes farmacolóxicos en nanocompostos, derivados da combinación de NPs plasmónicas e ZIF-8, permite a liberación controlada destes compostos en obxectivos terapéuticos específicos mediante a activación cun láser NIR. Non obstante, a capacidade limitada de penetración da luz nos tecidos é un obstáculo destes sistemas, o cal pode ser superado mediante o uso de MNPs que xeran calor en resposta a campos magnéticos alternos ou rotatorios.

Unha bioaplicación adicional é o emprego de PdNPs en química bioortogonal para promover a conversión localizada de moléculas terapéuticamente inactivas (profármacos) en axentes citotóxicos, no interior de células. Este procedemento require a funcionalización con axentes biocompatibles que estabilicen e protexan estas nanopartículas en medios biolóxicos.

Esta tese de doutoramento enfócase na síntese, caracterización, funcionalización e aplicacións de distintos tipos de NPs.

No terceiro capítulo, analízanse diversos aspectos cruciais das NPs plasmónicas que se organizan en dúas subseccións: i) a síntese, funcionalización e o impacto da co-exposición de NPs plasmónicas na súa degradación, ii) a influencia da funcionalización das AuNRs con PEG na dinámica das proteínas na biocorona, e a encapsulación das AuNRs e AuNSs en ZIF-8 para o seu uso en aplicacións como substratos SERS.

Nunha análise máis detallada, na primeira subsección sintetizáronse AuNPs, AgNPs e CuNPs estables en  $\text{CHCl}_3$ , de aproximadamente 15 nm de diámetro, e transfíronse a auga mediante un revestimento con PMA. Investigouse a estabilidade e degradación das NPs, tanto individualmente como en combinacións, así como a súa potencial citotoxicidade. A través da espectroscopía UV-Vis e das medicións de concentración mediante ICP, atopouse que as AuNPs e AgNPs preservan a súa estabilidade a 37 °C en auga durante, polo menos, 72 horas, mentres que as CuNPs mostraron indicios de degradación, reflectidos nun desprazamento ao vermello do LSPR e un aumento do  $\text{Cu}^{2+}$  disolto en dispersións de CuNPs, á medida que transcorría o tempo. As dispersións de AuNPs-AgNPs combinadas demostraron estabilidade. Non obstante, as mesturas que incluían CuNPs (AuNPs-CuNPs, AgNPs-CuNPs, AuNPs-AgNPs-CuNPs) evidenciaron a degradación das CuNPs, similar ao comportamento das CuNPs individuais. Dita degradación foi máis notable durante as primeiras horas e logo estabilizouse.

A través da proba de viabilidade con resazurina, estudouse a citotoxicidade das NPs e as súas combinacións nos cultivos celulares A549. As NPs de Au e Ag manifestaron unha toxicidade baixa, mantendo alta a viabilidade celular en todas as concentracións analizadas. Non obstante, as CuNPs mostraron unha diminución na viabilidade celular á concentración máis alta de 5 nM, probablemente debido á liberación de íons  $\text{Cu}^{2+}$  tóxicos. Con respecto ás combinacións de NPs, detectouse unha leve redución na viabilidade celular a 5 nM para as combinacións AgNPs-CuNPs e AuNPs-AgNPs-CuNPs, o que podería indicar un efecto sinérgico das AgNPs no aumento da toxicidade das CuNPs.

Estes descubrimentos iniciais suxiren a necesidade de realizar investigacións máis profundas para entender mellor a interacción entre diferentes NPs, a súa degradación e a citotoxicidade resultante. Este estudo podería expandirse para incluír diferentes tipos de cultivos celulares e unha gama máis extensa de concentracións de NPs, proporcionando unha perspectiva máis detallada do impacto da co-exposición a diferentes NPs.

Na seguinte subsección, descríbese a síntese de AuNRs que posteriormente foron sometidos a un proceso de PEGilación para manipular a súa carga superficial. As cargas superficiais foron modificadas a positivas, negativas ou neutras utilizando diferentes PEGs tiolados. A nosa caracterización detallada das partículas resultantes indicou que tales modificacións non provocaron alteracións significativas no LSPR.

Empregáronse as AuNRs funcionalizadas para investigar as interaccións coa BSA como un modelo de biocoroa protéica. Atopamos que a magnitude da interacción e a constante de disociación dependían da carga superficial das NPs. Ademais, investigouse a internalización das AuNRs en células HeLa e avalíouse como a formación da biocoroa e o tratamento fototérmico influían neste proceso. Aínda que a PEGilación e a formación da coroa de proteínas atenuaban a internalización celular, a adsorción de BSA diminuíu notablemente despois do tratamento fototérmico, especialmente nas mostras con carga positiva. Con todo, a internalización das AuNRs tras este tratamento só diminuíu significativamente nas mostras non PEGiladas, o que suxire que as cargas superficiais non influíron de maneira notable na captación celular.

A continuación, procedeuse á encapsulación de AuNRs en ZIF-8, xerando así un nanocomposto de estrutura núcleo-cascarón. As AuNRs estabilizáronse con CTAB e estudouse o impacto do emprego de diferentes concentracións de CTAB durante a síntese na morfoloxía dos NCs, comprobando que o tamaño dos NCs diminuíu ao aumentar a concentración de CTAB. Os tamaños promedio dos NCs obtivéronse utilizando o software ImageJ, dando como

resultado, por exemplo,  $169 \pm 13$  nm e  $160 \pm 8$  nm para as concentracións de 0,2 e 0,4 g.l<sup>-1</sup> de CTAB, respectivamente.

Tamén se avaliou a estabilidade dos NCs en varios medios, utilizando DLS para rastrexar as variacións de tamaño hidrodinámico ao longo do tempo. Observamos que os NCs de AuNR@ZIF-8 redistribuídos en auga presentaban unha diminución significativa de tamaño. Atopáronse resultados semellantes para os NCs redistribuídos en PSF. Para protexer os NCs da degradación en medios acuosos, foron recubertos con PMA. Tras o procedemento de recubrimento, os NCs conservaron a súa morfoloxía e o análise de DLS indicou que eran estables en auga.

Finalmente, abórdase a síntese e aplicación de NCs baseados en AuNSs e ZIF-8 como substratos para SERS. Este enfoque capitalizou a sinerxia entre as características distintivas das AuNSs e o ZIF-8, en particular, as propiedades plasmónicas das AuNSs e a porosidade xunto coa ampla superficie do ZIF-8.

Para os ensaios de SERS, elixíronse dous compostos, 4-MBA e RoB. As probas iniciais suxiren que as moléculas poden difundirse a través dos poros do ZIF-8 ata alcanzar as AuNSs aloxadas no núcleo do nanocomposto, permitindo así a detección destas moléculas mediante SERS. Observouse unha relación lineal entre a intensidade do pico Raman a 1074 cm<sup>-1</sup> e a concentración de 4-MBA no rango de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-5</sup> M, o que suxire a aplicabilidade deste sistema para a cuantificación de analitos.

O capítulo 4 divídese en dous subapartados, i) a síntese, funcionalización e caracterización das MNPs, estudou a influencia do dopaxe con Co nas propiedades magnéticas das MNPs e o proceso de transferencia a un medio acuoso e ii) a elaboración de nanocompostos estables.

No primeiro subapartado, descríbese o proceso de síntese das MNPs mediante un método de descomposición térmica dun precursor metálico. Con este método obtivéronse MNPs esféricas de diferentes tamaños e baixa polidispersidade. Atopouse que estas MNPs exhibían propiedades magnéticas, insuficientes para xerar calor, que foron melloradas ao someter as MNPs a un proceso de recozido.

A continuación, abórdase a funcionalización e estabilidade das MNPs nun medio acuoso utilizando PMA. As MNPs foron recubertas con PMA para mellorar a súa estabilidade en solucións acuosas e permitir a súa funcionalización con moléculas que presenten un grupo amino terminal. Un exemplo desa funcionalización implicou o uso de 6-AF. Sen embargo, só unha pequena fracción da cantidade total de 6-AF engadida adhíriuse ás MNPs, probablemente debido ao exceso de PMA que se eliminou durante o lavado posterior ao recubrimento polimérico.

Examinouse a influencia do dopado con Co nas propiedades magnéticas das MNPs. Sintetizáronse MNPs-Co reemplazando parcialmente os ións Fe<sup>2+</sup> nas posicións octaédricas da estrutura da magnetita con ións Co<sup>2+</sup> en varias proporcións. As MNPs transfíronse a auga mediante un recubrimento con PMA e caracterizáronse as propiedades magnéticas por medio do SQUID. As medidas realizadas a diferentes temperaturas mostraron que a concentración de Co tivo un impacto significativo nas propiedades magnéticas das MNPs. A unha temperatura de 10 K, as MNPs con maior concentración de Co presentan unha maior magnetización remanente. A 295 K, observouse un comportamento inusual nas propiedades magnéticas das nanopartículas dopadas con cobalto. A medida que aumentaba a concentración de dopado de Co<sup>2+</sup>, produciuse unha transición dunha anisotropía magnética negativa a unha positiva. Ademais, as nanopartículas dopadas con un 0,08 de Co mostraron un comportamento

superparamagnético. Estas descubertas indican a complexidade das interaccións magnéticas nos materiais dopados.

Estudouse a transferencia de MNPs a medios acuosos mediante a utilización de CTAB. As MNPs recubertas de AO foron transferidas a un medio acuoso empregando un protocolo baseado na formación dunha bicapa AO-CTAB. A través das medidas de tamaño hidrodinámico usando DLS, buscouse un procedemento eficiente para transferir MNPs ao medio acuoso minimizando a agregación.

Posteriormente, coas MNPs estabilizadas en auga, sintetizáronse nanocompostos de MNP recubierto con ZIF-8, co obxectivo final de deseñar un sistema capaz de lograr a liberación controlada de moléculas no interior das células mediante estímulos externos como AMF ou RMF. A eficiencia de encapsulamento de MNPs e o control sobre o seu tamaño demostráronse mediante a medición dos tamaños hidrodinámicos e a caracterización morfolóxica a través de SEM. Os resultados revelaron que ao aumentar a concentración de MNPs na síntese, diminuíu o tamaño dos nanocompostos de ZIF-8, o que sugire unha alta eficiencia de encapsulamento e certo grado de control sobre o seu tamaño.

Estudouse a encapsulación de CV en MNPs recubertas de MNP@ZIF-8 para a súa aplicación na entrega controlada de medicamentos. Os resultados mostraron que a encapsulación do CV non afectou a morfoloxía, tamaño, ou radio hidrodinámico dos NCs.

Para evitar a degradación de ZIF-8 en medios acuosos e asegurar a estabilidade dos MNP@ZIF-8(CV), levouse a cabo un recubrimento con PMA, o que permitiu a estabilidade coloidal en medios acuosos. A avaliación da estabilidade térmica e a porosidade dos MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF mediante análise termogravimétrico e BET, respectivamente, indicou unha boa estabilidade térmica ata 400°C e confirmou a microporosidade dos NCs.

Ademáis, empregouse WAXS para avaliar a cristalinidade dos MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF, os resultados confirmaron a alta cristalinidade e que a funcionalización con PMA non afectou a estrutura cristalina dos MNP@ZIF-8.

O capítulo 5 aborda a síntese, caracterización e funcionalización das PdNPs, o estudo da súa eficiencia como catalizadores e a súa encapsulación en ZIF-8.

Primeiramente, sintetizáronse e caracterizáronse PdNCs e PdNDs debido ao seu rendemento catalítico prometedor grazas ao seu tamaño e forma. As PdNDs, pola súa morfoloxía amorfa, presentan unha superficie específica maior, o que debería reflectirse en mellores propiedades catalíticas.

As PdNCs estabilizadas en auga mediante CTAB presentan citotoxicidade, polo que se estudou a posibilidade de substituír o CTAB por moléculas non citotóxicas que puidesen estabilizar as NPs en medios acuosos. Investigouse a estabilización das PdNPs con PEG e MC, e examinouse o impacto destes revestimentos nas propiedades catalíticas das NPs. Utilizáronse tres tipos de PEG: o metoxi-polietilenglicol-tiol (MeO-PEG-SH), que se une á superficie do Pd a través do grupo tiol, estabilizando as nanopartículas por impedimento estérico; o carboxi-polietilenglicol-tiol (COOH-PEG-HS) e o carboxi-polietilenglicol-amino (COOH-PEG-NH<sub>2</sub>) que tamén se unen mediante os seus grupos tiol e amino respectivamente, conseguindo a estabilización a través da repulsión electrostática e o impedimento estérico. A interacción entre as NPs e as MCs prodúcese principalmente por interaccións hidrofóbicas, adsorción de diferentes aminoácidos na superficie das NPs, e ligazóns S-Pd co aminoácido cisteína.

As medidas do tamaño hidrodinámico das PdNCs funcionalizadas mostraron que COOH-PEG-HS era máis estable que NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, que mostraron un incremento considerábel no tamaño hidrodinámico despois de 24 horas. Isto pode ser debido á debilidade da ligazón entre o grupo amino e o Pd en comparación coa ligazón formada polo grupo tiol e o Pd. No caso das PdNDs, non foi posible a funcionalización seguindo o mesmo protocolo. Estas PdNDs estabilízanse con PEI, cuxa estrutura altamente ramificada, xunto coa abundancia de grupos amino, ofrece múltiples puntos de anclaxe na superficie do Pd, complicando a substitución do PEI por outro polímero.

Para estudar as propiedades catalíticas das PdNPs funcionalizadas, empregouse a redución do AM con NaBH<sub>4</sub> en auga como reacción modelo. A avaliación realizouse mediante espectroscopía UV-Vis, seguindo a decoloración progresiva da solución. Recorreuse ao modelo de Langmuir-Hinshelwood para describir a cinética da reacción, postulando que os reactivos adsórbense primeiro na superficie do catalizador antes de reaccionar. A *k* para cada sistema catalítico baseado en Pd determinouse considerando unha cinética de primeiro orde. Os resultados mostraron que os sistemas avaliados presentaban valores de *k* superiores aos informados na literatura para a redución do AM con catalizadores baseados en NPs de Pd. Atopouse que os sistemas que usan PdNC e PdNCs@PEG presentaron as mellores constantes cinéticas. Contrariamente, observouse que a funcionalización con PEG ou MC non diminuíu significativamente a constante cinética. Tamén se investigou a reutilización dos sistemas catalíticos mediante tres reaccións consecutivas. Aínda que non foi eficiente para todos os sistemas, o sistema con MC mostrou os resultados máis favorábeis.

Finalmente, examinouse a encapsulación de PdNC en carcasas de ZIF-8 de diferentes grosores como estratexia para conseguir a estabilización dos PdNC en ambientes fisiolóxicos. Ademais de proporcionar protección ás NPs, o ZIF-8 permite o fluxo controlado dos reactivos cara ao núcleo catalizador do nanocompuesto debido ás súas propiedades porosas. Estudáronse diversas variables na síntese dos NCs, como a concentración de CTAB, o tempo de síntese e a temperatura, sobre o efecto no tamaño final dos nanocompuestos. Observouse que o tempo de exposición afectou o tamaño dos nanocompuestos, aínda que non a súa forma. A medida que se incrementaba o tempo de síntese, o tamaño dos nanocompuestos tamén incrementaba ata alcanzar un tamaño estábel despois de 3 horas. Ademais, descubriuse que a concentración de CTAB influía no tamaño dos nanocompuestos, con un tamaño menor á medida que se incrementaba a concentración de CTAB. A temperatura tamén tivo un efecto no tamaño dos nanocompuestos, sendo menor cando a síntese realizábase a temperaturas baixas. En xeral, observouse unha relación exponencial entre o diámetro hidrodinámico e o tempo de síntese, así como unha relación lineal entre o diámetro hidrodinámico e a concentración de CTAB. A redución no tamaño dos nanocompuestos ao incrementar a concentración de CTAB atribuíuse ao efecto das moléculas de CTAB na cinética de crecemento do ZIF-8.



## ABSTRACT

NPs, due to their size, shape, and composition, exhibit a series of idiosyncratic properties that are not observed in individual molecules or macroscopic materials. These peculiarities encompass specific mechanical, thermal, magnetic, electronic, optical, and catalytic behaviors. In the process of downsizing NPs to the nanoscale, an increase in the surface-to-volume ratio is observed, inducing significant transformations in their atomic structures and physicochemical properties compared to those of macroscopic materials. Additionally, the morphology of NPs plays a determining role in their properties, such as anisotropy in optical, magnetic, and catalytic properties. All these characteristics position NPs as potential actors in disciplines such as biomedicine, electronics, and catalysis.

However, it is relevant to consider emerging issues related to the toxicity and safety of NPs, which can be influenced by aspects such as size, shape, chemical composition, surface charge, catalytic activity, dose, and surface of the particles. Additionally, another inherent challenge of NPs is their tendency to aggregate, which can result in the progressive loss of their properties. Specifically, in the biological context, phenomena such as the formation of a protein corona around NPs need to be taken into account, as it can modify their interaction with biological barriers and cells. Ligands such as PEG are often used to stabilize NPs and reduce non-specific protein adsorption.

An alternative strategy for stabilizing NPs and preventing their aggregation is their functionalization, particularly through encapsulation in MOFs such as ZIF-8. MOFs are porous materials composed of metal ions or clusters of metals bonded to organic molecules, forming three-dimensional structures. The high porosity and chemical diversity of MOFs are their most remarkable attributes.

Among the potential applications of NPs, their use as vehicles for drug delivery is a relevant innovation in pharmacology. The encapsulation of pharmacological agents in nanocomposites derived from the combination of plasmonic NPs and ZIF-8 allows for the controlled release of these compounds into specific therapeutic targets through activation with a NIR laser. However, the limited penetration capacity of light in tissues is an obstacle for these systems, which can be overcome by using MNPs that generate heat in response to alternating or rotating magnetic fields.

An additional bioapplication is the use of PdNPs in bioorthogonal chemistry to promote the localized conversion of therapeutically inactive molecules (prodrugs) into cytotoxic agents within cells. This procedure requires the functionalization with biocompatible agents that stabilize and protect these nanoparticles in biological media.

This doctoral thesis focuses on the synthesis, characterization, functionalization, and applications of different types of NPs.

In the third chapter, various crucial aspects of plasmonic NPs are analyzed in two subsections: i) synthesis, functionalization, and the impact of co-exposure of plasmonic NPs on their degradation, ii) the influence of functionalization of AuNRs with PEG on protein dynamics in the biocorona, and the encapsulation of AuNRs and AuNSs in ZIF-8 for use in applications such as SERS substrates.

In a more detailed analysis, in the first subsection, stable AuNPs, AgNPs, and CuNPs were synthesized in  $\text{CHCl}_3$  with an approximate diameter of 15 nm and transferred to water through

PMA coating. The stability and degradation of the NPs, both individually and in combinations, as well as their potential cytotoxicity, were investigated. UV-Vis spectroscopy and concentration measurements using ICP revealed that AuNPs and AgNPs preserved their stability at 37 °C in water for at least 72 hours, while CuNPs showed signs of degradation, reflected in a redshift of LSPR and an increase in dissolved Cu<sup>2+</sup> in CuNPs dispersions over time. Combined dispersions of AuNPs-AgNPs demonstrated stability. However, mixtures including CuNPs (AuNPs-CuNPs, AgNPs-CuNPs, AuNPs-AgNPs-CuNPs) evidenced the degradation of CuNPs, similar to the behavior of individual CuNPs. This degradation was more notable during the first hours and then stabilized.

The viability assay with resazurin was used to study the cytotoxicity of NPs and their combinations in A549 cell cultures. AuNPs and AgNPs showed low toxicity, maintaining high cell viability at all analyzed concentrations. However, CuNPs showed a decrease in cell viability at the highest concentration of 5 nM, probably due to the release of toxic Cu<sup>2+</sup> ions. Regarding the combinations of NPs, a slight reduction in cell viability at 5 nM was detected for AgNPs-CuNPs and AuNPs-AgNPs-CuNPs combinations, which could indicate a synergistic effect of AgNPs in increasing the toxicity of CuNPs.

These initial findings suggest the need for further research to better understand the interaction between different NPs, their degradation, and the resulting cytotoxicity. This study could be expanded to include different types of cell cultures and a wider range of NP concentrations, providing a more detailed perspective on the impact of co-exposure to different NPs.

In the following subsection, the synthesis of PEGylated AuNRs to manipulate their surface charge is described. The surface charges were modified to positive, negative, or neutral using different thiolated PEGs. Detailed characterization of the resulting particles indicated that such modifications did not cause significant alterations in LSPR.

The functionalized AuNRs were used to investigate interactions with BSA as a model of protein biocorona. It was found that the magnitude of the interaction and the dissociation constant depended on the surface charge of the NPs. Additionally, the internalization of AuNRs in HeLa cells was investigated, and the influence of biocorona formation and photothermal treatment on this process was evaluated. Although PEGylation and protein corona formation attenuated cellular internalization, BSA adsorption decreased significantly after photothermal treatment, especially in samples with a positive charge. However, the internalization of AuNRs after this treatment only decreased significantly in non-PEGylated samples, suggesting that surface charges did not notably influence cellular uptake.

Next, the encapsulation of AuNRs in ZIF-8 was performed, generating a core-shell nanocomposite structure. The AuNRs were stabilized with CTAB, and the impact of using different concentrations of CTAB during synthesis on the morphology of the NCs was studied, confirming that the size of the NCs decreased with increasing CTAB concentration. The average sizes of the NCs were obtained using ImageJ software, resulting, for example, in 169 ± 13 nm and 160 ± 8 nm for concentrations of 0.2 and 0.4 g.l<sup>-1</sup> of CTAB, respectively.

The stability of the NCs in various media was evaluated using DLS to track hydrodynamic size variations over time. It was observed that the redispersed AuNR@ZIF-8 NCs in water exhibited a significant size decrease. Similar results were found for NCs redispersed in PSF. To protect the NCs from degradation in aqueous media, they were coated with PMA. After the coating process, the NCs retained their morphology, and DLS analysis indicated their stability in water.

Finally, the synthesis and application of Au NSs and ZIF-8-based nanocomposites were addressed in chapter 4. This approach capitalized on the synergy between the distinctive features of AuNSs and ZIF-8, particularly the plasmonic properties of AuNSs and the porosity along with the extensive surface area of ZIF-8.

For the SERS assays, two compounds, 4-MBA and RoB, were chosen. Initial tests suggested that the molecules could diffuse through the pores of ZIF-8 to reach the AuNSs housed in the core of the nanocomposite, enabling the detection of these molecules via SERS. A linear relationship was observed between the Raman peak intensity at  $1074\text{ cm}^{-1}$  and the concentration of 4-MBA in the range of  $10^{-6}$  to  $10^{-5}$  M, suggesting the applicability of this system for analyte quantification.

Chapter 4 is divided into two subsections: i) synthesis, functionalization, and characterization of MNPs, studying the influence of Co doping on the magnetic properties of MNPs and the transfer process to an aqueous medium, and ii) the development of stable nanocomposites.

In the first subsection, the synthesis of MNPs through a thermal decomposition method of a metal precursor is described. This method yielded spherical MNPs of different sizes with low polydispersity. These MNPs exhibited magnetic properties that were insufficient to generate heat, which were improved by subjecting the MNPs to an annealing process.

Subsequently, the functionalization and stability of MNPs in an aqueous medium using PMA were addressed. The MNPs were coated with PMA to enhance their stability in aqueous solutions and enable their functionalization with molecules presenting a terminal amino group. One example of such functionalization involved the use of 6-AF. However, only a small fraction of the total amount of added 6-AF adhered to the MNPs, likely due to the excess PMA that was removed during the post-polymeric coating washing step.

The influence of Co doping on the magnetic properties of MNPs was examined. MNPs-Co were synthesized by partially replacing  $\text{Fe}^{2+}$  ions in the octahedral positions of the magnetite structure with  $\text{Co}^{2+}$  ions in various proportions. The MNPs were transferred to water through PMA coating, and their magnetic properties were characterized using SQUID. Measurements at different temperatures showed that the Co concentration had a significant impact on the magnetic properties of the MNPs. At a temperature of 10 K, MNPs with higher Co concentration exhibited higher remanent magnetization. At 295 K, an unusual behavior was observed in the magnetic properties of cobalt-doped nanoparticles. As the  $\text{Co}^{2+}$  doping concentration increased, a transition from negative magnetic anisotropy to positive anisotropy occurred. Additionally, nanoparticles doped with 0.08 Co showed superparamagnetic behavior. These findings indicate the complexity of magnetic interactions in doped materials.

The transfer of MNPs to aqueous media using CTAB was studied. AO-coated MNPs were transferred to an aqueous medium using a protocol based on the formation of an AO-CTAB bilayer. Hydrodynamic size measurements using DLS were employed to find an efficient procedure for transferring MNPs to the aqueous medium while minimizing aggregation.

Subsequently, with the MNPs stabilized in water, MNP@ZIF-8 nanocomposites were synthesized, aiming to design a system capable of achieving controlled release of molecules inside cells through external stimuli such as AMF or RMF. The encapsulation efficiency of MNPs and control over their size were demonstrated by measuring the hydrodynamic sizes and performing morphological characterization using SEM. The results revealed that increasing the

concentration of MNPs in the synthesis resulted in smaller sizes of the ZIF-8 nanocomposites, suggesting high encapsulation efficiency and a certain degree of control over their size.

The encapsulation of CV in MNP-coated MNP@ZIF-8 for application in controlled drug delivery was investigated. The results showed that the encapsulation of CV did not affect the morphology, size, or hydrodynamic radius of the NCs.

To prevent ZIF-8 degradation in aqueous media and ensure the stability of MNP@ZIF-8(CV), they were coated with PMA, which provided colloidal stability in aqueous media. Evaluation of the thermal stability and porosity of MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF through thermogravimetric analysis and BET confirmed good thermal stability up to 400°C and confirmed the microporosity of the NCs.

Wide-angle X-ray scattering (WAXS) was employed to assess the crystallinity of MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF, and the results confirmed high crystallinity and that functionalization with PMA did not affect the crystal structure of MNP@ZIF-8.

Chapter 5 encompasses the synthesis, characterization, functionalization, and application of PdNPs, the study of their efficiency as catalysts, and their encapsulation in ZIF-8.

First, PdNCs and PdNDs were synthesized and characterized due to their promising catalytic performance based on their size and shape. PdNDs, with their amorphous morphology, exhibit a higher specific surface area, which should translate into improved catalytic properties.

PdNCs stabilized in water using CTAB exhibited cytotoxicity, so the possibility of replacing CTAB with non-toxic molecules that could stabilize the NPs in aqueous media was investigated. The stabilization of PdNPs with PEG and MC was explored, and the impact of these coatings on the catalytic properties of the NPs was examined. Three types of PEG were used: methoxy-polyethylene glycol-thiol (MeO-PEG-SH), which binds to the Pd surface through the thiol group, stabilizing the nanoparticles through steric hindrance, carboxy-polyethylene glycol-thiol (COOH-PEG-HS), and carboxy-polyethylene glycol-amino (COOH-PEG-NH<sub>2</sub>), both of which bind through their thiol and amino groups, respectively, with stabilization achieved through electrostatic repulsion and steric hindrance. The interaction between the NPs and MCs mainly occurs through hydrophobic interactions, the adsorption of different amino acids to the NP surface, and S-Pd bonds with the amino acid cysteine.

Hydrodynamic size measurements of functionalized PdNCs showed that COOH-PEG-HS was more stable than NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, which exhibited a considerable increase in hydrodynamic size after 24 hours. This could be due to the weaker bond between the amino group and Pd compared to the bond formed by the thiol group and Pd. In the case of PdNDs, functionalization following the same protocol was not possible. These PdNDs were stabilized with PEI, and the highly branched structure of this polymer, along with its abundance of amino groups, provides multiple anchoring points on the Pd surface, making it difficult to replace PEI with another polymer.

To study the catalytic properties of the functionalized PdNPs, the reduction of AM with NaBH<sub>4</sub> in water was used as a model reaction. Evaluation was performed using UV-Vis spectroscopy by monitoring the progressive decolorization of the solution. The Langmuir-Hinshelwood model was employed to describe the reaction kinetics, postulating that the reactants first adsorb on the catalyst's surface before reacting. The rate constant (k) for each Pd-based catalytic system was determined considering first-order kinetics. The results revealed that the evaluated systems exhibited higher k values than those reported in the literature for the reduction of AM using Pd NP-based catalysts. The systems utilizing PdNCs and PdNCs@PEG

showed the best kinetic constants. In contrast, functionalization with PEG or MC did not significantly decrease the kinetic constant. The reusability of the catalytic systems was also investigated through three consecutive reactions, although it was not efficient for all systems. The system with MC showed the most favorable results.

Finally, the encapsulation of PdNCs in ZIF-8 shells with varying thicknesses was examined as a strategy to achieve the stabilization of PdNCs in physiological environments. In addition to providing protection to the NPs, ZIF-8 allows for controlled flow of reactants to the catalytic core of the nanocomposite due to its porous properties. Several variables in the synthesis of the NCs, such as CTAB concentration, synthesis time, and temperature, were studied for their effect on the final size of the nanocomposites. It was observed that the exposure time affected the size of the nanocomposites, although not their shape. As the synthesis time increased, the size of the nanocomposites also increased until reaching a stable size after 3 hours. Furthermore, it was found that the CTAB concentration influenced the size of the nanocomposites, with smaller sizes obtained as the CTAB concentration increased. Temperature also had an effect on the size of the nanocomposites, with smaller sizes observed when the synthesis was carried out at lower temperatures. Overall, an exponential relationship between the hydrodynamic diameter and the synthesis time was observed, as well as a linear relationship between the hydrodynamic diameter and the CTAB concentration. The reduction in size of the nanocomposites with increasing CTAB concentration was attributed to the effect of CTAB molecules on the growth kinetics of ZIF-8.



## OBJETIVOS

### Objetivos generales

- Síntesis, funcionalización y caracterización de diversas NPs plasmónicas, estudio de su interacción con proteínas y su potencial aplicación en espectroscopía SERS.
- Síntesis, caracterización y dopaje de MNPs, así como el desarrollo de nanocompuestos estables y controlados para aplicaciones biomédicas potenciales, aprovechando las propiedades magnéticas.
- Síntesis, caracterización y estabilización de PdNPs en medios acuosos con recubrimientos no citotóxicos, análisis de cómo estos recubrimientos afectan a sus propiedades catalíticas y explorar la estrategia de encapsulamiento en corazas de ZIF-8 para lograr su estabilización en entornos fisiológicos.

### Objetivos específicos

#### Capítulo 3:

- 1) Síntesis y funcionalización de NPs plasmónicas: El primer objetivo de la tesis es abordar la síntesis y post-funcionalización de NPs plasmónicas de diferentes materiales (Au, Ag y Cu) y morfologías (esferas, barras y estrellas). Se busca obtener NPs con dimensiones equivalentes y transferirlas desde una fase de disolvente orgánico al agua mediante el recubrimiento de su superficie con una capa de PMA, un polímero anfifílico. El estudio se enfoca en la co-exposición de estas NPs plasmónicas para analizar cómo afecta a sus propiedades ópticas y su degradación con el tiempo, centrándose específicamente en el efecto del material, eliminando la influencia del tamaño y la química superficial.
- 2) Funcionalización de NPs plasmónicas con PEG y estudio de la dinámica de la biocorona proteica: El segundo objetivo se centra en la funcionalización de AuNRs y análisis del impacto de su funcionalización con PEG en la dinámica de la biocorona proteica en medios biológicos. Se estudia la interacción de diferentes AuNRs PEGilados con diferentes cargas superficiales con la BSA antes y después de la irradiación láser en el rango NIR.
- 3) Recubrimiento de AuNRs y AuNSs con ZIF-8 y empleo como sustratos SERS: El tercer objetivo trata sobre el recubrimiento de AuNRs y AuNSs con un recubrimiento de ZIF-8 para evitar la degradación en medios acuosos. Se explora la posibilidad de crecer capas de ZIF-8 de diferente grosor. Además, se investiga el uso de nanocompuestos formados por agregados de AuNSs recubiertas con ZIF-8 como sustratos para espectroscopía SERS.

**Capítulo 4:**

- 1) Síntesis y dopaje de MNPs: El primer objetivo del capítulo 4 es abordar la síntesis de MNPs estables en medio orgánico y examinar el impacto del dopaje con bajas proporciones de Co en sus propiedades magnéticas.
- 2) Elaboración de nanocompuestos estables: El segundo objetivo se enfoca en la transferencia de las MNPs desde un medio orgánico a un medio acuoso y la elaboración de nanocompuestos estables en ambientes acuosos. Estos nanocompuestos constan de un núcleo de MNP recubierto por una estructura porosa de ZIF-8. Se busca diseñar nanocompuestos que puedan ser activados por estímulos externos (campos magnéticos) para liberar moléculas de manera controlada en células, lo que podría tener aplicaciones en el campo de la liberación de fármacos u otras terapias dirigidas.

**Capítulo 5:**

- 1) Síntesis y funcionalización de PdNPs estables en medios acuosos: Síntesis de PdNPs y estudio de la posibilidad de reemplazar el surfactante catiónico CTAB, que presenta citotoxicidad, por otras moléculas no citotóxicas para estabilizar las PdNPs en medios acuosos. Se utilizaron tres tipos de PEG (metoxi-PEG-tiol, carboxi-PEG-amina y tiol-PEG-carboxi) y MC para este propósito.
- 2) Investigar el impacto de los recubrimientos en las propiedades catalíticas de las PdNPs: Analizar cómo los diferentes recubrimientos, como PEG y MC, afectan las propiedades catalíticas de las PdNPs. Se busca entender si los recubrimientos seleccionados afectan positiva o negativamente la actividad catalítica de las NPs y su potencial para aplicaciones en catálisis.
- 3) Explorar el control del encapsulamiento de PdNCs en corazas de ZIF-8: Como una estrategia adicional para lograr la estabilización de las PdNCs en entornos fisiológicos, se examina el control del encapsulamiento de PdNCs en corazas de ZIF-8 de distintos grosores.



# Capítulo 1

# 1. INTRODUCCIÓN Y ESTADO DEL ARTE

## 1.1. Conceptos generales

### 1.1.1. Los inicios de la nanotecnología

Aunque el término "nanotecnología" es relativamente reciente, la existencia y aplicaciones de las NPs se pueden rastrear a lo largo de distintas épocas históricas. En la antigüedad, las NPs se utilizaban en la fabricación de artefactos artísticos y ornamentales, tal como se evidencia en la célebre copa de Licurgo, datado en el siglo IV. Esta pieza exhibe distintos comportamientos ópticos en función de la iluminación, ya sea interna o externa: en luz reflejada, adopta una apariencia verde-amarillenta, mientras que, en luz transmitida, adquiere un tono rojo rubí. Dichos efectos se atribuyen a la presencia de NPs de plata (AgNP) y oro (AuNP) incrustadas en el vidrio.<sup>1</sup> Entre los siglos IV y V, se produjeron vidrieras con NPs para ornamentar iglesias, como es el caso del vidrio rubí.<sup>2</sup> En el siglo XVII, Johann Kunckel, un alquimista y vidriero alemán, escaló la producción de vidrio rubí mediante la adición de NPs de oro al vidrio fundido.<sup>3</sup> A lo largo de la historia, se han explorado y analizado las propiedades de las NPs, lo que ha facilitado su aplicación en diversos ámbitos, incluyendo la medicina, la electrónica y la ciencia de materiales.<sup>2</sup>

El término 'nano' proviene del prefijo griego que significa 'enano' o 'muy pequeño' y representa la milmillonésima parte de un metro ( $10^{-9}$  m). La nanociencia comprende el estudio de estructuras, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones singulares que surgen de la organización de sus átomos constituyentes en una escala de 1 a 100 nm.<sup>4</sup> Los orígenes de la nanociencia y la nanotecnología se remontan a varias décadas atrás, cuando los investigadores comenzaron a explorar y comprender el mundo a escala nanométrica. El término nanociencia fue acuñado por el destacado físico Richard Feynman, quien, en diciembre de 1959, durante la reunión anual de la American Physical Society en el Instituto de Tecnología de California (Caltech), impartió una conferencia titulada "There's Plenty of Room at the Bottom".<sup>5</sup> En esta presentación, Feynman propuso la posibilidad de manipular y controlar átomos y moléculas de manera individual. A pesar de que las ideas de Feynman eran visionarias en aquel momento, su discurso estableció los fundamentos para la investigación futura en el campo de la nanociencia, centrada en el estudio de estructuras y moléculas a una escala de nanómetros. Asimismo, contribuyó al desarrollo de la nanotecnología, la cual se refiere a la aplicación práctica de la nanociencia en la creación de dispositivos y tecnologías a nivel nanométrico.

A lo largo de las décadas siguientes, se llevaron a cabo avances significativos en la capacidad para observar y manipular la materia a escala nanométrica. El progreso en el desarrollo de herramientas de microscopía, como el microscopio de efecto túnel (STM, por sus siglas en inglés) en 1981 y el microscopio de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) en 1986, permitió a los investigadores visualizar y manipular átomos y moléculas con una resolución sin precedentes.<sup>6</sup> No obstante, fue durante la década de 1990 en la que este campo empezó a recibir una atención y financiación sustanciales.<sup>4</sup>

De manera paralela a estos avances, los investigadores iniciaron la síntesis y el estudio de diferentes tipos de NMs, así como la exploración de sus propiedades singulares y aplicaciones potenciales. Entre todas las topologías de tamaño nanométrico que se empezaron a estudiar y analizar, se ha desarrollado una amplia gama de NPs inorgánicas, incluyendo óxidos metálicos,

semiconductores y materiales magnéticos, entre otras. Este proceso ha fomentado un crecimiento exponencial del estudio de este tipo de materiales en el ámbito de la nanociencia y la nanotecnología.

### 1.1.2. Clasificación de los NMs

Los NMs abarcan una amplia gama de materiales con propiedades y aplicaciones diversas, que pueden ser clasificadas según sus dimensiones o composición. Los NMs presentan al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm.

Según sus dimensiones pueden clasificarse en las siguientes categorías:

**NMs de dimensión cero (0D):** En estos NMs las tres dimensiones se encuentran en el rango nanométrico. Algunos ejemplos son, por ejemplo, NPs esféricas como los puntos cuánticos, y NPs de oro y plata.<sup>7</sup>

**NMs unidimensionales (1D):** Estos NMs tienen una dimensión en la escala nanométrica (1-100 nm), mientras que las otras dos dimensiones son más grandes. Algunos ejemplos de NMs unidimensionales incluyen nanovarillas (NRs, del inglés *nanorods*), nanotubos y nanohilos.<sup>7</sup>

**NMs bidimensionales (2D):** Presentan dos dimensiones en la escala nanométrica, mientras que la tercera dimensión es más grande. Los NMs bidimensionales incluyen láminas delgadas, como el grafeno y los óxidos metálicos bidimensionales, así como películas delgadas y recubrimientos.<sup>7</sup>

**NMs tridimensionales (3D):** Los NMs tridimensionales tienen sus tres dimensiones son mayores que la escala nanométrica. Ejemplos de NMs tridimensionales incluyen nanoestructuras porosas, como aerogeles y esponjas de carbono, así como nanocompuestos y ensamblajes de NPs.<sup>7</sup>

Más concretamente, las NPs generalmente se clasifican en inorgánicas, orgánicas y basadas en carbono; dentro de estas categorías, pueden dividirse en subgrupos basándose en su composición y la estructura:

NPs inorgánicas:<sup>8</sup>

- ✓ Metálicas: Estas NPs comprenden elementos metálicos puros como oro, plata, platino, hierro y cobre.
- ✓ Basadas en óxidos metálicos: Incluyen óxidos metálicos como, por ejemplo, el dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), óxido de zinc (ZnO), óxido de hierro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y óxido de cerio (CeO<sub>2</sub>).
- ✓ De compuestos semiconductores: Incluyen materiales como sulfuros, seleniuros y fosfuros metálicos.
- ✓ Magnéticas: Contienen elementos magnéticos como el óxido de hierro y las ferritas.

NPs orgánicas:<sup>8</sup>

- ✓ Lipídicas: Están constituidas por lípidos, como fosfolípidos y triglicéridos.
- ✓ Dendrimeros: Son estructuras poliméricas tridimensionales ramificadas que presentan una geometría bien definida y una alta densidad de grupos funcionales.

- ✓ Nanocápsulas orgánicas: En esta categoría, se encuentran estructuras en las que un núcleo bioactivo (fármacos como la doxorubicina,<sup>9</sup> paclitaxel,<sup>10</sup> adriamicina,<sup>11</sup> y proteínas terapéuticas<sup>12</sup> entre otros) está rodeado por una capa o membrana orgánica.
- ✓ De proteínas y polisacáridos: Estas NPs están formadas por macromoléculas biológicas como proteínas, enzimas y polisacáridos.

NPs basadas en carbono:<sup>8</sup> En esta categoría, se encuentran estructuras de carbono como los nanotubos de carbono, el grafeno y los puntos cuánticos de carbono.

Esta clasificación proporciona una visión general de las distintas categorías de NPs inorgánicas y orgánicas. Es importante tener en cuenta que esta clasificación no es exhaustiva y que existen otras categorías y subcategorías de NPs.

### 1.1.3. Proceso de crecimiento de las NPs inorgánicas

Para optimizar el rendimiento de las NPs en aplicaciones específicas, es crucial comprender y controlar los mecanismos que regulan su formación y crecimiento.

La investigación sobre la preparación de partículas coloidales uniformes tiene sus raíces en la década de 1940. Los pioneros en este campo, entre ellos LaMer y sus colegas, llevaron a cabo experimentos fundamentales al preparar aerosoles de aceite e hidrosoles de azufre, y propusieron un modelo simplificado para el crecimiento cristalino que divide el proceso en etapas distintas de nucleación y crecimiento.<sup>13</sup>

Durante la etapa de nucleación, la concentración de átomos libres provenientes de la descomposición de un precursor alcanza un nivel crítico conocido como sobresaturación, lo cual da lugar a la formación de clústeres metálicos debido a la estabilización termodinámica que esto implica.<sup>14</sup> Cuando la concentración de átomos libres disminuye por debajo de la concentración de sobresaturación, se detiene la nucleación y se inicia una etapa de crecimiento. Durante esta etapa, los núcleos experimentan un aumento en su tamaño a medida que se adhieren más átomos a su superficie.<sup>14-15</sup>

Durante el proceso de crecimiento de las NPs, pueden ocurrir diversos mecanismos, entre ellos el conocido como crecimiento de Ostwald.<sup>16</sup> El crecimiento de Ostwald se fundamenta en la disolución de partículas de menor tamaño y la posterior deposición de átomos disueltos en partículas de mayor tamaño.<sup>16</sup> Este proceso se debe a las diferencias en la energía superficial entre partículas de diferentes dimensiones, específicamente, las NPs se tornan progresivamente más inestables a medida que disminuye el tamaño de la partícula debido al incremento relativo del área superficial disponible y, por consiguiente, de la energía del sistema. La ecuación de Gibbs-Thomson<sup>16</sup> expresa el efecto del tamaño de la partícula en la solubilidad y la estabilidad de las partículas en una fase sólida o líquida. Dicha estabilidad de fase se expresa en función de la concentración de solubilidad,  $C(r)$ , correspondiente a una partícula con radio  $r$ :

$$C(r) = C^o \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right) \quad (1)$$

donde  $C^o$  es la solubilidad de un átomo extraído de una superficie plana infinita,  $V_m$  es el volumen molar de la partícula,  $\gamma$  denota la energía superficial,  $R$  es la constante de gas y  $T$  indica la temperatura.

Por otro lado, el mecanismo de ensamblaje orientado se desarrolló para explicar el comportamiento del crecimiento de las NPs que parecía desviarse del crecimiento convencional de Ostwald.<sup>17</sup> Este se produce durante la evolución de los nanocristales/núcleos, en el cual partículas con orientaciones cristalográficas análogas (o con diferencias mínimas) colisionan y se fusionan para generar estructuras de mayor tamaño. Esta unión de partículas ocurre con el propósito de minimizar la energía total del sistema. Durante este proceso, se establecen orientaciones preferenciales que presentan una energía mínima. Estas orientaciones pueden ser inherentes a las partículas o pueden ser impuestas por ligandos que restringen el crecimiento en aquellas partículas que presentan una menor energía. Como resultado de este fenómeno, se forman nanoestructuras con morfologías irregulares y anisotrópicas, como nanovarillas, cuando se utilizan NPs como unidades básicas de construcción.<sup>17</sup>

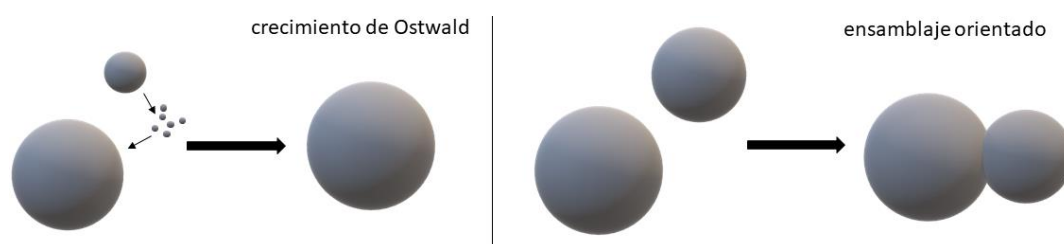


Figura 1: Representación esquemática de los mecanismos principales de crecimiento de NP.

Las interacciones de Coulomb y las fuerzas de Van der Waals también desempeñan un papel importante en el crecimiento de las NPs coloidales.<sup>18</sup> Estas interacciones influyen en la estabilidad de las suspensiones de NPs y en la morfología y propiedades finales de las nanoestructuras resultantes. Estas interacciones débiles son especialmente relevantes en la nucleación y el crecimiento de partículas a escala nanométrica, donde las fuerzas de Van der Waals pueden ser comparables o incluso mayores que las fuerzas electrostáticas.

Las interacciones de Coulomb, originadas por la atracción o repulsión entre partículas cargadas, pueden regular la cinética de ensamblaje de NPs pequeñas en sistemas coloidales. Además, estas interacciones electrostáticas pueden contribuir a la orientación y alineación de las NPs durante el proceso de crecimiento, lo cual puede conducir a la formación de nanoestructuras específicas.

Por otro lado, las fuerzas de Van der Waals, que son interacciones débiles entre átomos y moléculas debido a fluctuaciones temporales en la distribución de electrones, adquieren una importancia particular en la interacción y ensamblaje de NPs. Esto se debe al aumento en la superficie de contacto y al efecto de proximidad que se presenta en escalas nanométricas. Estas fuerzas pueden propiciar el crecimiento de NPs y la formación de estructuras más grandes y complejas, como nanoagregados o nanocompuestos.

En el contexto del crecimiento de NPs, las interacciones de Coulomb y las fuerzas de Van der Waals pueden competir o colaborar, afectando el proceso de ensamblaje y la formación de nanoestructuras específicas.<sup>18-19</sup>

Por último, para lograr un crecimiento controlado y obtener la simetría final deseada en las partículas, es necesario realizar modificaciones en las condiciones de síntesis. Estas modificaciones implican la separación de las fases de nucleación y crecimiento (crecimiento mediado por semillas) así como la adición de ligandos que dirigen la morfología de las NPs. La

separación de las etapas de nucleación y crecimiento facilita la regulación y el control del tamaño y la forma final de las NPs al enfocarse en la etapa de crecimiento.<sup>20</sup> Los agentes utilizados pueden ser surfactantes, ligandos o inhibidores, que modulan la energía superficial de las partículas en crecimiento y conducen a la formación de nanoestructuras con formas específicas.

Los ligandos como los surfactantes se unen a la superficie de las NPs mediante enlaces covalentes, iónicos o de coordinación. Estos ligandos pueden afectar la morfología de las NPs al influir en la energía superficial, la tasa de difusión y las características de empaquetamiento cerca de la superficie de las NP. El uso de ligandos específicos puede conducir a la formación de nanoestructuras con geometrías particulares y propiedades ajustadas.<sup>21</sup>

Los surfactantes son compuestos capaces de reducir la tensión superficial entre dos fases, como un sólido y un líquido. En el caso de las NPs, los surfactantes se adsorben en la superficie de las partículas en crecimiento, creando una barrera que afecta a la velocidad de crecimiento en diferentes direcciones/planos cristalinos. Al ajustar la concentración, pH, fuerza iónica y la naturaleza de los surfactantes, es posible controlar la morfología resultante de las NPs.<sup>22</sup>

#### 1.1.4. Síntesis y caracterización de NPs inorgánicas

En la síntesis de NPs, se distinguen dos enfoques principales: "top-down" y "bottom-up" (Figura 2). La estrategia "top-down" conlleva la reducción del tamaño de materiales de mayores dimensiones hasta obtener las NPs deseadas. En contraposición, el enfoque "bottom-up" se fundamenta en la construcción de NPs a partir de átomos, moléculas o iones, mediante procesos de autoensamblaje y autoorganización.<sup>7,23</sup>

En el ámbito de la investigación y producción de NPs inorgánicas, se utilizan distintos métodos de síntesis que pueden agruparse en tres categorías fundamentales: química, física y biológica.

La síntesis química representa un enfoque prevalente basado en procesos químicos para la generación de NPs. Dentro de los métodos químicos, la precipitación es un proceso en el cual se combinan soluciones precursoras que reaccionan químicamente, dando lugar a la formación de NPs que posteriormente precipitan en el medio. Otro método químico, el sol-gel, implica la creación de geles a partir de soluciones de precursores mediante reacciones de hidrólisis y condensación, seguidas de tratamientos térmicos para obtener las NPs. La reducción química conlleva la utilización de agentes reductores para transformar iones metálicos en NPs metálicas. En cuanto a la descomposición térmica, esta se basa en el calentamiento de un precursor a elevadas temperaturas, lo cual ocasiona su descomposición y la consiguiente formación de NPs. Finalmente, los métodos hidrotermal y solvotermal implican la síntesis de NPs en soluciones acuosas o no acuosas a altas presiones y temperaturas en autoclaves cerrados.<sup>7,24</sup>

En contraste con la síntesis química, la síntesis física utiliza métodos físicos para producir NPs. La evaporación y condensación son procesos que implican la evaporación de materiales sólidos, generalmente en condiciones de alto vacío, y su posterior condensación en NPs. Adicionalmente, la pulverización catódica ("sputtering") y la deposición química en fase de vapor (CVD, por sus siglas en inglés) hacen uso de haces de iones, plasma o reacciones en fase de vapor para depositar NPs sobre sustratos.<sup>7,24</sup>

Por último, la síntesis biológica emplea sistemas biológicos para la generación de NPs inorgánicas. Este método abarca la biosíntesis a través de microorganismos o extractos

botánicos, los cuales tienen la capacidad de producir NPs con propiedades particulares y funciones biológicas específicas.<sup>24</sup>

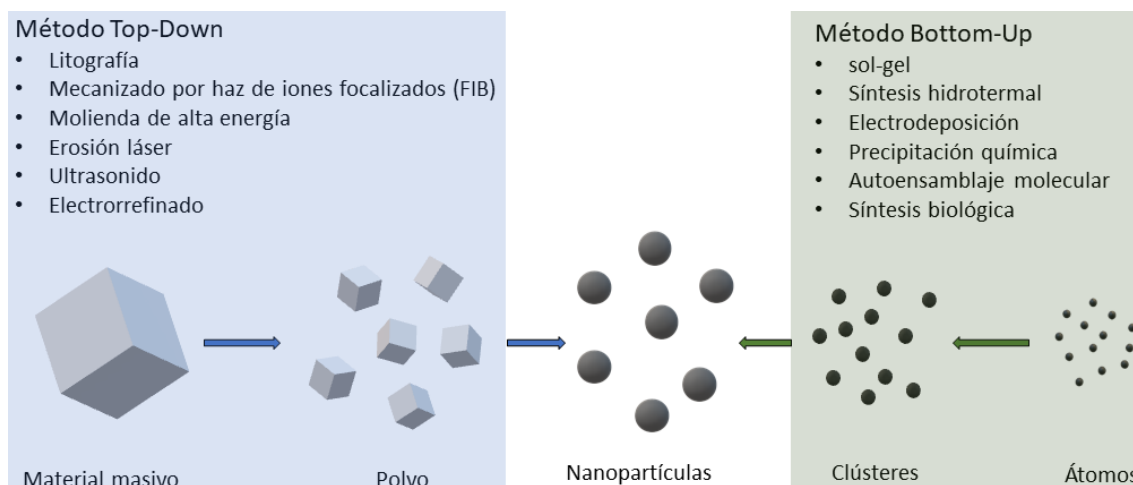


Figura 2: Esquema representativo de los dos principales enfoques en la síntesis de NPs con algunos métodos de ejemplo.

### 1.1.5. Funcionalización y estabilidad coloidal de las NPs inorgánicas

Durante el proceso de síntesis de NPs, se añaden surfactantes que desempeñan un papel crucial en la regulación de la morfología y control del tamaño.<sup>22</sup> Una vez completada la síntesis, las NPs están recubiertas por surfactantes que les confieren estabilidad por repulsión electrostática y por impedimento estérico. Si las NPs se pretenden emplear en aplicaciones biológicas, se requiere una modificación o funcionalización de sus superficies con recubrimientos biocompatibles que mejoren sus propiedades, funciones y estabilidad coloidal en medios de relevancia biológica.<sup>25</sup> Mediante la adición de grupos químicos específicos se puede controlar, pues, su hidrofobicidad, estabilidad coloidal, biocompatibilidad, entre otras. La funcionalización de NPs puede realizarse de varias maneras, incluyendo la síntesis *in situ* de grupos funcionales, la adsorción de moléculas específicas, y la unión covalente de grupos químicos en la superficie de las NPs.<sup>26</sup>

En el capítulo inicial de esta tesis, se describe un proceso de funcionalización de NPs estables en medios orgánicos mediante el uso de poli(isobutileno-alt-anhídrido maleico)-injerto-dodecilo (PMA), un polímero anfifílico. Este procedimiento permite la transferencia de estas NPs a medio acuoso desde una fase orgánica. Adicionalmente, en el presente capítulo también se aborda la funcionalización de AuNR mediante la incorporación del polímero PEG, con el objetivo de lograr su estabilización en entornos biológicos.

#### 1.1.5.a. Funcionalización con PEG

El PEG (HO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH) es un polímero anfifílico que se encuentra disponible en pesos moleculares que oscilan desde 200 hasta decenas de miles de Daltons. Los PEG de menor peso molecular son solubles en agua, disminuyendo su solubilidad con el aumento de su peso molecular.<sup>27</sup>

Este polímero tiene excelentes características de solvatación y se compleja con varios lantánidos y cationes de metales de transición. Además, el PEG demuestra una notable resistencia frente a procesos químicos y físicos como la oxidación, reducción y descomposición provocados por ácidos, bases, temperaturas moderadamente altas, peróxido de hidrógeno y borohidruro de sodio. En términos de funcionalización, el grupo OH terminal del PEG puede ser oxidado de manera selectiva para permitir la adición de diversos grupos terminales o la unión de ligandos más grandes, incluyendo biomoléculas.<sup>28</sup>

La funcionalización de las NPs con PEG, un proceso conocido como PEGilación, implica la unión o el recubrimiento de la superficie de las NPs con moléculas de PEG. Esto puede lograrse mediante adsorción superficial o a través de enlaces covalentes. La PEGilación tiene el potencial de mejorar la estabilidad de las NPs en soluciones biológicas, reduciendo la tendencia de las NPs a agregarse.<sup>28</sup>

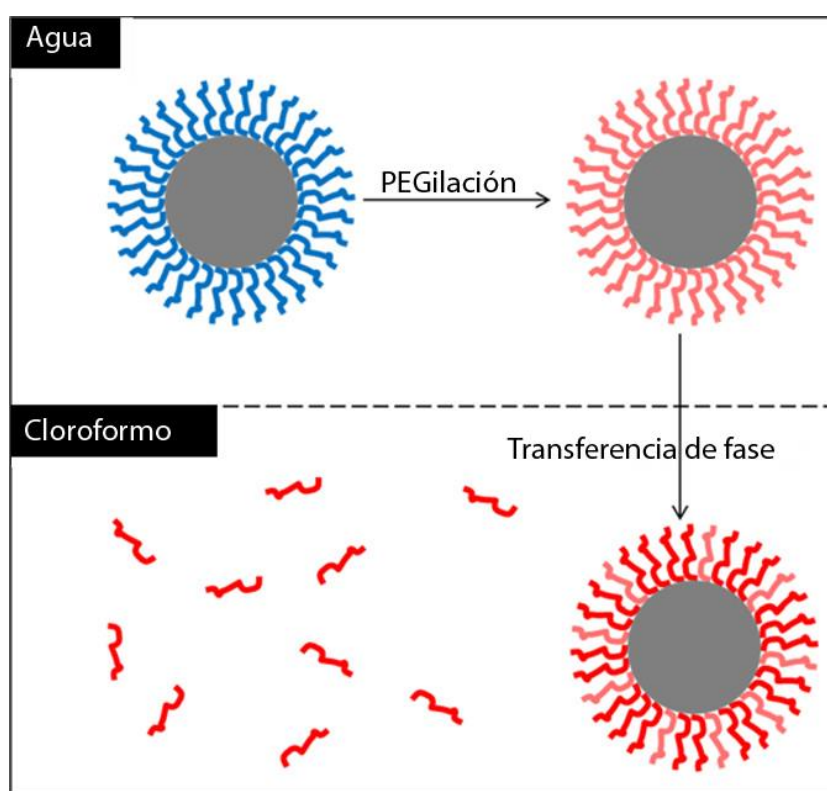


Figura 3: Hidrofobización de NPs de Au mediante su funcionalización en dos etapas: (1) PEGilación en agua (panel superior) mediante el desplazamiento de ligandos hidrofílicos (representados en azul) por moléculas de PEG-SH (representadas en rojo claro), seguido de la transferencia de fase a una solución de cloroformo que contiene alquilaminas (representadas en rojo oscuro). (Adaptado con permiso de la referencia <sup>26</sup>).

Además, la PEGilación puede mejorar la biodistribución de las NPs. Las NPs sin PEG pueden ser capturadas y eliminadas rápidamente por el sistema reticuloendotelial (RES), un conjunto de células encargadas de eliminar partículas extrañas del cuerpo humano. Al eludir esta captura por el RES, las NPs PEGiladas pueden tener una vida media más larga en la circulación sanguínea debido a que poseen propiedades de camuflaje mejoradas permitiendo, así, una mayor oportunidad para que las NPs lleguen a sus células/tejido diana en el cuerpo.<sup>29</sup>

### 1.1.5.b. Funcionalización recubriendo con polímeros anfifílicos

Muchas NPs monodispersas necesitan ser sintetizadas en disolventes orgánicos a alta temperatura en presencia de ligandos hidrófobos, por lo que para poder ser empleadas en soluciones acuosas es necesario funcionalizarlas adicionalmente. Una forma de lograr NPs robustas, electrostáticamente estables en forma coloidal, con una distribución de tamaño estrecha y estables en agua es envolviéndolas con un polímero anfifílico. La funcionalización de NPs con polímeros anfifílicos se basa en la encapsulación de las NPs con dichos polímeros. La porción hidrofóbica del polímero se intercala con los ligandos hidrofóbicos en la superficie de la NP, mientras que el segmento hidrofílico se proyecta hacia el medio circundante formando una corona que estabiliza la NP.<sup>30</sup>

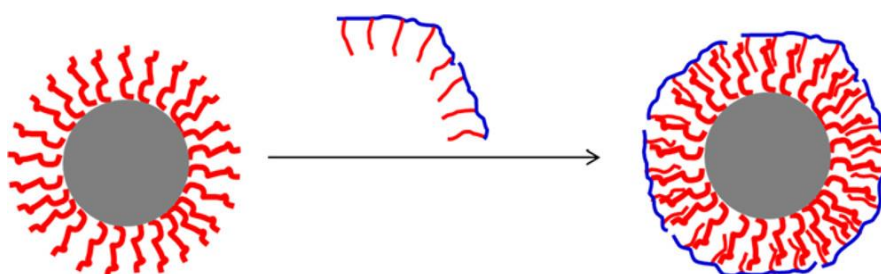


Figura 4: Los núcleos de las NPs (representados en gris), que están cubiertos con ligandos hidrofóbicos (representados en rojo), son modificados con un polímero anfifílico (el esqueleto hidrofílico dibujado en azul y las cadenas laterales hidrofóbicas dibujadas en rojo). El núcleo de la NP se incrusta en la micela de polímero resultante, lo que da como resultado una superficie de NP hidrofílica. (Adaptado con permiso de la referencia <sup>26</sup>).

En un estudio pionero realizado por el grupo de W. Parak se describió la funcionalización de NPs inorgánicas mediante un polímero anfifílico, derivado de una estructura de poli(anhídrido maleico).<sup>31</sup> Este polímero se modifica con cadenas laterales hidrofóbicas (DDA) y moléculas orgánicas funcionales para facilitar la transferencia de diversas NPs inorgánicas desde disolventes orgánicos a soluciones acuosas.

Este procedimiento ofrece la ventaja de permitir la modificación del polímero con un amplio rango de moléculas funcionales previo al recubrimiento de las NPs. Incluso moléculas que no son solubles en agua pueden ser integradas a la superficie de las NPs, puesto que la unión se lleva a cabo en un disolvente orgánico previo al recubrimiento con el polímero.

Este proceso de prefuncionalización puede ser estratégicamente útil para prevenir posibles inestabilidades coloidales que podrían surgir durante una etapa de modificación posterior. Una variedad de moléculas como, por ejemplo, PEG, biotina, galactosa y fluoresceína, pueden ser unidas a este polímero.<sup>31</sup>

### 1.1.6. Caracterización de NPs

La caracterización de las NPs es esencial para comprender y controlar sus propiedades y aplicaciones a escala nanométrica. Existen diversas técnicas de caracterización que se utilizan comúnmente en la investigación de NPs, algunas de las cuales se describen a continuación.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) y la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) constituyen técnicas extensamente empleadas para examinar la morfología, las dimensiones y la distribución de las NPs. La TEM proporciona imágenes de alta resolución de las partículas a escala atómica, mientras que la SEM suministra información acerca de la topografía superficial y la composición química.<sup>32</sup>

La difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés) representa otra técnica relevante en la caracterización de NPs inorgánicas, dado que posibilita la determinación de la estructura cristalina, la composición química y el tamaño del cristalito. La XRD se fundamenta en la interacción de los rayos X con la estructura cristalina de las NPs, generando patrones de difracción distintivos.<sup>32</sup>

La dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés) es un método empleado para medir el tamaño y la distribución del mismo en las NPs en suspensión. La DLS se basa en el análisis de las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada por las NPs a lo largo del tiempo, lo cual permite obtener información sobre el tamaño y la estabilidad de las partículas en suspensión.<sup>32-33</sup>

La espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis) se aplica para investigar las propiedades ópticas de las NPs, como la absorción y la dispersión de la luz. Esta técnica posibilita el estudio de las transiciones electrónicas en las NPs, lo que puede proporcionar información sobre la composición química y las propiedades ópticas específicas.<sup>32</sup>

Tabla 1: Ejemplos de técnicas que se emplean en la caracterización de las NPs y los parámetros obtenidos con cada técnica.

Técnica de caracterización	Parámetros obtenidos
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	Tamaño, forma, estructura cristalina, composición química
Microscopía electrónica de barrido (SEM)	Tamaño, forma, morfología superficial, distribución de partículas
Difracción de rayos X (XRD)	Estructura cristalina, tamaño de los cristalitos, orientación cristalina
Espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)	Composición elemental, estados de oxidación, coordinación y estructura local
Espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS)	Composición elemental, estados de oxidación, enlaces químicos
Espectroscopía de dispersión de luz (DLS)	Tamaño hidrodinámico, distribución de tamaños, potencial $\zeta$
Espectroscopía ultravioleta-visible (UV-Vis)	Absorción óptica, propiedades ópticas, tamaño y concentración de partículas
Análisis de seguimiento de NPs (NTA)	Tamaño de hidrodinámico, concentración, movimiento browniano
Adsorción de gas Brunauer-Emmett-Teller (BET)	Área superficial específica, tamaño de poro, volumen de poro
Análisis termogravimétrico (TGA)	Estabilidad térmica, composición, cambios de fase, pérdida de peso
Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado por Inducción (ICP)	Determinación cuantitativa de la composición elemental
Espectroscopia Raman	Estructura molecular, interacciones químicas y la simetría de las NPs
Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	Estructura molecular y los enlaces químicos
Termogravimetría Analítica (TGA)	Composición, estabilidad térmica y las propiedades de descomposición de diversos materiales

El análisis de seguimiento de NPs (NTA, por sus siglas en inglés) es un método óptico que permite medir el tamaño, la concentración y la distribución del tamaño de las NPs en suspensión. La NTA rastrea el movimiento browniano de las partículas en tiempo real y emplea el análisis de la trayectoria para obtener información sobre su tamaño y concentración.<sup>33</sup>

La técnica BET (Brunauer-Emmett-Teller) se emplea para determinar la superficie específica y el volumen de poros presentes en la estructura de las NPs. Dicho método se fundamenta en la adsorción de gases, tales como nitrógeno, en la superficie de las NPs y el análisis de la cantidad de gas adsorbido en función de la presión.<sup>32</sup>

La espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) ofrece información acerca de los grupos funcionales y las interacciones químicas en la superficie de las NPs.<sup>32</sup>

La termogravimetría analítica (TGA) es una técnica analítica térmica que mide la variación de masa de una muestra en función de la temperatura o el tiempo mientras se somete a un programa de calentamiento controlado. La TGA se utiliza para estudiar la composición, la estabilidad térmica y las propiedades de descomposición de diversos materiales, incluidos polímeros, compuestos orgánicos e inorgánicos, y materiales NMs.<sup>34-35</sup>

### 1.1.7. Propiedades y bioaplicaciones de NPs inorgánicas

Las NPs poseen características únicas que no se encuentran ni en las moléculas ni en materiales macroscópicos. Su tamaño les confiere un comportamiento híbrido, que combina aspectos propios de los cristales y de las moléculas.<sup>36</sup> El tamaño, forma y composición de las NPs inorgánicas son factores que determinan directamente sus propiedades, las cuales incluyen, entre otras, propiedades mecánicas, térmicas, magnéticas, electrónicas, ópticas y catalíticas particulares en comparación con los materiales masivos.<sup>37-38</sup> A su vez, estas propiedades determinan las aplicaciones potenciales de las NPs en áreas como la medicina,<sup>39</sup> la electrónica,<sup>40</sup> la catálisis<sup>41</sup> y la fabricación de materiales compuestos,<sup>42</sup> por mencionar algunas.

Al disminuir el tamaño de las partículas hasta la escala nanométrica, se incrementa su relación superficie-volumen. Esto conduce a cambios significativos en sus estructuras atómicas, electrónicas y magnéticas, así como en sus propiedades físicas y químicas en relación con el material a escala macroscópica. La forma de las NPs también influye en sus propiedades, como la anisotropía en las propiedades ópticas, magnéticas y catalíticas.<sup>43</sup>

La anisotropía se refiere a la variabilidad en las propiedades de un material en función de la dirección en la que se midan. Así, una NP puede exhibir comportamientos diferentes en función de su orientación espacial. Además, la presencia de defectos estructurales y la tensión superficial inherente a las NPs pueden contribuir significativamente a su mayor reactividad. Estos factores, a menudo, están directamente influenciados por la forma de las NPs. Por ejemplo, NPs de formas no esféricas pueden presentar una mayor cantidad de defectos y una mayor tensión superficial que sus homólogas esféricas, lo que podría conducir a una mayor reactividad química.<sup>44</sup> Algunas formas comunes de NPs inorgánicas incluyen esféricas, alargadas, cúbicas, hexagonales y de láminas delgadas.

En cuanto a las propiedades ópticas, electrónicas y magnéticas, las NPs inorgánicas exhiben características únicas. Por ejemplo, las NPs semiconductoras, como los puntos cuánticos, presentan propiedades ópticas y electrónicas singulares que se derivan del fenómeno conocido como confinamiento cuántico. En este contexto, el tamaño de la partícula se torna

comparable o incluso inferior a la longitud de onda de los electrones, lo que da lugar a un comportamiento cuántico de las partículas.<sup>45</sup> Esto implica que los electrones están confinados en un espacio reducido, lo que modifica las propiedades de absorción y emisión de luz de las partículas, permitiendo su utilización en una diversidad de aplicaciones, incluyendo la imagen celular, la administración de fármacos y agentes de contraste para detección de cáncer.<sup>46</sup>

Las NPs metálicas, específicamente las de oro y plata, exhiben características ópticas singulares atribuibles a su comportamiento plasmónico. Este fenómeno plasmónico se deriva de la oscilación colectiva de los electrones de conducción inducida por la incidencia de la luz. Como resultado, estas NPs manifiestan propiedades ópticas únicas.<sup>47</sup> Las NPs de oro y plata pueden absorber y dispersar luz de una manera altamente eficiente, lo que las hace útiles en una variedad de aplicaciones, desde la detección de moléculas<sup>48</sup> hasta la terapia fototérmica, en la que se utilizan para generar calor y destruir células cancerosas.<sup>47</sup>

Por otro lado, las MNPs pueden exhibir propiedades superparamagnéticas incluso a temperatura ambiente. Esta característica implica que, una vez eliminado el campo magnético externo, las partículas dejan de manifestar interacción magnética entre sí.<sup>49</sup> Este atributo las convierte en candidatas especialmente atractivas para aplicaciones médicas.<sup>50</sup> Por ejemplo, se emplean en la hipertermia magnética, un proceso en el cual generan calor para destruir células cancerosas. Además, se utilizan en el desarrollo de biosensores, en la administración dirigida de fármacos, y como agentes de contraste en la resonancia magnética (MRI), entre otras aplicaciones.<sup>50</sup>

La reactividad inherente a una NP catalítica se ve principalmente influenciada por la energía de los átomos superficiales, un parámetro que puede evaluarse a través del número de átomos adyacentes, así como por los modos de enlace y las energías asociadas a las moléculas pequeñas que se transformarán en la superficie de la NP.<sup>51</sup> La eficacia catalítica, que representa la habilidad de un catalizador para estimular una reacción química, es notablemente mayor en las NPs en comparación con sus homólogos macroscópicos. Este incremento en la eficacia se atribuye mayormente a la alta relación superficie-volumen que las NPs ostentan, resultando en una disponibilidad ampliada de sitios activos, es decir, los lugares en la superficie del catalizador donde se produce la reacción. La actividad de las NPs catalíticas puede ser modulada por diversos factores, como el pH, la temperatura, el entorno circundante y los iones metálicos.<sup>52</sup> Estas han encontrado aplicaciones en diversas áreas, como los biosensores, el tratamiento de la contaminación ambiental, el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, como agentes antibacterianos, y en la citoprotección contra biomoléculas específicas en la célula, entre otras.<sup>52</sup>

### 1.1.8. Toxicidad de las NPs inorgánicas

El potencial tóxico de las NPs inorgánicas puede verse modulado por diversas características intrínsecas, incluyendo el tamaño, la forma, la composición química, la solubilidad, la agregación, los ligandos presentes, el estado de oxidación y la absorción de partículas, como se comentó con anterioridad. Estos factores pueden influir significativamente en la interacción de las NPs con sistemas biológicos y su capacidad para atravesar barreras biológicas.<sup>53</sup>

Es importante destacar que la toxicidad de las NPs no es homogénea entre los diferentes individuos y especies, y puede variar significativamente debido a las diferencias genéticas, las condiciones de exposición y los factores ambientales.<sup>53</sup>

Los mecanismos subyacentes de la toxicidad asociada a las NPs inorgánicas a menudo implican la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción excesiva de ROS puede inducir estrés oxidativo, provocar inflamación, causar daños en el ADN, y alteraciones en la función celular.<sup>54</sup> Además, se ha observado que determinadas NPs tienen la capacidad de acumularse en órganos vitales, como el hígado, los pulmones y los riñones. Este fenómeno puede conllevar daños en las mitocondrias, mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y, en última instancia, apoptosis o muerte celular.<sup>55</sup>

## 1.2. NPs plasmónicas

Las NPs plasmónicas son materiales de particular interés debido a su capacidad para interactuar con la radiación electromagnética, lo que hace que tengan una gran potencial aplicación en diversas áreas como la biomedicina, energía y la electrónica, como se comentó anteriormente.<sup>56-57</sup> En particular, las NPs plasmónicas presentan una resonancia plasmónica de superficie localizada (LSPR del inglés *Localized Surface Plasmon Resonance*), que se produce cuando los electrones libres en la superficie metálica son excitados por la componente eléctrica de la radiación electromagnética, generando una oscilación coherente de los electrones de conducción alrededor de la partícula a una frecuencia resonante que produce un campo electromagnético localizado.<sup>58</sup> En NPs metálicas de oro, plata, cobre, entre otras, la frecuencia del LSPR se encuentra en la región del espectro visible, dando lugar a una intensa absorción y dispersión de luz en dicha región, siendo la razón de las intensas coloraciones que exhiben sus dispersiones coloidales.<sup>59</sup>

El LSPR concentra el campo eléctrico de la luz sobre la superficie de la partícula, amplificándolo en varios órdenes de magnitud. Este campo electromagnético se debilita gradualmente a medida que se aleja de la superficie de la NP.<sup>60</sup> Las características espectrales del LSPR dependen del tamaño, la geometría, la composición y el índice de refracción del entorno de la NP.<sup>61-62</sup> Por lo tanto, el control de estas propiedades resulta esencial para su aplicación en distintas áreas. Por ejemplo, la absorción y dispersión de luz se pueden ajustar mediante la modificación de la forma y tamaño de las NPs plasmónicas, lo que permite la sintonización de su espectro de absorción a diferentes longitudes de onda.<sup>62</sup>

A medida que aumenta el tamaño de la NP, la posición de la LSPR se desplaza hacia longitudes de onda mayores (rojo) y la intensidad de la resonancia aumenta. Este fenómeno es atribuible a la modificación del confinamiento espacial y la distribución de los electrones libres en la superficie de las NPs. Sin embargo, un aumento excesivo en el tamaño de la NP puede llevar a la aparición de modos plasmónicos de orden superior y a una disminución de la calidad de la LSPR.<sup>63</sup>

En lo que respecta a la forma, las NPs plasmónicas presentan geometrías variadas, como esferas, barras, cubos y estrellas, con perfiles de LSPR distintos. Por ejemplo, las AuNR exhiben dos modos de resonancia plasmónica: uno transversal y otro longitudinal. El modo longitudinal es más sensible a los cambios en el entorno de la NP y presenta una mayor intensidad de campo cercano en comparación con el modo transversal.<sup>64</sup>

El entorno de las NPs plasmónicas, incluyendo el índice de refracción del medio circundante y la presencia de moléculas o partículas cercanas, afecta también significativamente a la LSPR. Las variaciones en el índice de refracción pueden ocasionar desplazamientos en la posición del LSPR, lo cual facilita el desarrollo de sensores basados en NPs plasmónicas sensibles a cambios en el medio.<sup>60</sup>

### 1.2.1. La teoría de Mie

Para modelar y predecir cómo las NPs metálicas interactúan con la luz, incluyendo la absorción, dispersión y las propiedades ópticas resultantes, se hace uso de la teoría de Mie.<sup>61, 65</sup> La teoría fue desarrollada por Gustav Mie en 1908 y es una generalización de la teoría más simple de Rayleigh, que solo es aplicable a partículas mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz. La teoría de Mie permite calcular la eficiencia de absorción y dispersión en función de la composición, el tamaño y el índice de refracción de la partícula y del medio circundante.

Cuando sobre una solución de NPs metálicas dispersas en agua incide la luz, las NPs absorben y dispersan luz, la cual puede ser cuantificada mediante un espectrofotómetro. La interacción entre una suspensión coloidal ideal diluida de concentración  $N$  partículas por volumen y la luz de intensidad  $I_0$ , a lo largo de un camino óptico de  $x$  cm, resulta en la atenuación de la intensidad de luz que llega al detector del equipo, pudiéndose expresar la absorbancia de la siguiente forma:

$$A = \log[I_0/I(x)] = N\sigma x/2,303 \quad (2)$$

donde  $\sigma$  es la sección eficaz de extinción de una partícula, que puede expresarse como<sup>61</sup>

$$\sigma = \frac{2\pi}{(kR)^2} \sum_{n=1}^{n=\infty} (2n+1) \text{Re}\{a_n + b_n\} \quad (3)$$

siendo  $a_n$  y  $b_n$  los coeficientes de dispersión,  $R$  el radio de la partícula,  $\text{Re}$  se refiere a la parte real y  $n$  los distintos órdenes de multipolo, siendo  $k$ ,<sup>61</sup>

$$k = 2\pi \frac{\sqrt{\epsilon_m}}{\lambda} \quad (4)$$

donde  $\epsilon_m$  es la constante dieléctrica del medio en el que están dispersas las partículas.

Para NPs esféricas pequeñas con radios mucho más pequeños que la longitud de onda de la luz incidente ( $R \sim 10$  nm), es posible simplificar la ecuación (3) y considerar únicamente la contribución dipolar ( $n=1$ ), mediante la ecuación,<sup>61</sup>

$$\sigma = \frac{24\pi^2 R^3 \epsilon_m^{3/2}}{\lambda} \frac{\epsilon''}{(\epsilon' + 2\epsilon_m)^2 + \epsilon''^2} \quad (5)$$

siendo  $\epsilon'(\lambda) + i\epsilon''(\lambda)$  la función dieléctrica compleja del metal. Bajo estas circunstancias, la extinción de luz por las NPs depende del radio de las partículas, la composición de estas (constantes dieléctricas  $\epsilon'$  y  $\epsilon''$ ) y la constante dieléctrica del medio ( $\epsilon_m$ ). El denominador de la ecuación (5) predice un máximo cuando,

$$\epsilon' = -2\epsilon_m \quad (\text{si } \epsilon'' \ll \epsilon' + 2\epsilon_m) \quad (6)$$

lo cual ocurre en el visible para AuNP, plata y cobre siendo la explicación a la intensa coloración que presentan estas dispersiones coloidales.<sup>63</sup>

Si la dispersión de la luz es despreciable, se pueden distinguir dos casos límite en la ecuación (5) en los que la  $\sigma$  es 0. El primero es una partícula de un material que no absorba radiación, cuya constante dieléctrica es nula ( $\epsilon''=0$ ), y el segundo una partícula que refleja toda la luz ( $\epsilon''=\infty$ ). En el caso de partículas de tamaño en el que la dispersión de la luz no es despreciable, se producen variaciones en la frecuencia de resonancia, desplazándose la posición del plasmón hacia longitudes de onda mayores al aumentar el tamaño de la partícula.

Aunque la teoría de Mie proporciona resultados precisos para NPs esféricas, su aplicación a NPs con formas más complejas requiere de aproximaciones numéricas, como el método de los elementos finitos (FEM) o el método de los momentos discretos (DMM).<sup>66</sup> Estos métodos permiten abordar casos más complicados y adaptarse a una variedad más amplia de situaciones y aplicaciones en las que las NPs metálicas juegan un papel crucial.

### 1.2.2. Aplicaciones de las NPs plasmónicas

Numerosas aplicaciones aprovechan la capacidad de ajuste del LSPR, como por ejemplo la espectroscopia Raman mejorada por superficie (SERS, por sus siglas en inglés), las etiquetas plasmónicas, terapias basadas en partículas, detección de analitos o la catálisis, entre otras.<sup>61</sup> De entre estas aplicaciones, se aborda de manera concisa la espectroscopía SERS, dado que es de relevancia para la presente tesis.

La espectroscopia Raman es una técnica de caracterización no destructiva basada en la interacción entre la luz y las vibraciones moleculares de los materiales. Esta técnica ha demostrado ser una herramienta versátil y confiable en el análisis de composición química y propiedades estructurales de una amplia gama de materiales. Sin embargo, la señal Raman intrínseca de muchos compuestos es débil, lo que limita su aplicabilidad en la detección de especies en bajas concentraciones y sistemas complejos.<sup>67</sup> Para superar esta limitación, se ha desarrollado la técnica de SERS, que permite la detección de moléculas de baja concentración a través de la amplificación de campos electromagnéticos generados por la excitación de plasmones de superficie localizados.<sup>68</sup>

La SERS es una variante de la espectroscopía Raman tradicional que emplea nanoestructuras metálicas para amplificar la señal Raman de las moléculas adsorbidas en la superficie. Dos mecanismos principales contribuyen a la mejora de la señal: el electromagnético y el químico.<sup>68</sup>

El mecanismo electromagnético es el que más contribuye a la mejora de la señal Raman. Este surge de la amplificación de la luz mediante la excitación de la LSPR, que ocurre predominantemente en los huecos, hendiduras y puntas de los materiales plasmónicos. Dependiendo del material, el factor de mejora teórico puede alcanzar valores entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$ .<sup>68</sup>

Por otro lado, el mecanismo químico se debe a los procesos de transferencia de carga entre la molécula y la superficie metálica, con factores teóricos de mejora que pueden llegar hasta  $10^3$ .<sup>68</sup>

Desde su descubrimiento por R. Van Duyne y colaboradores en 1977,<sup>69</sup> la técnica de SERS ha experimentado un desarrollo acelerado en términos de diseño de sustratos, optimización de

condiciones experimentales y aplicaciones prácticas. Este avance constante destaca la relevancia y versatilidad de SERS en el campo de la espectroscopía.

### 1.3. Marcos organometálicos

Los marcos organometálicos (MOFs por sus siglas en inglés) son una clase de materiales porosos híbridos constituidos por centros metálicos y ligandos orgánicos (Figura 5). Estos componentes se unen mediante enlaces de coordinación para formar estructuras tridimensionales caracterizadas generalmente por una elevada área superficial y porosidad.<sup>70</sup> El concepto de MOF fue introducido por primera vez en la literatura científica en 1995.<sup>71</sup> Desde entonces, estos materiales han despertado un interés creciente en la comunidad científica, gracias a sus singulares propiedades y su extraordinaria versatilidad. Esta combinación de factores ha dado lugar a un amplio espectro de aplicaciones, convirtiendo a los MOFs en un área de investigación de enorme relevancia en el campo de los materiales avanzados.<sup>70</sup>

El avance en el diseño y desarrollo de los MOFs ha sido impulsado por la necesidad de materiales con propiedades particulares y funciones específicas para una diversidad de aplicaciones. Entre estas se incluyen el almacenamiento de gases,<sup>72</sup> la catálisis,<sup>73</sup> la separación de gases,<sup>74</sup> y la liberación controlada de fármacos,<sup>75</sup> entre otros. La versatilidad inherente a los MOFs radica en su estructura modular, la cual permite una considerable variabilidad en la selección de centros metálicos y ligandos orgánicos, así como en la configuración y topología de las redes que los constituyen. Esta diversidad estructural se traduce en una amplia gama de propiedades, lo que hace que los MOFs sean materiales altamente prometedores y adaptables a diferentes necesidades.<sup>70</sup>

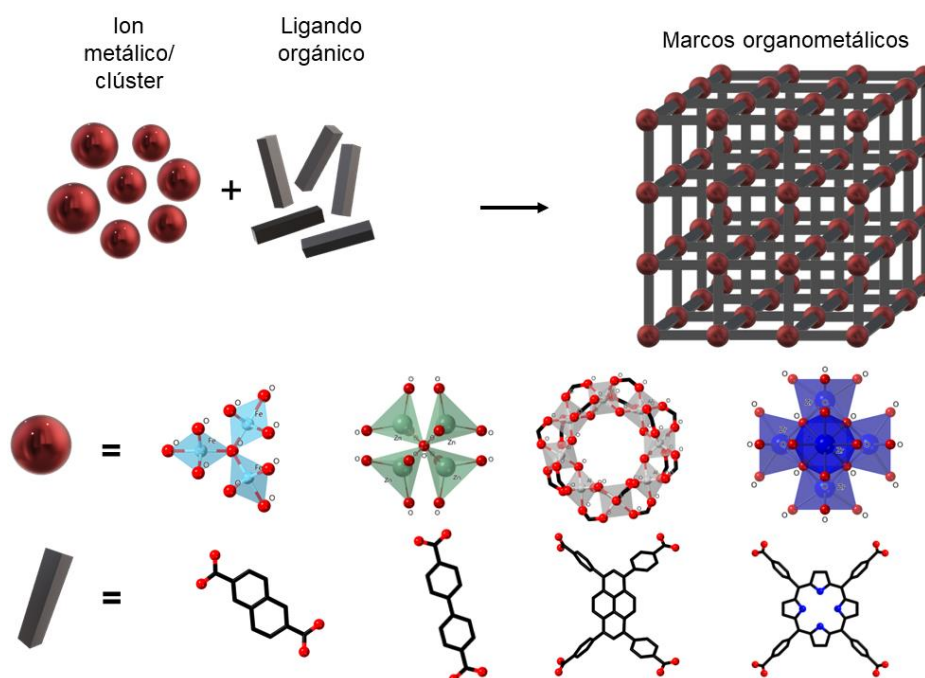


Figura 5: Representación esquemática de los MOF, mostrando algunas de las Unidades de Construcción Secundaria y conectores representativos (Adaptado con permiso de la referencia 76)

La importancia de los MOFs en el desarrollo tecnológico radica en su capacidad para combinar las propiedades de los materiales inorgánicos y orgánicos en una sola estructura. Esta característica híbrida les confiere una serie de ventajas frente a otros materiales porosos tradicionales, como las zeolitas y los carbones activados, entre las que destacan su mayor porosidad, área superficial y posibilidad de modificación química.<sup>77</sup>

Los MOFs pueden clasificarse en función del tamaño de los poros presentes en la estructura, distinguiéndose entre microporosidad (< 2 nm), mesoporosidad (2-50 nm) y macroporosidad (> 50 nm). En términos generales, los MOFs suelen presentar poros en el espectro de la microporosidad y mesoporosidad. Además, la superficie específica de un MOF es un parámetro que indica la cantidad de área superficial disponible por unidad de masa del material, y está directamente relacionada con la capacidad de adsorción y la eficiencia catalítica del MOF. Algunos MOFs pueden alcanzar áreas superficiales extremadamente elevadas, con un área superficial BET que oscila entre 1000 y 7000 m<sup>2</sup>/g.<sup>78</sup> Esta es notablemente superior a las áreas superficiales de otros materiales porosos convencionales como, por ejemplo, las NPs mesoporosas de silicio, que generalmente se encuentran en el rango de 700 a 1200 m<sup>2</sup>/g.<sup>77-78</sup>

La síntesis de MOFs se puede llevar a cabo mediante una variedad de métodos que permiten controlar y ajustar las características estructurales y funcionales del material obtenido. Los factores que influyen en la síntesis de MOFs incluyen la temperatura, el tiempo, la presión, la concentración de los reactivos y la presencia de moduladores o aditivos en la mezcla de reacción.<sup>79</sup> El control adecuado de estos parámetros puede resultar en la obtención de MOFs con características específicas y mejoradas, como una mayor estabilidad química y térmica, o una mayor área superficial y porosidad.

Se han identificado y desarrollado diversas familias de Marcos Orgánicos Metálicos (MOFs), cada una con características y composiciones distintivas. Algunas de las familias y tipos más relevantes de MOFs comprenden:

- ZIFs (Zeolitic Imidazolate Frameworks): La familia ZIF se caracteriza por el uso de imidazolatos como ligandos orgánicos.<sup>80</sup>
- UiO (Universitetet i Oslo): Los MOFs UiO utilizan zirconio como centro metálico y se enlazan a través de varios tipos de ácidos orgánicos, como el ácido tereftálico. UiO-66 y UiO-67 son dos de los MOFs más estudiados en esta familia.<sup>81</sup>
- HKUST-1 (Hong Kong University of Science and Technology-1): El HKUST-1 es un MOF tridimensional compuesto por centros metálicos de cobre y ligandos orgánicos basados en ácidos tricarbónicos.<sup>82</sup>
- MIL (Materials Institute Lavoisier): La serie MIL de MOFs utiliza una variedad de centros metálicos, incluyendo aluminio, cromo, hierro y escandio. Los enlaces orgánicos suelen ser ácidos orgánicos, como el ácido tereftálico.<sup>83</sup>
- PCN (porous coordination network): Los MOFs PCN utilizan zirconio como centro metálico y una variedad de ligandos orgánicos, como la porfirina.<sup>84</sup>
- NU (Northwestern University): Los MOFs NU utilizan zirconio como centro metálico y una variedad de ligandos orgánicos. Algunos ejemplos incluyen NU-1000 y NU-1100.<sup>85</sup>

Tabla 2: Ejemplos de algunos de los MOFs más utilizados con sus correspondientes centros metálicos, ligandos y topología.

MOF	Centros metálicos	Ligandos		Topología	Ref
ZIF-8	Zn	2-metilimidazolato		Sodalita (sod)	86
UiO-66	Zr	Ácido tereftálico		Cúbica centrada en las caras (fcu)	87
HKUST-1	Cu	1,3,5-bencenetricarboxilato		Boracita retorcida (tbo)	88
MIL-53	Al, Ga, Cr, Fe, Sc	1,4-bencenodicarboxilato		Poros unidimensionales	89
PCN-222	Zr <sub>6</sub>	meso-tetrakis (4-carboxifenil)porfirina		Csq	90
NU-1000	Zr <sub>6</sub>	1,3,6,8-tetrakis(p-ácido benzoico)pireno		Csq	91

Dentro del contexto de esta tesis, es pertinente abordar con mayor detenimiento la familia de MOFs de los ZIFs. Los ZIFs son una clase de materiales porosos que denominan "zeolíticos" por la similitud estructural que presentan estos materiales con las zeolitas, un tipo de materiales porosos muy utilizados en la industria para la adsorción y separación de moléculas. Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos con una estructura porosa, es decir, presentan una red tridimensional de canales y cavidades conectados entre sí que permiten la difusión de moléculas a través de ellas. Los ZIFs presentan una estructura porosa similar a la de las zeolitas, pero en lugar de aluminosilicatos, están formados por iones metálicos y ligandos imidazolatos que se organizan de forma ordenada y repetitiva, lo que da lugar a estructuras porosas con una alta superficie específica y capacidad de adsorción (Figura 6, A y B).<sup>92</sup> De esta forma, los ZIFs comparten las propiedades porosas y selectivas de las zeolitas.

Los ZIFs pueden contener una variedad de centros metálicos, incluyendo zinc (Zn), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), hierro (Fe), entre otros. El tipo de centro metálico presente en un ZIF puede influir en las propiedades físicas y químicas del material, incluyendo la estabilidad térmica, la selectividad de adsorción y las propiedades catalíticas. Respecto a los imidazolatos, existen gran variedad de ligandos, como MI, 2-etilimidazol, 2-benzimidazol, entre otros, que pueden variar en longitud y ramificación, lo que puede influir en la estructura y propiedades del ZIF resultante (Figura 6, B). Además, se puede modificar la estructura y las propiedades de los imidazolatos, con la introducción de grupos funcionales específicos para mejorar la capacidad de adsorción selectiva o la actividad catalítica de los ZIFs.<sup>93</sup>

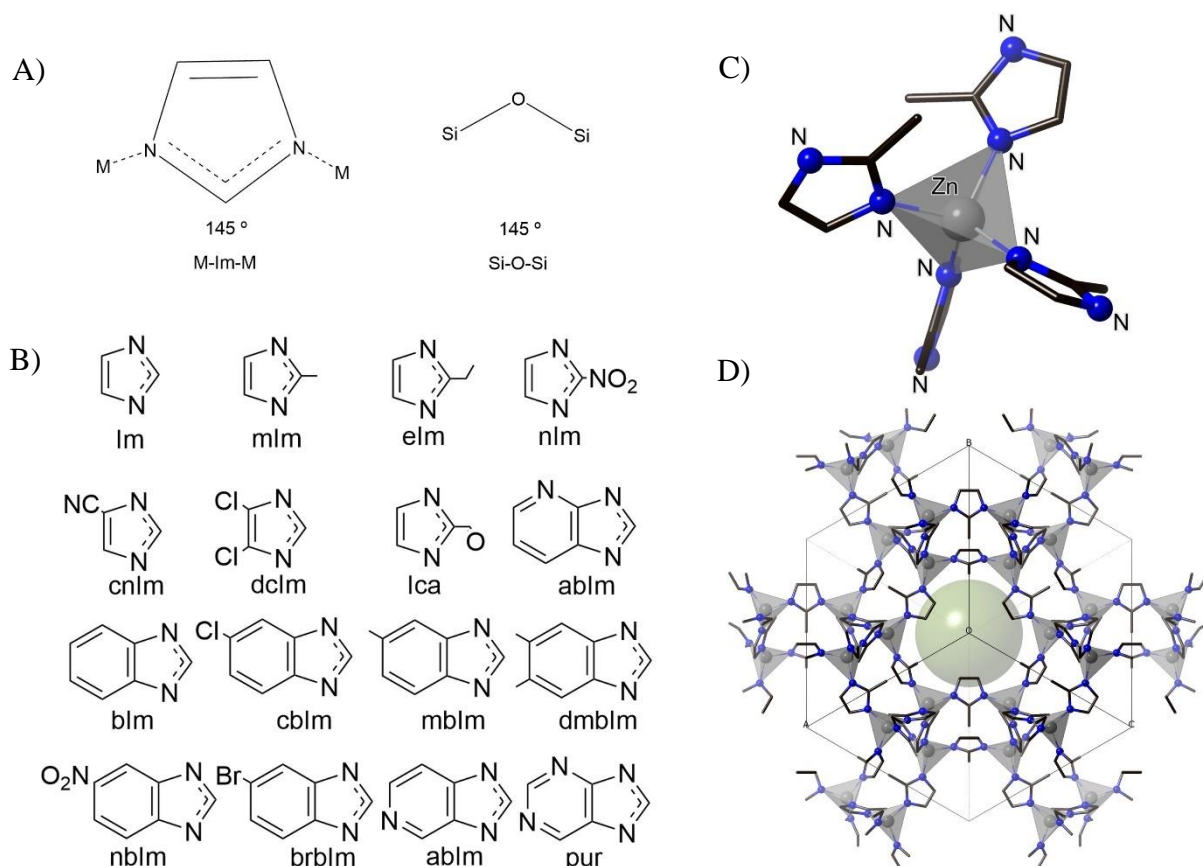


Figura 6: Comparación entre la estructura formada por la unión del imidazolato con los centros metálicos del ZIF con la de la unión del oxígeno-silicio de las zeolitas (a). Diferentes ligandos que pueden presentar los ZIFs (b). Estructura representativa del Zn tetracoordinado con ligandos imidazolato del ZIF-8 (c). Red tridimensional representativa del ZIF-8 (d).

Dentro de la familia de los ZIFs, el ZIF-8 ha sido ampliamente estudiado y utilizado en aplicaciones en diversos campos como la separación<sup>94</sup>, sensores<sup>95</sup>, catálisis<sup>96</sup>, y la nanomedicina<sup>97</sup>, entre otros. El ZIF-8 está compuesto por iones de zinc y ligandos imidazolato. Los iones de Zn están conectados entre sí a través de cuatro imidazolatos, formando una red tridimensional (Figura 6, C y D). Cada imidazolato tiene dos átomos de nitrógeno que se coordinan con dos iones de zinc vecinos, formando enlaces metal-ligando. El resultado es una estructura altamente porosa con una topología cristalina tipo sodalita, es decir, una estructura cristalina tridimensional que se caracteriza por tener grandes cavidades en su interior, con una alta superficie específica y un tamaño de poro uniforme. Los poros tienen un diámetro de 11,6 Å, conectados a través de pequeñas aperturas de 3.4 nm, lo que los hace adecuados para la adsorción y separación de moléculas de tamaño pequeño a medio. Además, el ZIF-8 presenta una excelente estabilidad térmica y química, lo que lo hace adecuado para aplicaciones en catálisis, separación y almacenamiento de gases, entre otros campos.<sup>98</sup>

La síntesis del ZIF-8 es relativamente sencilla y se realiza mediante la mezcla de sales de zinc y MI en una solución acuosa o en un solvente orgánico, como el MeOH o el DMF. La formación del ZIF-8 ocurre en un proceso de autoensamblaje a temperatura ambiente o a temperaturas moderadas.

## 1.4. NPs MAGNÉTICAS

Las NPs magnéticas están compuestas de elementos magnéticos, como hierro, níquel, cobalto y sus óxidos. Su comportamiento magnético único está fuertemente influenciado por el efecto de su tamaño y superficie, así como por su interacción con el campo magnético aplicado. La principal característica es que pueden ser manipuladas por un campo magnético externo, propiedad que las convierten en una herramienta valiosa en una variedad de bioaplicaciones como, por ejemplo, la administración dirigida de fármacos y genes, ingeniería de tejidos, seguimiento de células, imagen de resonancia magnética y bioseparación.<sup>99</sup>

### 1.4.1. Magnetismo

Los fundamentos del magnetismo están relacionados principalmente con el movimiento de los electrones. Hay dos contribuciones principales al momento magnético de un electrón: el momento magnético orbital, que se origina por el movimiento del electrón alrededor del núcleo atómico, y el momento magnético de espín, que está asociado con el espín intrínseco del electrón. En ciertos materiales, los momentos magnéticos de los electrones se alinean de manera paralela o antiparalela, lo que resulta en la formación de momentos magnéticos netos, también conocidos como momentos de espín.

Los materiales magnéticos pueden clasificarse, según cómo interactúan con los campos magnéticos en ferro(ferri)magnéticos, antiferromagnéticos, paramagnéticos y diamagnéticos.

Los materiales ferromagnéticos presentan una magnetización espontánea y remanente, incluso en ausencia de un campo magnético externo, debido a la interacción de intercambio entre los momentos magnéticos de los electrones. Estos materiales, como el hierro y el cobalto, tienen una alta susceptibilidad magnética y muestran un comportamiento de histéresis.<sup>100</sup>

Los materiales ferrimagnéticos, al igual que los ferromagnéticos, pueden retener la magnetización después de que se retira el campo magnético. Sin embargo, la magnetización en materiales ferrimagnéticos es el resultado de las contribuciones magnéticas opuestas pero desiguales de dos subredes de átomos.<sup>100</sup> Ejemplos de este tipo de materiales son la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ).

En los materiales antiferromagnéticos los momentos magnéticos de los átomos o iones están alineados en direcciones opuestas, lo que da como resultado una magnetización neta cero en ausencia de un campo magnético externo. Sin embargo, en presencia de un campo magnético externo, estos materiales pueden mostrar una respuesta paramagnética.<sup>100</sup>

Los materiales paramagnéticos exhiben una respuesta magnética positiva a un campo magnético externo, lo que significa que se magnetizan en la misma dirección del campo magnético aplicado. Sin embargo, a diferencia de los materiales ferromagnéticos, no retienen la magnetización después de que se retira el campo magnético. Ejemplos de materiales paramagnéticos incluyen el aluminio y el oxígeno gaseoso.<sup>100</sup>

Los materiales diamagnéticos no tienen momentos magnéticos intrínsecos y desarrollan una magnetización inducida débil en dirección opuesta al campo magnético aplicado; ejemplos de ellos incluyen gases nobles y líquidos iónicos.<sup>100</sup>

### 1.4.2. Histéresis

En el caso de materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos, la relación entre la intensidad del campo magnético aplicado ( $H$ ) y la resultante magnetización del material ( $M$ ) se representa mediante una curva, denominada de histéresis. Esta curva, característicamente no lineal y que no intercepta el origen, sugiere que la magnetización del material no es simplemente proporcional al campo magnético aplicado.

Un aspecto fundamental del ciclo de histéresis es la presencia de una magnetización remanente y el campo coercitivo. La magnetización remanente se refiere a la magnetización residual del material una vez que el campo magnético aplicado ha sido disminuido a cero. Por otro lado, el campo coercitivo es el campo magnético inverso necesario para anular la magnetización del material. Ambas propiedades son indicativas de la resistencia del material a modificaciones en su estado de magnetización.

Los materiales magnéticos se clasifican en "blandos" y "duros", basándose en sus características de histéresis. Los materiales blandos exhiben un ciclo de histéresis estrecho, lo que indica que pueden ser magnetizados y desmagnetizados con facilidad. Contrariamente, los materiales duros presentan un ciclo de histéresis más amplio, lo cual significa que requieren una mayor cantidad de energía para alterar su estado de magnetización. Esta diferenciación es esencial para el diseño y la selección de materiales en diversas aplicaciones magnéticas.

### 1.4.3. Magnetismo a escala nano

El magnetismo en las NPs se ve influenciado por el tamaño y la dimensionalidad de las partículas. A medida que el tamaño de las partículas disminuye hasta llegar a la escala nanométrica se producen cambios en sus propiedades magnéticas.

La anisotropía magnética es una propiedad intrínseca de los materiales magnéticos que describe la preferencia de orientación del momento magnético en relación con una dirección específica. En el caso de las NPs magnéticas, la anisotropía se ve afectada por el tamaño, la forma y la estructura cristalina de las partículas. La anisotropía magnética influye en la estabilidad del momento magnético y, por tanto, en las propiedades magnéticas de las NPs.<sup>101</sup>

En los materiales magnéticos de escala macroscópica, la minimización de la energía magnetostática del material se logra mediante la formación de dominios magnéticos. Estos dominios están separados por paredes de Bloch, zonas de transición donde los momentos magnéticos varían de manera gradual de un dominio a otro.

La formación de estas paredes de Bloch se origina a través de un proceso guiado por el equilibrio entre dos factores: En primer lugar, la energía magnetostática, que incrementa proporcionalmente al volumen del material; y en segundo lugar, la energía de la pared de dominio, que aumenta en proporción directa con el área interfacial entre los dominios.<sup>102</sup>

Al alcanzar un diámetro de partícula crítico, la energía necesaria para la formación de las paredes de dominio supera la requerida para soportar la energía magnetostática externa. Como consecuencia de este fenómeno, la formación de paredes de dominio cesa, resultando en un material que es monodominio. El diámetro crítico<sup>102</sup> para que esto suceda en el caso de MNPs esféricas viene dado por:

$$D_c \approx 18 \frac{\sqrt{A k}}{\mu_0 M^2} \quad (7)$$

donde A es la constante de intercambio, K es la constante de anisotropía efectiva,  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío y M es la magnetización de saturación. Para la mayoría de los NMs magnéticos,  $D_c$  estará en el rango de 10-100 nm, aunque para materiales con alta anisotropía magnética este valor puede ser mayor.

Otro efecto importante a escala nano es el superparamagnetismo. La energía de anisotropía magnética de cada partícula, que mantiene los momentos magnéticos orientados en una dirección específica es:<sup>102</sup>

$$E(\theta) = k V \text{sen}^2\theta \quad (8)$$

donde V es el volumen de la partícula, K la constante de anisotropía y  $\theta$  es el ángulo entre la magnetización y el eje fácil.<sup>1</sup>

Conforme disminuye el tamaño de la partícula, la energía térmica ( $k_B T$ , donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann y T la temperatura) puede ser mayor que  $kV$ ; bajo estas circunstancias la magnetización de la partícula puede invertirse con facilidad.

El tiempo de relajación,  $\tau$ , de una partícula es descrito por la expresión de Néel-Brown:<sup>102</sup>

$$\tau = \tau_0 \left( \frac{K V}{k_B T} \right) \quad (9)$$

donde  $\tau_0$  es del orden de  $10^{-9}$  s.

Así pues, si el momento magnético de la partícula se invierte en un tiempo menor que las escalas temporales experimentales, se dice que el sistema se encuentra en un estado superparamagnético y no presenta histéresis magnética.<sup>102</sup>

#### 1.4.4. Hipertermia

El origen de la generación de calor en las NPs magnéticas (MNPs) al aplicarles un AMF (del inglés Alternating Magnetic Field) surge debido a diferentes procesos de inversión de la magnetización en el sistema de partículas: histéresis, y relajación de Néel o Brown.<sup>103</sup> Estos mecanismos hacen que las MNPs conviertan la energía del campo magnético en calor, lo que puede ser utilizado en aplicaciones biomédicas como la hipertermia magnética.

Las pérdidas magnéticas por histéresis, que representan la cantidad de energía disipada durante cada ciclo de reversión de la magnetización, pueden cuantificarse mediante la integración del área encerrada en las curvas de histéresis. Estas pérdidas son fuertemente dependientes tanto de la amplitud del campo magnético como del historial magnético previo del material, es decir, cómo se ha magnetizado y desmagnetizado en el pasado.<sup>103</sup>

El calentamiento por relajación de Néel se debe a la reorientación del momento magnético de las MNPs en respuesta al campo magnético aplicado (Figura 7, A). Cuando se aplica un

AMF, el momento magnético de las MNPs intenta alinearse con la dirección del campo. Sin embargo, debido a la anisotropía magnética y la energía térmica, el momento magnético no se alinea perfectamente y experimenta una rotación. Esta rotación del momento magnético provoca una pérdida de energía en forma de calor. La relajación de Neél es el mecanismo dominante de generación de calor en NPs magnéticas con tamaños menores al diámetro crítico.<sup>104</sup>

El calentamiento por relajación de Brown se origina por la rotación física de las MNPs en respuesta al campo magnético aplicado (Figura 7, B). Cuando se aplica un AFM, las NPs experimentan una fuerza magnética que las hace girar en la dirección del campo. Durante este proceso de rotación, las NPs experimentan una resistencia viscosa del medio circundante, lo que resulta en una disipación de energía en forma de calor. La relajación de Brown es más relevante en NPs magnéticas de mayor tamaño o en aquellas que están fuertemente ligadas a su entorno.<sup>104</sup>

La capacidad de las MNPs para generar calor bajo un AMF se cuantifica a través de la SAR (por sus siglas en inglés de Specific Absorption Rate) o también a través del SLP (por sus siglas en inglés de *Specific Loss Power*).

El SLP es una magnitud que describe la potencia generada por gramo de material magnético en los tejidos o cultivos ( $\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$ ). Esta medida es proporcional a la pendiente inicial de la curva de calentamiento en un experimento de hipertermia magnética. En el contexto de la medición de hipertermia magnética, el SLP se deriva de la siguiente manera:<sup>105</sup>

$$\text{SLP} = \frac{m_d}{m_n} C_p \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (10)$$

siendo  $C_p$  el calor específico del coloide en  $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{C}^{-1}$  (para concentraciones bajas de MNPs, es igual a la capacidad calorífica del medio de suspensión),  $m_d$  y  $m_n$  son la masa del disolvente y de las NPs en mg, respectivamente y  $\Delta T/\Delta t$  es la pendiente en  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ .

El SAR es una medida de la eficiencia con la que absorbe la energía en un objeto o tejido cuando se somete a un campo de radiofrecuencia (RF).<sup>106</sup> Los valores de SAR depende de varios factores, como el tamaño de las NPs, su composición, estructura, la frecuencia y la intensidad del AMF aplicado, y las propiedades del medio circundante,<sup>107</sup> pudiendo ser calculada a partir de la siguiente expresión:<sup>108</sup>

$$\text{SAR} = \text{SLP} = \frac{P}{\rho} = \frac{A f}{\rho} \quad (11)$$

siendo  $A$ , el área del ciclo de histéresis registrado bajo el AMF aplicado de frecuencia,  $f$ , y  $\rho$  la densidad de las MNPs.

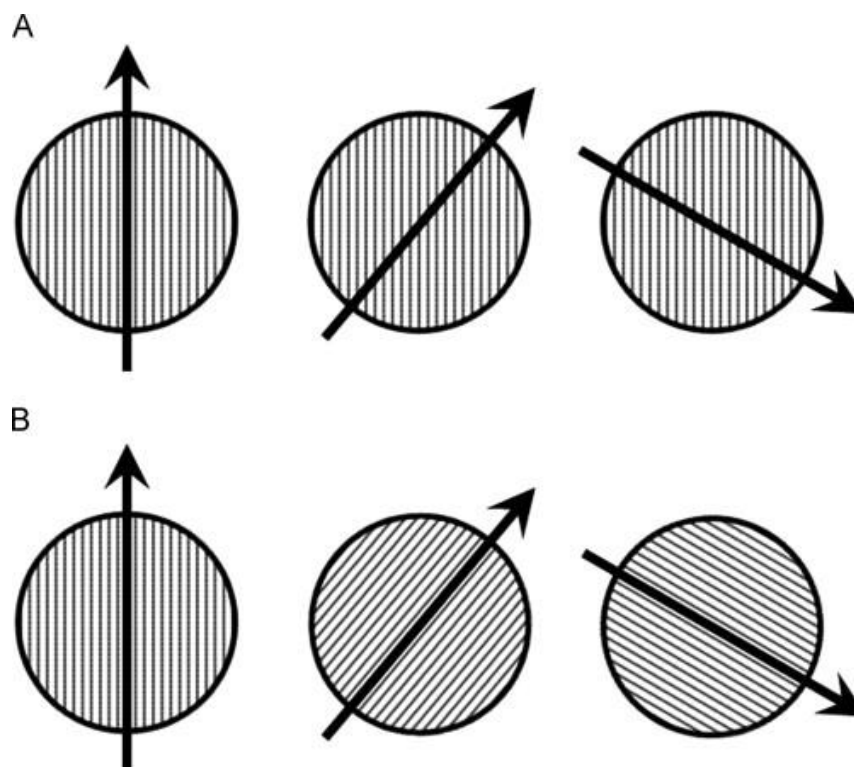


Figura 7: Rotación de Néel vs. rotación browniana. (A) Rotación de Néel: el momento magnético rota mientras la partícula permanece fija. (B) Rotación Browniana: el momento magnético permanece fijo con respecto a los ejes cristalinos mientras la partícula rota. (Adaptado con permiso de la referencia <sup>104</sup>)

### 1.5. NPS DE PALADIO

El paladio es un elemento químico perteneciente al grupo del platino, que se caracteriza por su elevada resistencia a la corrosión, su capacidad de absorción de hidrógeno y su excelente actividad catalítica. Desde su descubrimiento en 1803 por William Hyde Wollaston, el paladio ha sido objeto de estudio en distintas áreas de la química y la física debido a sus interesantes propiedades.<sup>109</sup> El paladio es un metal de transición, perteneciente al grupo 10 de la tabla periódica, con una configuración electrónica que se representa como  $[\text{Kr}] 4d^{10}$ . Este elemento presenta una superposición entre sus bandas de energía 4d y 5s, una característica común en los metales de transición. De manera notable, el paladio muestra una preferencia por llenar la banda 5s, de menor energía, antes que la banda 4d, de mayor energía. Este comportamiento resulta en una alta afinidad del paladio hacia los electrones donantes de otros átomos, lo que le permite la formación de enlaces con los sustratos.<sup>109</sup>

El paladio cristaliza en la estructura de red cúbica centrada en las caras (fcc), lo que crea una superficie con diferentes tipos de sitios atómicos, como los átomos de la esquina, los de la arista y los de la cara.<sup>109</sup> Estos diferentes sitios atómicos pueden tener diferentes actividades catalíticas y selectividades.

El uso del paladio como catalizador se ha aplicado ampliamente en varias reacciones químicas industriales y de laboratorio. Entre las reacciones más notables se encuentra la hidrogenación de dobles enlaces, donde el paladio permite la adición de hidrógeno a los compuestos orgánicos insaturados.<sup>110</sup> Además, la catálisis con paladio ha sido fundamental en

reacciones de acoplamiento cruzado, como la reacción de Suzuki-Miyaura, que permite la formación de enlaces carbono-carbono.<sup>111</sup>

Uno de los desarrollos más destacados en el campo de la catálisis heterogénea de paladio es el uso de NPs de paladio (PdNPs). En la catálisis heterogénea, el catalizador y los reactivos existen en distintas fases, típicamente sólida y gaseosa o líquida. Los catalizadores heterogéneos ofrecen notables beneficios debido a su elevada estabilidad, su capacidad para ser separados del producto con facilidad y su potencial de reutilización.<sup>112</sup>

En un proceso típico de catálisis heterogénea, los reactivos se adsorben sobre la superficie del catalizador, sitio en el que tiene lugar la reacción. Posteriormente, los productos resultantes se desadsorben, dejando libre la superficie del catalizador para que puedan adsorberse más reactivos. Este proceso puede incrementar de manera considerable la velocidad de las reacciones químicas, permitiendo que se produzcan a temperaturas inferiores y/o a velocidades superiores a las que se darían en ausencia de un catalizador.

En el caso particular de las PdNPs, estas pueden ser soportadas, generalmente en un óxido,<sup>113</sup> carbón activado,<sup>114</sup> una zeolita<sup>115</sup> o en un MOF.<sup>116-117</sup> Estos soportes sólidos aportan a las PdNPs una serie de ventajas adicionales. Primero, al disponer las NPs sobre estos soportes, se incrementa el área superficial efectiva del catalizador. Además, el soporte contribuye a aislar las NPs entre sí, lo que previene su aglomeración y lixiviación evitando la pérdida de actividad catalítica. La aglomeración de las NPs puede limitar la disponibilidad de sitios activos y, por lo tanto, reducir la efectividad del catalizador. Otra ventaja significativa es que facilitan la separación y reutilización del catalizador: En lugar de permanecer en la mezcla de reacción, las PdNP permanecen adheridas al soporte, lo que permite separar fácilmente el catalizador del producto de la reacción. Esto evita la pérdida de metales costosos y permite la reutilización del catalizador.<sup>116</sup>

Dado que la actividad catalítica está íntimamente relacionada con el número de sitios activos disponibles en la superficie de un catalizador, la reducción del tamaño de las partículas a escala nanométrica aumenta drásticamente la proporción de átomos de superficie. Este aumento de la relación superficie-volumen se traduce en una mayor eficiencia catalítica, ya que se dispone de más sitios activos para la interacción con los reactivos.<sup>118</sup>

El tamaño, la forma, la composición y la estructura de las NPs pueden ajustarse mediante diversas técnicas de síntesis, lo que permite una optimización de las propiedades catalíticas. Este control fino de las propiedades de las NPs ofrece la posibilidad de diseñar catalizadores personalizados que se ajusten a las necesidades específicas de determinadas reacciones.<sup>119</sup>



# Capítulo 2

## 2. MÉTODOS Y MATERIALES

### 2.1. REACTIVOS

Citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , Sigma Aldrich #W302600);; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, #E26282); ácido tetracloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4$ , #254169), borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ , #452882); nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , #209139); ácido ascórbico (AA, #A1300000); bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, #MKBX6159V); ácido tánico (AT, #1401-55-4); oleylamina (OLAM, #O7805); cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ , #48603); acetilacetato de cobre (II) ( $\text{Cu}(\text{acac})_2$ , #C87851), cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ , #44944); cloruro de hierro (II) ( $\text{FeCl}_2$ , #372870); cloruro de cobalto (II) ( $\text{CoCl}_2$ , #C8661); oleato de sodio ( $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NaO}_2$ , #26125); hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ , #270504); 1-octadeceno (ODE, #8.22112); ácido oleico (AO, #364525); acetilacetato de paladio(II) ( $\text{Pd}(\text{acac})_2$ , #209015); tetraclorepaladato (II) de potasio ( $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ , #323411); dimetilformamida (DMF, #227056); dietilenglicol (DEG, #H26456); oleilamina (OLAM, #O7805); polietilenimina (PEI, #408727); 2-metilimidazol (MeIm; #M50850); nitrato de zinc hexahidratado ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; #96482); violeta de cresilo (CV, #C5042); tetrahidrofurano (THF, #401757); poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido) (PMA, #531278); MeOH (DDA, #D222208); hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ , #S5881); PEG 5 kDa; mucina (MC, #M2378); 6-aminofluoresceína (6-AF, #201634); amino-PEG-tiol ((HS-PEG5K-NH2 #JKA5145); carboxi-PEG-tiol (HS-PEG5K-COOH, #757845); albúmina sérica bovina (BSA, #A2153) fueron comprados en Sigma-Aldrich.

El ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ , Acros # 11905071) y ácido clorhídrico (HCl) fueron comprados en Fisher Scientific.

El medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, #41966-029), Rodamina B isotiocianato (# 283924) y la fluoresceína-5-isotiocianato (FITC, #1245460250) fue comprador en Thermo Fisher Scientific.

La (and-6)-Carboxitetrametilrodamina (TAMRA, #AS-81120-1) fue comprada en AnaSpec.

El etanol absoluto ( $\text{EtOH}$ , #ET00052500) fue comprado en Scharlab.

### 2.2. MÉTODOS

#### 2.2.1. Consideraciones generales.

Todo el material de vidrio fue lavado con agua y detergente, agua regia y enjuagado con agua Milli-Q y acetona. El agua regia fue preparada, antes de su uso, mezclando 3 volúmenes de ácido clorhídrico (HCl) por cada volumen de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). El agua regia es un oxidante fuerte y corrosiva por lo que debe prepararse y manipularse con extrema precaución.

### 2.2.2. Síntesis de AuNPs

Las AuNPs monodispersas y estabilizadas con citrato se sintetizaron mediante un protocolo estándar previamente descrito.<sup>26</sup>

Un matraz de fondo redondo de tres bocas, conteniendo 144 ml de agua Milli-Q se llevó a ebullición mediante el uso de una manta calefactora. Se utilizó un condensador para prevenir la evaporación del agua. Una vez iniciada la ebullición, se añadieron 3.5 ml de citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ) (60 mM) y 1,5 ml de ácido cítrico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) (60 mM) y se agitó (450 RPM) durante 30 min. A continuación, se introdujeron 0,1 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) dentro de la mezcla seguido de la adición de 1 ml de ácido tetracloroáurico (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ) (25 mM). Tras unos segundos, se observó un cambio de color desde amarillo pálido hasta azul para finalmente cambiar a rojo-vino, lo que indicó la formación de AuNPs. Finalmente, se enfrió la dispersión hasta la temperatura ambiente y se determinó el tamaño y la concentración de las AuNPs a partir del máximo de absorbancia del plasmón medido por espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis). El tamaño se calculó a partir de la posición del plasmón, y la concentración se determinó mediante la ecuación de Lambert Beer:

$$A(\lambda) = \varepsilon_{NP}(\lambda) \cdot l * C_{NP} \quad (12)$$

donde  $\varepsilon_{NP}(\lambda)$  es el coeficiente molar de extinción, que es función del tamaño de las NPs,  $A(\lambda)$  la absorbancia,  $l$  es la longitud del camino óptico de la cubeta y  $C_{NP}$  es la concentración de NPs.

### 2.2.3. Síntesis de AuNRs

Las AuNRs estabilizadas con CTAB se sintetizaron siguiendo un método de crecimiento mediado por semillas, de acuerdo al protocolo descrito por el grupo de C. Murphy.<sup>120</sup> Este método implicó la adición de una solución de semilla de oro a una solución de reactivo de crecimiento que contiene CTAB como agente estabilizante. La temperatura y la relación molar de reactantes se controlaron cuidadosamente para promover el crecimiento preferencial de las AuNR en lugar de las NPs esféricas.

El primer paso en la síntesis de las semillas de oro consistió en la adición de 0,25 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  (0.01 M) a 7,5 ml de una disolución de CTAB (0,2 M) a una temperatura de 26 °C. Posteriormente, se agregó con rapidez 0,6 ml de una solución recién preparada de borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) (0.01 M), mientras se agitaba la solución a una velocidad de 350 rpm durante un período de 2 minutos. La adición de  $\text{NaBH}_4$  provocó un cambio inmediato del color de la solución de amarillo a marrón. Las semillas de oro resultantes se dejaron en reposo durante 1 hora antes de su uso, para garantizar la descomposición completa del  $\text{NaBH}_4$ .

La segunda parte del proceso de síntesis implicó el crecimiento de las AuNRs a partir de las semillas previamente sintetizadas. Para ello, se preparó una disolución de 100 ml de CTAB (0,2 M) a una temperatura de 26°C, y se agitó mientras se añadieron 4.25 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  (0,01 M) y 1,23 ml de una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) (0,01 M). Tras agitar la solución durante 2 minutos, se añadieron 0.68 ml de una solución de AA (0,1 M). Después de agitar durante 10 minutos, se agregó 1,1 ml de la solución de semillas y se agitó durante 2 minutos más. Finalmente, la solución se dejó en reposo durante toda la noche a una temperatura de 26 °C.

Las AuNR resultantes se purificaron mediante centrifugación a 10000 rcf durante 30 minutos en dos ocasiones. Posteriormente, se dispersaron los sedimentos en una solución de CTAB (0,16 mg/mL) para garantizar la estabilidad de los AuNRs durante su almacenamiento.

#### 2.2.4. Determinación de la concentración de AuNRs por ICP

Se digirieron 20  $\mu$ l de la dispersión de AuNRs con agua regia. Para ello, sobre los 20  $\mu$ l se añadieron 120  $\mu$ l de HNO<sub>3</sub> y 360  $\mu$ l de HCl. Se dejó la mezcla, al menos, 3 h para asegurarse de la completa digestión de las NPs. A continuación, se añadieron 4,5 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura y se determinó la concentración de Au mediante ICP, siendo la concentración de Au en la muestra:

$$C_m = d * C_{ICP} = 250 * C_{ICP} \quad (13)$$

donde  $C_m$  es la concentración de Au de la muestra original en g.l<sup>-1</sup>,  $d$  la dilución de la muestra que se mide en el ICP respecto a la original y  $C_{ICP}$  la concentración determinada por el ICP en g.l<sup>-1</sup>.

La masa de un solo AuNR ( $m_{AuNR}$ ) se calculó como:

$$m_{AuNR} = \rho_{Au} * v = 19,3 * \pi * h * r^2 \quad (14)$$

siendo  $\rho_{Au}$  la densidad del Au en gcm<sup>-3</sup>,  $v$  el volumen medio de un AuNRs en cm<sup>3</sup>,  $h$  y  $r$  son la altura y radio medio de los AuNRs en cm, respectivamente.

Conocida la concentración de Au y la masa de un AuNR, la masa molar ( $M_{AuNRs}$ ) se calculó como:

$$M_{AuNRs} = m_{AuNR} * NA \quad (15)$$

siendo NA el número de Avogadro.

#### 2.2.5. Cálculo del coeficiente de extinción de los AuNRs

A partir de la concentración de la muestra de AuNRs determinada mediante ICP-MS, se pudo calcular el coeficiente de extinción de estos y, así, poder obtener también su concentración a partir del espectro UV-Vis.

De acuerdo con la ley de Beer-Lambert, la absorbancia de una muestra es directamente proporcional a su concentración molar ( $C$ ), al camino óptico ( $L$ ) y al coeficiente de extinción molar de la muestra ( $\epsilon$ ), si despejamos  $\epsilon$ , teniendo en cuenta que  $L$  es 1 cm, queda:

$$\epsilon = \frac{C}{A} \quad (16)$$

Representando medidas de absorbancia a  $\lambda=450$  nm de longitud de onda a diferentes concentraciones de NP, la pendiente de la recta que se ajustó a los puntos experimentales es el coeficiente de extinción molar.

### 2.2.6. Recubrimiento de los AuNRs con BSA

La BSA se marcó con FITC. Primero, el FITC se disolvió en DMSO para preparar soluciones de reserva de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . Luego, el colorante se incubó con la BSA durante 4 h a temperatura ambiente en un tampón de carbonato ( $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 9,2$ ) para permitir la reacción entre los grupos isotiocianato y los grupos amina de la proteína. La proporción utilizada para la conjugación fue de 25 moléculas de colorante por molécula de BSA. A continuación, se utilizó una columna de exclusión de tamaño (PD-10, MWCO =  $5000 \text{ Da}$ ; #GE17-0851-01) para purificar la proteína marcada (BSA-FITC) del exceso de colorante libre. Se utilizó el ensayo de Bradford (Pierce TM Coomassie Plus Assay Kit; ThermoFisher #23236) para determinar las concentraciones de proteínas (CP). Para ello, se mezclaron  $150 \mu\text{L}$  de muestras de proteína estándar diluida (estándar BSA inicial de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en un rango de trabajo de  $1\text{-}25 \mu\text{g mL}^{-1}$  y muestras desconocidas con  $150 \mu\text{L}$  de reactivo de Coomassie en una microplaca de 96 pocillos. La absorbancia a  $570 \text{ nm}$  se leyó utilizando un lector de microplacas (TECAN, Infinite 200 pro). Luego, se preparó una curva de calibración midiendo la fluorescencia de varias diluciones de BSA conocidas con concentración CP. La fluorescencia se midió utilizando un lector de placas, lo que nos permitió correlacionar la concentración de proteína y la fluorescencia. Las muestras de BSA-FITC se protegieron de la luz y se almacenaron a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . La BSA-FITC ( $0.12 \text{ mM}$ ) se utilizó para formar la corona proteica en los AuNRs. Los complejos AuNRs@BSA se prepararon justo antes de cada experimento. Los AuNRs se incubaron con BSA (utilizando una proporción de 4000 BSA por AuNR) en un tampón de PBS (con una concentración final de AuNRs de  $1.0 \cdot 10^{12} \text{ AuNRs mL}^{-1}$ ) a temperatura ambiente en un agitador. Después de 1 h de incubación, se centrifugaron los AuNRs@BSA a  $13000 \text{ rcf}$  y se resuspendieron en PBS fresco para eliminar la proteína no unida. Se repitió este paso de lavado tres veces en total. Finalmente, las partículas se resuspendieron en PBS.

### 2.2.7. Experimento de irradiación láser de los AuNR@BSA

Se irradió  $0,5 \text{ ml}$  de una dispersión de AuNR@BSA PEGilada a concentración  $5 \text{ nM}$  con un láser de diodo de infrarrojo cercano (NIR) ( $\lambda = 805 \text{ nm}$ , potencia de salida de  $500 \text{ mW}$ ). La irradiación láser a  $4 \text{ W cm}^{-2}$  se llevó a cabo durante 3 min. Tras la irradiación, las muestras se precipitaron mediante centrifugación y se analizó la cantidad de BSA que quedó adsorbida en la superficie de los AuNRs.

La BSA@FITC adsorbida en la superficie de los AuNRs se midió antes y después de la irradiación láser (cuando los AuNRs estaban dispersos en PBS o en medios de cultivo celular completos) mediante medidas de intensidad de fluorescencia utilizando un lector de microplacas (TECAN, Infinite 200 Pro.).

### 2.2.8. Síntesis de AuNSs

Las AuNSs se sintetizaron empleando AuNPs como semillas, cationes de plata como agentes de terminación y AA como agente reductor. Las AuNPs se sintetizaron por reducción con citrato de sodio mediante el protocolo descrito por F. Schulz et al.<sup>121</sup> La síntesis de semillas consistió en calentar  $1 \text{ l}$  de agua Milli Q hasta alcanzar el punto de ebullición con agitación a  $400 \text{ rpm}$ . Posteriormente, se añadieron  $26 \text{ ml}$  de citrato de sodio ( $60 \text{ mM}$ ) y  $8,7 \text{ ml}$  de ácido cítrico ( $60 \text{ mM}$ ), manteniendo la ebullición durante un período de  $30 \text{ min}$ . A continuación, se agregaron  $0,7 \text{ ml}$  de EDTA ( $30 \text{ mM}$ ) y  $6,9 \text{ ml}$  de  $\text{HAuCl}_4$ . Tras transcurrir  $1 \text{ min}$  se observó un cambio en el color de la solución, pasando de amarillo pálido a rojo vino indicando, así, la

síntesis de nanopartículas esféricas. Seguidamente, se enfrió la dispersión en un baño de agua helada hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Para la síntesis de las AuNSs, a 100 ml de una solución de  $\text{HAuCl}_4$  (0,25 mM) contenida en un vaso de precipitados, agitando a 250 rpm, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{HCl}$  (1M) y 4 ml de semillas de AuNP (2 nM). A continuación, se agregaron simultáneamente 1.5 ml de  $\text{AgNO}_3$  (1 mM) y 0,75 ml de AA (66,7 mM), lo que provocó que la solución adquiriera un color azul oscuro. Tras 5 minutos, se añadieron 25 ml de una solución de bromuro de CTAB (0,2 M) para detener el crecimiento de las AuNSs. La mezcla se agitó durante 2 minutos más y se sumergió en un baño de hielo durante 5 minutos. Por último, las AuNS se centrifugaron durante 10 minutos a 7000 rcf y se lavaron 2 veces con una solución acuosa de CTAB con una concentración de 0,16  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Finalmente, las AuNS se dispersaron en 2 ml de una solución acuosa de CTAB con una concentración de 0,16  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  para garantizar su estabilidad durante el almacenamiento. Suponiendo que se formó una AuNS a partir de cada AuNP, y que durante los lavados no se perdieron semillas, se supuso una concentración final de AuNSs de 4 nM.

### 2.2.9. Síntesis de NPs de plata (AgNPs) en medio acuoso

Las AgNPs se sintetizaron siguiendo el método descrito por V. Puentes et al.<sup>122</sup> En un vaso de precipitados de 250 ml, se disolvieron 42,5 mg de ácido tánico (0,25 mM) y 147,0 mg de citrato de sodio (5 mM) en 100 ml de agua Milli-Q. La solución se calentó hasta alcanzar los 100 °C y, una vez que comenzó a hervir, se adicionó 1 ml de  $\text{AgNO}_3$  (25 mM). Tras 10 segundos de reacción, se enfrió rápidamente la solución sumergiéndola en un baño de hielo. Finalmente, las NPs se purificaron mediante una centrifugación a 16000 rcf durante 20 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido se dispersó en agua Milli-Q para su posterior uso.

### 2.2.10. Síntesis de NPs de plata (AgNPs) en medio orgánico

Las AgNPs fueron sintetizadas por descomposición térmica de un precursor de plata utilizando el método descrito por S. Peng et al.<sup>123</sup> En un matraz de 100 ml, se mezclaron 1 mmol de  $\text{AgNO}_3$  y 20 ml de OLAM. La mezcla fue desgasificada calentándola a 60 °C bajo vacío durante 20 min. A continuación, la solución se calentó hasta 240 °C bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$  y se dejó durante 1 h. Después de enfriar la solución a temperatura ambiente, se añadieron 25 ml de EtOH y se precipitó la mezcla a 2000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el precipitado se suspendió en 10 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ).

### 2.2.11. Síntesis de NPs de cobre (CuNPs)

Las CuNPs fueron sintetizadas siguiendo el método descrito por M. Shi et al.<sup>124</sup> En un matraz de 50 ml de tres bocas, se disolvieron 0,1 g de acetilacetato de cobre (II) ( $\text{Cu}(\text{acac})_2$ ) en 10 ml de OLAM y se desgasificó durante 1 h bajo vacío a temperatura ambiente. A continuación, se calentó lentamente hasta 230 °C bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$  y se dejó durante 3 h. Para purificar las NPs, una vez que la dispersión estaba a temperatura ambiente, se añadieron 30 ml de EtOH desoxigenado y se centrifugó a 2500 rcf durante 10 min. A continuación, se dispersó el precipitado en  $\text{CHCl}_3$  desoxigenado y se volvió a lavar con EtOH. Las CuNPs se almacenaron bajo vacío hasta su uso.

### 2.2.12. Síntesis de MNPs de óxido de hierro

Las MNPs fueron sintetizadas por descomposición térmica siguiendo un protocolo adaptado del descrito previamente por P. Anikeeva et al.<sup>125</sup> Se sintetizaron MNPs con fórmula  $\text{Co}_{(x)}\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  con diferentes proporciones de Co.

Para preparar 1 mmol de precursor organometálico ( $\text{Co}_{(x)}\text{Fe}_{(3-x)}(\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2)_8$ ) se disolvieron 2 mmoles de cloruro de hierro (III) ( $\text{FeCl}_3$ ),  $1-x$  mmoles de cloruro de hierro (II)  $\text{FeCl}_2$ ,  $x$  mmoles de cloruro de cobalto (II) ( $\text{CoCl}_2$ ) y 8 mmoles de oleato de sodio ( $\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{NaO}_2$ ) en una mezcla formada por 10 ml de EtOH, 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q y 20 ml de hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ). Alternativamente, se pueden preparar precursores de  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}(\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2)_2$ ),  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{Fe}_2(\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2)_6$ ), y  $\text{Co}^{2+}$  ( $\text{Co}(\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2)_2$ ), por separado, cuantificar la concentración de metal mediante ICP y mezclarlos en las proporciones adecuadas para obtener el precursor organometálico con la proporción de Co deseada. En el caso de preparar 1 mmol de precursor se mezclan 2 mmoles de oleato de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $1-x$  mmoles de oleato de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $x$  mmoles de oleato de  $\text{Co}^{2+}$ .

A continuación, se calentó la mezcla a reflujo a  $75^\circ\text{C}$  con agitación magnética (400 rpm) durante 4 h y se separó la fase orgánica, la cual se lavó con agua Milli-Q en un embudo de decantación. En un matraz redondo de 50 ml, se calentó la fase orgánica durante 2 h a  $85^\circ\text{C}$  con agitación magnética (250 rpm), y después a vacío a  $113^\circ\text{C}$  durante 2 h adicionales (Figura 8).

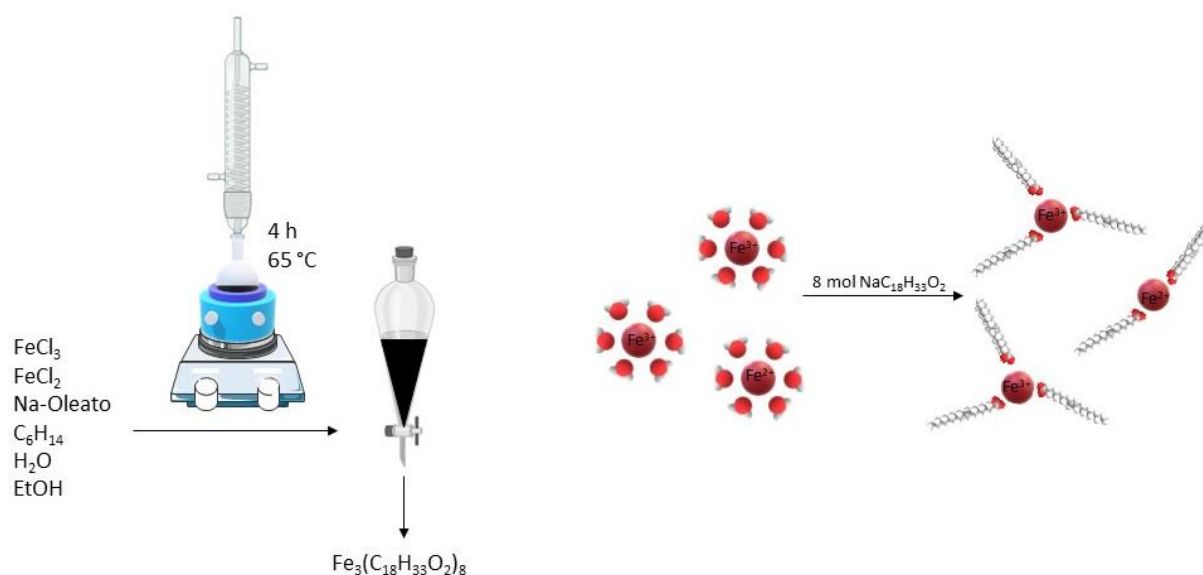


Figura 8: Esquema de la preparación del oleato de hierro. Montaje del sistema de reflujo para la síntesis (izquierda) y representación de la coordinación de cationes de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  con aniones oleato (derecha).

Para sintetizar MNPs de 15 nm, se disolvió 1 mmol de precursor con la proporción de Co deseada en 5 ml de ODE y  $175\ \mu\text{l}$  de AO en un matraz de 3 bocas de 50 ml (Figura 9). Se calentó a  $110^\circ\text{C}$  a vacío durante 1 hora. Seguidamente, se calentó hasta  $200^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$ ; finalmente, se incrementó la temperatura hasta  $310^\circ\text{C}$  con un gradiente de  $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  y se

mantuvo durante 1 h. La mezcla se recogió en 40 ml de una mezcla 1:1 de EtOH:C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> y se centrifugó (7000 rcf durante 10 min). El precipitado se dispersó en 10 ml de C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, 5 ml de EtOH y se centrifugó (7000 rcf durante 10 min) dos veces. Finalmente, el sedimento se dispersó en 10 ml de C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.



Figura 9: Esquema del montaje para la síntesis de MNPs.

Cambiando la temperatura final de la rampa de calentamiento, se pudieron obtener diferentes tamaños de NP como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3: Tamaño de las MNPs en función de la temperatura final de la reacción.

Tamaño / nm	Temperatura final / °C
12	305
15	310
18	315

### 2.2.13. Síntesis de PdNCs

Los PdNCs cóncavos fueron sintetizados siguiendo el método químico en solución adaptado del protocolo descrito por L. Cai et al.<sup>126</sup> Una sal de paladio, tetracloropaladato (II) de potasio (K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>), fue reducida con AA en presencia de CTAB, que actuó como agente estabilizador. En un vaso de precipitados de 50 ml con agitación magnética (250 rpm), se disolvieron 0,5 ml de CTAB (0,1 M) y 2,5 ml de K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> (10 mM) en 21,2 ml de agua MilliQ. A continuación, se añadieron 0,75 ml de AA (0,1 M) y se introdujo el vaso de precipitados en un baño de agua a 35 °C. Se agitó la mezcla a 35 °C hasta que el color de la solución cambió a negro (~5 min), lo que indicó la formación de PdNCs. Por último, se purificó la suspensión coloidal mediante centrifugación (7200 rcf durante 10 min) dos veces y se redispersó en una solución acuosa de CTAB (0,16 mg·ml<sup>-1</sup>).

### 2.2.14. Síntesis de PdNDs

Se sintetizaron dos tipos de PdNDs utilizando un método químico húmedo adaptado del protocolo descrito por I. Pastoriza-Santos et al.<sup>127</sup> Para ello, se redujeron dos sales de paladio, acetilacetato de paladio(II) ( $\text{Pd}(\text{acac})_2$ ) y tetracloropaladato(II) de potasio ( $\text{K}_2\text{PdCl}_4$ ) en DMF y una mezcla de DEG con OLAM, respectivamente, en presencia de PEI, un polímero cargado positivamente.

#### 2.2.14.a. Síntesis de PdND1

Se añadieron 209  $\mu\text{l}$  de PEI con una jeringa a 8 ml de DMF contenidos en un matraz de 2 bocas de 50 ml. Se agitó la solución durante 20 minutos (250 rpm). A continuación, se calentó hasta 130°C con una manta calefactora y se añadieron 7,6 mg de  $\text{Pd}(\text{aca})_2$ . Seguidamente, se elevó la temperatura hasta 150 °C y se mantuvo durante 1 h. Tras enfriar a temperatura ambiente, la muestra se transfirió a un tubo cónico de 15 ml, se agregaron 8 ml de EtOH y se centrifugó (16000 rcf durante 10 min). El precipitado fue suspendido en 15 ml de EtOH. Este proceso se repitió con acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) y agua Milli-Q. Finalmente, el precipitado fue suspendido en 4 ml de agua Milli-Q.

#### 2.2.14.b. Síntesis de PdND2

Se añadieron 209  $\mu\text{l}$  de PEI con una jeringa a un matraz de 3 bocas de 50 ml que contenía 4 ml de DEG y 4 ml de OLAM, y se agitó la mezcla durante 20 min a 250 rpm. Manteniendo la agitación, se añadieron 24 mg de  $\text{K}_2\text{PdCl}_4$  a la mezcla, se calentó hasta 110 °C y se mantuvo durante 1 h bajo vacío. Por último, bajo una corriente de  $\text{N}_2$ , se elevó la temperatura hasta 150 °C y se mantuvo durante 1 h. Después de enfriar a TA, el contenido se transfirió a tubos cónicos de 15 ml y se adicionaron 5 ml de EtOH. La muestra se purificó por centrifugación (7200 rcf durante 10 min). El precipitado se suspendió en 8 ml de EtOH, y este proceso se repitió con  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$  y agua Milli-Q. Finalmente, el precipitado se suspendió en 4 ml de agua Milli-Q.

### 2.2.15. Determinación de las constantes de reacción

En un vial de 2 ml, se mezclaron 4,5  $\mu\text{l}$  de la dispersión de PdNC de una concentración de Pd de 1 mM, 25  $\mu\text{l}$  de AM ( $0,3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y 965  $\mu\text{l}$  de MeOH. La mezcla se introdujo en una cubeta UV-Vis y, sobre la mezcla ya introducida en el equipo, se añadió el  $\text{NaBH}_4$  en exceso, específicamente, 5  $\mu\text{l}$  de  $\text{NaBH}_4$  ( $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), y se midió la absorbancia a 664 nm de longitud de onda durante 80 s. Se representó el  $\text{Ln}(A/A_0^{-1})$  en función del tiempo, y se ajustaron los puntos obtenidos a una línea recta mediante el empleo de una regresión lineal. La pendiente de dicha recta se interpretó como el valor negativo de k.

Se repitió el mismo procedimiento para cada uno de los sistemas, pero mezclando 5,3; 100 y 55  $\mu\text{l}$  de una dispersión de 1 mM en Pd para los PdNC@PEG, PdNC@MC y PdND, respectivamente.

### 2.2.16. Síntesis de ZIF-8

Estas partículas se sintetizan siguiendo un protocolo previamente publicado por el grupo donde he desarrollado esta tesis.<sup>128</sup> Con el fin de controlar el tamaño y forma de las partículas, se utilizó CTAB durante la síntesis. En un vial de vidrio de 5 ml bajo agitación magnética y a

TA, se mezcla 1 ml de solución acuosa de MI (1,3 M), 1 ml de solución acuosa de nitrato de zinc hexahidratado ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) (0,025 M) y 1 ml de solución acuosa de CTAB (0,16  $mg \cdot ml^{-1}$ ). La mezcla se agitó durante 5 min y se dejó en reposo durante 3 h a TA. La aparición de turbidez blanca indicó la formación de los ZIF-8. Finalmente, las partículas se precipitaron por centrifugación (7000 rcf, 10 min) y se lavaron dos veces con MeOH. Tras el lavado se dispersaron en 1 mL de MeOH.

Finalmente, se determinó la concentración mediante el DLS. Para ello se prepararon varias diluciones (1:2500, 1:2000, 1:1500, 1:1000 y 1:500) de la muestra en agua. Se midió la concentración en el DLS en  $NPs \cdot ml^{-1}$  por triplicado y los valores medios se convirtieron a  $nmoles \cdot l^{-1}$ , multiplicando por  $10^{11}$  y dividiendo por el número de Avogadro. Por último, se representó la concentración en nM frente a la inversa del factor de dilución (por ejemplo, en el caso de la dilución 1:2500, la inversa del factor de dilución es  $2500^{-1}$ ), los puntos se ajustaron por regresión lineal a una recta, cuya pendiente fue la concentración de ZIF-8 en nM en la muestra original.

El procedimiento de determinación de la concentración fue extensible para todos los nanompuestos y ZIF-8 cargados descritos en los siguientes apartados.

### 2.2.17. Síntesis del nanocompuesto (NC) formados por NP recubiertas de ZIF-8 (NP@ZIF-8)

En la síntesis de NC, las NPs fueron utilizadas como semillas sobre las cuales se creció una capa de ZIF-8. Este protocolo fue equivalente al descrito anteriormente para el ZIF-8 con la modificación de que se añadió 1 ml de disolución acuosa de CTAB (0,2  $g \cdot l^{-1}$ ) con las NPs (AuNR, AuNS, MNP o PdNP) dispersas a una concentración de 2 nM. La purificación de los NC fue la misma que la del ZIF-8. Dado que para la síntesis se añadió 1 ml de NPs a una concentración de 2 nM, y suponiendo que un NC creció a partir de cada NP, se estimó que la concentración final de NCs fue de 2 nM.

Además, se llevaron a cabo experimentos para analizar el efecto de distintos procesos de lavado en los AuNRs@ZIF-8 resultantes. Estos lavados consistieron en dos etapas de centrifugación (7000 rcf, 10 min) y redispersión en 1 ml de diferentes combinaciones de agentes dispersantes (Tabla 4).

Tabla 4: Diferentes combinaciones de agentes dispersantes probados para el lavado de los NC.

1ª redispersión	2ª redispersión
MeOH	H2O
H2O	H2O
MeOH	PSF
H2O	PSF
PSF	PSF
MeOH	MeOH

### 2.2.18. Síntesis de NP@ZIF-8 cargado con CV

Este protocolo es equivalente al descrito anteriormente para los NCs con la modificación de que se añadió en la disolución acuosa de CTAB (0,16  $g \cdot l^{-1}$ ), CV (0.1  $g \cdot l^{-1}$ ), las NPs a una

concentración de 2 nM y tan solo se lavó 1 vez con MeOH para evitar eliminar el CV encapsulado. Al no contar con un recubrimiento polimérico de protección, el CV adsorbido en las superficies internas del ZIF-8 se puede eliminar con facilidad.

#### **2.2.19. Síntesis del nanocompuesto NPagregadas@ZIF-8**

Este procedimiento fue análogo al de los NP@ZIF-8 con la diferencia que las NPs dispersas en agua a una concentración de 4 nM, y solo el CTAB residual de la síntesis de las AuNSs.

#### **2.2.20. Medidas SERS con los NPagregados@ZIF-8**

En un recipiente de 1 ml, se añadieron 25  $\mu$ l de una suspensión de NPagregadas@ZIF-8 a una concentración de 5 nM. A continuación, se añadió el volumen requerido de una solución de 4-MBA o RoB, dependiendo de la concentración deseada para el experimento. La mezcla se completó con agua Milli-Q hasta alcanzar un volumen final de 500  $\mu$ l. La solución se agitó durante un período de una noche a temperatura ambiente.

Posteriormente, se extrajeron 400  $\mu$ l de la mezcla y se transfirieron a un tapón de polipropileno con un diámetro de 24 mm. Se colocó el tapón bajo el láser del equipo y se procedió a medir la señal Raman utilizando un láser de 808 nm bajo las condiciones seleccionadas.

#### **2.2.21. Transferencia de MNPs estabilizadas en medio orgánico a agua mediante el uso de CTAB**

En un vial de 10 ml de CTAB (0,05 g.l<sup>-1</sup>) se añadió 1 ml de MNP dispersadas en CHCl<sub>3</sub> o hexano, se tapó y agitó vigorosamente hasta que se formó una emulsión, y se sometió a sonicación (a temperatura ambiente durante 1 min a 200 W). Si se observaba que se separaban las fases orgánica y acuosa, se añadía 1 ml adicional de CTAB (0,05 g.l<sup>-1</sup>), se agitó y sonicó de nuevo; si se seguía observando fase orgánica, se adicionaba 1 ml adicional de CTAB y así sucesivamente hasta que se consiguió una emulsión estable. A continuación, se agitó la mezcla a 1200 rpm, se calentó en un baño de agua a 55 °C durante 10 min y se aumentó la temperatura a un gradiente de 1 °C.min<sup>-1</sup> hasta 75 °C, dejándola durante 30 min para evaporar la fase orgánica. Para lavar las NP, se precipitaron mediante centrifugación y se dispersaron en CTAB (0,16 g.l<sup>-1</sup>). Después de 2 lavados, se precipitaron una vez más y se dispersaron en CTAB (0,4 g.l<sup>-1</sup>). Por último, con el propósito de eliminar los agregados de MNPs, se centrifugó durante 3 minutos a 3000 rcf. Como resultado, se obtuvo un precipitado compuesto por agregados de MNP, los cuales fueron descartados, permaneciendo en el sobrenadante tan solo las MNP que estaban bien dispersas.

#### **2.2.22. Evaluación de la degradación de NP mediante ICP**

Se prepararon diferentes viales conteniendo 10 ml de dispersiones individuales de NPs esféricas de Au, Ag y Cu, así como también sus respectivas mezclas, todas ellas a una concentración de 1 nM. Estos viales se colocaron en un baño de agua a una temperatura constante de 37 °C. A intervalos de tiempo específicos, se extrajeron alícuotas de 0,5 ml de

cada vial. Estas alícuotas se sometieron a centrifugación durante 30 min a una velocidad de 40000 rcf, permitiendo la separación del sobrenadante y el precipitado.

El sobrenadante resultante de cada alícuota se diluyó hasta alcanzar un volumen final de 5 ml y se determinó la concentración de los elementos Au, Ag y Cu utilizando ICP. Por otro lado, el precipitado obtenido tras la centrifugación se trató con 0,5 ml de agua regia y se sometió a un proceso de digestión durante al menos 3 h. Posteriormente, se diluyó hasta alcanzar un volumen de 5 ml y se midió utilizando el ICP.

El porcentaje de metal (%Me) en el sobrenadante se calculó como:

$$\%_{Me} = \frac{C_{SN}}{C_{SN} + 10 * C_P} \quad (17)$$

siendo el  $C_{SN}$  y  $C_P$  la concentración del metal determinada en el sobrenadante y el precipitado, respectivamente.

### 2.2.23. Recubrimiento con polímeros anfifílicos

#### 2.2.23.a. Síntesis de PMA

La síntesis del PMA se realizó siguiendo un protocolo previamente descrito por W. Parak et al.<sup>26</sup> En un balón de 50 ml de fondo redondo se añadieron 40 ml de THF, 20 mmoles de poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido) y 15 mmoles de DDA. La solución se llevó a reflujo (65°C) y se dejó toda la noche bajo agitación magnética a 350 rpm. Posteriormente, el polímero fue secado en rotavapor y disuelto en 40 ml de CHCl<sub>3</sub>. Considerando que cada mol de poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido) se correspondía con un mol de PMA, se obtuvo una concentración teórica de PMA de 0,5 M.

#### 2.2.23.b. Modificación del PMA

El protocolo del PMA fue modificado mediante la incorporación de sondas fluorescentes específicas. El procedimiento fue análogo al descrito en el apartado 2.2.23.a, con la adición de una sonda fluorescente en una proporción determinada. En el caso de la 6-AF, se marcaron un 5 % o 10 % de los monómeros del PMA.

Para marcar el 5 % de los monómeros de PMA, se añadieron en un balón de fondo redondo de 50 ml, 40 ml de THF, 20 mmoles de poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido), 15 mmol de DDA y 1 mmol de 6-AF (o 2 mmol de 6-AF en el caso del marcado del 10 %). La solución se llevó a reflujo (65°C) y se mantuvo durante toda la noche con agitación magnética. Posteriormente, el polímero fue secado en el rotavapor y disuelto en 40 ml de CHCl<sub>3</sub>, obteniendo una concentración final de 0,5 M.

#### 2.2.23.c. Purificación del PMA

Una vez finalizada la síntesis del PMA, tanto en su forma pura como modificada, se procedió a realizar una etapa de purificación. Esta etapa fue fundamental para eliminar restos de DDA no unidos al PMA. En un matraz de 50 ml se añadieron 5 mL de PMA (0,5 M) y 20 ml de hexano. Se enfrió en el congelador (aproximadamente a -4°C) durante 2 h hasta que se observó en el fondo del matraz el PMA precipitado. A continuación, se centrifugó a 7200 rcf durante 2 min, se desechó el sobrenadante, se secó el PMA y este se dispersó en CHCl<sub>3</sub>.

## 2.2.23.d. Recubrimiento con PMA

Previamente a la funcionalización de las NPs esféricas, fue necesario determinar la concentración de estas para calcular la cantidad de PMA necesario en función del número de monómeros por  $\text{nm}^2$ . En primer lugar, se necesitó obtener el tamaño medio de las NPs y la concentración de metal. Conociendo el tamaño medio de las NPs (se obtuvo como el valor medio de la distribución de tamaño obtenida de medir al menos 100 NPs en imágenes de SEM o TEM), se calculó su volumen promedio. Asumiendo que las NPs esféricas de Au, Ag, Cu y MN estaban compuestas por Au, Ag, Cu y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , respectivamente, multiplicando el volumen de NP por la densidad correspondiente se obtuvo la masa de una NP mediante la expresión:

$$m = V_e * \delta = \frac{4}{3} \pi r^3 * \delta * 10^{-21} \quad (18)$$

donde  $m$  era la masa en gramos de una NP,  $V_e$  el volumen de una esfera,  $\delta$  la densidad del metal en  $\text{g.cm}^{-3}$  y  $r$  el radio medio de la NP en nm.

Para determinar la concentración de metal por ICP, el procedimiento consistió en secar 100  $\mu\text{l}$  de la muestra ya que las NP estaban dispersas en  $\text{CHCl}_3$ , digerirlas en 500  $\mu\text{l}$  de agua regia durante al menos 3 h y, a continuación, se determinó la concentración de metal por ICP; en el caso de las MNP hubo que tener en cuenta que mediante el ICP obtuvimos la concentración de Fe que hay que convertir en concentración de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :

$$[\text{Fe}_3\text{O}_4] = [\text{Fe}]_{\text{ICP}} * \frac{231 \text{ g Fe}_3\text{O}_4}{3 * (55.8 \text{ g Fe})} \quad (19)$$

donde  $[\text{Fe}_3\text{O}_4]$  era la concentración de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en  $\text{g.l}^{-1}$  de la muestra digerida, y  $[\text{Fe}]_{\text{ICP}}$  la concentración de Fe en  $\text{g/l}$  determinada por ICP.

La concentración de NPs se calculó entonces como:

$$[\text{NP}] = \frac{[\text{Metal}]}{m * 6.022 * 10^{14}} \quad (20)$$

siendo  $[\text{NP}]$  la concentración de NPs en  $\text{nmoles/l}$  y  $[\text{Metal}]$  el valor de la concentración de cada metal o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obtenido a partir del ICP en  $\text{g.l}^{-1}$ .

Para calcular la cantidad de PMA que hay que adicionar a la suspensión de MNPs, se calculó el área total de la NPs como:

$$A_{\text{total}} = A_{\text{NP}} * N = 4\pi r^2 * V_m * [\text{NP}] * 6.022 * 10^8 \quad (21)$$

donde  $A_{\text{total}}$  era el área total de NPs en  $\text{nm}^2$  y  $V_m$  el volumen de la muestra en  $\mu\text{l}$ :

$$V_{\text{PMA}} = \frac{n * A_{\text{tot}}}{0.5 * 6.022 * 10^{17}} \quad (22)$$

donde  $V_{\text{PMA}}$  es el volumen en  $\mu\text{l}$  de PMA añadido a una concentración 0,5 M y  $n$  el número de monómeros por  $\text{nm}^2$ .

Así, una vez realizadas las estimaciones previas, se mezclaron los distintos tipos de NPs dispersas en disolvente orgánico con PMA disuelto en  $\text{CHCl}_3$  (las relaciones de números de

monómero/área partícula empleadas fueron de 4000, 300, 300 y 600 monómeros por nm<sup>2</sup> para AuNPs, AgNPs, CuNPs y MNPs, respectivamente).

Los valores de monómeros por nm<sup>2</sup> elegidos fueron lo suficientemente altos para garantizar la estabilidad de las NPs en medio acuoso, sin requerir un exceso significativo de polímero. Se llevó a cabo un incremento gradual en el número de monómeros para cada tipo de NP, hasta alcanzar un punto en el que se logró redispersar las NPs en medio acuoso. Este enfoque permitió asegurar que las NP mantuvieran su estabilidad en el entorno acuoso sin necesidad de emplear una cantidad excesiva de polímero.

A continuación, se evaporó lentamente el disolvente en el rotavapor. Una vez seco, se hidrolizó el PMA añadiendo una disolución acuosa de NaOH (0,1 M) y se sonicó durante 1 min hasta que las NPs se dispersaron en agua.

En el caso de los NCs dispersos en MeOH, el procedimiento fue análogo al descrito para las NPs pero utilizando una relación de 600 monómeros/nm<sup>2</sup> y una proporción de 3:1 de MeOH:CHCl<sub>3</sub>.

#### 2.2.23.e. Recubrimiento de los AuNRs con PEG y marcado con rodamina

En este apartado se describe el recubrimiento con PEG de AuNRs y PdNPs.

La funcionalización de los AuNRs se llevó a cabo en 2 etapas de adición de PEG. En la primera adición, sobre una dispersión de AuNRs (10 nM) en agua, se añadió PEG 5 kDa (10 g.l<sup>-1</sup>). El volumen de PEG añadido se calculó para alcanzar una relación de 40000 cadenas de PEG por cada AuNR. El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$V_{PEG} = v_{AuNRs} * 10^{-3} * 10 * 10^{-9} * 40000 * 5000 * 10^3 \quad (23)$$

donde  $V_{PEG}$  es el volumen de disolución de PEG y  $v_{AuNRs}$  el volumen de dispersión de AuNRs en ml.

La mezcla se agitó a 350 rpm durante 8 h para lograr una dispersión homogénea de las cadenas de PEG en las superficies de los AuNRs. Posteriormente, se sometió la muestra a una centrifugación a 13000 rcf durante 30 min.

En la segunda etapa, el precipitado se suspendió en 5 ml de una disolución de PEG en MeOH que contenía la misma cantidad de PEG añadida en la primera etapa, y se agitó a 350 rpm durante 5 h. A continuación, la solución se centrifugó a 13000 rcf durante 30 min y, por último, se redispersó en H<sub>2</sub>O.

Las AuNRs PEGiladas se marcaron con un colorante de rodamina para los estudios de captación celular. Para ello, se utilizó Rodamina B isotiocianato para marcar las AuNRs PEGiladas con carga positiva y neutra, y se utilizó TAMRA para marcar las AuNRs PEGiladas con carga negativa, mediante la química de carbodiimida. Se utilizó un exceso molar de 20 moléculas por cada AuNRs. Para calcular la masa de rodamina ( $m_{Ro}$ ) a pesar en mg, se realizó el siguiente cálculo:

$$m_{Ro} = C * R * v * M_{Ro} * 10^{-8} = 10 * 20 * 100 * M_{Ro} * 10^{-8} \quad (24)$$

siendo  $C$  la concentración de NP en nM,  $R$  la relación de moléculas por NP,  $v$  el volumen de la dispersión en  $\mu$ l y  $M_{Ro}$  la masa molar de la Rodamina en kDa.

A continuación, se disolvió la Rodamina y se añadió en 100  $\mu\text{l}$  de una dispersión de AuNRs PEGilados a una concentración de 10 nM y la solución resultante se agitó durante una noche a 350 rpm. Por último, los AuNRs se purificaron mediante centrifugación.

#### 2.2.23.f. Recubrimiento de los PdNC y PdND con PEG

La funcionalización de los PdNCs/PdNDs es análoga a la de los AuNR con ligeras modificaciones.

Así, se determinó la concentración de Pd de los PdNCs y PdNDs mediante ICP. Para llevar a cabo esta determinación, se realizó una digestión de las dispersiones de PdNC y PdND durante un mínimo de tres horas, utilizando 20  $\mu\text{l}$  de muestra mezclados con 480  $\mu\text{l}$  de agua regia. Posteriormente, se añadieron 4,5 ml de agua para diluir la solución, y finalmente se midió la concentración de Pd utilizando el ICP. Se calculó el tamaño medio de las NPs. Conociendo el tamaño medio de NP (se obtuvo como el valor medio de la distribución de tamaño obtenida de medir al menos 100 NPs en imágenes de SEM o TEM), se calculó su volumen promedio. En el caso de los PdNC:

$$m = V_{PdNC} * \delta_{Pd} = l^3 * 12,0 * 10^{-21} \quad (25)$$

donde  $m$  era la masa en gramos de una PdNC,  $V_{PdNC}$  el volumen de un PdNC,  $\delta$  la densidad del Pd en  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  y  $l$  la longitud media del lado de los PdNC en nm.

Los PdND se trataron como si fuesen esferas, por lo que:

$$m = V_e * \delta_{Pd} = \frac{4}{3} \pi r^3 * 12,0 * 10^{-21} \quad (26)$$

siendo  $r$  el radio medio de las PdND en nm.

A continuación se calcularon la concentración de NPs tal como se describe en el apartado 2.2.23.d. y el área total de 100  $\mu\text{l}$  a una concentración de 10 nM de PdNC y PdND, ecuaciones (27) y (28), respectivamente:

$$A_{total PdNC} = A_{NP} * N = 6l^2 * 1000 * 6.022 * 10^8 \quad (27)$$

$$A_{total PdND} = A_{NP} * N = 4\pi r^2 * 1000 * 6.022 * 10^8 \quad (28)$$

Para la funcionalización, se utilizó una relación de 100 moléculas de PEG por  $\text{nm}^2$  y la cantidad de PEG se calculó como:

$$m_{PEG} = \frac{A_{tot} * R * M_{PEG}}{6.022 * 10^{20}} = \frac{A_{tot} * 100 * M_{PEG}}{6.022 * 10^{20}} \quad (29)$$

donde  $m_{PEG}$  era la masa de PEG en mg,  $A_{tot}$  el área total de NPs en  $\text{nm}^2$ , R la relación moléculas de PEG por  $\text{nm}^2$  y  $M_{PEG}$  la masa molar del PEG en kDa

Para realizar la funcionalización experimentalmente, se pesó el PEG calculado y se disolvió en un vial en el volumen ( $v$ ) necesario para tener una concentración de  $10 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ :

$$v = \frac{10}{m_{PEG}} \quad (30)$$

siendo  $v$  el volumen de agua en ml en el que se disolvió el PEG.

A la disolución de PEG se adicionó 1  $\mu$ l de NaOH (2 M), se agitó y se añadieron los 100  $\mu$ l de PdNCs o PdNDs a 10 nM. La mezcla se dejó agitando durante 8 h a 350 rpm. Posteriormente, se procedió a precipitar a una velocidad de 10000 rcf, se lavaron y se dispersaron en agua Mili-Q, en el mismo volumen (100  $\mu$ l) en el que estaban dispersos inicialmente los PdNCs.

#### 2.2.23.g. Recubrimiento de los PdNC y PdND con MC

El protocolo empleado para funcionalizar los PdNCs y PdNDs con MC de 640 kDa es análogo al empleado con el PEG. En este caso al tratarse de una molécula mucho más grande en comparación con el PEG se utilizó una relación de 100 moléculas por NPs. Para 100  $\mu$ l de una dispersión de PdNCs o PdNDs a 10 nM, la masa de MC ( $m_{MC}$ ) necesaria fue:

$$m_{MC} = C * R * v * M_{MC} * 10^{-8} = 10 * 100 * 100 * 640 * 10^{-8} = 0,6 \text{ mg} \quad (31)$$

siendo  $C$  la concentración de NPs en nM,  $R$  la relación de moléculas por NP,  $v$  el volumen de la dispersión en  $\mu$ l y  $M_{MC}$  la masa molar de la MC en kDa.

Para ello, se pesó la MC y se disolvió en 16,6 ml de agua para tener una concentración de 10  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ :

$$v = \frac{10}{m_{MC}} = \frac{10}{0,6} = 16,6 \text{ ml} \quad (32)$$

A continuación, se adicionó 1  $\mu$ l de NaOH (2 M), se agitó y se añadieron los 100  $\mu$ l de PdNC o PdMC a una concentración de 10 nM. La mezcla se mantuvo agitando durante 8 h a 350 rpm. Posteriormente, se procedió a la precipitación a una velocidad de 10000 rcf, se lavaron y se dispersaron en 100  $\mu$ l de agua Mili-Q, el mismo volumen en el que estaban dispersos inicialmente las NP.

#### 2.2.23.h. Transferencia de las AuNP a medio orgánico

Las AuNPs esféricas previamente sintetizadas se transfirieron a  $\text{CHCl}_3$  mediante un proceso de intercambio de ligandos descrito previamente.<sup>129</sup> Sobre los 150 ml de las AuNPs obtenidas previamente se añadieron 100  $\mu$ L de una disolución de PEG de 750 Da (15 mM) y se agitó durante 1 h para permitir el intercambio de ligandos. Mediante centrifugación (1500 rcf, 10 min), utilizando filtros de centrifugación (100 kDa) se concentró la muestra hasta un volumen final de entre 5-8 ml. Seguidamente, se adicionaron 30 ml de una disolución de DDA (0,2 M) en  $\text{CHCl}_3$  formándose dos fases y se mantuvo agitando durante una noche, durante la cual las AuNP fueron transferidas gradualmente desde la fase acuosa hasta la orgánica. Por último, las NP dispersas en fase orgánica se precipitaron mediante centrifugación (10000 rcf, 20 min) y se dispersaron en  $\text{CHCl}_3$ . Este último paso se repitió 2 veces para eliminar el exceso de ligando.

### 2.3. RECTAS DE CALIBRADO

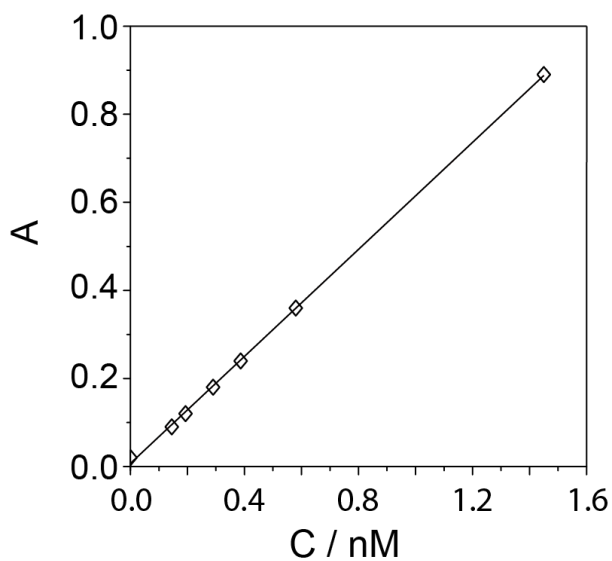


Figura 10: Correlación entre la concentración de AuNRs determinada por ICP-MS y la absorción UV-VIS ( $\lambda = 450$  nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 6 \times 10^8 x + 0,00727$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

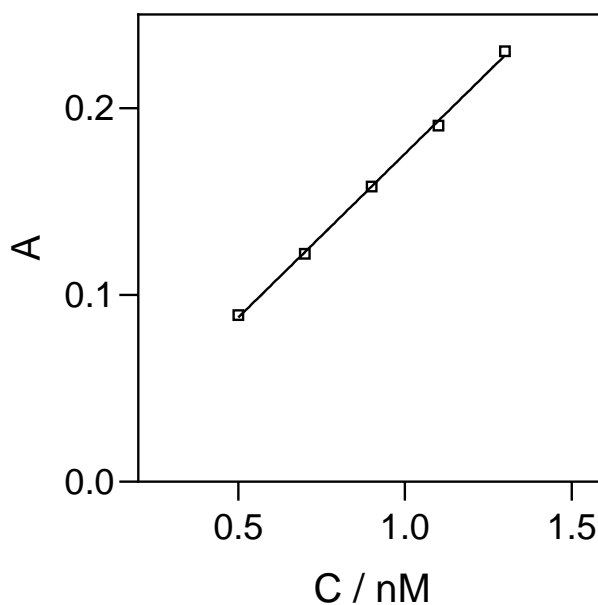


Figura 11: Correlación entre la concentración de AuNP determinada por ICP-MS y la absorción UV-VIS ( $\lambda = 450$  nm). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 1.75 \times 10^8 x + 0,00018$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

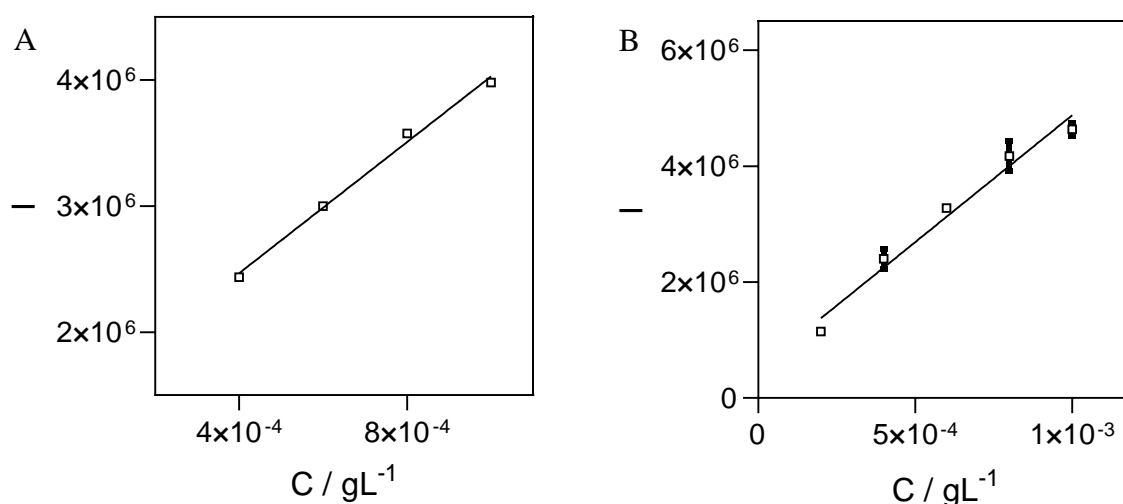


Figura 12: Correlación entre la concentración de CV y la intensidad de emisión de fluorescencia ( $\lambda = 621 \text{ nm}$ ). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal en H<sub>2</sub>O ( $y = 4.38 \times 10^9 x + 5.01 \times 10^5$ ,  $r^2 = 0,967$ ) (A) y en MeOH ( $y = 2.60 \times 10^9 x + 1.43E \times 10^6$ ,  $r^2 = 0,994$ ) (B).

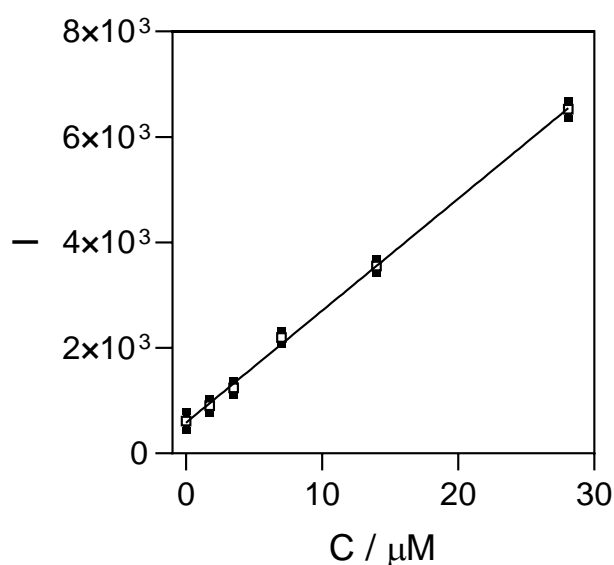


Figura 13: Correlación entre la concentración de 6-AF en MeOH y la intensidad de emisión de fluorescencia ( $\lambda = 518 \text{ nm}$ ). Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 212.2 x + 582.2$ ,  $r^2 = 0,999$ ).

## 2.4. INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS

Para la caracterización óptica de las diferentes suspensiones coloidales se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Biochrom Libra S60.

La caracterización de la fluorescencia se llevó a cabo mediante un fluorímetro Horiba FluoroMax-3. Cada medida se obtuvo mediante el cálculo de la media de tres réplicas independientes.

Las medidas de espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer Spectrum Two con ATR; las muestras secas en polvo se colocaron en la ventana ATR y se analizaron desde 700 hasta 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Cada medida se obtuvo a partir de la media de 3 réplicas.

Las medidas Raman se realizaron con un equipo Renishaw inVia Reflex sobre un sustrato de vidrio con un haz láser a 785 nm y con un objetivo de 50X. Las muestras se irradiaron con una potencia de 10 mW con tiempo de adquisición de 13 s y 4 acumulaciones. Para tratar los espectros se utilizó el software Wire 3.2.

El análisis termogravimétrico (TGA) de muestras en polvo se realizó con un TA Instruments Inc. Q5000, bajo atmósfera de nitrógeno con un flujo de gas de 20  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$  de aire y las muestras se analizaron con un gradiente de temperatura de 10  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  desde 30 hasta 800  $^{\circ}\text{C}$ .

El tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron por dynamic light scattering (DLS) utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP equipado con un láser de 10 mW de He-Ne que operó a 633 nm de longitud de onda y un ángulo de dispersión fijado a 173  $^{\circ}$ . El resultado de la medida se obtuvo mediante el cálculo del valor medio de tres réplicas independientes, en las cuales se realizaron tres escaneos consecutivos de una duración de 10 segundos cada uno. El potencial Z ( $\zeta$ ) de las NP se determinó por anemometría de láser Doppler con el mismo equipo Malvern Zetasizer Nano ZSP. El valor medio se obtuvo a partir de tres réplicas, siendo cada una de ellas compuesta por un total de diez escaneos.

La concentración de los nanocompuestos se midió mediante análisis de seguimiento de NPs (NTA). Todas las muestras se analizaron en agua utilizando un NanoSight NS300 (Malvern Instrument Ktd) equipado con un láser de 405 nm. Todas las mediciones se realizaron a 24  $^{\circ}\text{C}$ . Cada medida se obtuvo mediante el cálculo de la media de tres réplicas independientes. A su vez, cada réplica se generó a partir del análisis de un total de 1498 frames.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron con un equipo HRTEM libra 200 FE OMEGA operado a 200 kV.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se adquirieron con un microscopio FSEM Zeiss Ultra Plus operado a 3 kV.

La espectroscopía de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) se llevó a cabo utilizando un Agilent 5800 ICP-OES.

Para la medición de los ciclos de magnetización y pérdidas magnéticas de las MNPs, se empleó un magnetómetro de la serie AC Hyster de Nanotech Solutions. Este magnetómetro está equipado con dos bobinas: la bobina Sens, que realiza mediciones en 8 frecuencias diferentes que van desde 10 hasta 100 kHz, y la bobina Advance, que realiza mediciones en 8 frecuencias que abarcan desde 25 hasta 350 kHz. Ambas bobinas operan en campos magnéticos que varían desde 4 hasta 24  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ , a excepción de la máxima frecuencia de la bobina Advance, que trabaja a 20  $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$ . Para llevar a cabo las mediciones, se introdujo una muestra de 40  $\mu\text{l}$  en el magnetómetro. La muestra se preparó con una concentración de Fe de 0.3  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . La muestra se introdujo en un capilar específico (WG-3000-3 3 mm NMR Economy Sample Tube w/o Cap, 3) diseñado para contenerla adecuadamente durante el proceso de medición.

Las isothermas de adsorción de  $\text{N}_2$  a 77 K se midieron en un analizador de adsorción Micromeritics 3Flex. Las muestras (alrededor de 20 a 30 mg) se activaron durante la noche a alto vacío a 90  $^{\circ}\text{C}$  antes del análisis. El área de superficie específica se extrapoló dentro del intervalo de presión relativa ( $P/P_0$ , donde  $P_0$  es la presión de saturación) de 0,05-0,3 aplicando

la ecuación de Brunauer, Emmett & Teller (BET). Los datos se analizaron utilizando el software 3Flex V5.03 (Micromeritics Instrument Corp., Norcross, GA, Estados Unidos).

Las mediciones de WAXS y SAXS se realizaron utilizando un Anton Paar SAXSpoint 5.0 equipado con una fuente de micro rayos X de Cu ( $\lambda = 0,154$  nm) con un detector 2D Pilatus3 R 1 M a 2 distancias diferentes: 288 mm para WAXS y 1343 mm para SAXS – en tubo capilar marca Hilgenberg de 1 mm de diámetro externo.



# Capítulo 3

En el apartado 3.31. de este capítulo se van a reproducir los resultados de la siguiente referencia:

Ester Polo, Vida Araban, Beatriz Pelaz, **Aitor Alvarez**, Pablo Taboada, Morteza Mahmoudi, Pablo del Pino. Photothermal effects on protein adsorption dynamics of PEGylated gold nanorods. Applied Materials Today, Volume 15, Pages 599-604 (2019).

### 3. NPS PLASMÓNICAS Y SU FUNCIONALIZACIÓN

#### 3.1. INTRODUCCIÓN

Con el aumento en los últimos años de la aplicación de NP plasmónicas en la producción industrial y el consumo doméstico, están surgiendo una serie de cuestiones acerca de la seguridad de estas partículas. La toxicidad de estas NPs está influenciada por una variedad de factores, incluyendo su tamaño, forma, composición química, carga superficial, actividad catalítica, dosis y superficie.<sup>130</sup> Sin embargo, la toxicidad asociada con la exposición simultánea a diferentes NPs plasmónicas ha recibido poca atención. La toxicidad, en este caso, puede deberse a la interacción entre las NPs individuales debido a sus diversas propiedades fisicoquímicas.

Por otra parte, las NPs debido a su alta energía superficial son termodinámicamente inestables y susceptibles de agregarse, lo que resulta en la pérdida de las propiedades con el paso del tiempo. Para muchas de las nuevas aplicaciones es necesario la preparación de NPs que se mantengan inalterables durante largos periodos de tiempo en diferentes ambientes, lo cual se consigue a través de la funcionalización de las NPs. Una de las estrategias para evitar su degradación es la encapsulación o crecimiento en el interior de MOFs. El ZIF-8, uno de los MOFs más estudiados, puede crecer sobre NPs inorgánicas de diferentes morfologías (esferas, cubos, estrellas, barras, etc.) y composiciones.<sup>131-132</sup> Los múltiples sitios de coordinación y la estructura bien definida de los poros del MOF estabiliza las NPs al proporcionar confinamiento espacial y evitar que se agreguen.<sup>133</sup> Como resultado se obtienen nanocompuestos (NC) que combinan las propiedades de las NP con las del ZIF-8. Estos NC se han presentado, por ejemplo, como plataformas para promover la liberación de fármacos en células vivas controlados mediante un estímulo externo (luz).<sup>131</sup>

Para bioaplicaciones, cuando las NPs se encuentran dispersas en un medio biológico, las proteínas del medio se adsorben sobre la superficie de la NP, formando una corona de proteína que influye en las interacciones de las NPs con barreras biológicas y células.<sup>134</sup> La corona proteica está influida por varios factores como son el tamaño de la NP, la composición superficial de la NP, esto es, los ligandos presentes en su superficie, y su carga superficial.<sup>135</sup> Los ligandos como el poli (etilenglicol) (PEG) se usan comúnmente para proporcionar NPs con estabilidad coloidal a través de interacciones electrostáticas y estéricas, así como para reducir la adsorción inespecífica de proteínas

En este capítulo, se aborda la síntesis y post-funcionalización de NPs plasmónicas de diversos materiales (Au, Ag y Cu) y morfologías (esferas, barras y estrellas). El capítulo se estructura en tres secciones en las que se examina la influencia de la co-exposición de NPs plasmónicas en su degradación, el efecto de la funcionalización con PEG en la dinámica de las proteínas presentes en la biocorona que se puede formar en la superficie de las NPs, y la encapsulación de las NPs en ZIF-8 para su empleo como sustratos de espectroscopía SERS.

Así, en la primera sección, se describe la síntesis de tres variedades de NPs plasmónicas (oro, plata y cobre) con dimensiones equivalentes ( $d_c \approx 15$  nm) y su transferencia desde una fase de disolvente orgánico al agua mediante el recubrimiento de la superficie con una capa de polímero anfifílico (poli(isobutileno-alt-anhídrido maleico)-injerto-dodecilo, PMA). Se evalúa a continuación cómo la co-exposición de las NPs plasmónicas afectó a sus propiedades ópticas y a la degradación a lo largo del tiempo, eliminándose así la influencia del tamaño y la química superficial de las NPs para centrarse exclusivamente en el efecto del material. Esta sección

forma parte de un estudio más amplio que busca comprender cómo la co-exposición de estas NPs influye en la toxicidad, aunque este aspecto no se aborda en esta tesis.

La segunda sección se enfoca en la síntesis de AuNR y el análisis del impacto de su funcionalización con PEG en la dinámica de la corona proteica en medios biológicos antes y después de la irradiación con luz. En este trabajo, se investigó la interacción de diferentes AuNRs PEGilados con diversas cargas superficiales con la proteína albúmina sérica bovina (BSA) antes y después de la irradiación láser en el rango del infrarrojo cercano (NIR).

La última sección aborda el recubrimiento de nanovarillas y nanoestrellas de Au con ZIF-8. Para evitar la degradación en medios acuosos, los NC se recubrieron con PMA. Según las aplicaciones se pueden crear capas de ZIF-8 de diferente grosor. Finalmente, se exploró el uso de NC compuestos por agregados de AuNS recubiertos con ZIF-8 como sustratos SERS.

### **3.2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AuNP, PLATA, COBRE Y SUS MEZCLAS**

Se llevó a cabo la síntesis de NPs esféricas plasmónicas de oro (AuNPs), plata (AgNPs) y cobre (CuNPs) hidrofóbicas. Posteriormente, fueron transferidas a fase acuosa, recubriendo su superficie con una capa de PMA. El PMA es un polímero anfifílico que presenta un esqueleto hidrofílico y ancla cadenas de dodecilamina (DDA) hidrofóbicas (su síntesis se describe en el apartado 2.2.23.a). Se utilizó una proporción de 4000, 300 y 300 monómeros.nm<sup>-2</sup> para las AuNPs, AgNPs y CuNPs, respectivamente. Sobre las NPs dispersas en fase orgánica, se adicionó el PMA disuelto en cloroformo, se secó y se hidrolizaron los anillos maleicos del esqueleto del polímero con una solución básica (NaOH 0.1 M). Como resultado se obtuvieron NPs revestidas con PMA que presentaron sobre la superficie grupos carboxílico cargando negativamente la superficie, lo que confirió estabilidad a las NPs en medios acuosos. Tras el revestimiento, fue necesario centrifugar las muestras para purificar las NP y eliminar las micelas de PMA libres formadas debido a la utilización de un exceso de polímero. Por último, se estudiaron las propiedades ópticas y estabildades de las dispersiones acuosas de estas NP y sus mezclas.

Las AuNPs se sintetizaron en agua siguiendo una modificación del método de Turkevich<sup>136</sup>, a partir de la reducción de ácido cloroáurico (HAuCl<sub>4</sub>) con citrato de sodio a la temperatura de ebullición del agua (2.2.2). Las AuNPs sintetizadas presentaron buena monodispersidad con un diámetro medio de 13.7 ± 1.6 nm obtenido a partir del análisis de imágenes de TEM de ca. 300 NPs (Figura 14, A). Tras la síntesis, las partículas se transfirieron a cloroformo (protocolo descrito en el apartado 2.2.23.h), mediante un proceso de intercambio de ligandos en el que los citratos fisisorbidos sobre la superficie del Au fueron sustituidos por moléculas de PEG. Las AuNPs fueron de nuevo transferidas a medio acuoso recubriéndolas con PMA (protocolo descrito en el apartado 2.2.23.d). Las AuNPs@PMA presentaron estabilidad coloidal con un diámetro hidrodinámico en número medio de 18.1 ± 3.1 nm y su LSPR se ubicó en  $\lambda_{SPR} = 524$  nm (Figura 14, C-D).

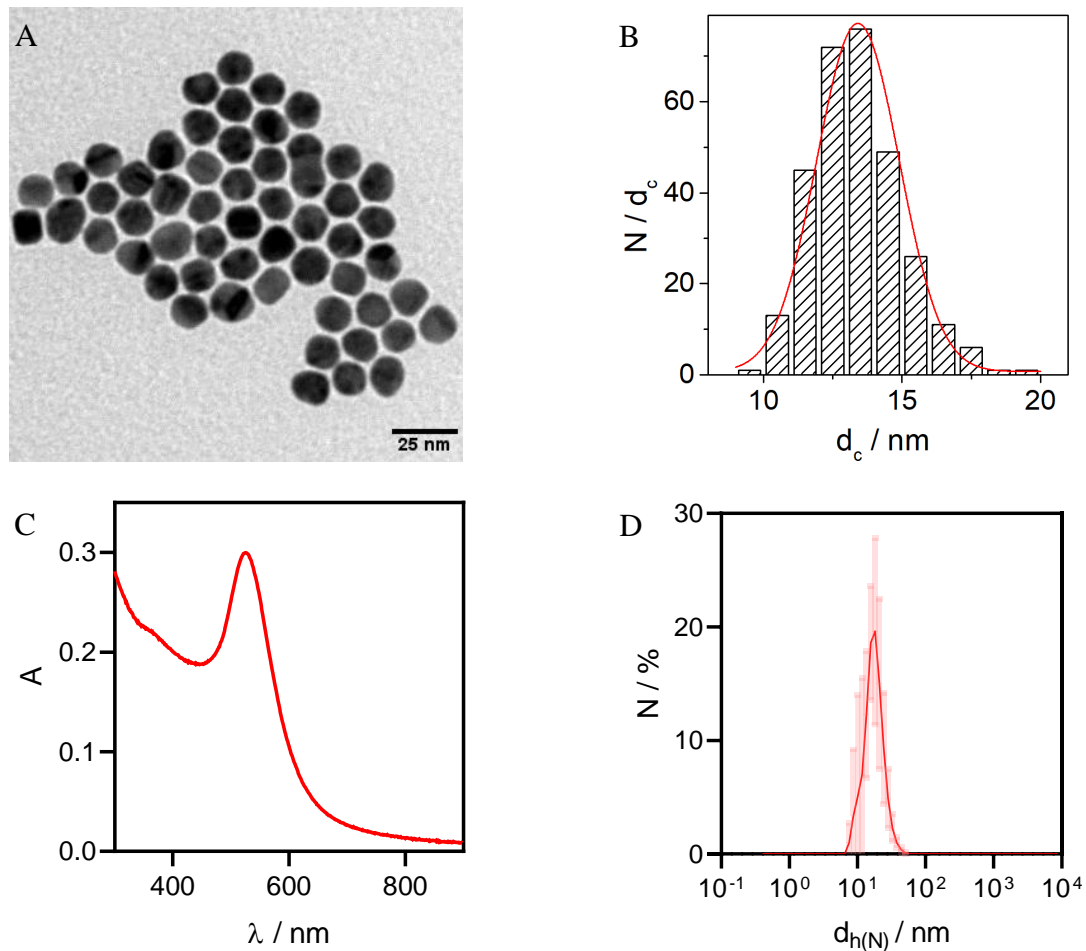


Figura 14: Imagen de TEM representativa de las AuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica  $N$  ( $N = 300$ ) del diámetro de los AuNP ( $d_c$ ) según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 524$  nm (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las AuNPs@PMA (D).

Las AgNPs fueron sintetizadas siguiendo un método de descomposición térmica de  $\text{AgNO}_3$  disuelto en OLAM (protocolo 2.2.10). Las AgNPs obtenidas presentaron un diámetro medio de  $13.2 \pm 1.7$  nm obtenido a partir de la medida de 300 NP en las imágenes de TEM (Figura 15, A). Tras la síntesis, se funcionalizaron con PMA (siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.23.d) para transferirlas a agua. Las AgNPs@PMA presentaron estabilidad coloidal con un diámetro hidrodinámico en número medio de  $15.7 \pm 1.8$  nm y su LSPR se ubicó en  $\lambda_{\text{SPR}} = 402$  nm (Figura 15, C-D).

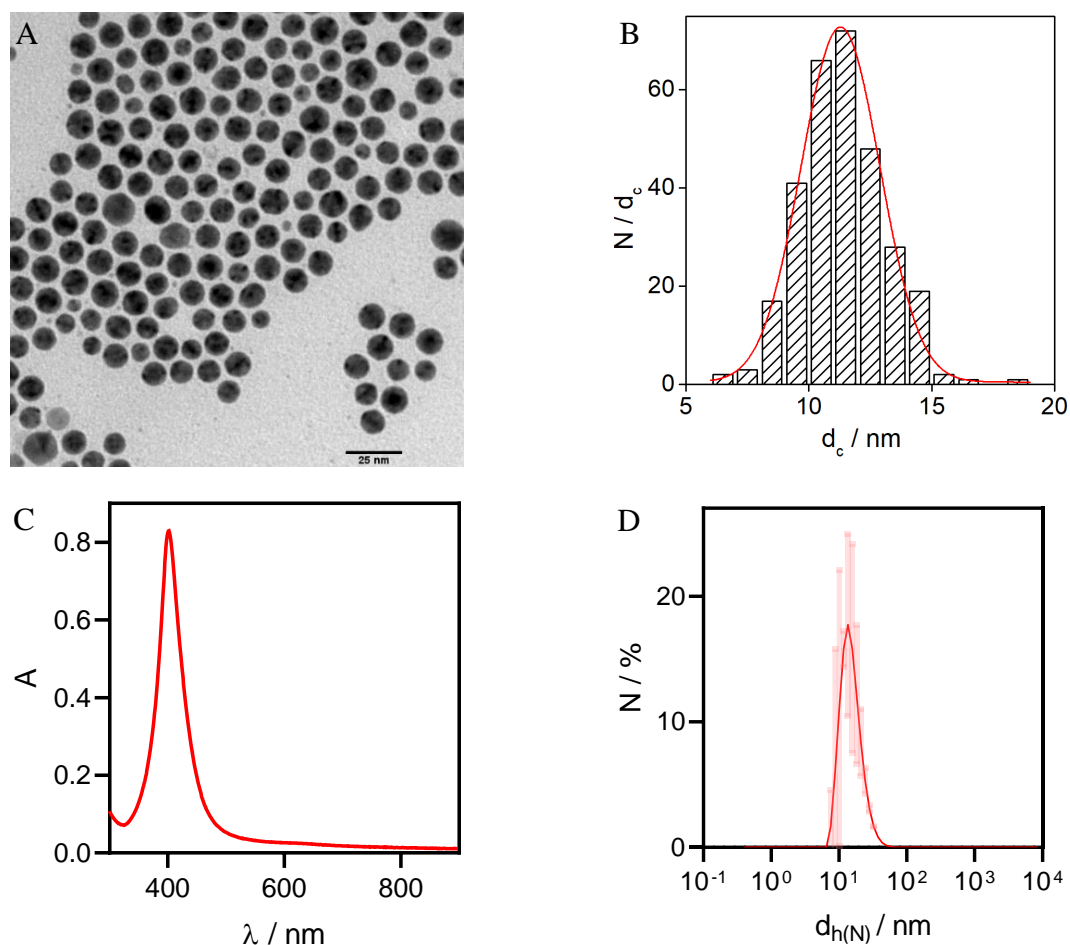


Figura 15: Imagen de TEM representativa de los AgNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica  $N$  ( $N = 300$ ) del diámetro de los AgNP según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AgNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 402$  nm (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las AgNPs@PMA (D).

Las CuNPs fueron sintetizadas por descomposición térmica de acetilacetonato de cobre (II) en OLAM (protocolo 2.2.11). Se sintetizaron CuNPs con un tamaño medio de  $15.7 \pm 2.6$  nm de diámetro, según el análisis de imágenes obtenidas mediante SEM (Figura 16, A). Tras el recubrimiento con PMA el diámetro hidrodinámico en número medio fue de  $25.3 \pm 3.0$  nm y su resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR, del inglés Localized Surface Plasmon Resonance) se ubicó en  $\lambda_{\text{SPR}} = 578$  nm (Figura 16, C-D).

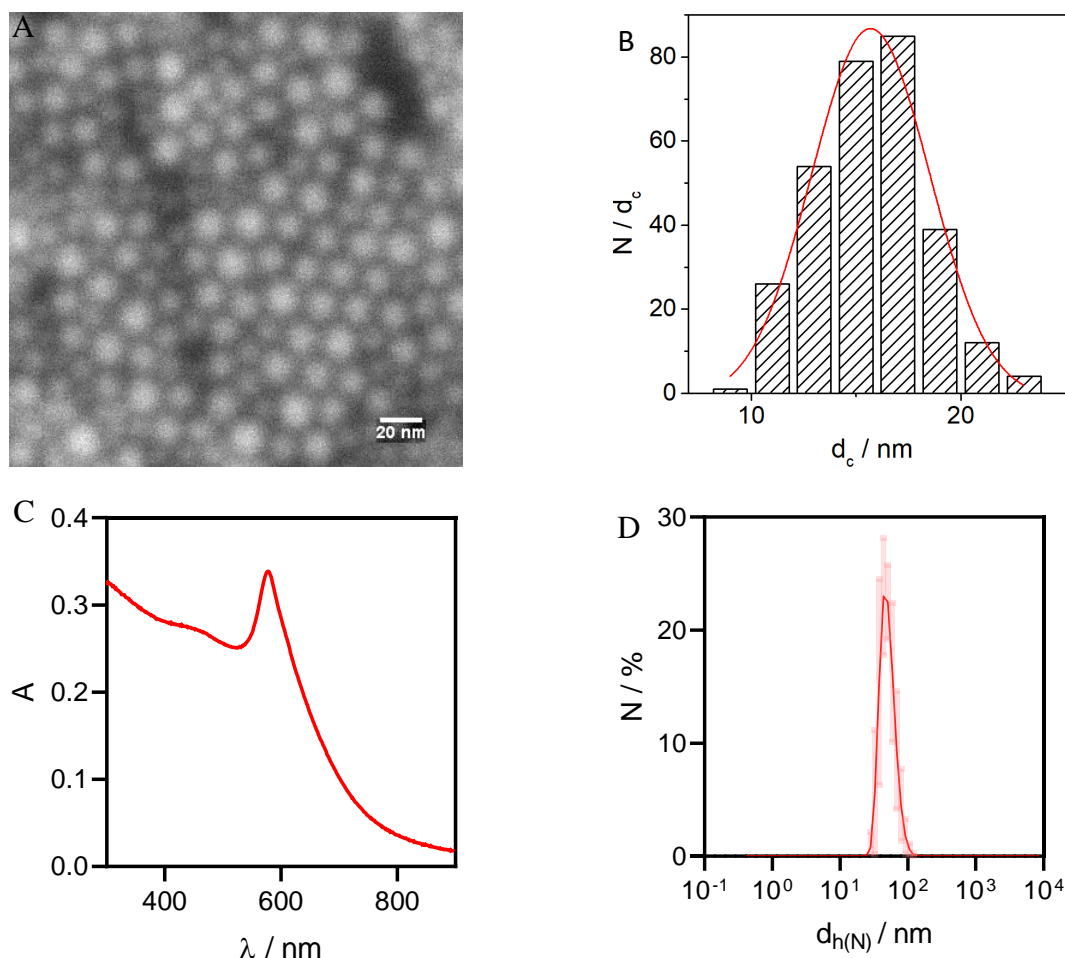


Figura 16: Imagen de SEM representativa de los CuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes de la distribución numérica  $N$  ( $N = 300$ ) del diámetro de las CuNPs según lo determinado a partir del análisis de imágenes SEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las CuNPs@PMA que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 578 \text{ nm}$  (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS de las CuNPs@PMA (D).

### 3.2.1. Estudio de la degradación de NPs metálicas y sus mezclas.

Se estudió la estabilidad de NPs plasmónicas y sus combinaciones a través de la medición de espectros UV-Vis y concentraciones por ICP durante un período de 72 h a 37 °C en agua. Este análisis se inscribió en el marco de una investigación más extensa que no se abordó en esta tesis doctoral, en la cual se pretende determinar si la exposición simultánea a diversas NPs plasmónicas podría generar una citotoxicidad incrementada debido a la degradación acelerada de las CuNPs.

Para examinar las propiedades ópticas de las mezclas de NPs, se emplearon dispersiones equimolares de AuNPs y CuNPs a una concentración de 0.2 nM. En el caso de las AgNPs, se utilizó una concentración cuatro veces menor (0.05 nM), ya que el coeficiente de extinción de la LSPR de las AgNPs es significativamente más alto en comparación con el de AuNPs y CuNPs. Por consiguiente, fue necesario trabajar con una menor concentración de AgNPs para realizar una comparación adecuada entre los tres espectros analizados.

En los espectros UV-Vis se observó que el LSPR de las AuNPs era estrecho y centrado a ca. 523 nm. La posición del LSPR a lo largo del tiempo que duró el experimento indicó que estas NPs son estables en agua a 37 °C, al menos, durante 72 h (Figura 17, A). Se observó un pequeño aumento del coeficiente de extinción a partir de las 14 h. Teniendo en cuenta que para llevar a cabo estas medidas se utilizó la misma cubeta, por lo que, podemos considerar que el camino óptico ( $l$ ) y el coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) permanecieron invariables, la única variable que debería tener efecto sobre el aumento de la extinción es un pequeño aumento de la concentración de NP. Esto podría achacarse a la evaporación del disolvente, concentrando ligeramente la muestra.

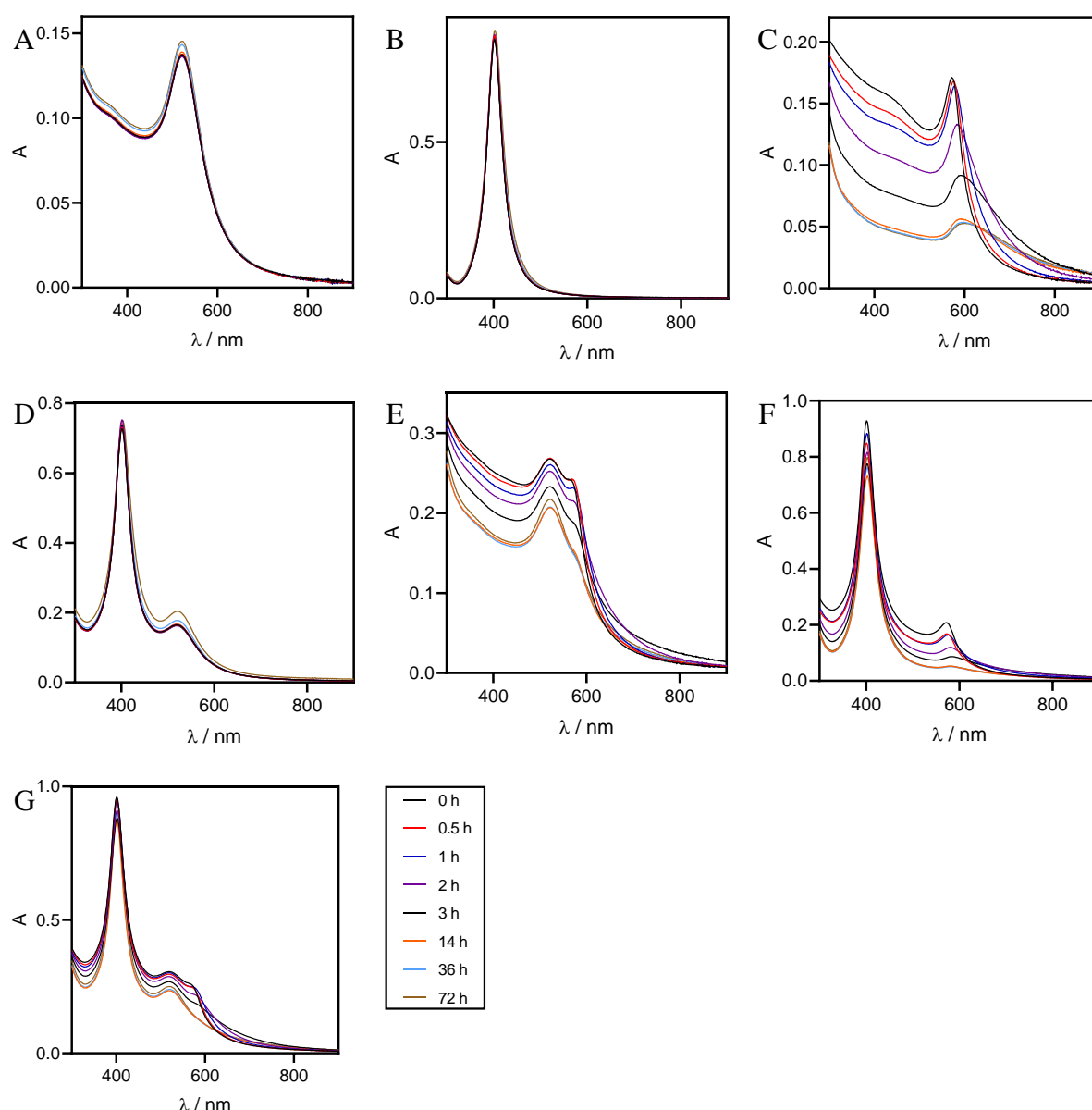


Figura 17: Espectros de absorción UV-Vis de AuNPs (A), AgNPs (B), CuNPs (C), AuNPs-AgNPs (D), AuNPs-CuNPs (E), AgNPs-CuNPs (F), AuNPs-AgNPs-CuNPs (G).

En el caso de las AgNPs, el comportamiento fue análogo al caso de las AuNPs, permaneciendo el LSPR centrado a 402 nm (Figura 17, B), no apreciándose una variación significativa en el coeficiente de extinción. Al igual que en el caso de las AuNPs, los espectros medidos indicaron que las AgNPs fueron estables durante el tiempo de análisis.

En el caso de las CuNPs, se observó una disminución de la intensidad, pasando la absorbancia de 0,17 a 0,05, mientras que el LSPR se desplazó al rojo, pasando desde los 572 nm hasta 601 nm en 72 h. Este comportamiento fue consistente con las descripciones anteriores en la literatura científica,<sup>124</sup> que indican que los átomos de Cu en la superficie de estas NPs, en presencia de oxígeno, se oxidan fácilmente a Cu<sub>2</sub>O (Figura 17, C).

Respecto a las mezclas, en el caso de las AuNPs-AgNPs (Figura 17, D), no se apreciaron cambios en la posición del LSPR, lo que indicó que las NPs se mantuvieron estables. No obstante, se produjo un ligero aumento de la intensidad de los espectros, tal como se observó en los espectros de las muestras de AuNPs solas, posiblemente debido a la razón expuesta previamente.

En el caso de las muestras mezcladas con CuNPs se observó un comportamiento análogo al de la muestra de CuNPs puras, tanto con AuNPs (Figura 17, E), como con AgNPs (Figura 17, F) o ambas (Figura 17, G), puesto que se observó un desplazamiento al rojo y la desaparición del LSPR de las CuNPs. En la mezcla con AgNPs, el LSPR se desplazó desde 572 nm hasta los 583 nm a las 72 h. En la mezcla de AuNPs y CuNPs, a las 72 h prácticamente no se podía identificar el LSPR correspondiente a las CuNPs. En la mezcla de las 3 NPs, el comportamiento del LSPR del Cu fue similar al de la mezcla AuNPs-CuNPs, no siendo posible detectar el plasmón del Cu a las 14 h de incubación.

El siguiente paso consistió en evaluar la degradación de las NPs a través de la cuantificación, en distintos intervalos temporales, del porcentaje de metal disuelto originado por la descomposición de las NPs, determinado por ICP en mezclas equimolares (1 nM) de las NPs (protocolo descrito en el apartado 2.2.22). Para ello, se mantuvieron las diferentes muestras a 37 °C durante 72 h y, en momentos específicos, se extrajo una alícuota de 0,5 ml. Dicha alícuota se sometió a centrifugación durante 30 min con el objetivo de separar las NPs de la fase acuosa, en la cual se encontraban los iones disueltos provenientes de la degradación de las NPs. Posteriormente, se determinó la concentración de metales en la fase acuosa y en el precipitado.

En el caso de las AuNPs (Figura 18, A) y AgNPs (Figura 18, B), ya sea por separado o en mezcla (Figura 18, D), se observó un comportamiento análogo al descrito previamente a través de las mediciones de espectroscopía UV-Vis. Específicamente, se verificó la estabilidad de dichas NPs a lo largo del tiempo, dado que prácticamente no se detectaron metales disueltos en el sobrenadante.

En relación a las CuNPs (Figura 18, C), el porcentaje de Cu en el sobrenadante se incrementó progresivamente durante las 72 h, lo cual respaldó la hipótesis de una degradación gradual de las CuNPs, tal como se evidencia en las mediciones de UV-Vis. Durante las primeras horas, este proceso fue especialmente pronunciado, y a partir de las 16 h, los valores se mantuvieron esencialmente estables, con aproximadamente el 60-65% del Cu detectado en el sobrenadante. Este comportamiento fue congruente con las observaciones realizadas mediante la técnica de UV-Vis.

En el caso de la mezcla de AuNPs-CuNPs (Figura 18 E), la presencia de CuNPs no pareció afectar a la estabilidad de las AuNPs, ya que la presencia de Au en el sobrenadante fue escasa,

lo que sugirió que las AuNPs presentaban una degradación mínima. En cuanto al porcentaje de Cu en el sobrenadante, se pudo apreciar un aumento en general a lo largo del tiempo, lo cual indicó una degradación progresiva de las CuNPs. Cuando se comparó el comportamiento de la degradación con el caso en el que las CuNPs estaban aisladas, se observó una tendencia similar en cuanto al aumento del porcentaje de Cu en el sobrenadante a lo largo del tiempo; sin embargo, el porcentaje de Cu en el sobrenadante extraído de la mezcla AuNPs-CuNPs fue generalmente más bajo en comparación con las CuNPs aisladas.

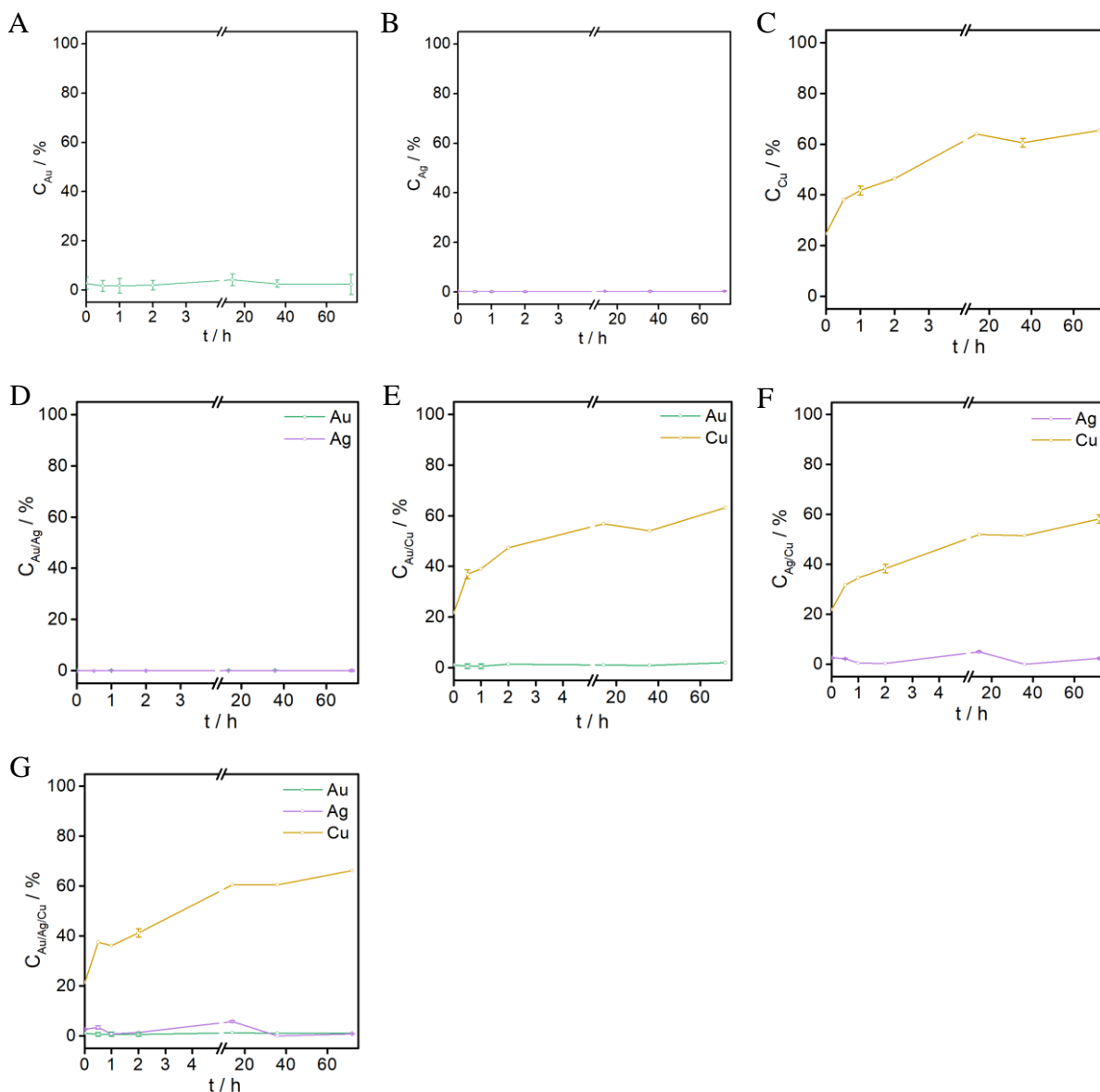


Figura 18: Evaluación de la degradación a 37 °C a lo largo de 72 h, dada como el porcentaje de metal determinado por ICP en el sobrenadante de AuNPs (A), AgNPs (B), CuNPs (C), AuNPs-AgNPs (D), AuNPs-CuNPs (E), AgNPs-CuNPs (F), AuNPs-AgNPs-CuNPs (G).

En cuanto a la mezcla de AgNPs-CuNPs (Figura 18, F), se detectaron pequeñas cantidades de Ag en el sobrenadante, pero no se observó ninguna tendencia clara, lo cual pudo deberse a que, durante el proceso de precipitación y separación, este se pudo "contaminar" con AgNPs.

Análogamente al caso anterior, las AgNPs se mantuvieron estables, mientras que, en el caso de las CuNPs, se observó una degradación progresiva, siendo esta degradación más moderada que en el caso de las CuNPs aisladas.

Finalmente, al mezclar los tres tipos de NPs (Figura 18, G), los resultados obtenidos fueron similares a los casos de las mezclas más simples con comportamiento comparable. En resumen, en todos los casos, el perfil de degradación de las CuNPs fue muy similar, siendo más pronunciado durante las primeras horas y más moderado a partir de las 16 horas, comportamiento que, por otro lado, fue deducible de los espectros UV-Vis, en los cuales se observó que, durante las primeras horas, se apreció un descenso de la absorbancia que se tornó mucho más moderado o inapreciable a las 14 horas.

Con el objetivo de investigar si la co-exposición de NPs plasmónicas tiene un efecto significativo en la citotoxicidad, se llevó a cabo un análisis para evaluar los efectos de diferentes concentraciones de NPs y sus combinaciones en cultivos celulares. En particular, se utilizó el ensayo de viabilidad resazurina para evaluar la citotoxicidad en células A549.

En la Figura 19 se presenta la evaluación de la citotoxicidad de las NPs y sus combinaciones en células A549, a través de la realización del ensayo de viabilidad resazurina. Se analizaron cinco concentraciones diferentes (5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM, 50 pM) para cada tipo de NPs y sus combinaciones.

El análisis de los datos indicó que las medidas de viabilidad celular, en general, fueron elevadas para todas las NPs y sus combinaciones, en la mayoría de las concentraciones ensayadas. Estos valores, en muchos casos superiores incluso al 100%, sugirieron que la viabilidad celular no se ve significativamente comprometida en respuesta a estas NPs.

Para las NPs de Au y Ag, la viabilidad celular se mantuvo alta a lo largo de todas las concentraciones analizadas, lo que indicó una toxicidad aparentemente baja. En el caso de las CuNPs estas mostraron una disminución de la viabilidad celular a la concentración más alta de 5 nM, bajando hasta el 87,5 %. Esta toxicidad inducida pudo ser producida por la liberación de iones  $\text{Cu}^{2+}$  provocando múltiples efectos tóxicos, como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica.<sup>137</sup>

En relación a las combinaciones de NPs, también se observó una consistente mínima muerte celular en la mayoría de las concentraciones. Sin embargo, se observó una reducción en la viabilidad celular a la concentración más alta de 5 nM para las combinaciones AgNPs-CuNPs y AuNPs-AgNPs-CuNPs, lo que indicó una mayor toxicidad de estas combinaciones de NPs a esta concentración. De hecho, la viabilidad celular en estos dos casos fue levemente inferior a la observada para las CuNPs solas, lo que podría sugerir un posible efecto sinérgico de las AgNPs en la potenciación de la toxicidad de las CuNPs. En este caso, la degradación intracelular de las CuNPs podría verse acelerada por la presencia de AgNPs, en base a sus potenciales estándar de reducción ( $E_0$ ). Estudios anteriores han documentado un aumento en la toxicidad cuando se produce una exposición simultánea a NPs, específicamente de Au y óxido de hierro, en contraposición a la exposición a un solo tipo de NPs.<sup>138</sup> Sin embargo, en esos casos, no se formuló ninguna hipótesis acerca del potencial incremento en la toxicidad.

Estos resultados son preliminares por lo que es necesario más experimentos para confirmar las observaciones realizadas. Por ejemplo, ampliar este estudio para incluir otros tipos de cultivos celulares, a fin de determinar si los efectos observados son universales o específicos

del tipo celular. Además, la evaluación de una gama más amplia de concentraciones permitiría un análisis más detallado del posible efecto de la co-exposición a diferentes NPs en la toxicidad de las NPs de cobre. Con ello, se podría llegar a una mejor comprensión de la interacción y potencial sinergia entre estas NPs y su implicancia en la citotoxicidad.

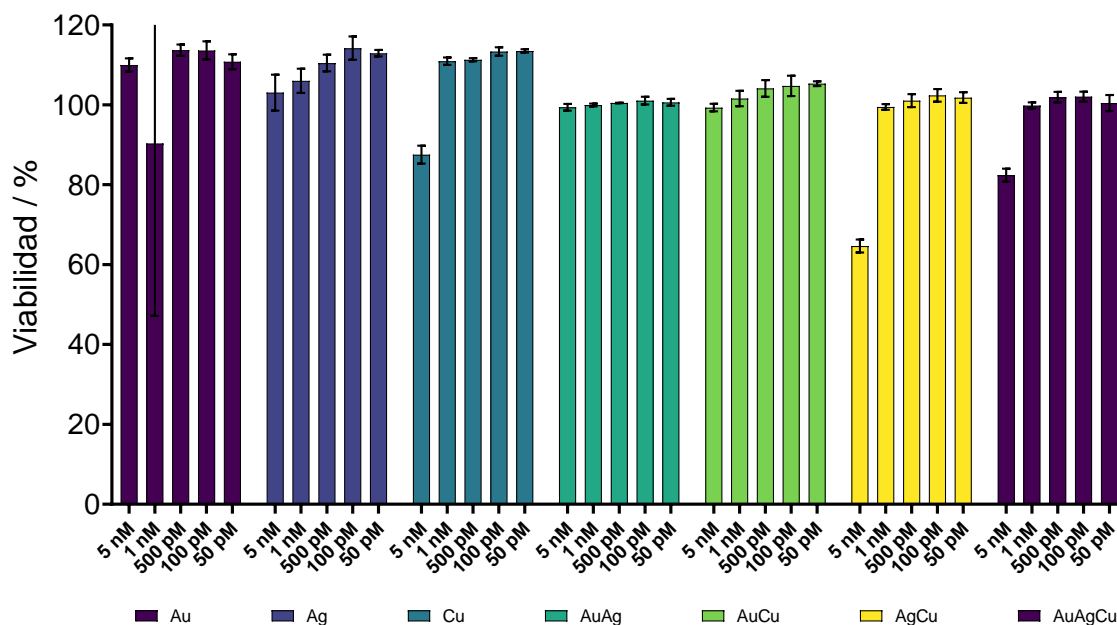


Figura 19: Ensayo de viabilidad celular en células A549 incubadas con diferentes concentraciones de NPs de Au, Ag, Cu y sus combinaciones.

### 3.3. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NPS PLASMÓNICAS ANISOTRÓPICAS

#### 3.3.1. Síntesis, funcionalización con PEG y caracterización de los AuNRs

Se sintetizaron AuNRs a partir de la reducción con AA de  $\text{Au}^{3+}$  sobre semillas de Au previamente sintetizadas en presencia de cationes  $\text{Ag}^+$  y utilizando CTAB como surfactante, tal como se describe en el apartado de métodos (2.2.3). Los AuNRs obtenidos tenían una longitud de  $33,5 \pm 4,1$  nm y anchura de  $9,5 \pm 1,1$  nm, presentando buena monodispersidad y con el LSPR longitudinal ubicado en  $\lambda_{\text{LSPR}} = 770$  nm.

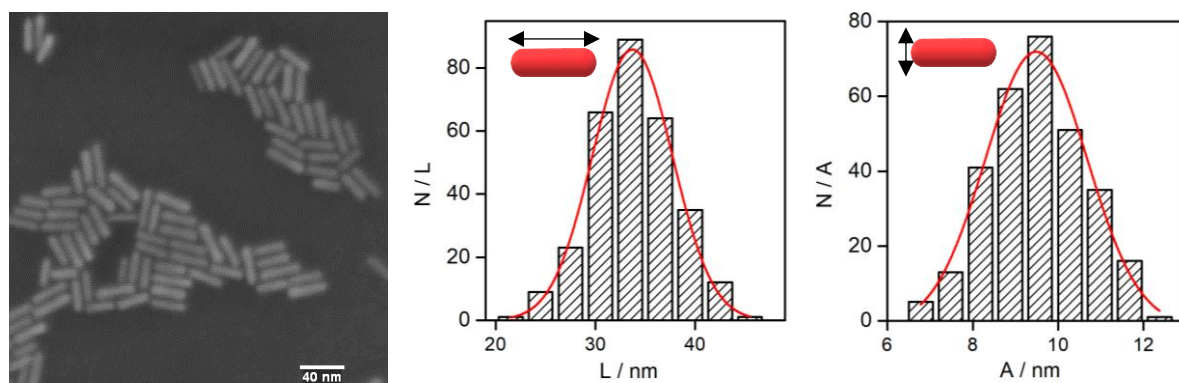


Figura 20: Imagen de SEM representativa de los AuNRs obtenidos junto con la representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes de la distribución numérica  $N$  ( $N = 300$ ) del largo ( $L = 33,5 \pm 4,1$  nm) y ancho ( $A = 9,5 \pm 1,1$  nm) de los AuNRs, según lo determinado a partir del análisis de imágenes SEM.

Tras la síntesis, se llevó a cabo un proceso de intercambio de CTAB por polímeros de PEG de 5 kDa con dos tipos diferentes de ligandos tiolados bifuncionales. Estos permitieron introducir cargas en la superficie de las AuNRs mediante el uso de HS-PEG-NH<sub>2</sub> (para carga positiva), HS-PEG-COOH (para carga negativa), o una combinación equimolar de ambos (para carga neutra) (Figura 21). De esta forma, se fabricaron AuNRs PEGilados con carga superficial positiva, negativa o neutra.

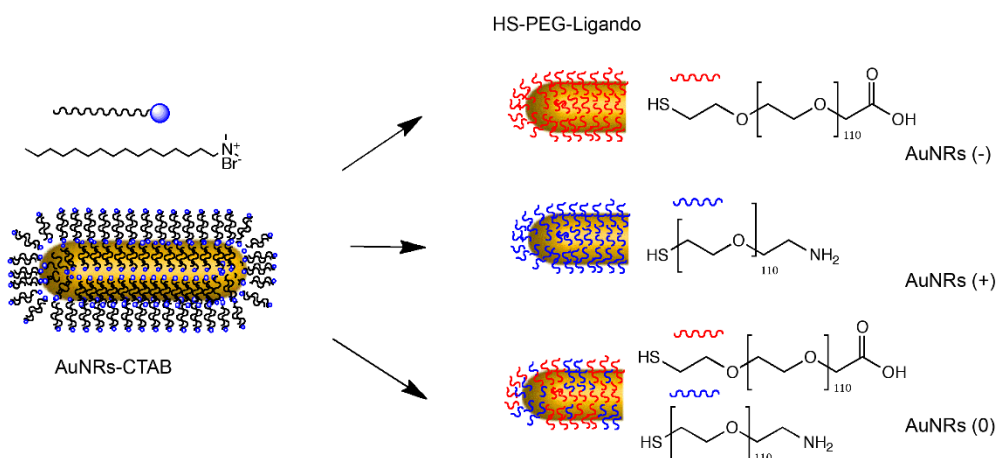


Figura 21: Representación esquemática representativa de los AuNRs PEGilados.

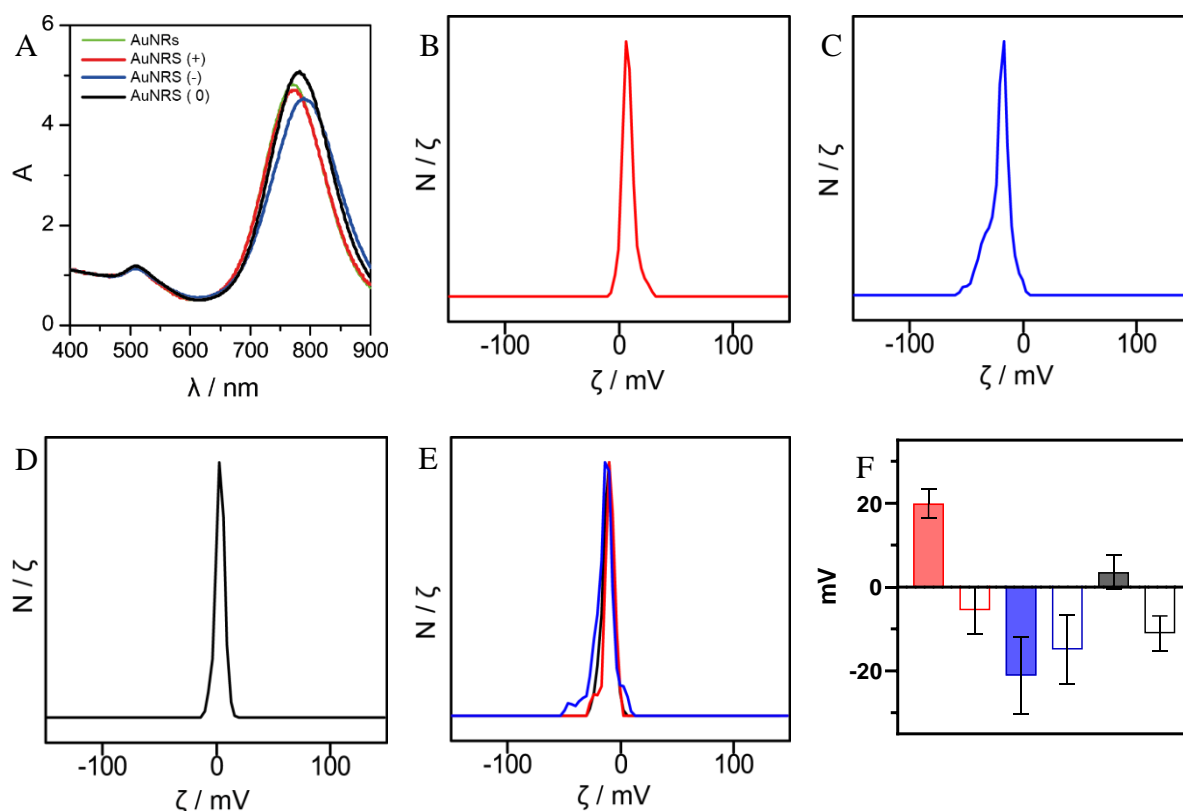


Figura 22: Espectros de absorción UV-Vis de AuNRs-CTAB (línea verde), AuNRs@PEG<sup>+</sup> (línea roja), AuNRs@PEG<sup>-</sup> (línea azul) y AuNRs@PEG<sup>0</sup> (línea negra) que muestra el pico de resonancia de plasmón superficial local (LSPR) en  $\lambda \approx 780$  nm (A). Potenciales  $\zeta$  de los AuNRs: AuNRs@PEG<sup>+</sup> ( $\zeta = 19,9 \pm 5,3$  mV) (B); AuNRs@PEG<sup>-</sup> ( $\zeta = -21,1 \pm 9,1$  mV) (C); AuNRs@PEG<sup>0</sup> ( $\zeta = 3,6 \pm 4,0$  mV) (D). Comparación del potencial  $\zeta$  de diferentes muestras AuNRs@PEG@BSA, PEG<sup>+</sup> (rojo), PEG<sup>-</sup> (azul) y PEG<sup>0</sup> (negro) normalizados a la unidad (E). Comparación del potencial  $\zeta$  de los AuNRs@PEG<sup>+</sup> (rojo), AuNRs@PEG<sup>-</sup> (azul) y AuNRs@PEG<sup>0</sup> (negro), en presencia (barras sin relleno) y ausencia de BSA (barras con relleno) (F).

A continuación, los AuNRs funcionalizados se utilizaron para estudiar el efecto del calentamiento plasmónico sobre la dinámica de las proteínas de la biocorona formada alrededor de los AuNRs@PEG. La albúmina fue la proteína elegida como modelo (BSA, Figura 23, A), ya que es la proteína más abundante en la sangre. A pesar de que la interacción entre la BSA y las NPs es débil, debido a su abundancia en la sangre, se produce la asociación de la BSA con la superficie de las NP.

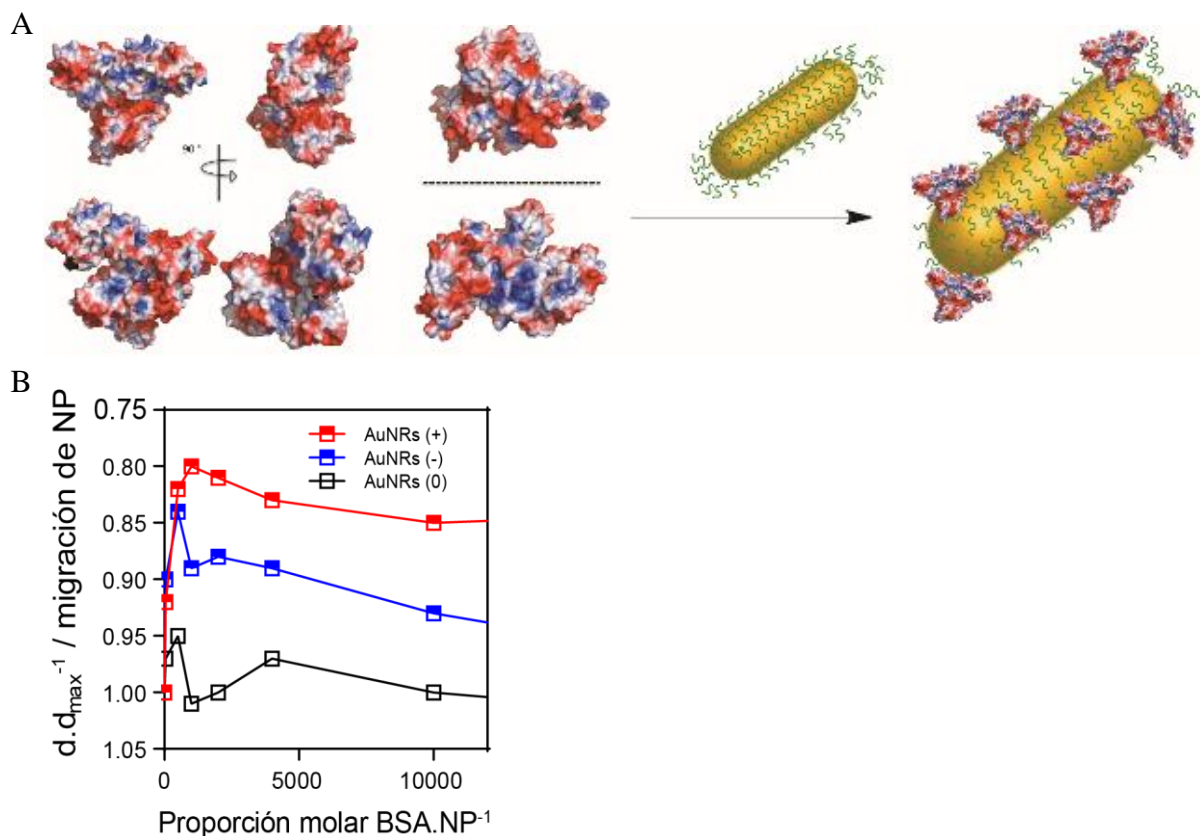


Figura 23: Representación esquemática de la estructura de BSA con los residuos de aminoácidos cargados positivamente coloreados en azul y los residuos de aminoácidos cargados negativamente coloreados en rojo (software Pymol®)<sup>139</sup> (A). Migración de los AuNRs PEGilados con diferentes cantidades de BSA adsorbidas en su superficie. La movilidad electroforética relativa del complejo AuNRs@BSA se calcula como la distancia que ha migrado cada banda correspondiente de AuNRs@BSA normalizada por la distancia del control AuNRs (sin proteína) (B)

Para ello, se midió la movilidad electroforética de los AuNRs incubados con concentraciones crecientes de BSA para estudiar la interacción de la proteína con la superficie de los AuNRs@PEG. La movilidad electroforética depende de la carga superficial, número de moléculas de BSA que interaccionen con la superficie de los AuNRs y la fuerza de la interacción de las uniones AuNRs-BSA. Así, los AuNRs@PEG<sup>+</sup> presentaron una movilidad electroforética mayor en comparación con los PEGilados con carga negativa y neutros (Figura 23, B). Como consecuencia, el potencial  $\zeta$  de las muestras incubadas con BSA fue  $-5.5 \pm 5.6$ ,  $-14.9 \pm 8.2$  y  $-11.0 \pm 4.1$  mV (Figura 22, E y F) correspondiente a las muestras PEGiladas con carga positiva, negativa y neutra, respectivamente. Todos los AuNRs funcionalizados presentaron carga negativa tras la incubación con BSA debido a la formación de la corona proteica.

Los resultados de calorimetría de valorización isotérmica mostraron una unión más fuerte entre la BSA y los AuNRs PEGilados con carga positiva y negativa en comparación con los de carga neutra. La fuerza de las interacciones entre los AuNRs y la BSA siguió el siguiente orden de mayor a menor: PEGilados con carga positiva < PEGilados con carga negativa < PEGilados con carga neutra. Además, se observó una clara dependencia de la constante de disociación de unión con la carga superficial de los AuNRs, presentando constantes de disociación (K) de  $4.22 \times 10^{-6}$ ,  $3.51 \times 10^{-6}$  y  $2.81 \times 10^{-6}$  M<sup>-1</sup> (

Tabla 5) para las partículas PEGiladas con carga positiva, negativa y neutra, respectivamente. Esto pudo deberse a que, aunque la PEGilación reduce la afinidad de los AuNRs a las proteínas, la carga final de la superficie afecta a la cantidad de proteína adsorbida.

*Tabla 5: Parámetros termodinámicos de la interacción entre BSA-AuNR PEGilados a 25 °C calculados a partir del ajuste de los datos de calorimetría de valorización isotérmica utilizando un modelo basado en un único conjunto de sitios de unión de proteínas idénticos.*

Muestra	$K \cdot 10^{-6} / M^{-1}$	$\Delta H / KJmol^{-1}$	$\Delta S / KJmol^{-1}$	$\Delta G / KJmol^{-1}$
Neutral	2.81	-84.7	-0.18	-31.6
Negativo	3.51	-308.8	-0.93	-31.1
Positivo	4.22	-552	-1.75	-30.6

Por último, se investigó la internalización de los AuNRs@BSA en células HeLa, tanto en ausencia como en presencia de irradiación lumínica en el NIR. Resultados previos, como los obtenidos por S. Suslick et al.<sup>140</sup> han señalado que a pesar de que la irradiación láser tiene efectos mínimos en la carga superficial total de la corona proteica, el calentamiento plasmónico ocasiona cambios significativos en la composición de dicha corona proteica. Este mismo patrón se observó en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Los cambios en la corona proteica podrían tener implicaciones en la absorción de las AuNRs y en su potencial efecto biológico. Mientras que el enfoque de Suslick et al. se centró en el efecto de la temperatura resultante del calentamiento plasmónico sobre la corona de proteínas, en este estudio se investigó cómo estos cambios en la corona proteica pueden afectar a la internalización de las AuNRs en células HeLa.

A diferencia de los estudios previos, en este caso se consideró el efecto de la carga del PEG en la adsorción de las proteínas. Se observó, en concordancia con estudios previos,<sup>140-141</sup> que la internalización de las muestras PEGiladas fue baja en comparación con la internalización de los AuNRs no PEGilados (Figura 24, A). La internalización de los AuNRs PEGilados por las células fue reducida debido a las propiedades de sigilo que les confiere la capa de PEG, haciéndose más acentuada la reducción debido a la corona de BSA preformada (Figura 24, B). Para estudiar el efecto del calentamiento fototérmico en la internalización tras la irradiación con láser ( $\lambda = 805$  nm, potencia de  $4W.cm^2$  durante 3 min), las muestras se precipitaron y se determinó la cantidad de BSA que permanecía adsorbida sobre la superficie de los AuNRs (descrito en el apartado 2.2.7). La disminución de la BSA adsorbida fue significativa en las muestras PEGiladas con carga positiva y moderada en las muestras con carga negativa y neutra, tanto en PBS como en DMEM (Figura 24, C). Sin embargo, tras el tratamiento fototérmico de los AuNRs recubiertos con BSA, la internalización fue significativamente menor solo en el caso de las muestras no PEGiladas (Figura 24, D). En general, las PEGilaciones con carga superficial diferente afectaron a la formación de la corona de proteínas, especialmente tras el tratamiento fototérmico; sin embargo, estos efectos no afectaron significativamente a la captación celular.<sup>141-143</sup>

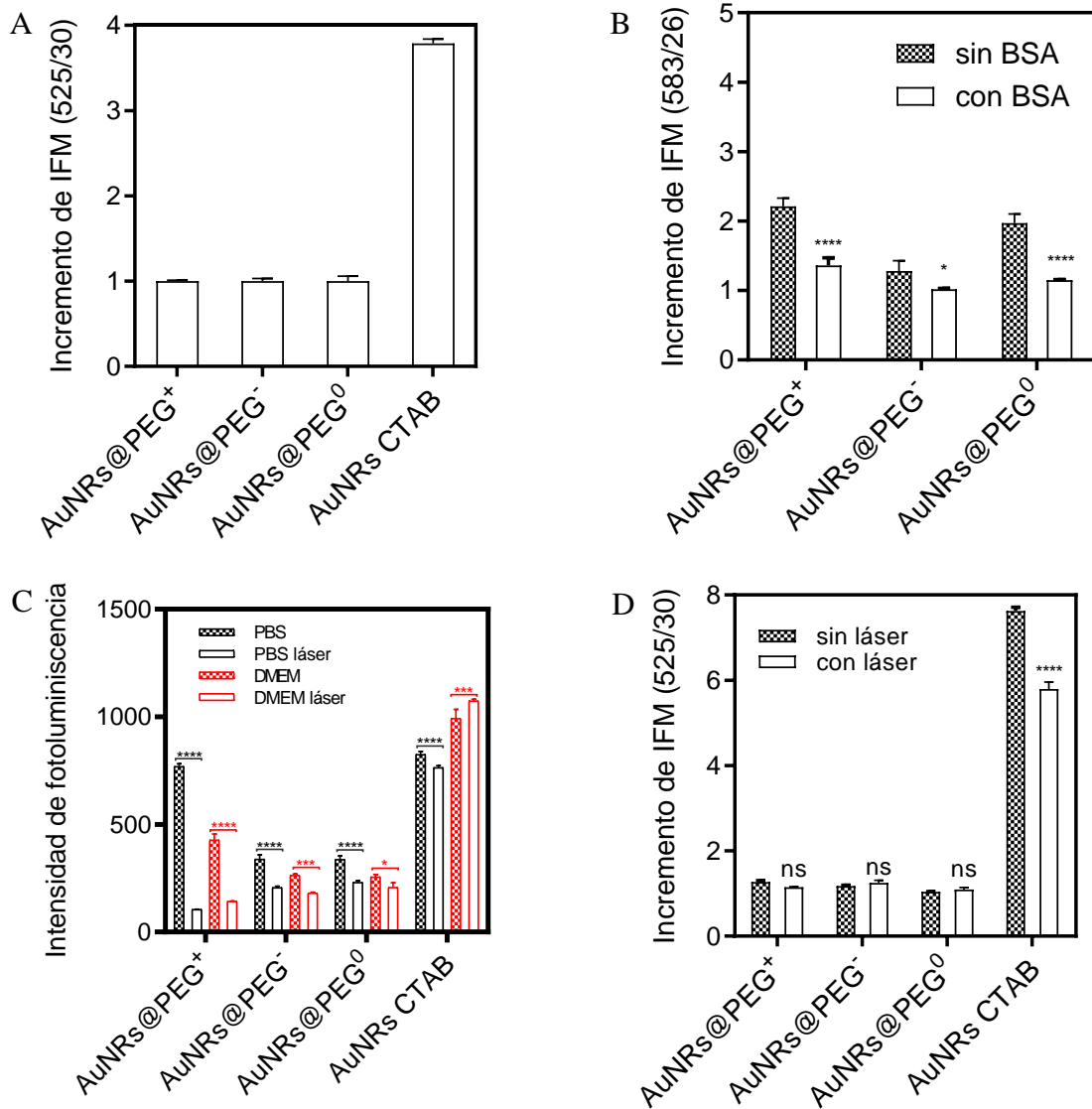


Figura 24: Interacciones de los AuNRs@BSA PEGilados con células: Internalización celular de AuNRs@BSA en células HeLa después de 3 h de incubación analizada por citometría de flujo. El incremento en la intensidad de fluorescencia media (IFM) para la intensidad de fluorescencia de la fluoresceína (FITC) demuestra la internalización de los AuNRs debido al marcado de la BSA con la sonda fluorescente (A). Internalización celular de AuNRs y AuNRs@BSA en células HeLa después de 18 h de incubación analizada por citometría de flujo. El incremento de IFM de la fluorescencia de la rodamina, demuestra la internalización de los AuNRs marcados con rodamina (B). Experimentos en tubo de ensayo de liberación de BSA desde la superficie de los AuNRs en diferentes medios (tampón PBS y medios de células completas) desencadenada por la irradiación con un láser de 805 nm de longitud de onda, durante 3 min y una potencia de 4 W/cm<sup>2</sup> (C). Internalización celular de AuNRs@BSA en células HeLa después de 3 h de incubación analizada por citometría de flujo. Aumento de la IFM de la internalización de AuNRs en células HeLa antes y después de la irradiación con láser. Las barras de error representan la desviación estándar entre tres réplicas. En todos los datos, la significación estadística se evaluó mediante la prueba t: cada muestra se comparó con la muestra sin tratamiento (ns, no significativa; \*P < 0,05; \*\*P < 0,01; \*\*\*P < 0,001).

### 3.3.2. Encapsulado en ZIF-8 de AuNR (AuNR@ZIF-8)

Los AuNRs estabilizados por CTAB se recubrieron con una capa de ZIF-8 siguiendo el procedimiento descrito en los métodos (2.2.17) formando un nanocompuesto (NC) con una estructura tipo núcleo-caparazón en la que el AuNR ocupó el centro del ZIF-8. La síntesis del NC implicó la adición de los AuNRs dispersos en una solución de CTAB sobre los precursores del ZIF-8. La mezcla se agitó durante 5 min y se dejó reposar durante 3 h, tiempo durante el cual se observó la aparición gradual de turbidez roja, lo que indicó la formación de los NCs. Tras la síntesis y purificación de los AuNR@ZIF-8, estos se redispersaron en 100  $\mu$ l de MeOH (Figura 25).

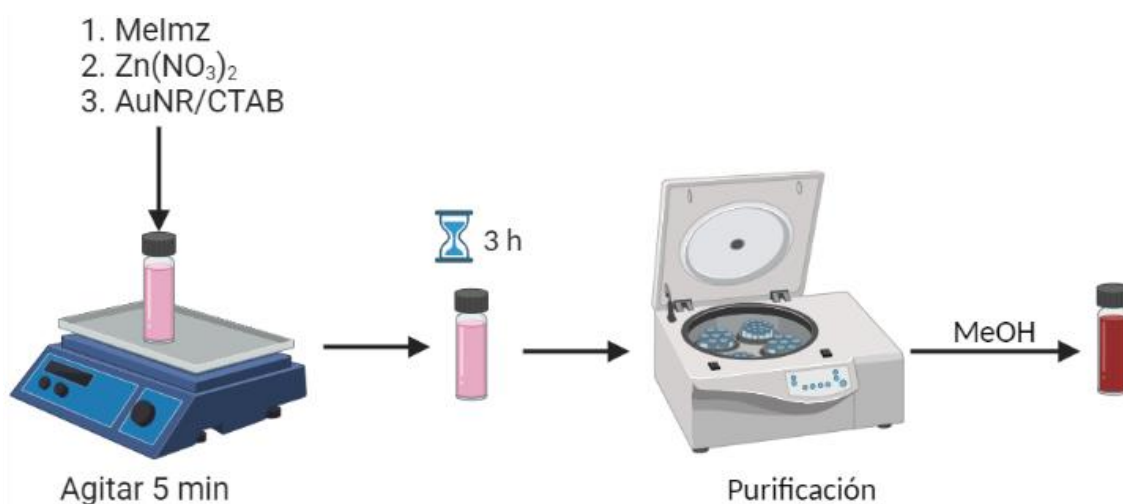


Figura 25: Esquema representativo de la síntesis de AuNR@ZIF-8.

En este caso se utilizaron diferentes concentraciones de CTAB durante la síntesis: 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se analizó su influencia en la morfología de los NCs mediante SEM. A concentraciones altas de CTAB ( $\geq 0,6 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ ), se produjeron ZIF-8 con dos morfologías y tamaños: Por un lado, se encontraron ZIF-8 cúbicos sin encapsulamiento de NPs, y, por otro lado, se encontraron ZIF-8 amorfos de tamaño reducido que contienen AuNRs encapsulados, estando la mayoría de los ZIF-8 vacíos. Por el contrario, las imágenes de SEM mostraron que tanto las muestras de NCs sintetizados utilizando concentraciones de CTAB de 0,2 como de 0,4  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  no presentaron ZIF-8 vacíos. Para la medición del tamaño promedio de los NC se utilizó el software ImageJ para dibujar círculos alrededor de, al menos, 50 NC y medir su diámetro, considerando este valor como el tamaño de cada NC debido a la forma irregular de los cubos. Así, se obtuvieron tamaños medios de  $169 \pm 13 \text{ nm}$  y  $160 \pm 8 \text{ nm}$  para las concentraciones de 0,2 y 0,4  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de CTAB, respectivamente.

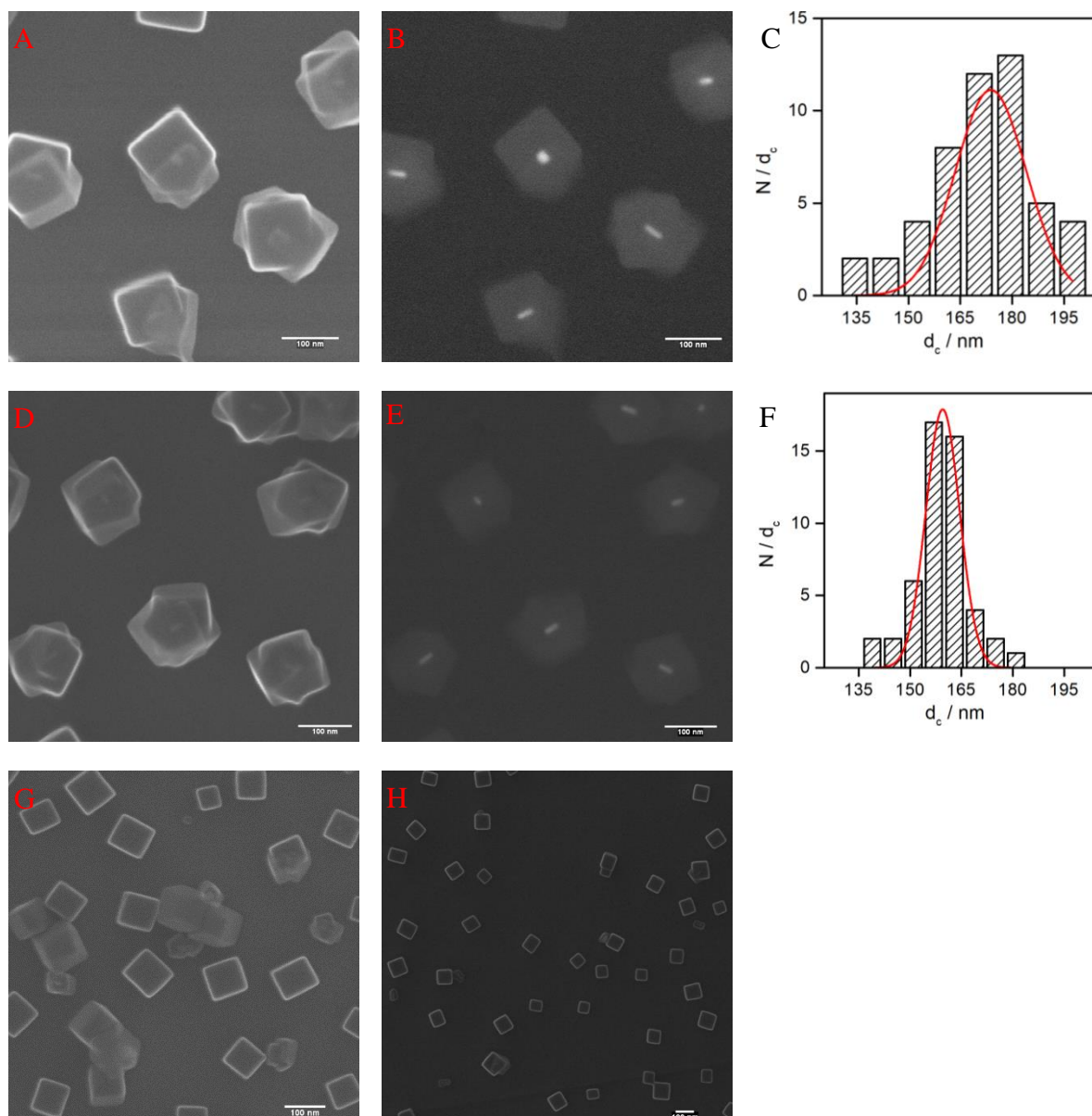


Figura 26: Imágenes de SEM con detector InLens a 5 kV, representativa de las AuNR@ZIF-8 utilizando diferentes concentraciones de CTAB durante la síntesis: 0,2 g.l<sup>-1</sup>(A), 0,4 g.l<sup>-1</sup>(D); 0,6 g.l<sup>-1</sup> (G) y 0,8 g.l<sup>-1</sup> (H). imágenes de SEM obtenidas con detector As y representaciones correspondientes de los histogramas de frecuencia del tamaño del diámetro medio del círculo que rodea una partícula AuNR@ZIF-8, obtenidos a partir de la medida de 50 AuNR@ZIF-8, utilizando diferentes concentraciones de CTAB: 0,16 g.l<sup>-1</sup> (B,C) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (E,F).

Por otra parte, se estudió la influencia del proceso de lavado en la estabilidad de los NCs sintetizados a concentraciones de 0,2 y 0,4 g.l<sup>-1</sup> de CTAB. Para ello, se llevaron a cabo diferentes tipos de lavado con distintos agentes dispersantes, tales como agua, MeOH y PSF. En particular, se evaluaron las siguientes combinaciones de lavado y redispersión: lavado con MeOH seguido de redispersión en MeOH (MeOH/MeOH), lavado con MeOH y redispersión en agua (MeOH/H<sub>2</sub>O), lavado y redispersión en agua (H<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O), lavado con MeOH y redispersión en PSF (MeOH/PSF), lavado con agua y redispersión en PSF (H<sub>2</sub>O/PSF), y finalmente, lavado y redispersión con PSF (PSF/PSF).

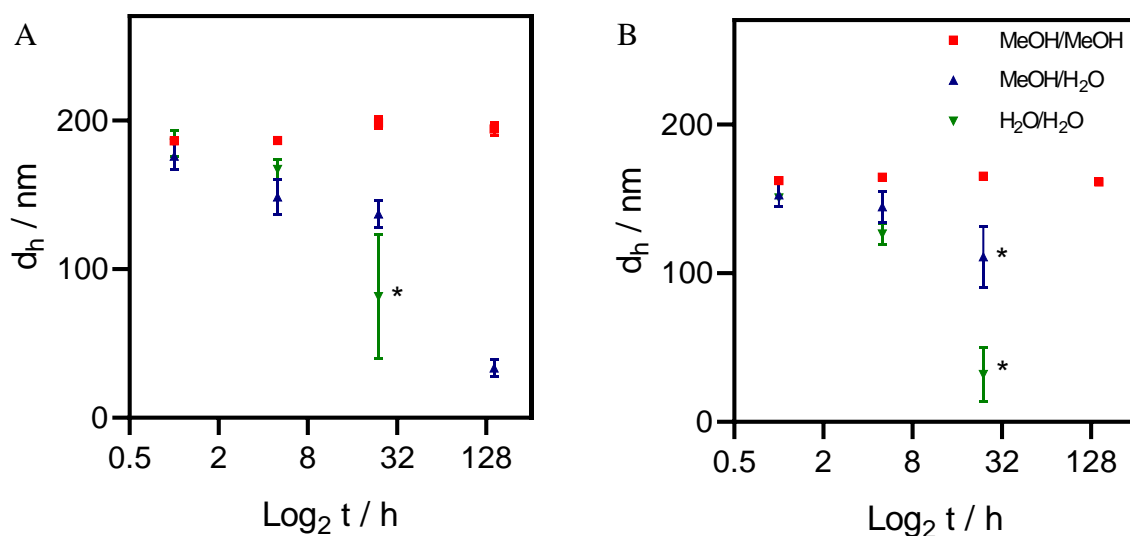


Figura 27: Tamaño hidrodinámico promediado en número medido a lo largo de 144 h (escala  $\text{Log}_2$ ) con DLS de los AuNR@ZIF-8 utilizando diferentes lavados y sintetizados en presencia de 0,2 g.l<sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (B) de CTAB. Los lavados marcados (\*) indica que en la siguiente medida los AuNR@ZIF-8 se agregaron.

Para evaluar la estabilidad de los NCs sintetizados, se empleó el DLS para medir la evolución del tamaño hidrodinámico en número medio en diferentes instantes temporales posteriores a la síntesis, específicamente a las 1, 5, 24 y 144 h. Los resultados obtenidos mostraron que, tras 5 h de la síntesis, los AuNR@ZIF-8 redispersos en agua experimentaron una significativa reducción en su tamaño hidrodinámico, y que la degradación continuó a lo largo del tiempo (Figura 27, Tabla 6).

En relación a la estabilidad del ZIF-8 en medios acuosos, existen discrepancias en la literatura científica. En contraposición a los hallazgos presentados en este capítulo, diversos estudios han confirmado la estabilidad del ZIF-8 en condiciones acuosas. Yaghi et al.,<sup>98</sup> por ejemplo, fueron los primeros en reportar que el ZIF-8 preservaba su estructura cristalina y porosidad tanto en agua a temperatura ambiente como en agua en ebullición. Esta estabilidad fue atribuida a la naturaleza hidrofóbica del ZIF-8 y a la fuerte unión coordinativa entre el zinc y el nitrógeno presente en los ligandos de imidazol. Además, se ha documentado que la estructura cristalina del ZIF-8 permanece inalterada después de la adsorción de diversos compuestos, como el benzotriazol,<sup>144</sup> ácido ftálico y ftalato de dietilo,<sup>145</sup> y furfural,<sup>146</sup> en soluciones acuosas. Incluso se ha observado que el ZIF-8 puede mantener su estabilidad en agua de mar durante 15 días.<sup>147</sup>

Por otro lado, y en concordancia con lo que se presenta en este capítulo, numerosos estudios sostienen que el ZIF-8 no es estable en condiciones acuosas.<sup>148-150</sup> La síntesis del ZIF-8 se realiza en agua, y la estructura es estable hasta que se lava el ZIF-8 y se dispersa en agua. Esta observación concuerda con los resultados publicados por Y.S. Lin,<sup>149</sup> quien propone que la estabilidad del ZIF-8 depende de la concentración de imidazolato, el cual, en nuestro caso, está presente en exceso en la solución acuosa previa al lavado. Además, se ha observado que la estabilidad en agua es independientemente del tamaño de los cristales de ZIF-8 y de los métodos de preparación.<sup>151</sup>

Tabla 6: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con diferentes fases dispersantes y redispersados en H<sub>2</sub>O, sintetizados con 0,2 g.l<sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (B) de CTAB.

		Tamaño hidrodinámico / nm			
		H <sub>2</sub> O/H <sub>2</sub> O		MeOH/H <sub>2</sub> O	
t / h	CTAB / g.l <sup>-1</sup>	0,2	0,4	0,2	0,4
	0		183 ± 3	143 ± 6	187 ± 8
1		184 ± 9	151 ± 3	176 ± 9	152 ± 8
5		167 ± 7	126 ± 7	149 ± 12	145 ± 11
24		81 ± 42	32 ± 18	137 ± 9	111 ± 21
144		626 ± 494,4	93 ± 107	34 ± 6	1026 ± 395

Tabla 7: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con diferentes fases dispersantes y redispersados en PSF, sintetizados con 0,2 g.l<sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (B) de CTAB.

		Tamaño hidrodinámico / nm					
		MeOH/PSF		H <sub>2</sub> O/PSF		PSF/PSF	
t / h	CTAB / g.l <sup>-1</sup>	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,4
	0		1,7 ± 0,8	1,8 ± 0,7	2,2 ± 0,9	3,9 ± 1,7	2,5 ± 1,2
1		1,8 ± 0,7	2,3 ± 0,8	2 ± 0,6	2,3 ± 0,5	3,1 ± 1,9	3,2 ± 1,9
5		1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,1	1,4 ± 0,4	5,4 ± 3,2	3,4 ± 1,7	2,1 ± 0,1
24		2,1 ± 0,4	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,3	9,0 ± 8,7	1,6 ± 0,3
144		1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,1 ± 0,4	22,3 ± 96	1,8 ± 0,4

Tabla 8: Tamaño hidrodinámico promediada en número medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8 lavados con MeOH y redispersados en MeOH, sintetizados con 0,2 g.l<sup>-1</sup> (A) y 0,4 g.l<sup>-1</sup> (B) de CTAB.

		Tamaño hidrodinámico / nm	
		MeOH/MeOH	
t / h	CTAB / g.l <sup>-1</sup>	0,2	0,4
	0		188 ± 2
1		186 ± 2	162 ± 2
5		186 ± 2	164 ± 1
24		198 ± 4	165 ± 2
144		194 ± 4	161 ± 2

Los resultados obtenidos para los NCs redispersos en PSF (Tabla 7) indicaron que estos no poseen estabilidad en dicho medio. La observación de valores tan reducidos en el tamaño hidrodinámico sugiere que los NCs experimentaron agregación y precipitación, lo que justifica dichos valores bajos. En contraposición, los NCs lavados y redispersados con MeOH (Figura

27, Tabla 8) presentaron un comportamiento estable durante al menos 144 horas después de la síntesis.

Así, a partir de las imágenes de SEM se confirmó que los NCs no eran estables en PSF, rompiéndose en cuanto eran redispersados (Figura 28, A, B y C). Sin embargo, cuando se redispersaron en agua se apreció una conservación de la morfología, aunque los análisis realizados mediante DLS revelaron un proceso de degradación con el tiempo. Por otra parte, para los NCs lavados y redispersados en MeOH, no se apreciaron signos de deterioro, lo que sugirió una mayor estabilidad en este medio (Figura 28, F).

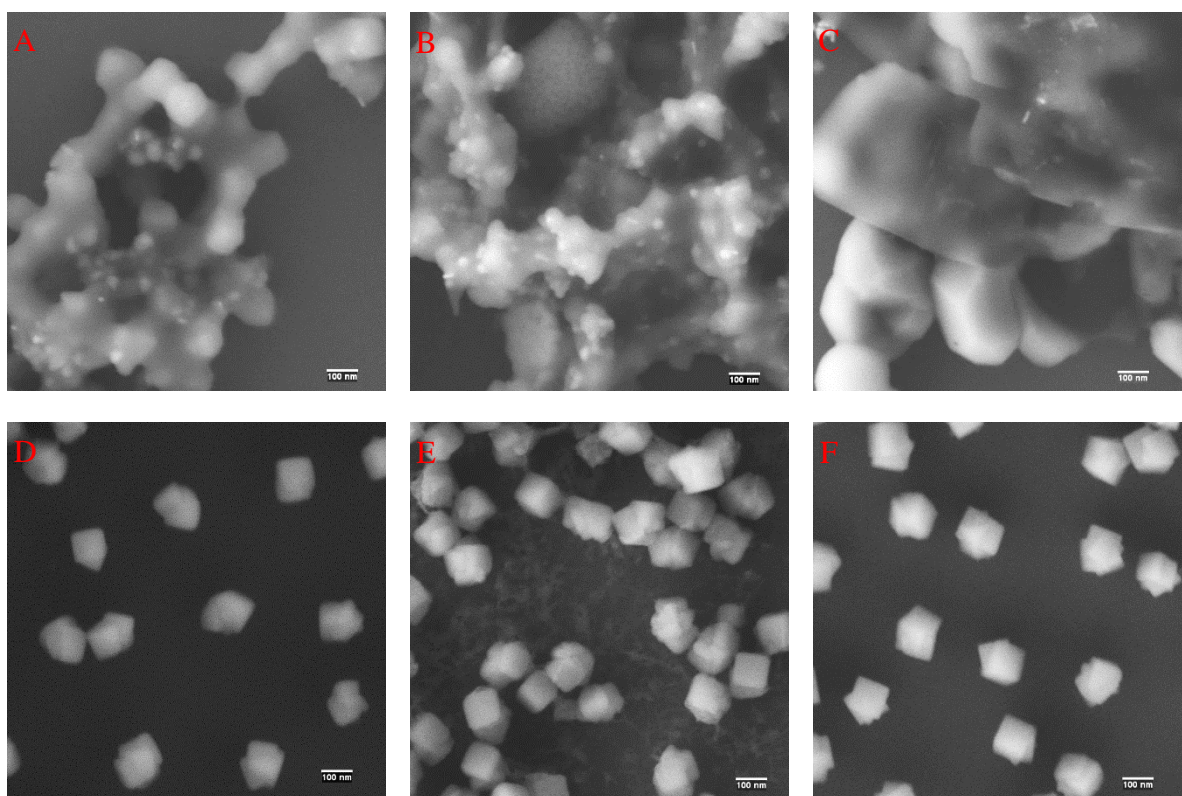


Figura 28: Imágenes de SEM con detector SE2 a 5 kV, representativas de las AuNR@ZIF-8 redispersados en PSF y lavados con MeOH (A), H<sub>2</sub>O (B) y PSF (C); redispersados en H<sub>2</sub>O y lavados con H<sub>2</sub>O (D) y MeOH (E); lavados y redispersados en MeOH (F).

Como se ha mostrado previamente, el ZIF-8 es estable en MeOH pero sufre degradación en medios acuosos. Con el fin de prevenir el contacto del ZIF-8 con el agua y, por lo tanto, asegurar su estabilidad en medios acuosos, los NC se recubrieron con un polímero anfifílico, PMA (Figura 29). El proceso de síntesis del PMA (2.2.23.a) y el protocolo de recubrimiento se describen en detalle en los métodos (2.2.23.d). La Figura 30 muestra un esquema representativo del recubrimiento con PMA.

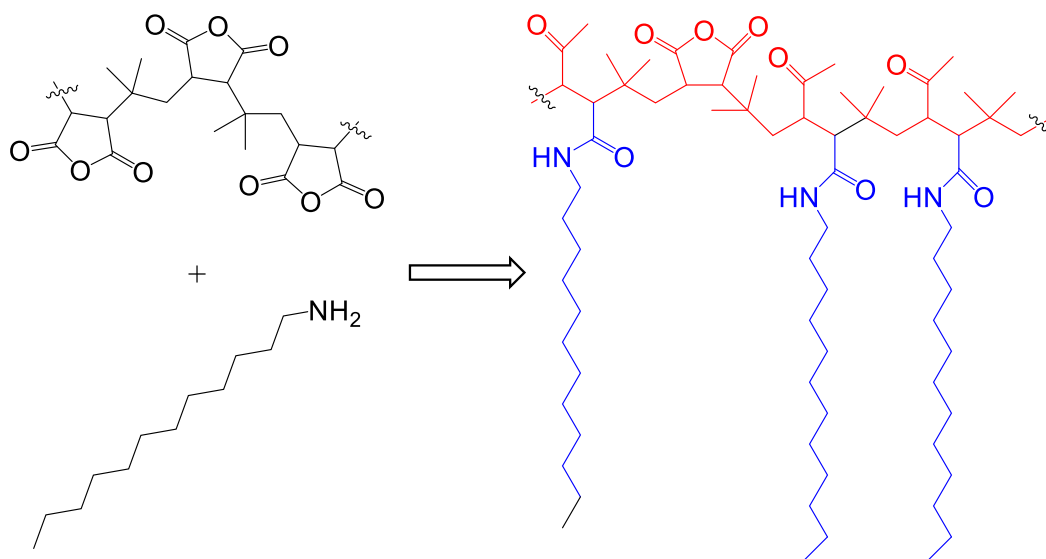


Figura 29: Esquema representativo de la reacción de 20 mmoles de poli(isobutilen-alt-maleico anhídrido) y 15 mmoles de MeOH dando lugar al PMA, polímero anfifílico formado por un esqueleto hidrofílico (rojo) al que se anclan cadenas hidrofóbicas de MeOH (azul).

La optimización del recubrimiento con PMA se basó en lograr la estabilidad coloidal de los NCs@PMA en medios acuosos utilizando la cantidad mínima de PMA para evitar la formación de un exceso de micelas poliméricas libres. Este enfoque permitió el desarrollo de una estrategia efectiva para recubrir los NC con PMA, lo que resultó en una protección efectiva contra la degradación en medios acuosos. No obstante, el proceso de recubrimiento de los NCs con PMA requirió conocer previamente la concentración de los NCs, considerando que por cada NP iba a crecer un NC. Dado que en cada síntesis se utilizó 1 ml de una dispersión de 2 nM de AuNRs, y que, tras la purificación los NCs se llevaron a un volumen final de 100  $\mu$ l de MeOH, esto dió como resultado una concentración final de NCs 20 nM. En el proceso de recubrimiento con PMA, se utilizó una relación de 600 monómeros de PMA por cada  $\text{nm}^2$  de superficie de ZIF-8. Esta cantidad de monómeros se consideró suficientemente elevada para lograr la estabilización deseada de los ZIF-8, evitando así la presencia de un exceso de polímero libre tras el proceso de recubrimiento.

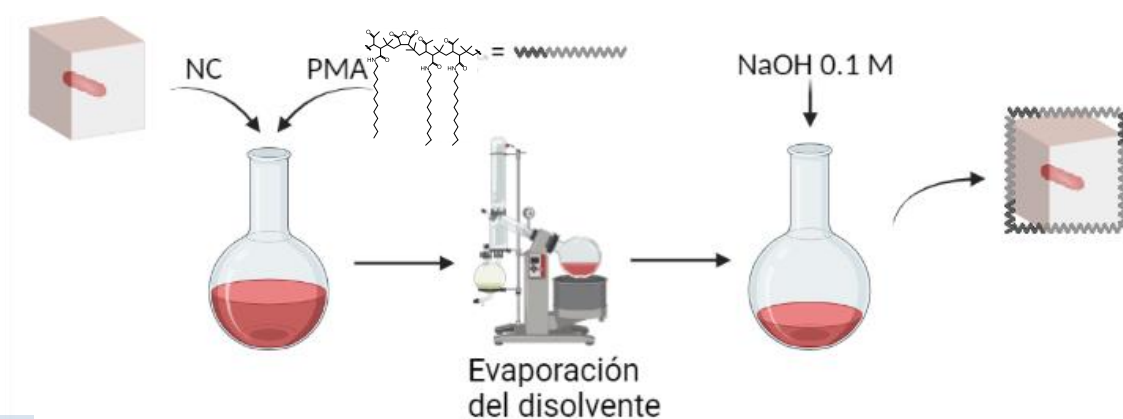


Figura 30: Esquema representativo de la funcionalización de los AuNR@ZIF-8 con PMA.

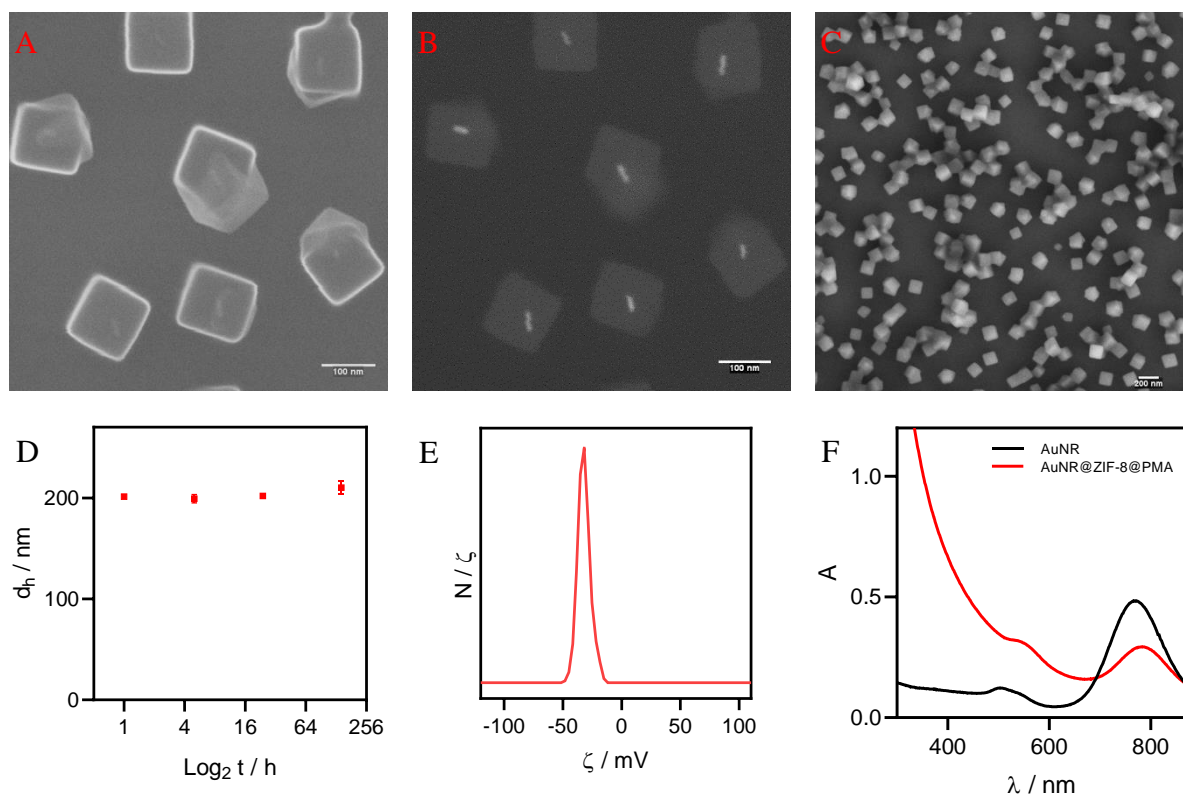


Figura 31: Imágenes de SEM a diferentes magnificaciones representativas de los: AuNR@ZIF-8@PMA tras 144 h dispersos en agua con detectores InLens (A); AsB (B) a 20 kV y detector SE2 a 3 kV (C). Tamaño hidrodinámico en número medio medido a lo largo de 144 h con DLS de los AuNR@ZIF-8@PMA (D). Potencial zeta trans la funcionalización con PMA (E). Espectro normalizado de los AuNR@ZIF-8 con el pico del LSPR centrado a 782 nm, y espectro de los AuNR con el LSPR centrado a 768 nm (F).

Tras la funcionalización, purificación y redispersión en agua de los AuNRs@PMA, las microfotografías de SEM revelaron que estos conservaban su morfología intacta. Mediante anemometría de láser Doppler se encontró que su potencial  $\zeta$  fue de  $-31,7 \pm 0,7$  mV, lo cual fue consistente con los resultados obtenidos en trabajos previos.<sup>131</sup> Asimismo, se observó que el tamaño hidrodinámico de los NCs permaneció prácticamente constante a lo largo de un periodo de 144 horas, lo que indicó que, tras la funcionalización, los NCs eran estables en agua. En particular, se determinó que el tamaño hidrodinámico de los AuNRs a las 144 horas fue de  $210 \pm 6$  nm, y su índice de polidispersidad (PDI) fue de 0,091 (Figura 31, D). El espectro UV-Vis (Figura 31) mostró un desplazamiento al rojo del pico del LSPR de los AuNR@ZIF-8@PMA respecto al de los AuNRs solos debido al mayor índice de refracción del ZIF-8 ( $\approx 1.54$ ) en comparación con el agua, situándose a 782 nm. Este comportamiento fue similar al observado en sistemas análogos previamente reportados.<sup>152</sup>

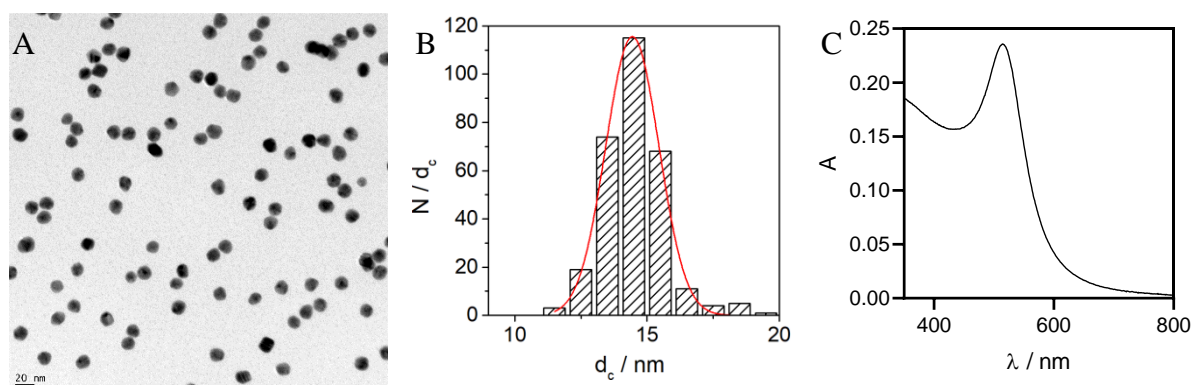
### 3.3.3. Síntesis y encapsulación en ZIF-8 de AuNS

Se sintetizaron AuNSs siguiendo un protocolo recogido en el apartado de métodos (2.2.8) previamente descrito en la literatura científica. Para ello, se sintetizaron AuNSs a partir de AuNPs estabilizadas por citrato, usando iones plata como agentes de bloqueo y AA como agente reductor.

El primer paso de la síntesis consistió en la generación de semillas de Au mediante la reducción de cationes  $\text{Au}^{3+}$  con citrato, según el procedimiento descrito por Schulz et al.<sup>121</sup> Las AuNPs resultantes presentaron un diámetro medio de  $14,3 \pm 1,1$  nm, determinado a partir de la medición de 300 partículas en imágenes de TEM (Figura 32, A y B). A continuación, se caracterizaron las propiedades ópticas de las AuNPs mediante UV-Vis. El espectro mostró que el LSPR se situó en  $\lambda_{\text{LSPR}} = 515$  nm (Figura 32, C). Conociendo la concentración de Au determinada por ICP-MS, y asumiendo que las NPs eran esferas de diámetro medio de  $14,3 \pm 1,1$  nm, se obtuvo una concentración de NP de 1,3 nM. A partir de la medida de la absorbancia a 450 nm de longitud de onda a diferentes concentraciones de NPs ( $A_{450\text{nm}}=0,158$ ), se calculó finalmente un coeficiente de extinción a 450 nm ( $\epsilon_{450}$ ) de  $1,75 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Figura 11).

Para la síntesis de AuNSs las semillas se utilizaron a una concentración de 2 nM, y se asumió que por cada AuNP creció una AuNS. Tras purificar las AuNSs estas se redispersaron en 4 ml de una disolución acuosa de CTAB  $0,2 \text{ g.l}^{-1}$ , siendo la concentración final de AuNSs de 2 nM. En el espectro UV-Vis (Figura 20, E) el LSPR estaba localizado a  $\lambda_{\text{LSPR}} = 725$  nm. Las AuNSs, tal como se observa en la imagen SEM (Figura 20, D), presentaron una morfología irregular con las puntas características de este tipo de NPs.

Al igual que en el caso de los AuNRs, también se sintetizaron NCs utilizando las AuNSs como semillas sobre las que se creció el ZIF-8, dando lugar a NCs de AuNS@ZIF-8, analizándose la influencia de diferentes concentraciones de AuNSs en las nanoestructuras resultantes (Figura 33). Las imágenes SEM muestran los NCs sintetizados con diferentes concentraciones de AuNSs (Figura 34). Estos NCs fueron más grandes que los sintetizados con AuNRs como semillas, lo que pudo atribuirse al mayor tamaño de las primeras en comparación con las segundas. La geometría de los NCs es cuasiesférica, no presentando vértices como en el caso de los AuNR@ZIF-8. En las imágenes, en concordancia con los datos de DLS (Figura 34), se apreció que a medida que se aumentaba la concentración de AuNSs se producía una disminución en el tamaño medio de los NCs. De las concentraciones estudiadas, la más adecuada fue 2 nM, ya que a menor concentración de NPs había nanoestructuras de ZIF-8 vacías mientras que a mayores concentraciones aumentó el número de NCs con más de una estrella como núcleo por cada ZIF-8; incluso a concentraciones altas (6 nM), se observaron estrellas no encapsuladas (Figura 34, K).



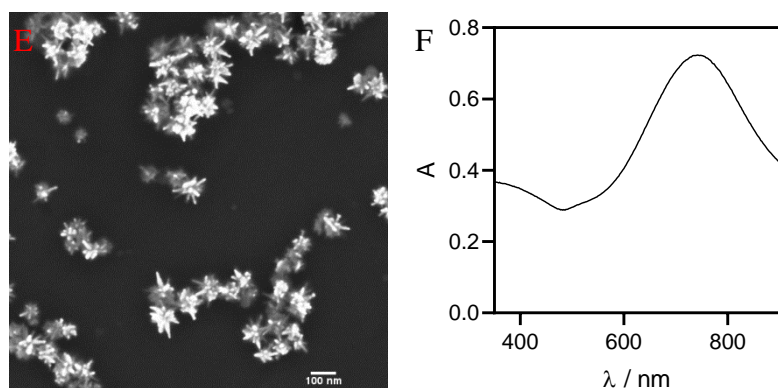


Figura 32: Imagen de TEM representativa de las AuNPs (A). Representación de los histogramas de frecuencia de tamaño correspondientes a la distribución numérica  $N$  ( $N = 300$ ) del diámetro de las AuNPs según lo determinado a partir del análisis de imágenes TEM (B). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNPs, que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 515$  nm (C). Micrografía SEM representativa de las AuNSs, detector InLens a 3 kV(D). Espectro de absorción UV-Vis de las AuNSs que muestra su pico de resonancia de plasmón superficial localizada (LSPR) en  $\lambda = 725$  nm.

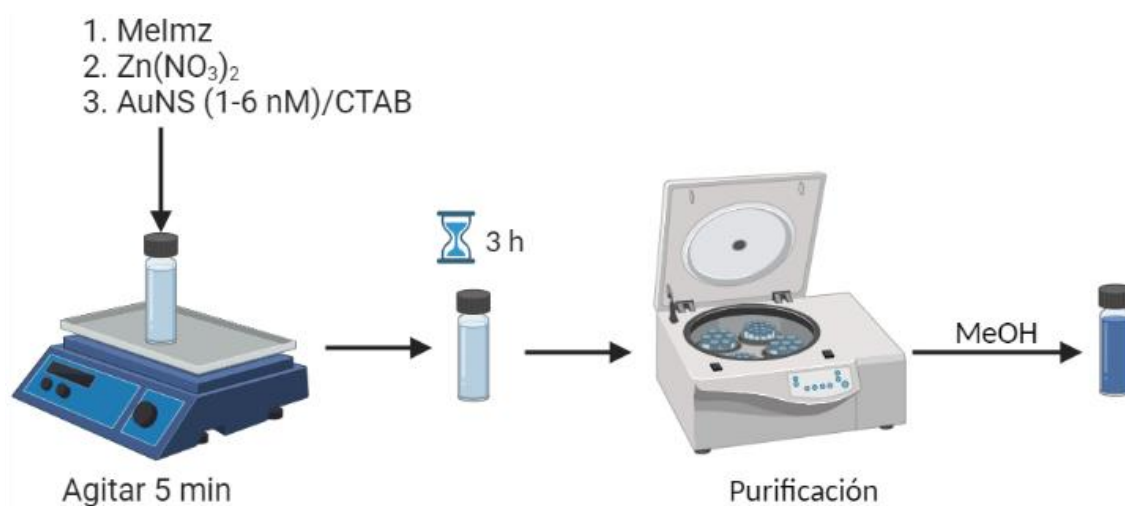
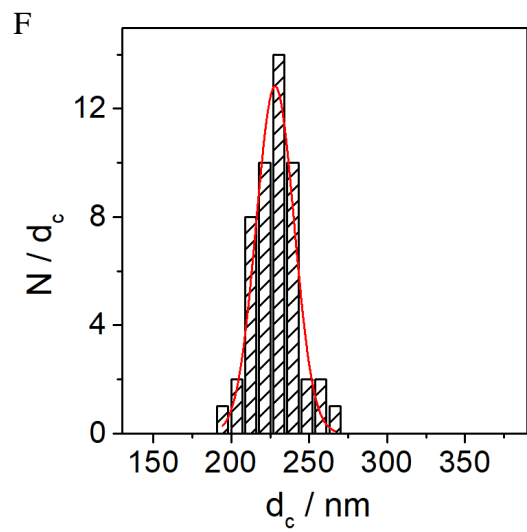
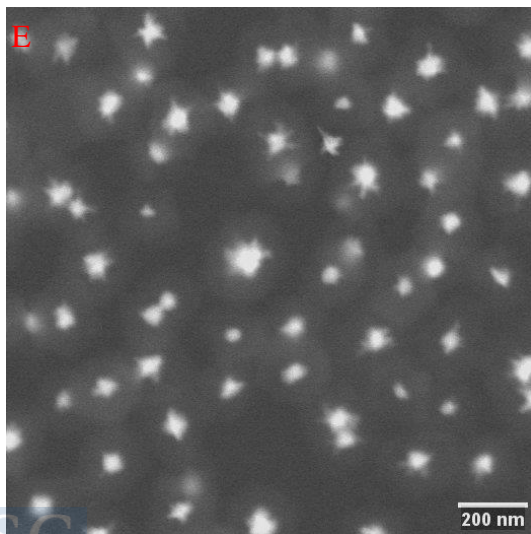
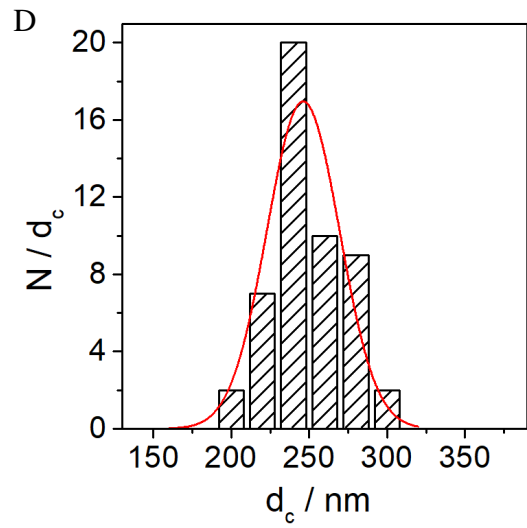
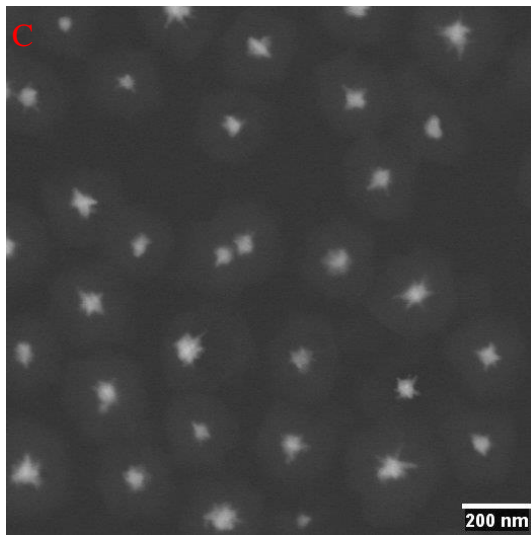
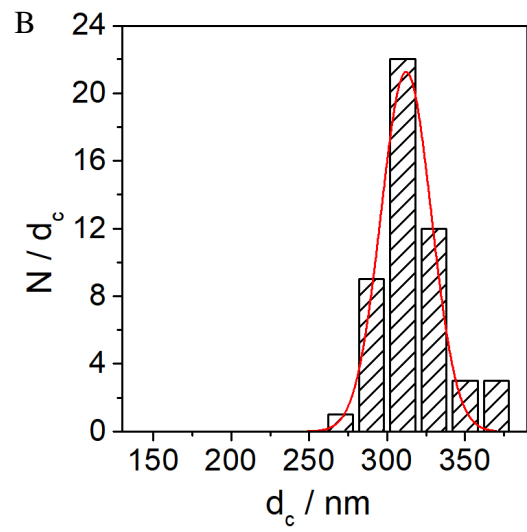
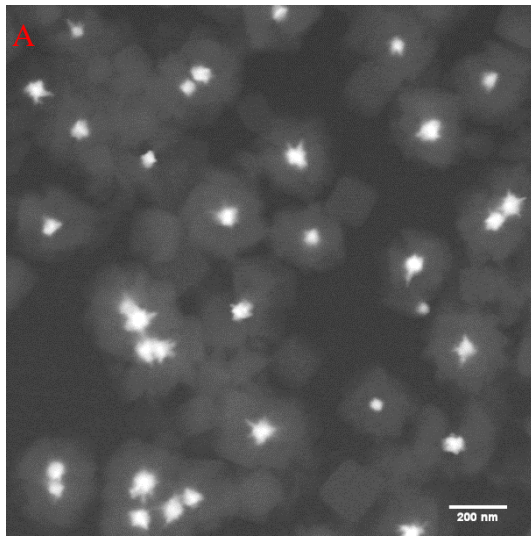


Figura 33: Esquema representativo de la síntesis de AuNS@ZIF-8



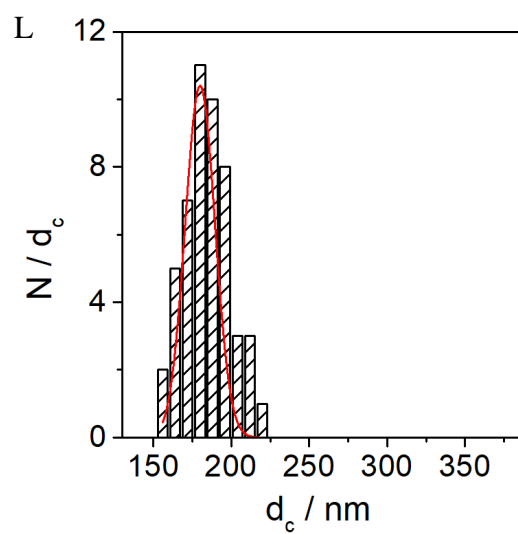
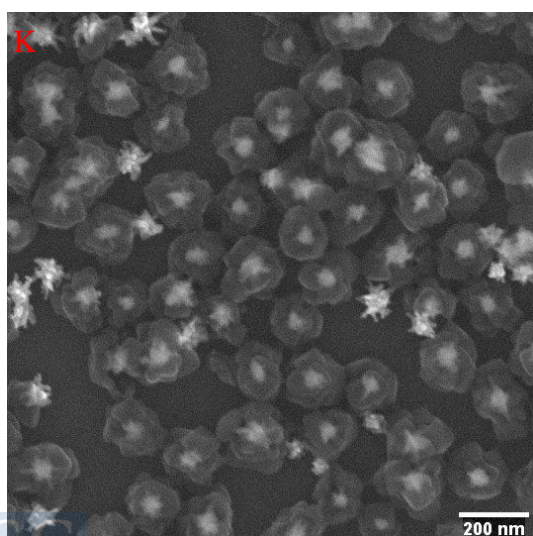
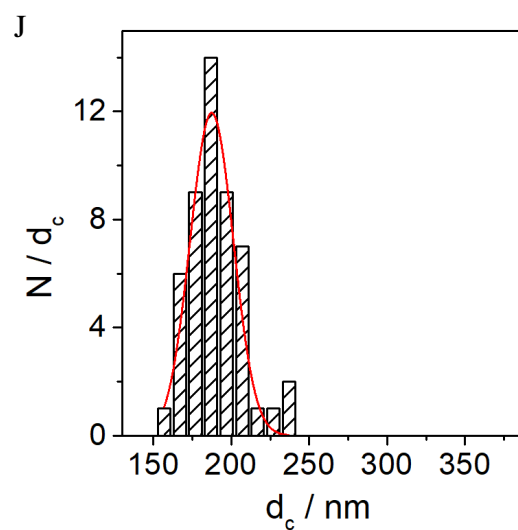
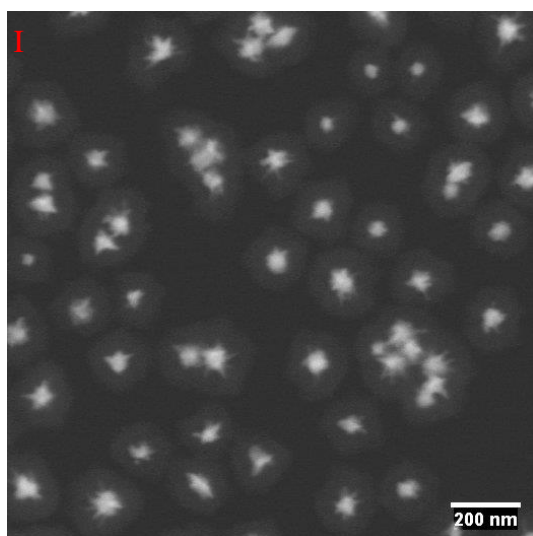
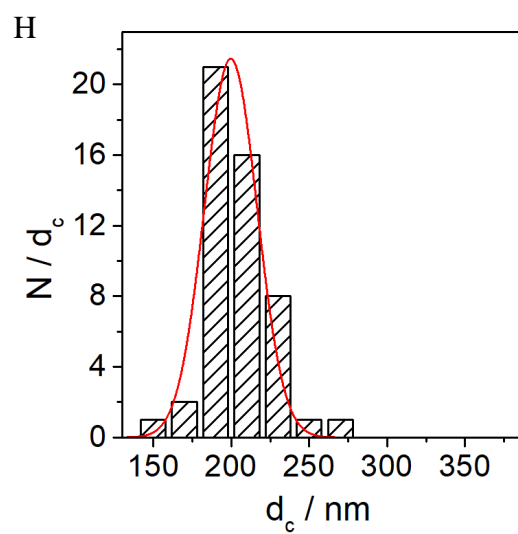
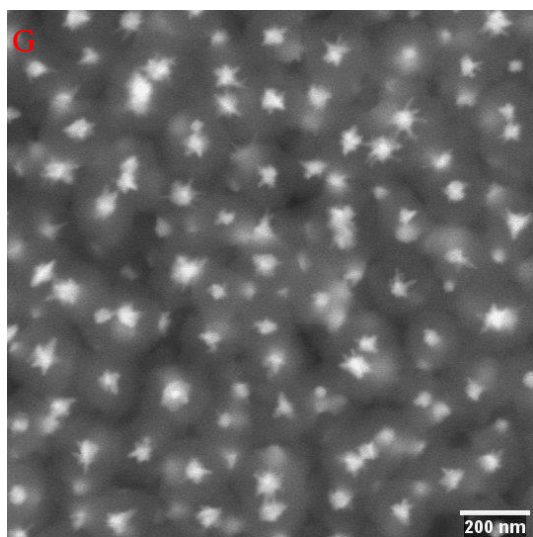


Figura 34: Imagen de SEM con detector AsB a 30 kV, representativa de los AuNS@ZIF-8 y las correspondientes representaciones de los histogramas de frecuencia del tamaño del diámetro medio (obtenidos a partir de la medida de 50 AuNS@ZIF-8), calculados mediante la envolvente formada por un círculo que rodea un AuNS@ZIF-8 a diferentes concentraciones de AuNSs: 1 nM (A, B), 2 nM (C, D), 3 nM (E, F), 4 nM (G, H), 5 nM (I, J) y 6 nM (K, L).

Así, la disminución del tamaño del NC al aumentar la concentración de AuNSs se ajustó a una función sigmoïdal (Figura 35, A). A concentraciones de partícula bajas, la curva presentó una pendiente pronunciada mientras que, al aumentar la concentración, la curva se fue aplanando progresivamente. Esto pudo explicarse considerando a las AuNSs como puntos de nucleación. Al incrementarse la concentración de AuNSs, aumentó el número de puntos de nucleación, lo que dio lugar a una mayor formación de NCs. Como consecuencia, el tamaño de los NCs disminuyó, siempre y cuando la cantidad de precursores se mantenía constante. Esta disminución se hizo menos abrupta a medida que fue aumentando la concentración de AuNSs debido a que comenzaron a formarse NCs con 2 o más AuNSs, apareciendo ya a concentraciones altas, AuNS no encapsuladas.

Por otra parte, el espectro UV-Vis (Figura 35, B) mostró el aumento del LSPR al aumentar la concentración de AuNSs empleadas, encontrándose un mayor incremento de intensidad a concentraciones altas de NP ( $\geq 5$  nM). Esto pudo deberse a la presencia de AuNSs no encapsuladas. Por otra parte, al igual que en el caso de los AuNR@ZIF-8, se observó un desplazamiento hacia el rojo del LSPR de los NC respecto al de las AuNSs libres.

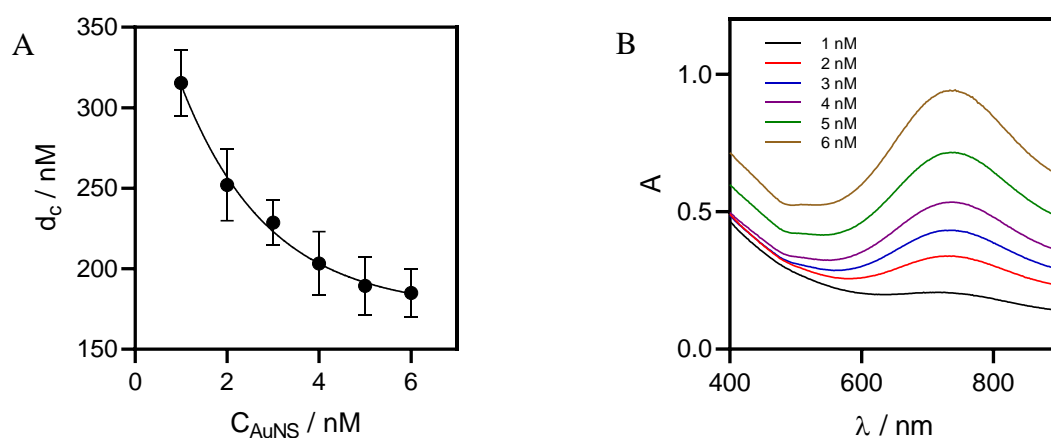


Figura 35: Relación entre el tamaño de los AuNS@ZIF-8 y la concentración de AuNSs utilizadas para sintetizar los NCs. Espectro de absorción UV-Vis de los AuNS@ZIF-8 que muestra su pico de LSPR en torno a  $\lambda = 743$  nm

Tabla 9: Tamaño hidrodinámico en número medio obtenido por DLS y tamaño obtenido a partir de las imágenes de SEM, respectivamente, de los AuNS@ZIF-8 utilizando diferentes concentraciones de AuNSs en su síntesis.

Concentración AuNS / nM	PDI	Tamaño hidrodinámico / nm	Tamaño SEM / nm
1	0,199	272	317 $\pm$ 23
2	0,189	222	252 $\pm$ 22
3	0,028	256	228 $\pm$ 14
4	0,078	231	203 $\pm$ 20
5	0,063	218	189 $\pm$ 18
6	0,133	176	186 $\pm$ 18

### 3.3.4. Desarrollo de un nanocompuesto AuNS@ZIF-8 como sustrato SERS

A continuación, se estudió la aplicación de los NCs como sustratos para espectroscopía de Raman mejorada por superficie (SERS). En particular, se emplearon NCs formados por agregados de AuNSs recubiertos con una capa de ZIF-8, sintetizados siguiendo el procedimiento detallado en la sección de métodos (2.2.19). Posteriormente, se aplicó una capa de PMA sobre los NCs para estabilizarlos en soluciones acuosas, de acuerdo con lo descrito en la sección de metodología (2.2.23.d).

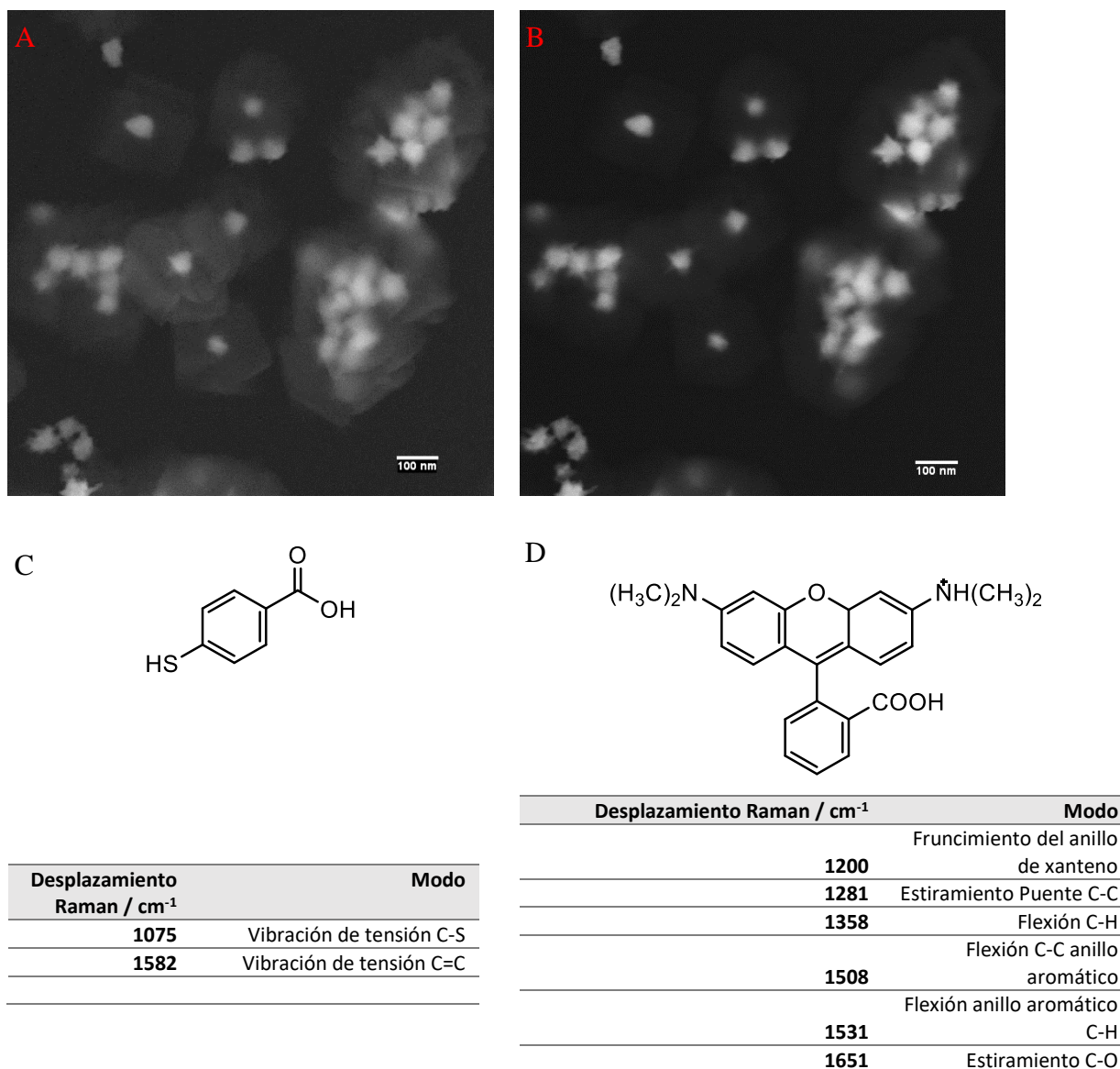


Figura 36: Imagen de SEM a 20 kV, representativa de las AuNS@ZIF-8 con detector SE2 (A) y AsB (B). Estructura del 4-MBA y sus señales Raman más intensas (C). Estructura de RoB y sus señales Raman más intensas (D).

Se seleccionaron el 4-MBA y la RoB como compuestos prueba Raman. La Figura 36 C y D, muestran las estructuras moleculares del 4-MBA y RoB, así como las bandas Raman más intensas correspondientes a cada compuesto.

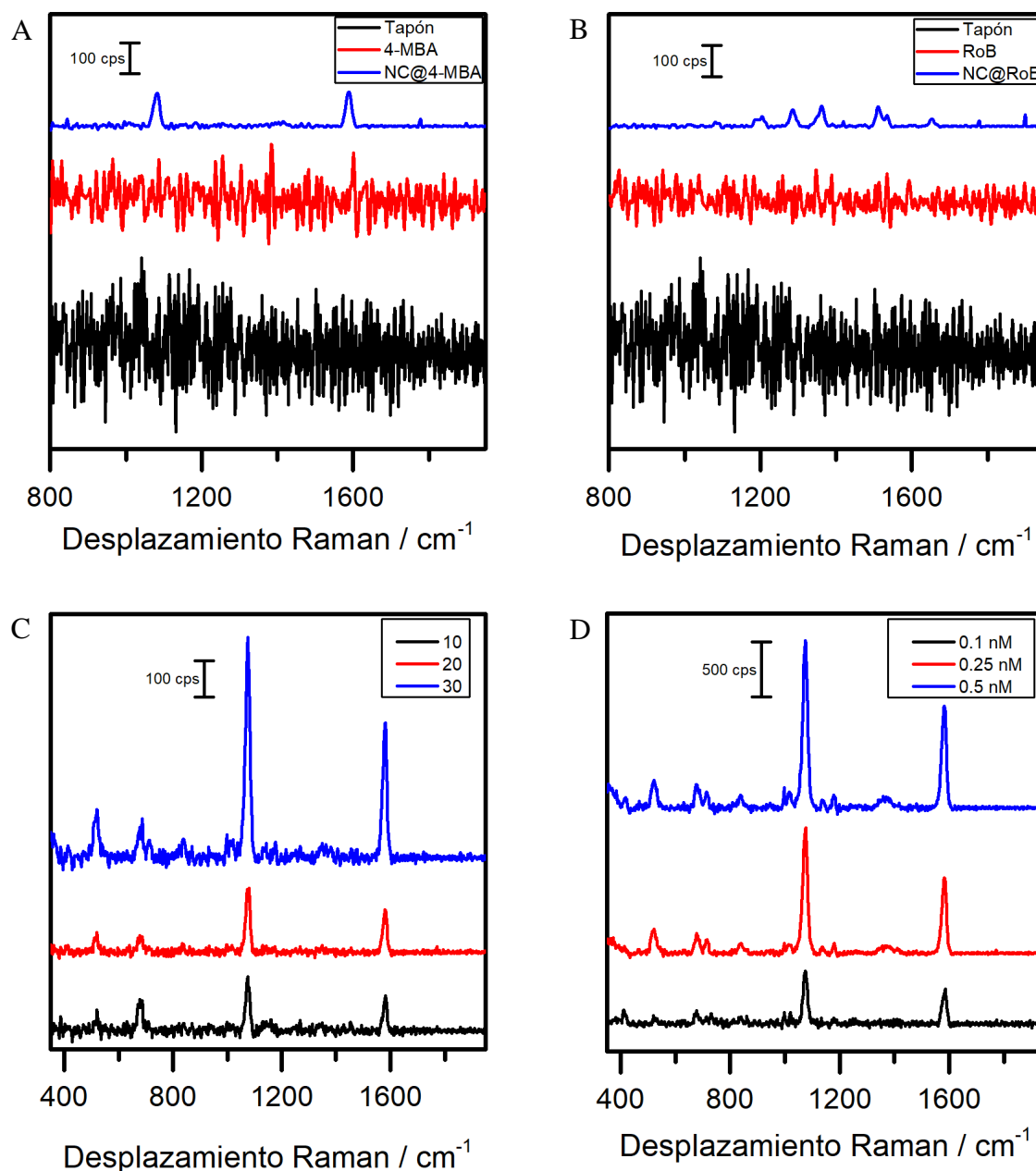


Figura 37: Espectros Raman del 4-MBA medido en una dispersión acuosa de NC a 0,1 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M comparado con el espectro del 4-MBA en agua y el tapón de polipropileno sobre el que se realizan las medidas (A). Espectro Raman de la RoB medido en una dispersión acuosa de NC a 0,1 nM y una concentración de RoB de  $10^{-3}$  M comparado con el espectro de la RoB en agua junto con el tapón de sobre el que se realizan las medidas (B). Espectros Raman del 4-MBA medidos en dispersiones acuosa de NC: a 0,1 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M a diferentes números de adquisiciones (C), a diferentes concentraciones de NC y 30 acumulaciones (D). Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia láser de 60 mW y 0,5 s de tiempo de integración.

Así, se prepararon suspensiones acuosas de los NCs con agregados de AuNSs en su interior a una concentración de 0,1 nM y diferentes concentraciones de 4-MBA y RoB (en el apartado 2.2.20 describe la preparación de las muestras para medir en el Raman). Estas suspensiones se agitaron durante una noche para permitir que las moléculas difundiesen a través de los canales porosos del ZIF-8, hasta alcanzar el núcleo del NC, donde estaban inmovilizadas la AuNSs. Las concentraciones de pruebas Raman utilizadas fueron  $10^{-3}$  y  $10^{-5}$  M. En el caso de la RoB se detectó señal a concentraciones de  $10^{-3}$  M; sin embargo, no se detectó señal a  $10^{-5}$  M. En el caso del 4-MBA se detectó señal a ambas concentraciones. Posteriormente, se repitieron las medidas a concentraciones de  $10^{-3}$  M en el caso de la RoB y  $10^{-5}$  M en el caso del 4-MBA, pero en ausencia de NCs, sin detectarse señal en ningún caso (Figura 37). Esto indicó que solo era posible detectar estas moléculas a estas concentraciones en presencia de NCs dispersos, lo que implicó que las moléculas podían difundir a través de los poros del ZIF-8 hasta alcanzar el núcleo del NC, entrando en contacto con las AuNSs y produciéndose, al irradiar la muestras con el láser, el aumento de la señal Raman.

Al aumentar el número de acumulaciones a 30 s, aumentó significativamente la intensidad de la señal Raman, aunque esto implicó un aumento considerable en el tiempo de adquisición (Figura 37, C). Por otro lado, también se observó un aumento significativo en la intensidad Raman al aumentar la concentración de NCs de 0,1 a 0,25 nM; sin embargo, no se observó un aumento significativo adicional en la intensidad de la señal Raman al aumentar la concentración de NCs hasta 0,5 nM (Figura 37, D).

A continuación, se estudia la evolución del espectro Raman del 4-MBA en función del tiempo permitido para la encapsulación de la sonda. A partir de una dispersión de NC a una concentración de 0,1 nM con 4-MBA disuelto a una concentración de  $10^{-5}$  M, se toman alícuotas a diferentes tiempos, desde 0 hasta los 240 min y se mide el espectro Raman bajo las mismas condiciones. Se observa que 15 min después de la preparación de la mezcla ya se detectan las señales del 4-MBA. La intensidad de las señales va en aumento hasta los 60 min, momento a partir el cual, la señal permanece invariable (Figura 39).

Por último, se procedió a realizar mediciones de los espectros Raman para diferentes concentraciones de 4-MBA utilizando los NCs como sustratos. Con la finalidad de garantizar una carga máxima, se estableció un tiempo de carga de 120 min. Las mediciones fueron realizadas utilizando el láser de 785 nm, con una potencia de 60 mW, 10 acumulaciones, 0,5 s de integración y una concentración de NCs de 0,25 nM. Se midieron concentraciones que oscilaron entre  $10^{-5}$  M y  $10^{-7}$  M, evidenciándose que la disminución de la concentración de 4-MBA se correlacionó con una disminución en la intensidad de la señal Raman. Además, se mantuvo una relación lineal entre la intensidad del pico a  $1074\text{ cm}^{-1}$  y la concentración entre  $10^{-6}$  y  $10^{-5}$  M. Es importante destacar que, incluso a las concentraciones más reducidas ( $10^{-7}$  M), se continuó detectando la señal Raman del 4-MBA.

En la literatura científica existen diversos ejemplos de sustratos para SERS que combinan el uso de ZIF-8 con NPs plasmónicas. Un ejemplo de ello es el trabajo de Hai *et al.* quienes desarrollaron un material compuesto por NPs de oro y plata inmovilizadas sobre una superficie de vidrio y recubiertas con ZIF-8.<sup>153</sup> Este sustrato presenta una alta estabilidad y sensibilidad, lo que le permite evitar la agregación excesiva de las NPs y lograr una rápida determinación de carbendazim, un fungicida sistémico que induce efectos tóxicos agudos en humanos y es un importante contaminante detectable en alimentos, suelos y agua.<sup>154</sup> Este sustrato ha demostrado ser capaz de detectar el carbendazim en muestras de agua de mar, con un límite de detección

(LOD) de  $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  y un rango de detección lineal amplio entre  $10^{-9}$  y  $10^{-5}$  M. En relación a la detección del 4-MBA, se han reportado sustratos SERS basados en nanoestrellas de tipo núcleo-capa de oro-plata recubiertas de sílice conjugados con anticuerpos,<sup>155</sup> que permiten la detección lineal de este compuesto a concentraciones que van desde  $1,9 \times 10^{-5}$  M hasta  $1,9 \times 10^{-11}$  M de 4-MBA,

En otro trabajo, R. Alvarez-Puebla *et al.*<sup>156</sup> diseñaron un nanocompuesto compuesto por AuNS individuales encapsuladas en ZIF-8, formando estructuras conocidas como "cáscaras de yema huecas", diseñadas específicamente para la detección por espectroscopía Raman de realce superficial (SERS). Los autores destacan que el principal beneficio de estas estructuras radica en el amplio volumen existente entre el núcleo plasmónico y la cáscara de ZIF-8, que puede utilizarse para la acumulación óptica, la catálisis o el almacenamiento de medicamentos. Adicionalmente, esta singular estructura ofrece una mejora significativa en la estabilidad coloidal y la capacidad de tamizar moléculas en función de su tamaño o carga. Aunque los autores sostienen que la cubierta de ZIF-8 es estable en agua, es importante destacar que, como se evidencia en este capítulo y la literatura científica<sup>148-151</sup>, la cobertura de ZIF-8 no es estable en entornos acuosos a menos que se proteja con una capa polimérica. El sustrato diseñado se sometió a diferentes pruebas para la detección de cuatro analitos, siendo el 4-MBA uno de los evaluados. Los sustratos se cargaron durante 30 min en disoluciones de diferentes concentraciones, logrando detectar el 4-MBA a una concentración de  $10^{-7}$  M, que es la misma concentración detectable con los sustratos descritos en esta sección.

Comparados con otros sustratos SERS previamente documentados en la literatura científica, los resultados obtenidos mediante los NCs presentados en este capítulo podrían ser considerados modestos. En efecto, mientras que el nanocompuesto descrito en este estudio exhibe un rango de detección lineal de hasta  $10^{-6}$  M para 4-MBA, se han citado sustratos SERS capaces de alcanzar niveles de detección hasta de  $1,9 \times 10^{-11}$  M. No obstante, es crucial destacar que el objetivo principal de este experimento es demostrar la viabilidad de emplear este tipo de nanocompuestos para la detección mediante SERS. A este respecto, es claro que existe un amplio margen para mejorar su rendimiento y optimizar los límites de detección y cuantificación alcanzados. Además, los NCs aquí desarrollados presentan una ventaja significativa en términos de estabilidad coloidal, a diferencia de la mayoría de los sustratos SERS que utilizan ZIF-8 descritos en estudios anteriores.

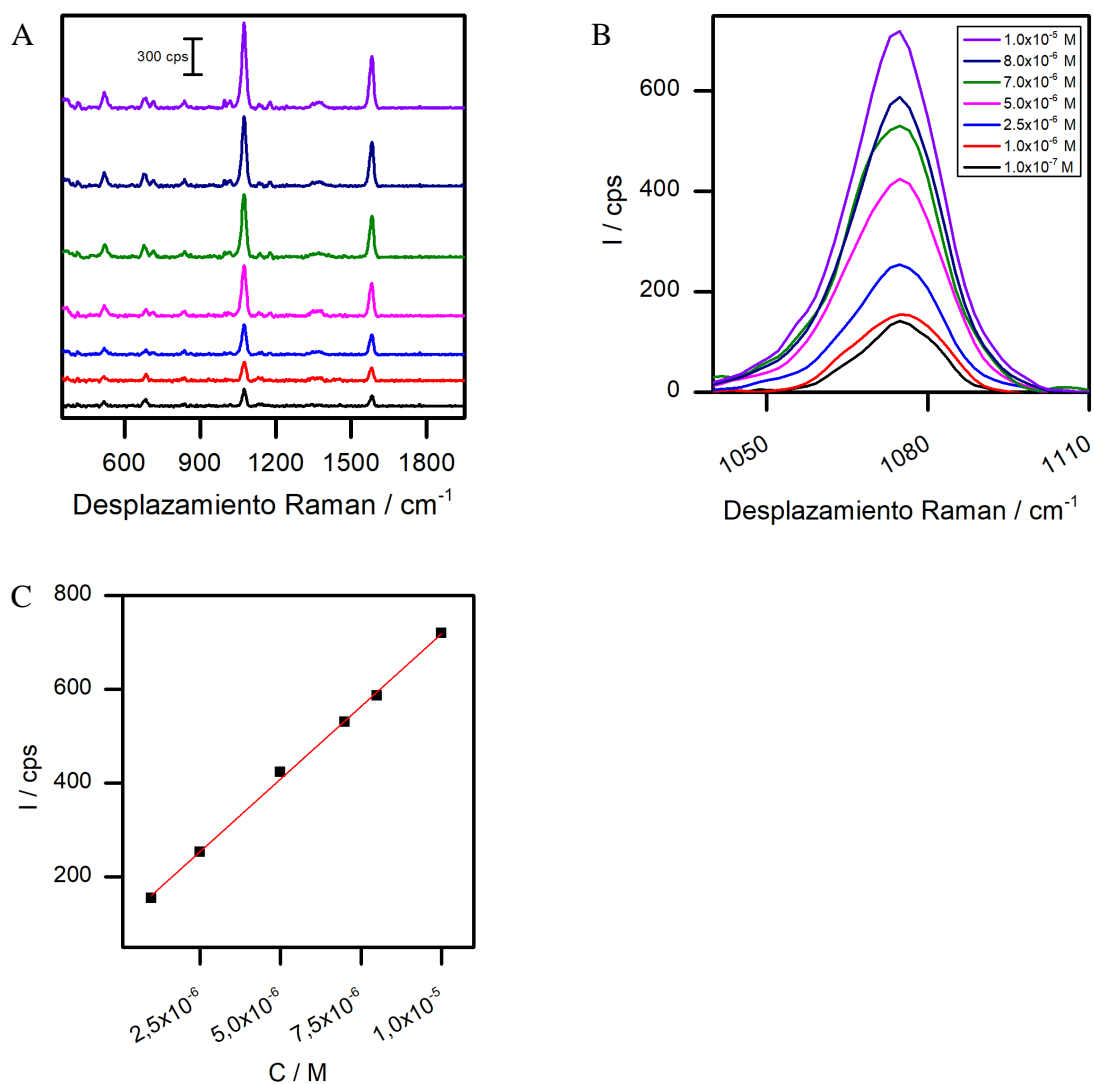


Figura 38: Espectros Raman del 4-MBA medidos en dispersiones acuosas de NC a 0,25 nM a diferentes concentraciones de 4-MBA (A) y detalle del espectro de la sonda entre 1040 y 1110  $\text{cm}^{-1}$  (B). Correlación entre la concentración de 4-MBA y la intensidad de la señal Raman a 1074  $\text{cm}^{-1}$ . Los puntos se ajustaron mediante un análisis de regresión lineal ( $y = 6,2 \times 10^7 x + 98,3$ ,  $r^2 = 0,999$ ) (C). Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia de 60 mW, 10 acumulaciones y 0,5 s de tiempo de integración.

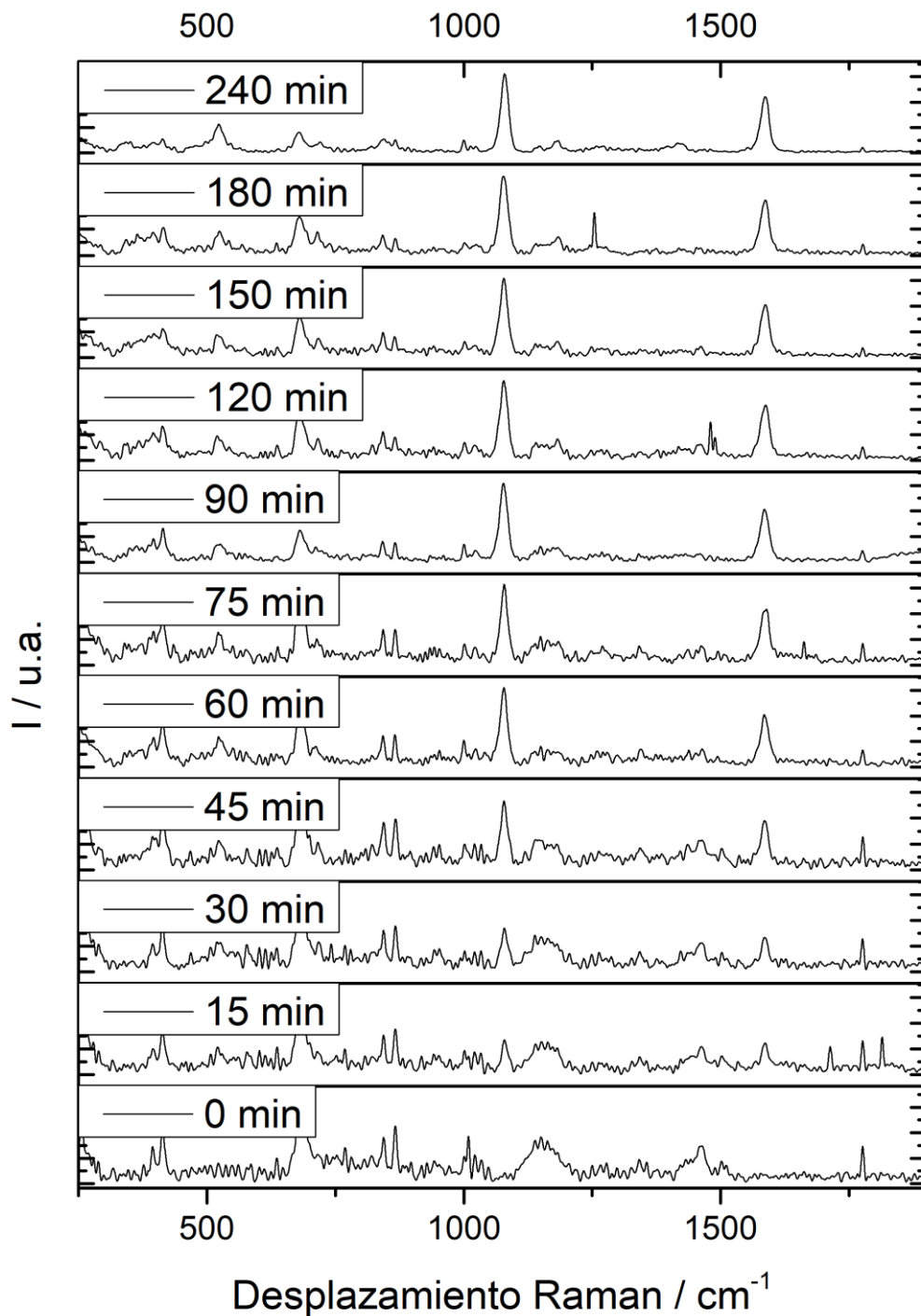


Figura 39: Evolución de los espectros Raman de 4-MBA en función del tiempo de encapsulación medidos en una dispersión acuosa de NC a 0,25 nM y una concentración de 4-MBA de  $10^{-5}$  M. Todos los espectros fueron adquiridos utilizando un láser de 785 nm a una potencia de 60 mW, 10 acumulaciones y 0,5 s de tiempo de integración.



# Capítulo 4

## 4. MNPS Y SU FUNCIONALIZACIÓN

### 4.1. INTRODUCCIÓN

La utilización de NPs como vehículos para la administración de fármacos representa una estrategia novedosa y prometedora en el campo de la farmacología, con el potencial de optimizar la eficacia terapéutica y mitigar los efectos secundarios asociados con los tratamientos farmacológicos convencionales.<sup>157-158</sup> Esta técnica se basa en la capacidad de las NPs para encapsular agentes farmacológicos y liberarlos de manera controlada en objetivos terapéuticos específicos, tales como tumores o células en estado inflamatorio. Asimismo, las NPs ofrecen la ventaja adicional de conferir protección al fármaco frente a procesos de degradación o metabolización prematura, lo cual contribuye a una liberación más prolongada y sostenida del compuesto activo en el organismo.<sup>159</sup>

Las NPs destinadas a la administración de fármacos pueden ser elaboradas a partir de una diversidad de materiales, incluyendo polímeros, lípidos y metales. La posibilidad de manipulación a escala nanométrica permite diseñar estas partículas con una amplia gama de tamaños, formas y propiedades fisicoquímicas. Estas características pueden ser utilizadas para controlar la velocidad y el lugar de liberación del fármaco en el cuerpo.<sup>159</sup>

Una metodología en el ámbito de la administración de fármacos mediante NPs consiste en la incorporación de estos agentes farmacológicos en nanocompuestos, conformados por una NP plasmónica encapsulada en un MOF. Por ejemplo, el grupo donde he desarrollado esta tesis diseñó recientemente un nanocompuesto que consta de estrellas de oro encapsuladas en ZIF-8 que al ser irradiados con un láser de 808 nm, absorben luz y generan calor, liberando la carga de forma controlada por efecto de la termoforesis.<sup>131</sup> No obstante, la principal limitación de estos sistemas radica en la capacidad restringida de penetración de la luz en los tejidos, lo que circunscribe la utilización de estos sistemas a las regiones más superficiales del cuerpo.

Con el objetivo de solventar la limitación inherente a la capacidad de penetración de la luz, se pueden emplear MNPs como fuentes generadoras de calor. Estas NPs, al ser sometidas a un AMF de alta frecuencia, producen calor,<sup>160</sup> lo que ofrece una estrategia efectiva para abordar las limitaciones de las técnicas basadas en la utilización de la luz. De esta manera, se puede alcanzar un control más eficaz de la liberación de fármacos en regiones más profundas del organismo, lo cual potencialmente expande la gama de aplicaciones de estas tecnologías nanométricas en la administración de fármacos.

Este capítulo se compone de dos secciones principales. En la primera, se aborda la síntesis de NPs magnéticas (MNPs) de magnetita estables en medio orgánico y se examina el impacto del dopaje con bajas proporciones de cobalto sobre sus propiedades magnéticas. La dopación de MNPs con Co se ha asociado con un aumento en la anisotropía magnética, lo cual se refleja en una mayor eficiencia en hipertermia y en el contraste en resonancia magnética en comparación con las nanopartículas de magnetita del mismo tamaño que carecen de cobalto.<sup>161</sup> Sin embargo, el uso de estas MNPs dopadas con Co en aplicaciones biomédicas ha generado controversia debido a la toxicidad inherente del cobalto. La literatura científica reporta una toxicidad significativa para las nanopartículas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  sin recubrimiento.<sup>161-162</sup> Para abordar esta problemática, se han investigado recubrimientos utilizando sílice o polímeros, los cuales han demostrado mejorar considerablemente la biocompatibilidad de las MNP dopadas con

En la segunda sección de este capítulo, se detalla el proceso de transferencia de las MNPs a un medio acuoso así como la elaboración de nanocompuestos estables en ambientes acuosos. Estos nanocompuestos se componen de un núcleo de MNP que se encuentra recubierto por una estructura porosa de ZIF-8. Estos nanocompuestos han sido diseñados con el propósito de lograr la liberación controlada de moléculas en el interior de las células, siendo esta activada por estímulos externos tales como campos magnéticos alternos (AMF) o campos magnéticos rotativos (RMF).

#### 4.2. SÍNTESIS, FUNCIONALIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MNPs

La magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se caracteriza por su estructura cristalina de espinela cúbica inversa. Esta estructura específica se deriva de una fórmula química de la forma general  $\text{AB}_2\text{O}_4$ . En el caso de la magnetita, los cationes que ocupan los sitios A y B son iones  $\text{Fe(II)}$  y  $\text{Fe(III)}$ , respectivamente. Los iones  $\text{Fe(III)}$  ocupan principalmente las posiciones tetraédricas, mientras que las posiciones octaédricas albergan tanto iones  $\text{Fe(II)}$  como  $\text{Fe(III)}$ .<sup>163</sup> En lo que respecta a sus propiedades magnéticas, la magnetita exhibe un comportamiento ferrimagnético, esto es, los momentos magnéticos de los átomos se alinean en direcciones opuestas, pero con magnitudes diferentes, como se comentó con anterioridad. La magnetita dopada con cobalto (Co) implica la sustitución de iones  $\text{Fe(II)}$  en las posiciones octaédricas por iones  $\text{Co(II)}$ . Este dopaje altera las propiedades magnéticas de la magnetita.

La síntesis de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se realizó a través de un método denominado termólisis, que implicó la descomposición térmica de un precursor organometálico, específicamente un oleato metálico, disuelto en un disolvente de elevado punto de ebullición, como el ODE. La presencia de un agente tensioactivo orgánico, como el ácido oleico, actuó como estabilizador en el medio orgánico de las MNPs. Este procedimiento ofreció un control meticuloso de la composición y el tamaño de las MNPs. Sin embargo, las partículas resultantes exhibieron valores de saturación magnética relativamente bajos en comparación con el material a escala macroscópica. Esta disminución en la saturación magnética se atribuyó a la formación de fases de wüstita, las cuales muestran propiedades antiferromagnéticas a temperatura ambiente.<sup>125</sup>

En los protocolos típicos descritos para sintetizar MNPs, comúnmente se emplean gradientes de calentamiento de  $3,3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ; bajar el gradiente a  $1 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  evitó el solapamiento entre la fase de nucleación y la de crecimiento de las NPs, resultando en una menor polidispersidad en la distribución del tamaño de las MNPs. Como disolvente se utilizó ODE debido a su elevado punto de ebullición ( $315 \text{ }^\circ\text{C}$  a  $1013 \text{ hPa}$ ). A través de la variación de la temperatura final de la síntesis, fue posible controlar el tamaño de las MNPs. A medida que se incrementó la temperatura final, el tamaño de las MNPs también aumentó. Así, temperaturas finales de  $305$ ,  $310$  y  $315 \text{ }^\circ\text{C}$  se correspondieron con tamaños de partícula de  $12,2 \pm 0,9$ ;  $15,5 \pm 1,1$  y  $17,8 \pm 1,8 \text{ nm}$ , respectivamente. (Figura 40). Este método permitió la síntesis de MNPs esféricas con baja polidispersidad, aunque cabe destacar que el incremento de su tamaño contribuyó a una ligera elevación de la polidispersidad relativa, pasando de un  $7,4\%$  en el caso de las NPs de  $12,2 \pm 0,9 \text{ nm}$  hasta el  $10,1\%$  en el caso de partículas de  $17,8 \pm 1,8 \text{ nm}$ .

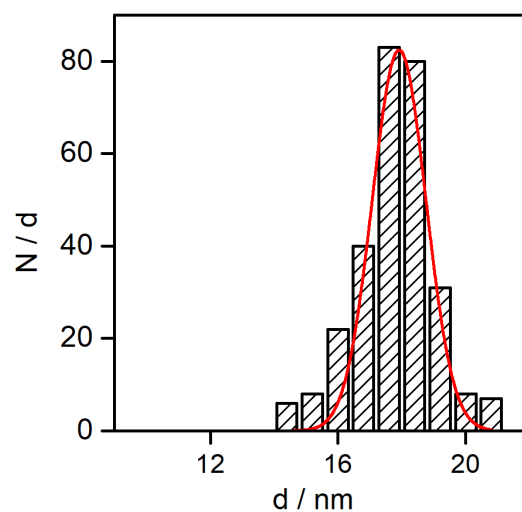
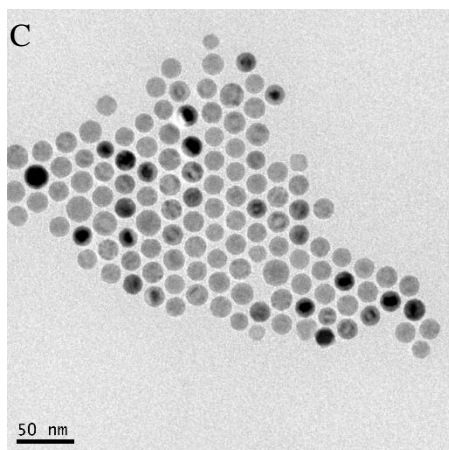
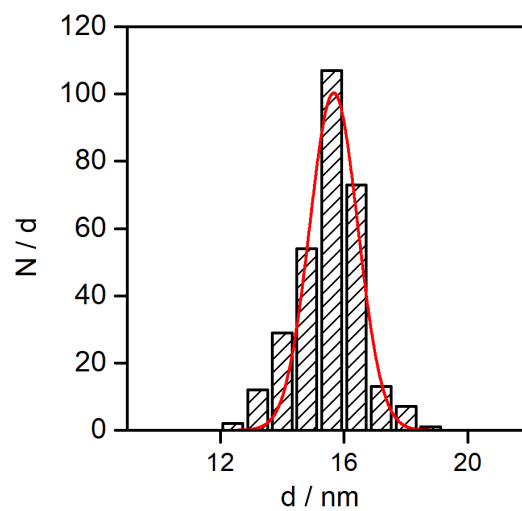
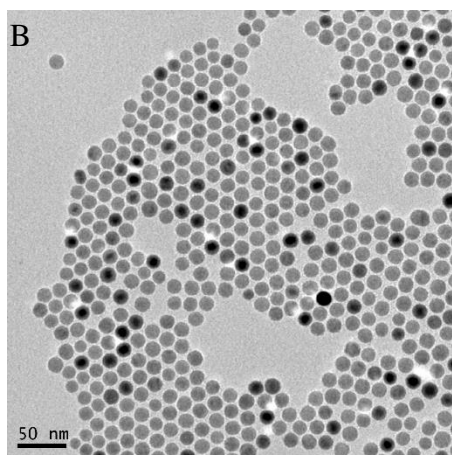
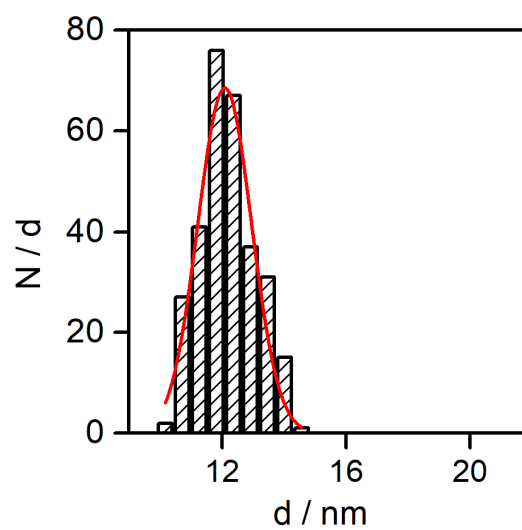
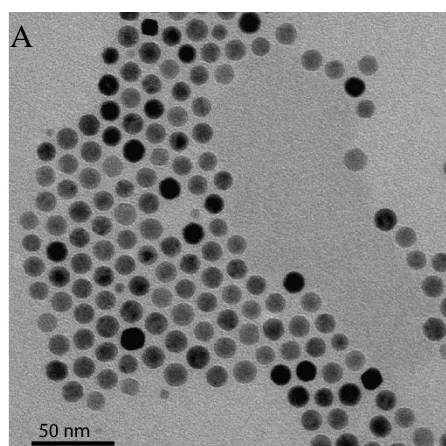


Figura 40: Imágenes de microscopio electrónico de transmisión (TEM) de MNPs calentadas a 305 (A), 310 (B) y 315 °C (C), con tamaños medios de  $12,2 \pm 0,9$ ,  $15,5 \pm 1,1$  y  $17,8 \pm 1,8$  nm, respectivamente, y las correspondientes distribuciones del diámetro de, al menos, 300 NPs.

Sintetizadas las MNPs, el siguiente paso fue evaluar sus propiedades magnéticas. Para ello, nos centramos en las de mayor tamaño, ya que estas son las de mayor interés desde un punto de vista para la generación de calor. Se procedió a medir la magnetización a temperatura ambiente de las MNPs con un tamaño promedio de  $17,8 \pm 1,8$  nm, utilizando una intensidad de campo de  $24,0 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  y una frecuencia de  $296,9$  kHz. La magnetización de saturación ( $M_s$ ) obtenida fue de  $56,7 \pm 1,3 \text{ Am}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  y la tasa de absorción específica (SAR) fue de  $64,9 \pm 18,7 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Es importante señalar que el valor de la  $M_s$  se presentó como significativamente bajo en comparación con los valores típicos reportados de la magnetita a tamaño macroscópico ( $86 \text{ Am}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ),<sup>164</sup> lo que también implicó menores pérdidas por histéresis magnética. Este fenómeno se pudo atribuir a la presencia de fases de wüstita (FeO) en las MNPs. La wüstita es una fase antiferromagnética que presenta un comportamiento paramagnético a temperatura ambiente, lo que puede influir negativamente en la magnetización de las MNPs. Para mejorar las propiedades magnéticas, es necesario convertir la wüstita en magnetita, una transformación que se puede lograr mediante un proceso denominado recocido, que implica una oxidación de las partículas. En la literatura científica se han reportado múltiples metodologías para esta oxidación.

Una de las técnicas es la introducción de oxígeno durante el proceso de termólisis. Sin embargo, esta estrategia conlleva ciertos riesgos asociados dada la temperatura de autoignición del ODE, que se sitúa en los  $252$  °C. También se ha documentado el uso de oxidantes como el ácido 3-cloroperbenzoico y el N-óxido de trimetilamina. No obstante, estos compuestos se consideran altamente tóxicos y peligrosos, lo que limita su aplicabilidad.<sup>164</sup> Finalmente, se optó por un procedimiento más seguro, aunque lento, que consistió en someter las MNPs a un calentamiento constante a  $160$  °C durante un período de tres días. Para prevenir la agregación durante el tratamiento de las NPs, se añadió una cantidad de  $5 \mu\text{l}$  por cada ml de disolvente de una mezcla de ácido oleico:OLAM en una relación de 1:1.

Tras el tratamiento térmico, se procedió a realizar nuevamente la medida de magnetización de las MNPs recocidas. Se observó, así, que la  $M_s$  aumentó significativamente, pasando de  $56,7 \pm 1,3 \text{ Am}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  a  $88,3 \pm 2,1 \text{ Am}^2\cdot\text{kg}^{-1}$  (Figura 41). A su vez, las pérdidas por histéresis también experimentaron un incremento sustancial, lo cual elevó la SAR hasta alcanzar un valor de  $254,1 \pm 45,1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ . Estos resultados indicaron que el tratamiento térmico fue eficaz en la transformación de las fases de wüstita presentes en las MNPs a magnetita. La  $M_s$  obtenida después del tratamiento térmico se aproximó también de manera significativa al valor esperado para la magnetita ( $86 \text{ Am}^2\cdot\text{kg}^{-1}$ ), lo que corroboró la eficacia del proceso de oxidación.

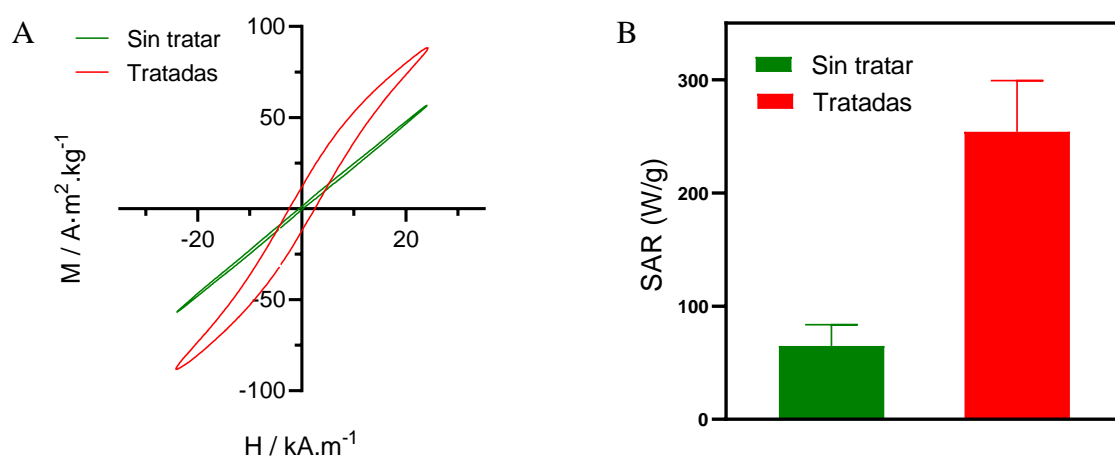


Figura 41: Curvas de magnetización de una muestra de MNPs medidas a temperatura ambiente antes y después del tratamiento térmico (A). Valores de SAR de las MNPs antes y después de dicho tratamiento (B).

Además, tanto los valores de DLS como las imágenes de SEM confirmaron que el tratamiento térmico no afectó al tamaño ni a la morfología de las MNPs resultantes (Figura 42).

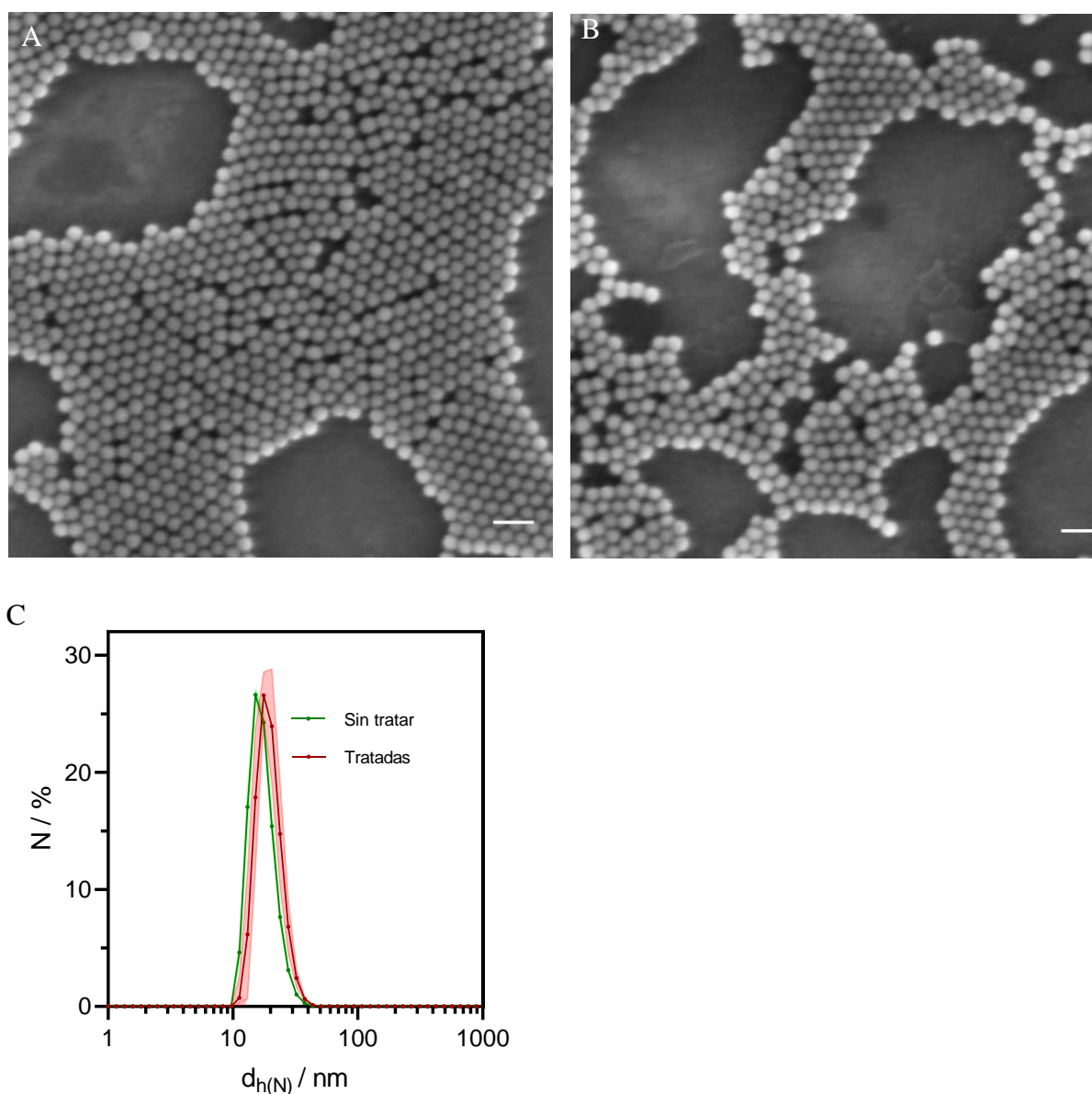


Figura 42: Imágenes de SEM de las MNPs sin tratar (A) y después del tratamiento térmico (B). Barra de escala de 50 nm. Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número obtenido por DLS (C).

#### 4.2.1. Funcionalización y estabilidad de las MNPs en medio acuoso con PMA

Una vez que las MNPs fueron sometidas al tratamiento térmico, el siguiente paso fue su transferencia a medio acuoso. Las MNPs recubiertas por AO no son estables en medio acuoso. Con el fin de transferirlas, las NPs dispersadas en un medio orgánico fueron recubiertas con PMA.<sup>26</sup> En el caso de las MNPs se utilizaron 600 monómeros de PMA por nm<sup>2</sup>. Esta proporción de monómeros por nm<sup>2</sup> fue suficiente para que las MNPs presentasen estabilidad coloidal en soluciones acuosas y, a su vez, se evitó la formación de micelas libres de polímero debido a un exceso de PMA.

Se calculó el volumen necesario de la disolución de PMA (tal como se describe en el apartado 2.2.23.d) y se añadió a las MNPs, se sonicó la muestra a continuación para homogeneizar la mezcla, se evaporó el disolvente en el rotavapor y se hidrolizó con una disolución alcalina (Figura 43).

El PMA permite su funcionalización con moléculas que presenten, por ejemplo, un grupo amino terminal en su estructura molecular. Esta funcionalización puede realizarse tanto durante la propia síntesis del PMA como en una etapa posterior a ésta. La funcionalización se produce mediante un mecanismo de ataque nucleofílico en el cual el grupo amino terminal se une a un carbono electrófilo del anhídrido maleico presente en el PMA (se presenta una representación de este proceso en la Figura 43).

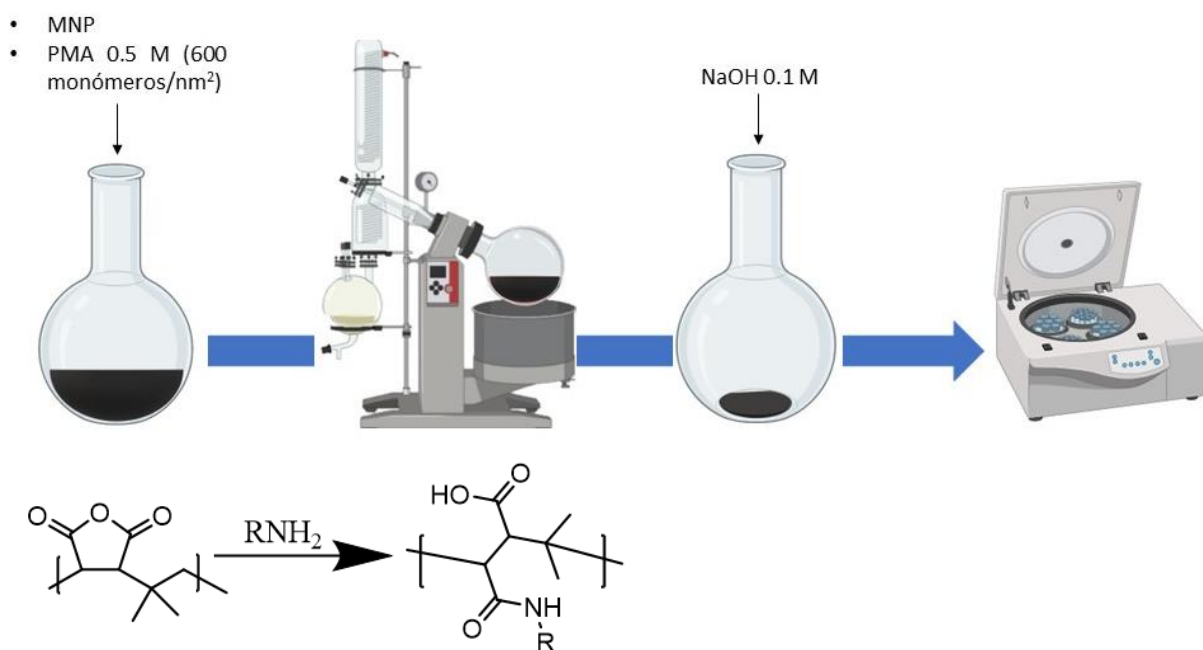


Figura 43: Representación del protocolo de funcionalización de las MNPs con PMA (arriba). Representación de la apertura de un anillo anhídrido maleico del PMA por un grupo amino (abajo).

Por ejemplo, se procedió a la funcionalización del PMA con un 10% de 6-aminofluoresceína (6-AF) siguiendo el protocolo descrito (2.2.23.b). Para ello, se prepararon MNPs fluorescentes mediante el recubrimiento de las mismas con el PMA modificado. Para cuantificar el número de moléculas de 6-AF presentes por NP, se llevó a cabo un proceso de calibrado mediante la preparación de una curva de calibración que nos permitió establecer la relación entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de 6-AF disuelta en agua (Figura 44, A). Posteriormente, se procedió a medir la fluorescencia de diferentes diluciones de una muestra de NPs recubiertas con PMA modificado (Figura 44, B) para determinar el grado efectivo de sustitución del polímero.

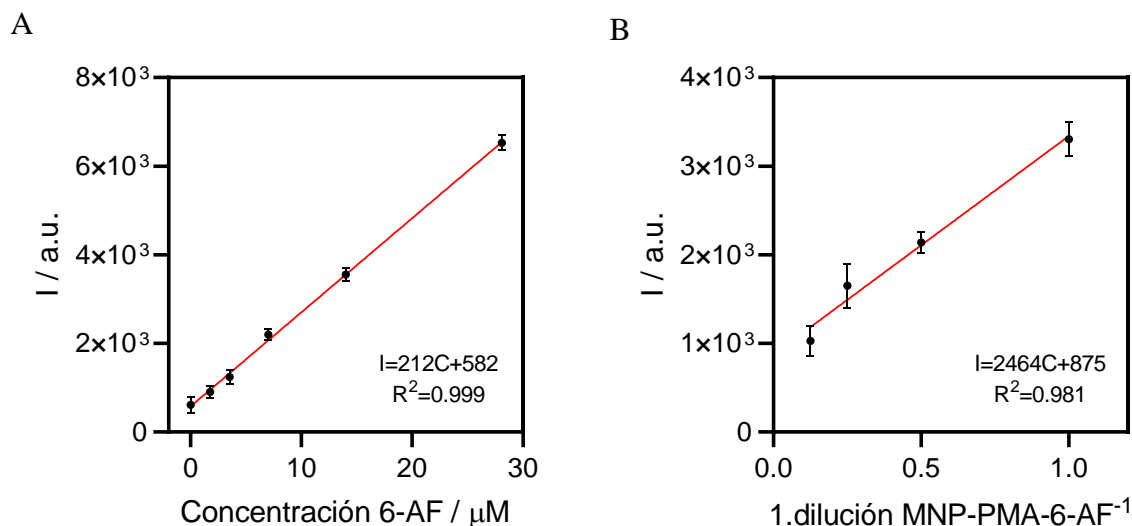


Figura 44: Curva de calibrado de la intensidad de fluorescencia del 6-AF6 en agua en función de su concentración medido bajo una excitación de 490 nm (A). Intensidad de fluorescencia frente a la inversa del factor de dilución (1/dilución) de diferentes concentraciones de MNPs recubiertas con PMA-6-AF en agua (B).

La Tabla 10 presenta los datos obtenidos a partir de las medidas de fluorescencia realizadas en muestras de NPs de MNPs-PMA-6-AF a diferentes concentraciones. Se calculó que el número medio de moléculas de 6-AF por NP fue de 1899. Teniendo en cuenta que se añadieron 600 monómeros de PMA por nm<sup>2</sup>, esto es, 59700 monómeros por NP, este resultado representó un 3,2% de la cantidad de sonda fluorescente inicialmente utilizada (Tabla 11). Es probable que esta diferencia entre la cantidad de 6-AF añadida y la cantidad que recubre las NPs se deba al exceso de PMA que es eliminado durante el proceso de lavado después del recubrimiento polimérico.

Tabla 10: Fluorescencia medida de diferentes concentraciones de MNPs-PMA-6-AF y la relación calculada de moléculas de 6-AF.MNP<sup>-1</sup>.

MNPs-PMA-6-AF / nM	I / a.u.	Concentración 6-AF / μM	Nº moléculas 6-AF.MNP <sup>-1</sup>
8,50	3303	12,8	1508
4,25	2140	7,3	1729
2,13	1651	5,0	2374
1,06	1028	2,1	1987
		Media	1899

Tabla 11: Relación máxima de moléculas de 6-AF por cada MNP.

Tamaño / nm	Superficie / nm <sup>2</sup>	Monómeros. MNP <sup>-1</sup>	Nº moléculas 6-AF.MNP <sup>-1</sup>
17.8	995	597000	59700

hidrodinámico de  $22,4 \pm 0,9$  nm y un PDI de 0,137, indicando una distribución homogénea en tamaño y forma. Además, presentaron un potencial  $\zeta$  de  $-27,9 \pm 5,6$  mV. (Figura 45).

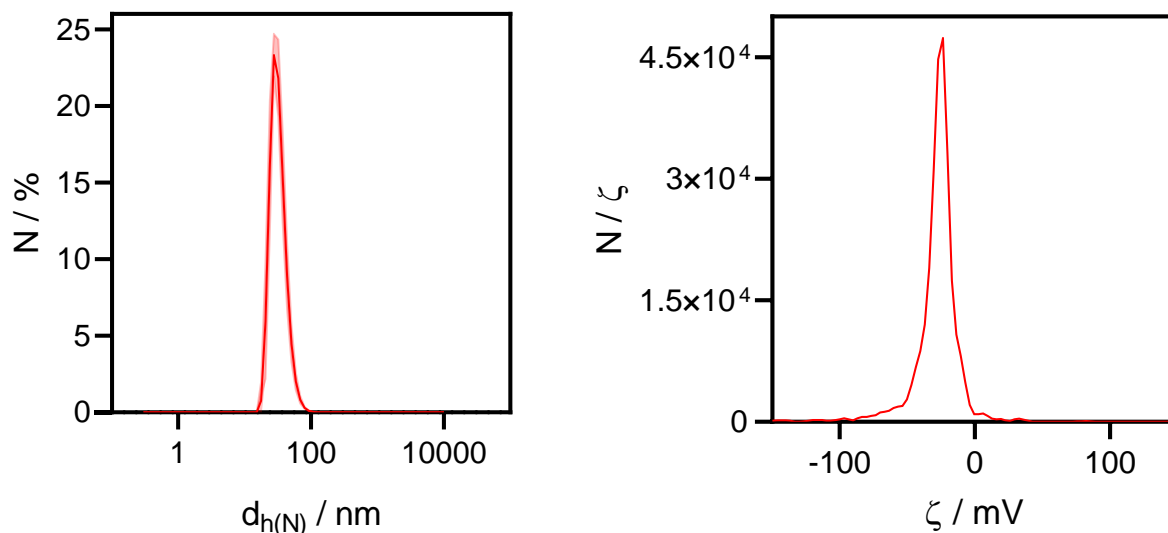


Figura 45: Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número, medido con DLS (A) y potencial  $\zeta$  (B) de las MNPs-PMA-6-AF

#### 4.2.2. Influencia sobre las propiedades magnéticas del dopado con cobalto de NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

En esta parte del trabajo, se pretendió investigar la influencia del dopaje con cobalto en las propiedades magnéticas de NPs de magnetita. Para ello, se sintetizaron MNPs de fórmula Co<sub>(x)</sub>Fe<sub>(3-x)</sub>O<sub>4</sub> (MNPs-Co) de entre 18-20,5 nm mediante la sustitución parcial de los iones Fe<sup>2+</sup> en posiciones octaédricas de la estructura de la magnetita con iones Co<sup>2+</sup> en diferentes proporciones (x entre 0,01 y 0,6). El protocolo de síntesis de las partículas se describe en el apartado 2.2.12. La correspondencia entre la cantidad de Co teórica añadida durante la síntesis y la determinada en las MNPs dopadas mediante ICP fue adecuada, especialmente en los dopados bajos de Co. Se consideró que el dopaje con sustituciones de Co entre el 1 y el 5% fue prácticamente estequiométrico, como se observa en la Tabla 12. No obstante, a partir de un dopaje igual o superior a 0,10 moles de Co se evidenció que la cantidad de Co detectada en las MNPs era menor que la añadida.

Al igual que en el caso de las MNPs de magnetita, estas MNPs tras la síntesis se sometieron a un proceso de recocido de 72 h necesario para que se produjese la oxidación total del Fe y Co, observándose un incremento de la pérdida de histéresis y, por lo tanto, del SAR (Figura 46). Además, las MNPs-Co se funcionalizaron con 600 monómeros de PMA por nm<sup>2</sup> para su transferencia a medio acuoso.

Tabla 12: Correspondencia de los moles de Co (x) añadidos con relación a los de Fe y los moles de Co determinados por ICP.

X moles de Co añadidos	x moles de Co determinados por ICP	Co (x) determinado por ICP respecto al añadido / %
0,01	0,01	110
0,02	0,02	95
0,03	0,03	93
0,04	0,04	98
0,05	0,05	100
0,05	0,05	102
0,10	0,08	80
0,10	0,09	90
0,15	0,11	73
0,15	0,12	80
0,15	0,13	87
0,60	0,30	50

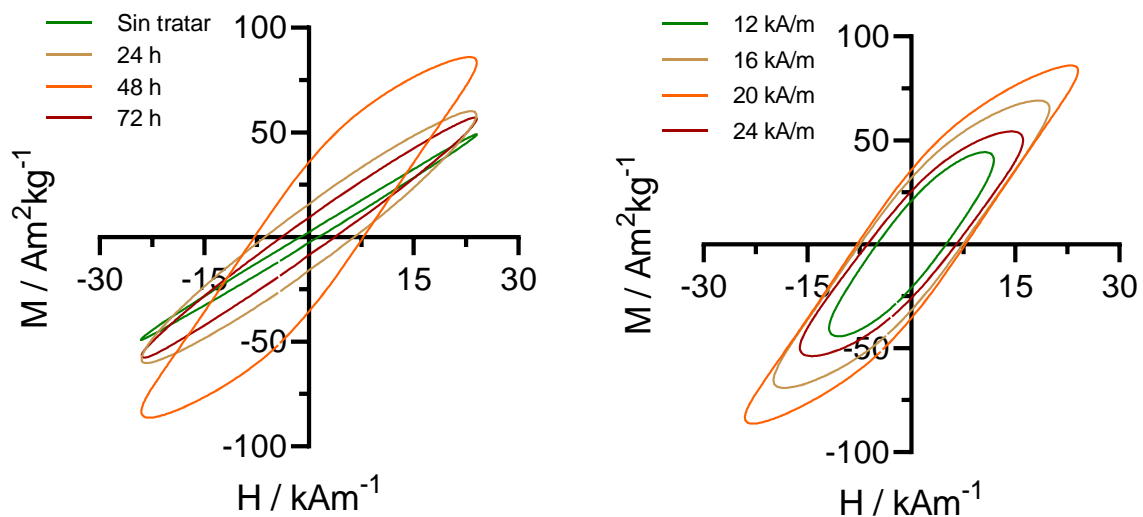


Figura 46: Evolución de las curvas de histéresis obtenidas mediante magnetometría a temperatura ambiente a diferentes tiempos de recocido de una muestra dopada con un 20 % de  $\text{Co}^{2+}$  respecto al  $\text{Fe}^{2+}$  (A). Curvas de histéresis medidas a diferentes campos magnéticos aplicados (B).

La Figura 47 presenta las curvas de histéresis obtenidas en tolueno antes de la funcionalización con PMA y en agua después de la funcionalización de una muestra de MNPs-Co dopadas con una proporción de 10% de Co. Como resultado de este recubrimiento polimérico, el tamaño hidrodinámico de las NPs se incrementó desde  $21,5 \pm 0,9$  nm hasta  $26,3 \pm 2,3$  nm. La magnetización de saturación ( $M_s$ ), que representa la magnetización máxima que puede alcanzar el material, se mantuvo constante en ambos medios.

La coercividad ( $H_c$ ) se refiere a la resistencia de un material magnético a su desmagnetización. Valores elevados de coercividad indican una mayor resistencia a perder su magnetización. Así, se observa que las MNPs dispersas en tolueno presentaron una coercividad superior a las que se encontraban en fase acuosa. En relación con su alta coercividad, la SAR

para las partículas en tolueno fue considerablemente superior a la de las partículas en agua. Este resultado sugiere que las partículas en tolueno tienen una mayor capacidad para absorber energía. La diferente viscosidad de los disolventes es uno de los factores que podría estar contribuyendo a esta diferencia. Como se ha reportado en estudios anteriores,<sup>165</sup> los valores de  $H_c$  y SAR, a valores bajos de viscosidad, tienden a incrementarse a medida que la viscosidad disminuye. Dado que el tolueno presenta una viscosidad inferior al agua, esto podría explicar la mayor SAR observada para las partículas en tolueno.

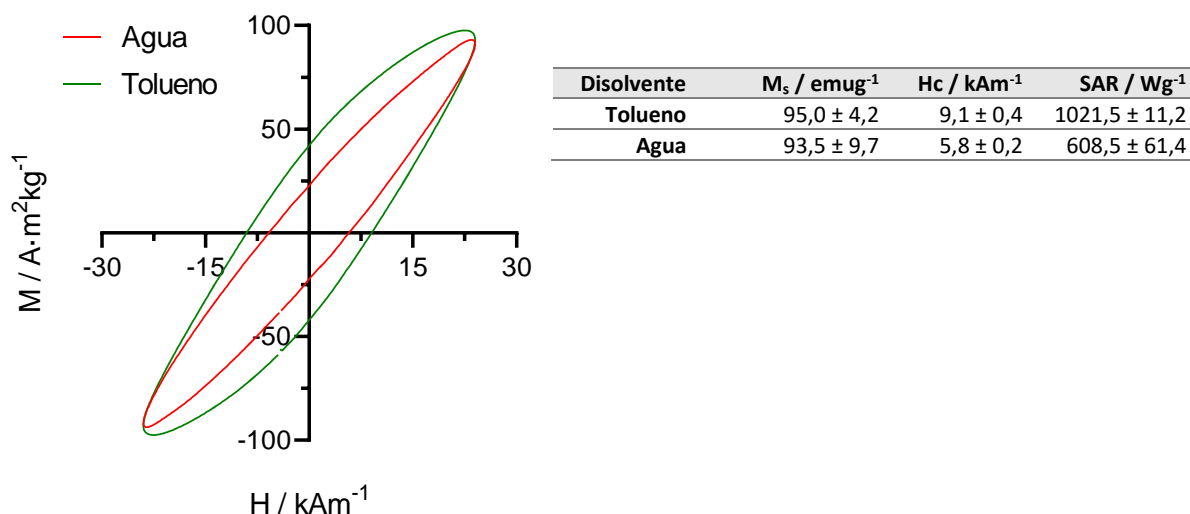
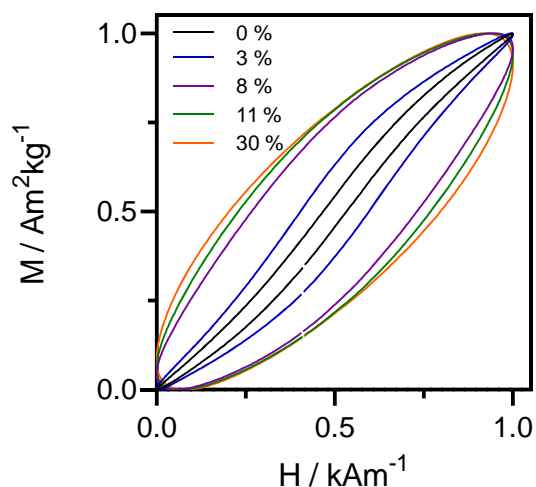


Figura 47: Curvas de magnetización de una muestra de MNPs dopada con Co (en proporción 0,1) medidas a temperatura ambiente con un magnetómetro a 300 kHz y  $24 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  en agua y tolueno. En la tabla se recogen los valores de la magnetización de saturación, coercividad y SAR para cada caso.

A continuación, se evaluó una selección de MNPs dispersas en tolueno con diámetros que oscilaban entre los 18 y 20,5 nm con distintas proporciones de Co (3, 8, 11 y 30 %, respecto a la proporción de  $\text{Fe}^{2+}$  en la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). La medición de sus curvas de histéresis se realizó mediante un magnetómetro a temperatura ambiente, a un campo de  $24 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  y una frecuencia de 300 kHz. La Figura 48 representa las curvas normalizadas correspondientes a estas MNPs-Co. Así, se observó que a medida que aumenta la proporción de Co en las MNPs, la apertura de la curva de histéresis se amplió significativamente.

A continuación, se determinaron las curvas de histéresis a temperaturas de 295 K y 10 K utilizando un dispositivo cuántico de interferencia superconductora, conocido como SQUID (Superconducting Quantum Interference Device). Las MNPs se pipetearon sobre un trozo de papel para su posterior análisis. Sin embargo, debido a la sensibilidad de las mediciones a la masa del material magnético, se tomó la decisión de transferir las MNPs a agua.

La transferencia de las MNPs-Co al agua se realizó mediante recubrimiento con PMA (2.2.23.d), con el propósito de reducir los posibles errores asociados al proceso de pipeteo de disolventes orgánicos (con micropipetas diseñadas para agua) y, así, mejorar la precisión de las mediciones. Al emplear agua como disolvente se logró una mejor estandarización de la cantidad de MNPs pipeteadas, lo cual fue fundamental para obtener resultados más confiables y precisos en los experimentos.



Co / %	Tamaño hidrodinámico / nm	Tamaño SEM / nm
0	18,4 ± 1,4	17,9 ± 1,6
3	17,4 ± 0,3	18,0 ± 1,3
8	20,1 ± 0,7	20,7 ± 1,3
11	20,1 ± 0,4	19,6 ± 1,5
30	18,2 ± 0,4	20,5 ± 1,2

Figura 48: Curvas de magnetización medidas a 300 KHz y  $24 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$  de muestras de MNPs dopadas con diferentes proporciones de Co normalizado entre 0 y 1 medidas con magnetometría a temperatura ambiente. La tabla recoge medidas de tamaño hidrodinámico promediado en número y medido a partir de la medida de al menos 300 MNPs en imágenes de SEM.

La concentración de Co tuvo un efecto significativo en las propiedades magnéticas de las NPs tal como se observa en la Figura 49. Al comparar las medidas a las dos temperaturas ensayadas se pudieron observar algunas tendencias claras. Así, se observó que la  $M_s$  aumentó incluso con una pequeña incorporación de Co, indicando que la presencia de este metal potenció la alineación de los momentos magnéticos dentro de las NPs. Por otro lado, a una temperatura de 10 K se apreció un incremento tanto de la magnetización remanente ( $M_r$ ), que define la magnetización residual en un material una vez eliminado el campo magnético aplicado, como de la  $H_c$  a medida que se incrementó la concentración de Co. Es decir, a temperaturas más bajas, las NPs con mayor concentración de Co tendieron a retener más magnetización después de la eliminación del campo magnético externo y también requirieron un campo magnético más potente para ser desmagnetizadas.

Además, a 295 K se observó un comportamiento inusual, aunque recientemente predicho teóricamente:<sup>166</sup> La coercitividad disminuyó inicialmente entre las concentraciones de Co de 0 y 0,08, pero luego aumentó a concentraciones de Co superiores. Este comportamiento contraintuitivo (disminución de la anisotropía magnética a medida que su aumenta el dopado de  $\text{Co}^{2+}$ ), se puede entender como una transición del sistema desde una constante de energía de anisotropía cúbica negativa ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) a una positiva ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). La remanencia mostró una tendencia similar, pero menos acentuada. De particular interés fue el caso de las NPs dopadas con 0,08 de Co. A 295 K, estas MNPs mostraron un comportamiento superparamagnético, en el que los momentos magnéticos pueden cambiar libremente de dirección, resultando en una magnetización neta cero en ausencia de un campo magnético externo. Esta observación fue evidente en la ausencia de histéresis a esta concentración de dopado, incluso al ampliar la escala de observación, en contraste con lo observado con las otras concentraciones de Co.

Al comparar las medidas a ambas temperaturas, respecto a la  $H_c$ , los valores fueron considerablemente más altos a 10 K en comparación con los de 295 K para todas las concentraciones de Co. Esta tendencia sugirió que, a temperaturas más bajas, las NPs muestran una mayor resistencia a ser desmagnetizadas. Esto puede deberse a una reducción de los

movimientos térmicos que permiten a los momentos magnéticos reorientarse y facilitar la desmagnetización.

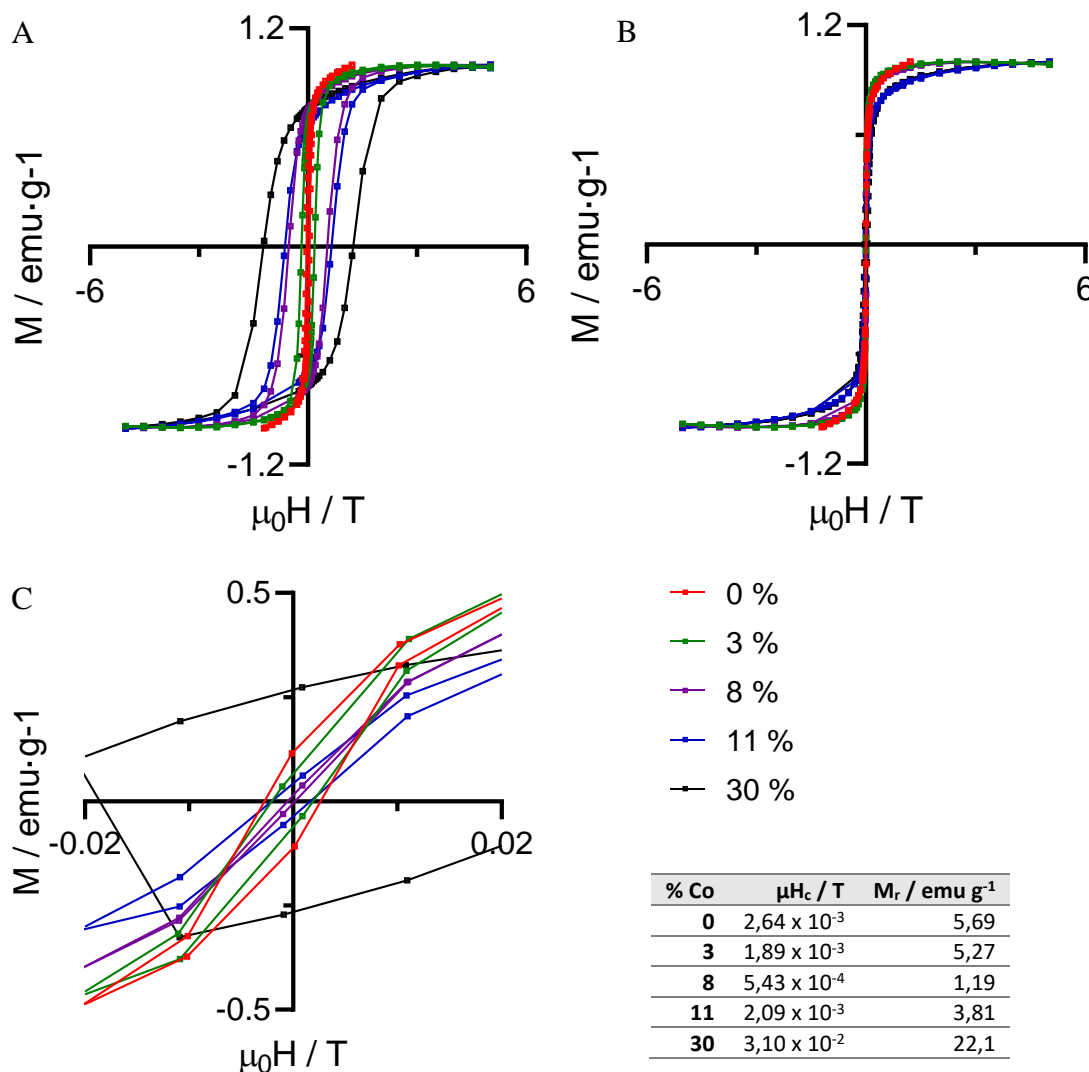


Figura 49: Curvas de histéresis obtenidas a partir de las medidas de SQUID de las MNPs con diferentes grados de dopaje de Co de 0, 0,03, 0,08, 0,11 y 0,30, donde M se encuentra normalizada entre 1 y -1, a 10 (A) y 295 K (B), y una ampliación de la medida a 295 K entre -0,02 y 0,02 T (C) para facilitar la visualización de la histéresis. La tabla muestra los datos de  $H_c$  y  $M_r$  correspondientes a las diferentes sustituciones de Co en medidas realizadas a 295 K.

Finalmente, la  $M_r$  fue también más alta a 10 K en comparación con su valor a 295 K para todas las concentraciones de Co. Esto implicó que las NPs retienen más su magnetización después de la retirada del campo magnético a temperaturas más bajas, lo que puede ser otro indicador de la influencia de los movimientos térmicos en las propiedades magnéticas de las NPs.

#### 4.2.3. Estabilización de las MNPs en medios acuosos con CTAB.

Previamente a la síntesis de NCs basados en MNPs recubiertas por ZIF-8, fue necesario estabilizar con CTAB las MNPs en agua.

La superficie de las MNPs está recubierta por ácido oleico (AO), adsorbido por quimisorción. Varios estudios han probado que la quimisorción se lleva a cabo por la formación de un enlace entre el ácido carboxílico de AO y el Fe de las MNPs.<sup>167</sup> Con el objetivo de transferir las MNPs a un medio acuoso, se probaron adaptaciones de diferentes protocolos previamente descritos. Estos métodos se basan en el recubrimiento con una bicapa AO-CTAB. En total, se probaron tres protocolos diferentes, cuyo éxito se evaluó mediante la medición del tamaño hidrodinámico con DLS. En definitiva, lo que se buscó fue un procedimiento sencillo con el que conseguir que las MNPs fuesen transferidas de la manera menos agregada posible a la fase acuosa. Para estos experimentos se emplearon MNPs de  $20,7 \pm 1,9$  nm de diámetro promedio (Figura 50).

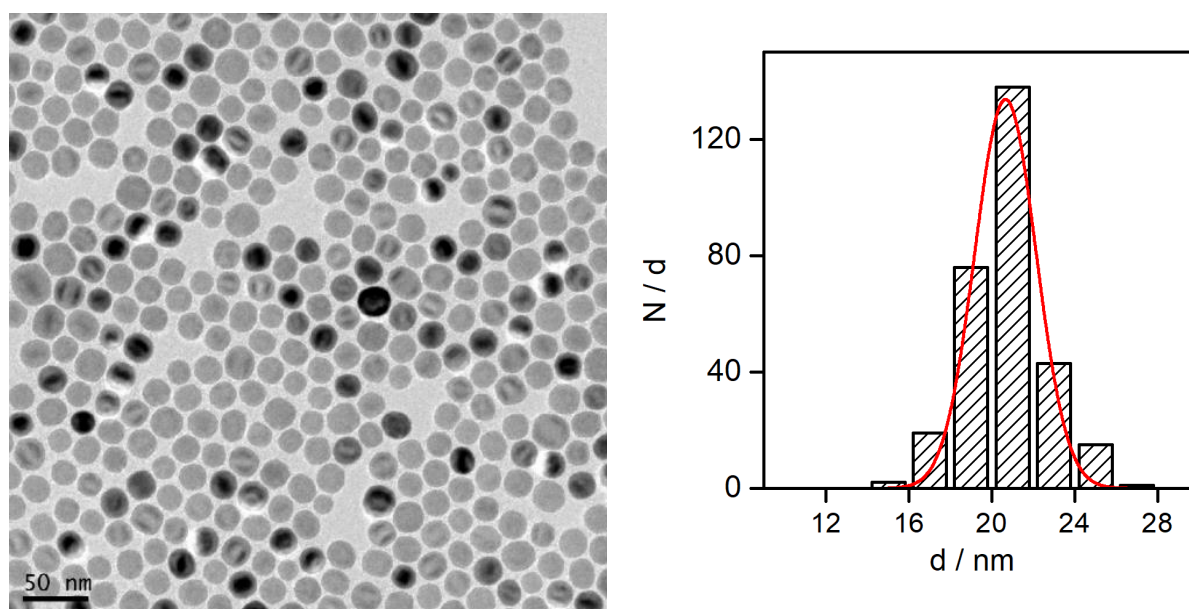


Figura 50: Imagen de TEM de las MNPs utilizadas para las pruebas de transferencia de fase y su correspondiente distribución de tamaños (tamaño medio de  $20,7 \pm 1,9$  nm)

En el protocolo 1<sup>168</sup> se trabajó con MNPs dispersadas en 600  $\mu$ l de hexano o tolueno a una concentración de 0,3  $\mu$ M, a las cuales se agregó diferentes volúmenes (recogidos en la Tabla 13) de una solución acuosa de CTAB de 0,02 mol.l<sup>-1</sup> para alcanzar una relación de moléculas de CTAB.nm<sup>-2</sup> deseada. Posteriormente, se añadió agua Milli-Q a la solución hasta completar 6 ml, y se sonicó durante 10 min. A continuación, se llevaron a cabo cuatro ciclos de lavado de las MNPs, precipitándolas a 8000 rcf. Finalmente, estas se redispersaron en 1 ml de agua Milli-Q y se centrifugaron a 3000 rcf durante 3 min para eliminar agregados. Se probaron diferentes relaciones de moléculas CTAB.nm<sup>-2</sup> (Tabla 13) observándose que, al utilizar la misma relación reportada en procedimientos previos ( $1,1 \times 10^2$  moléculas de CTAB.nm<sup>-2</sup>), las MNPs no precipitaban al ser lavadas. Sin embargo, al disminuir la relación de surfactante, se logró transferir las MNPs a agua, pero se observó que los tamaños hidrodinámicos resultantes eran demasiado elevados, lo que sugirió la formación de agregados (Tabla 13).

Tabla 13: Tamaño hidrodinámico promediado en número de las MNPs transferidas a agua mediante recubrimiento con CTAB siguiendo diferentes condiciones del protocolo 1.

Condición	V CTAB/ ml	Diámetro NP / nm	Moléculas CTAB.nm <sup>-2</sup>	Tamaño hidrodinámico / nm
Referencia <sup>168</sup>		11	1,1 x 10 <sup>2</sup>	20,7 ± 2,5
1	0,5	20,2 ± 2,3	1,1 x 10 <sup>2</sup>	No precipitan
2	0,15	20,2 ± 2,3	4,3 x 10 <sup>1</sup>	78,6 ± 4,1
3	0,13	20,2 ± 2,3	1,3 x 10 <sup>1</sup>	67,3 ± 5,7

En el segundo protocolo<sup>169</sup> se evaluaron diferentes relaciones de CTAB.nm<sup>-2</sup> y distintos procedimientos de lavado. El protocolo consistió en mezclar 9 ml de una disolución acuosa de CTAB 0,1 mol.l<sup>-1</sup> con 2 ml de isopropanol y adicionar 700 µl de a la concentración requerida de MNPs para obtener la relación CTAB.nm<sup>-2</sup> deseada. La solución resultante se sonicó durante 3 h, agitando cada 15 min para evitar que las fases se separasen y, finalmente, se mantuvo la muestra en un baño a 35 °C durante 8 h para evaporar la fase orgánica. En este caso se utilizaron relaciones de moléculas CTAB.nm<sup>-2</sup> más altas, consiguiendo obtener radios hidrodinámicos menores respecto a los obtenidos en el protocolo 1. Por otro lado, se probaron diferentes lavados en agua sin y con CTAB 0,16 g.l<sup>-1</sup>, precipitando las partículas a 15000 (Tabla 14) o 20000 rcf (Tabla 15). Finalmente, también se evaluó la precipitación de agregados de partículas, y para ello, luego de lavar las MNPs, estas se precipitaron a 3000 rcf durante 3 min, quedando las NPs no agregadas suspendidas en el sobrenadante y descartando el precipitado rico en agregados de MNPs. En general, se obtuvieron los mejores resultados en términos de DLS trabajando en un rango de 1,1 x 10<sup>4</sup> – 2,3 x 10<sup>4</sup> moléculas de CTAB.nm<sup>-2</sup>, lavando las NP con CTAB 0,16 g.l<sup>-1</sup> y precipitando los potenciales agregados. A valores altos de moléculas CTAB.nm<sup>-2</sup>, los tamaños hidrodinámicos fueron más elevados, lo que indicó que un exceso de CTAB no es adecuado para la transferencia a fase acuosa.

Tabla 14: Tamaño hidrodinámico en número medio de las MNPs transferidas a agua medido con DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 2, precipitados a 15000 rcf.

Moléculas CTAB.nm <sup>-2</sup>	Tamaño hidrodinámico / nm		
	Lavado con H <sub>2</sub> O sin precipitar agregados	Lavado con H <sub>2</sub> O	Lavado con CTAB 0,16 g.l <sup>-1</sup>
1,1 x 10 <sup>4</sup>	58,0 ± 2,0	50,7 ± 1,3	44,4 ± 20,7
2,3 x 10 <sup>4</sup>	63,3 ± 8,8	62,0 ± 4,4	58,0 ± 5,8
4,5 x 10 <sup>4</sup>	84,1 ± 5,4	62,9 ± 3,3	81,6 ± 8,4
9,0 x 10 <sup>4</sup>		71,3 ± 8,5	
1,8 x 10 <sup>5</sup>		82,6 ± 18,5	
3,6 x 10 <sup>5</sup>		138,8 ± 48,2	

Tabla 15: Tamaño hidrodinámico promediado en número de las MNPs transferidas a agua medido obtenido mediante DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 2, precipitados a 20000 rcf.

Moléculas CTAB.nm <sup>-2</sup>	Tamaño hidrodinámico / nm	
	Lavado con H <sub>2</sub> O sin precipitar agregados	Lavado con H <sub>2</sub> O
1,1x10 <sup>4</sup>	63,7 ± 9,2	56,0 ± 3
2,3 x 10 <sup>4</sup>	56,8 ± 3,9	
4,5 x 10 <sup>4</sup>	71,4 ± 9,2	

Por último, el tercer protocolo<sup>170</sup> consistió en mezclar 9 mg de MNPs dispersas en cloroformo, con 5 ml de una disolución acuosa de CTAB 0,2 M y agitar vigorosamente durante 40 min. A continuación, se calentó la disolución a 65 °C durante 30 min para evaporar la fase orgánica. En este caso se probó con MNPs de diferentes tamaños, entre 20 y 12 nm, lo que implicó diferentes relaciones de moléculas CTAB.nm<sup>-2</sup>. También se evaluó la potencial influencia del disolvente en el que se encontraban dispersadas las MNPs, empleando cloroformo y hexano. De los 3 protocolos testados, este último fue el más sencillo y con el que se obtuvieron los tamaños hidrodinámicos promediados en número más bajos (Tabla 16). Con los experimentos llevados a cabo, no se pudo afirmar que hubiese diferencia entre la utilización de cloroformo o hexano como dispersante. Además, los tamaños hidrodinámicos más bajos se obtuvieron con las MNPs de mayor tamaño, lo que pudo deberse a una relación CTAB más adecuada y/o a una menor tendencia a la agregación en el caso de las MNPs de mayor tamaño.

Tabla 16: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido por DLS siguiendo diferentes condiciones del protocolo 3.

Diámetro NP / nm	Disolvente	Moléculas CTAB.nm <sup>-2</sup>	Tamaño hidrodinámico / nm
20,7 ± 1,9	CHCl <sub>3</sub>	1,2 x 10 <sup>3</sup>	33,5 ± 1,7
17,8 ± 2,2		1,0 x 10 <sup>3</sup>	40,4 ± 2,2
18,3 ± 2,0	Hexano	1,0 x 10 <sup>3</sup>	42,0 ± 11,5
16,7 ± 2,0		8,7 x 10 <sup>2</sup>	56,5 ± 11,9
11,9 ± 0,9		7,0 x 10 <sup>2</sup>	49,1 ± 4,5

Los resultados del DLS indicaron que las MNPs con un tamaño de 20,7 ± 1,9 nm, tras ser transferidas a un medio acuoso, presentaron un tamaño hidrodinámico coherente con el tamaño medido mediante imágenes de TEM.

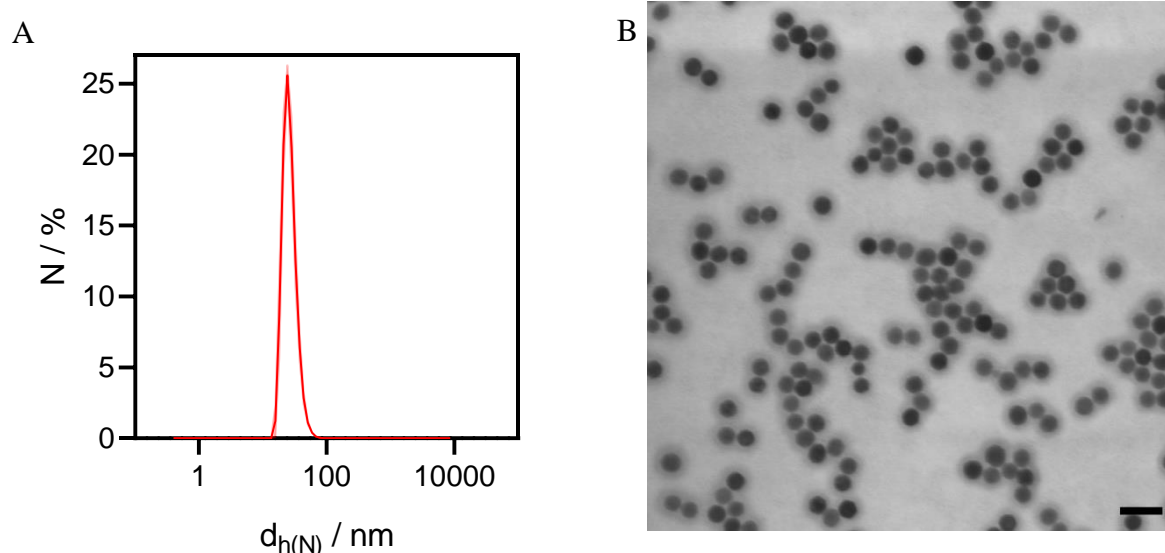


Figura 51: Tamaño hidrodinámico promediado en número (A) obtenido por DLS, e imagen de STEM (barra de escala 50 nm) de las MNPs-CTAB transferidas a agua (B).

### 4.3. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DE NCs MNPs@ZIF-8

Los estudios previos para sintetizar NCs de MNPs@ZIF-8 han seguido principalmente dos estrategias diferentes: la impregnación y la estrategia núcleo-carcasa.

La impregnación consiste en crecer las MNPs en los poros del MOF, obteniendo NPs o clústers de pequeño tamaño depositados en el interior de los poros del ZIF-8.<sup>171</sup>

La estrategia núcleo-carcasa consiste en crecer el ZIF-8 sobre la superficie de MNPs producidas mediante síntesis solvotermal, funcionalizadas con polidopamina o poliestireno de sulfonato de sodio (PSS)<sup>172-173</sup>. Otro procedimiento descrito consiste en recubrir con sílice mesoporosa las MNPs y crecer el ZIF-8 sobre la sílice.<sup>174</sup> También se utilizan MNPs sintetizadas por termólisis estabilizadas con PVP, sobre las que crece el ZIF-8 mediante diferentes estrategias, solvotermal (DMF, MeOH), asistido por microondas, sonoquímico, mecanoquímico, gel seco y método microfluídico.<sup>175</sup>

Estos métodos implican que los NCs descritos están formados generalmente por MNPs grandes (>50 nm) con una carcasa de ZIF-8 fina, que se utilizan para catálisis<sup>172-173</sup>, eliminar contaminantes del agua<sup>172</sup> o para separaciones<sup>176</sup>, o bien, son propuestos como sistemas para la liberación controlada de fármacos al exponer los NCs a campos magnéticos alternos.<sup>171</sup> En el caso de estos últimos, las MNPs son todavía pequeñas para generar el suficiente calor, tal que los NCs deben ser expuestos a campos magnéticos alternos muy intensos.

En este trabajo, se llevó a cabo la síntesis de NCs de MNP@ZIF-8 mediante una estrategia de núcleo-carcasa. La estructura de estos nanocompuestos estaba compuesta por un núcleo de MNP con un diámetro aproximado de 20 nm encapsulado con una capa de ZIF-8.

Una vez transferidas las MNPs a agua mediante la ayuda de la concentración de CTAB adecuada como se comentó en el apartado anterior, se determinó su concentración utilizando la metodología descrita en el apartado 4.2.1. Para crecer el ZIF-8 sobre las MNPs (MNP@ZIF-8), sobre una mezcla de los precursores (MI y  $Zn(NO_3)_2$ ) se añadieron las MNPs dispersas en una disolución de CTAB 0,2 g.l<sup>-1</sup>. La disolución mezcla se agitó durante 5 min y se dejó en reposo durante 3 h, tiempo suficiente para completar el crecimiento de los cristales de ZIF-8 sobre las MNPs. Con el objetivo de determinar cómo influye la concentración de MNPs a la síntesis, se llevaron a cabo pruebas utilizando dos concentraciones diferentes de MNPs, 24 y 12 nM. Para purificar los NCs, estos se centrifugaron a 8000 rcf y se redispersaron en MeOH (Figura 52). Los tamaños hidrodinámicos obtenidos mediante DLS mostraron que a medida que aumentó la concentración de MNPs, disminuyó el tamaño hidrodinámico promediado en número de los NCs. Esto sugirió que la técnica utilizada fue eficaz para producir NCs con una alta eficiencia de encapsulamiento de MNPs y un cierto grado de control sobre su tamaño. (Figura 52).

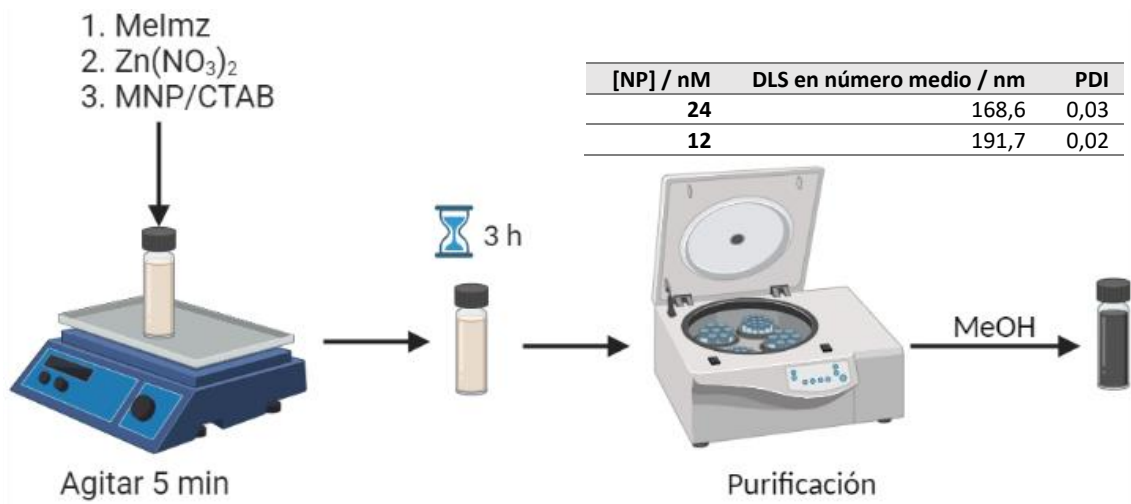
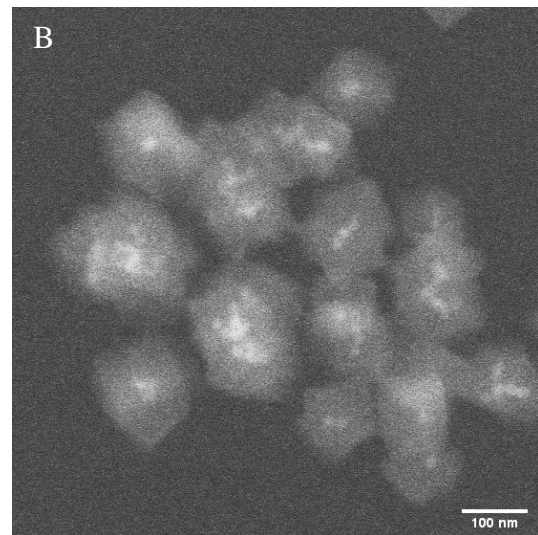
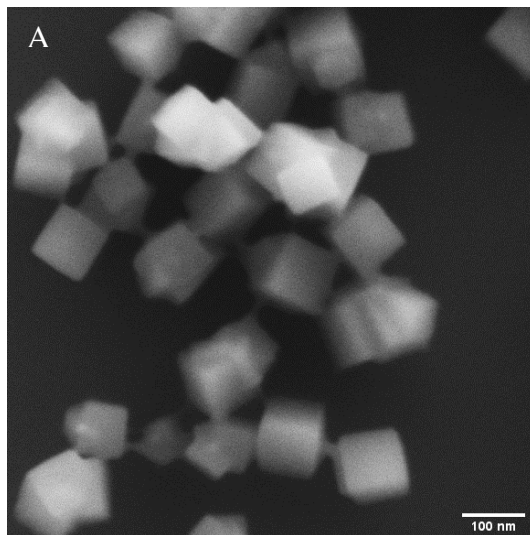


Figura 52: Esquema representativo de la síntesis de MNP@ZIF-8 y tamaño hidrodinámico promediado en número de los MNP@ZIF8.



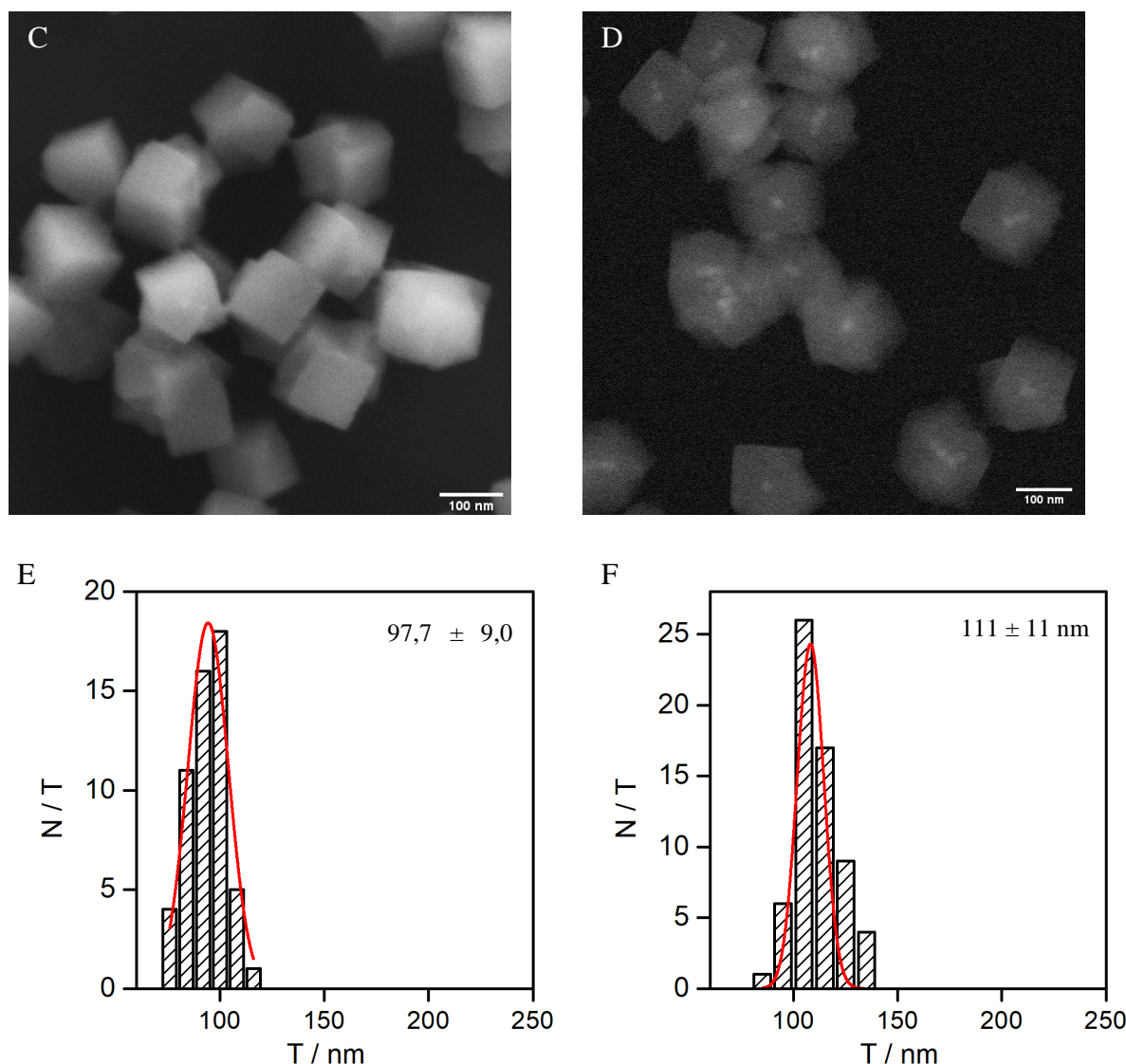
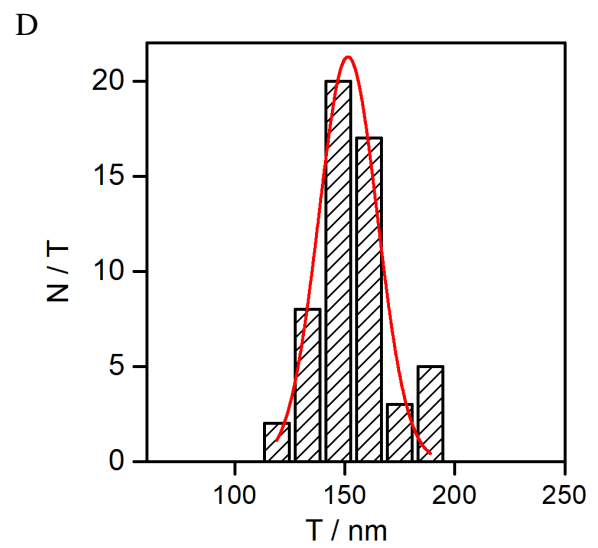
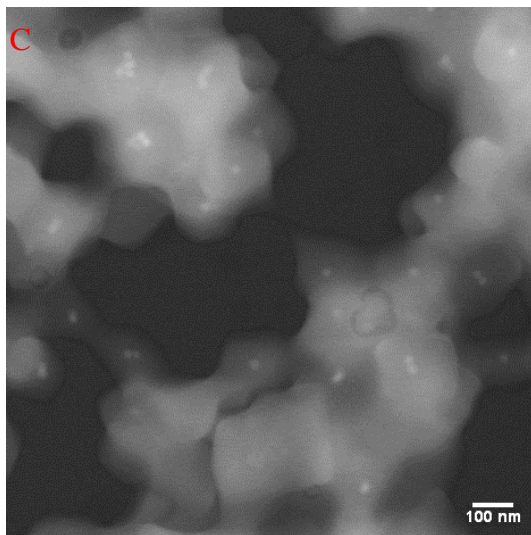
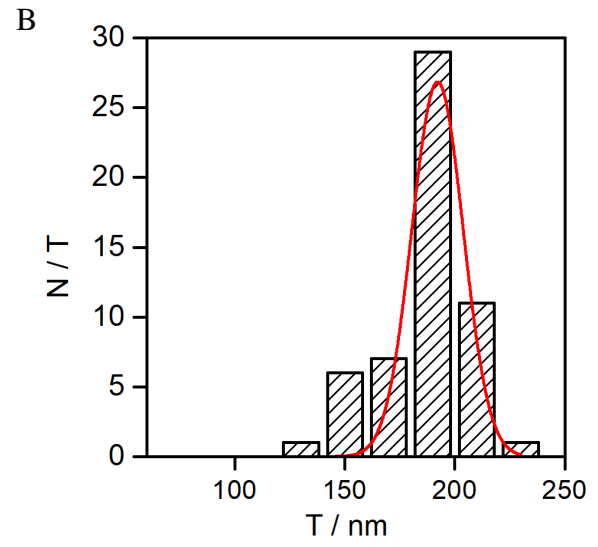
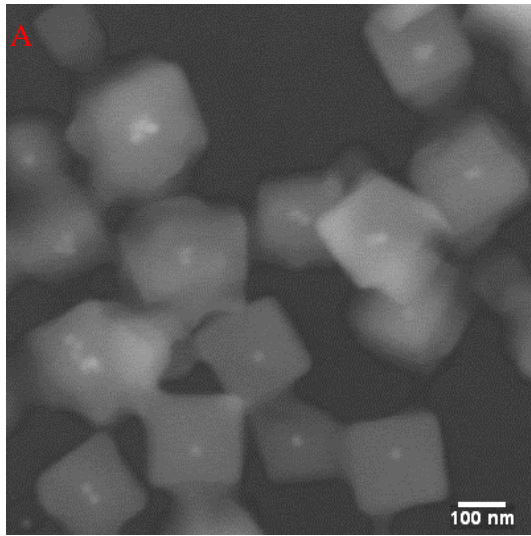
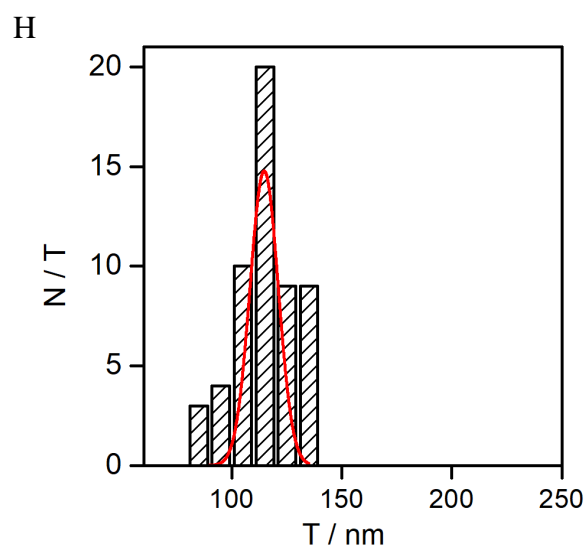
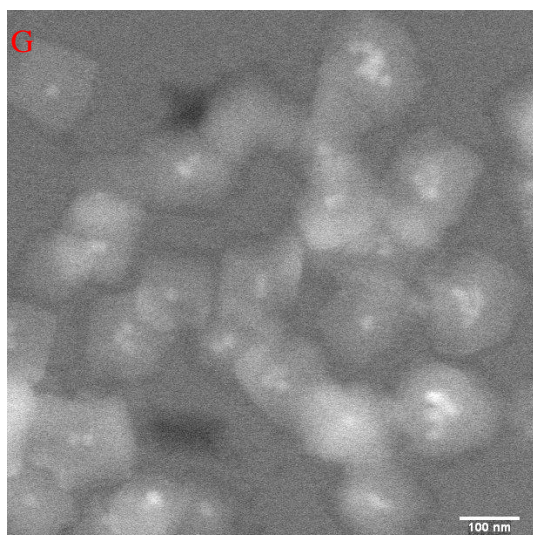
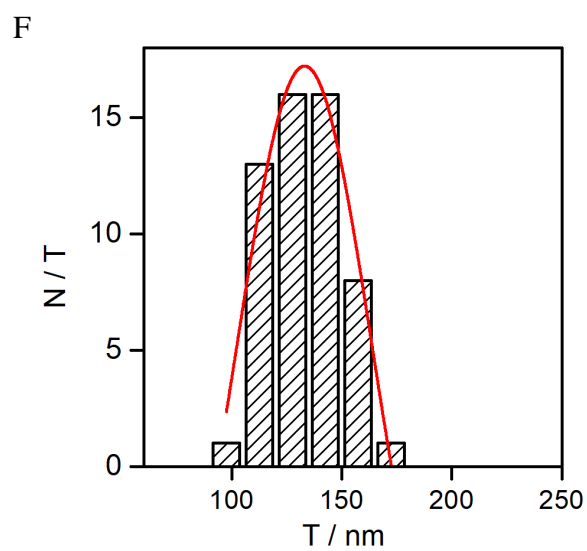
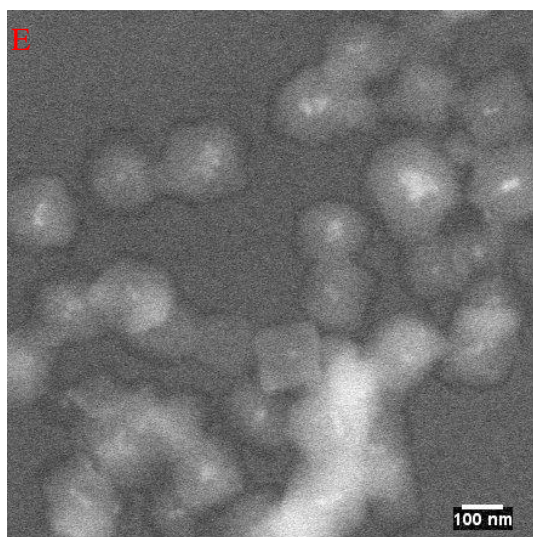


Figura 53: Imágenes SEM con detectores SE2 (izquierda) y AsB a 20 kV (derecha) representativas y la correspondiente distribución de tamaño ( $T$ ) de MNP@ZIF-8 preparados a partir de MNPs a concentraciones de 24 nM (A, B y E) y 12 nM (C, D y F).

A continuación, se realizó la caracterización morfológica de los MNP@ZIF-8. Las microfotografías de SEM (Figura 53) confirmaron que a medida que se aumentó la concentración de MNPs en la síntesis, disminuyó el tamaño de los NCs de ZIF-8. En las imágenes obtenidas con el detector AsB a 20 KV, se observó claramente cómo las MNPs estaban encapsuladas en el interior de los cristales de ZIF-8. Además, se apreció que a mayor concentración de MNPs utilizada en la síntesis, i) mayor fue el número de NPs por cristal de ZIF-8; ii) y menor fue el tamaño de los cristales de ZIF-8, que presentaron una morfología poliédrica. Esta relación entre el tamaño del ZIF-8 y la concentración de las MNPs fue exponencial (Figura 54, D). Por otro lado, se comprobó que mediante el ajuste fino de la concentración de las MNPs fue posible obtener NCs con una NP por cristal de ZIF-8. En el caso de las MNPs utilizadas en este trabajo, se observó que al añadir 2 nM de MNPs durante la síntesis, el número de ZIF-8 con más de una NP por MOFs es muy reducido.





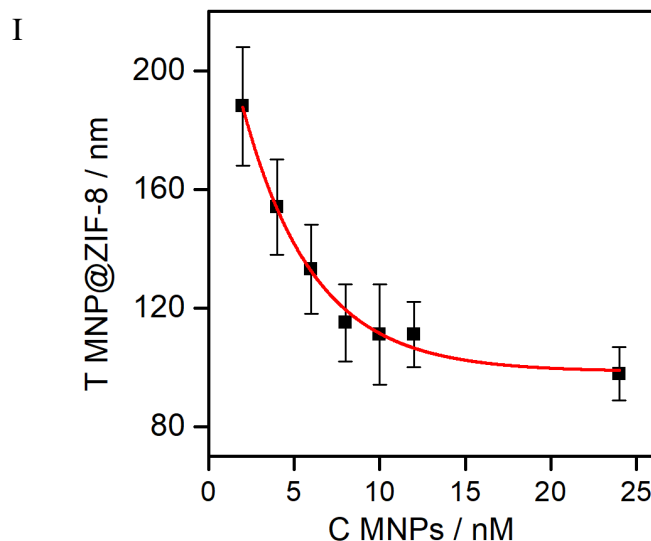


Figura 54: MNP@ZIF-8 sintetizados en presencia de diferentes concentraciones de MNPs, 2, 4, 6 y 8 nM (A, C, E y G respectivamente), con sus correspondientes distribuciones de tamaño (B, D, F y H). Relación entre la concentración de MNPs y tamaño final de los MNP@ZIF-8 (I).

#### 4.3.1. Encapsulación de colorantes en nanocompuestos MNP@ZIF-8

Una vez optimizada la síntesis de los nanocompuestos MNP@ZIF-8, el siguiente paso en este trabajo fue la encapsulación de una molécula fluorescente en su estructura. En este caso, se eligió utilizar CV como molécula fluorescente debido a su amplia disponibilidad, su facilidad de uso, y que es un marcador lisosomal fluorescente extremadamente fotoestable que no sufre decoloración por luz o fotoconversión, y es mínimamente fototóxico.<sup>177</sup> La molécula de CV es un compuesto orgánico que presenta una alta eficiencia de fluorescencia y una amplia banda de absorción. En particular, esta molécula absorbe luz de longitud de onda de 584 nm y emite fluorescencia a 620 nm (Figura 55). Estas propiedades hacen que el CV sea una molécula ideal para estudiar la aplicación de los NCs en la liberación controlada de fármacos. Una vez encapsulado, el CV puede actuar como un indicador de la liberación de la carga cuando los NCs están expuestos a un AMF. Utilizando técnicas de microscopía confocal y fluorescencia, es posible medir la eficiencia de la liberación de la carga mediante la medida de la fluorescencia emitida por el CV.

La encapsulación del CV en el ZIF-8 se llevó a cabo mediante la adición de un exceso de la sonda fluorescente en la mezcla de reacción durante la síntesis del compuesto, tal como se describe en el apartado de métodos (2.2.18) en presencia de CTAB 2 M.

Una vez encapsulado el CV, las partículas fueron purificadas y se estimó la cantidad encapsulada de forma indirecta, determinando el CV no encapsulado que se recogió durante la purificación de la muestra al centrifugarla. Para ello, se elaboraron dos curvas de calibrado de intensidad de fluorescencia frente a la concentración de CV, una en agua y otra en MeOH (Figura 12) midiéndose la fluorescencia en los 2 sobrenadantes recogidos de los lavados. En total, se añadieron 100  $\mu$ l de una disolución de CV de concentración 1 g.l<sup>-1</sup>. Tras el primer y segundo lavado se recogieron 3 y 1 ml, respectivamente, de sobrenadante. Los resultados obtenidos mostraron que el CV determinado por fluorescencia en el primer y segundo lavado fue de  $7,93 \times 10^{-3}$  (3 ml recogidos) y  $2,33 \times 10^{-2}$  g/l (1 ml recogido), respectivamente, lo que se correspondió con un 24,0 y 23,3 % del CV adicionado durante la síntesis. Esto hizo un total del

47.3 % del CV en el sobrenadante y, por diferencia, un 52.7 % del CV encapsulado en los MNP@ZIF-8 (Tabla 17).

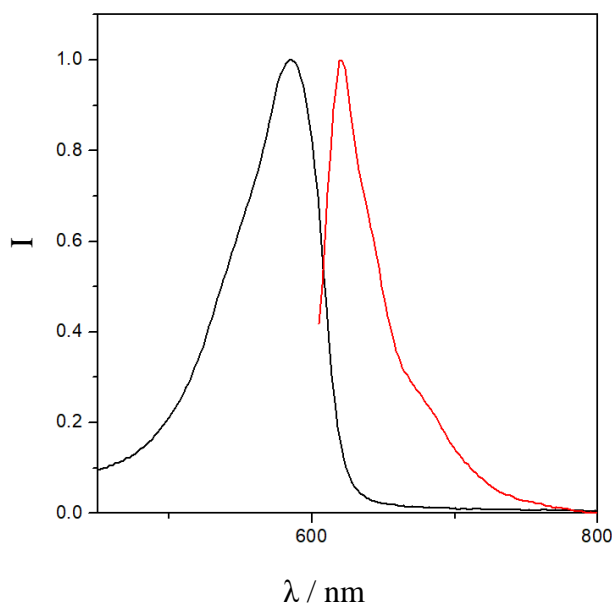


Figura 55: Espectros normalizados de absorción UV-Vis (negro) y de fluorescencia (rojo) del CV

Tabla 17: Concentración de CV encapsulado en MNP@ZIF-8

Lavado	Sobrenadante / ml	[CV]teórica / $g \cdot l^{-1}$	[CV]fluorímetro / $g \cdot l^{-1}$	CV lavado / %
1	3	$3,3 \times 10^{-2}$	$7,93 \times 10^{-3}$	24,0
2	1	$1,0 \times 10^{-1}$	$2,33 \times 10^{-2}$	23,3
<b>Total</b>				<b>47,3</b>

La encapsulación del CV en los MNP@ZIF-8 no afectó ni a la morfología, ni al tamaño, ni al radio hidrodinámico de los NCs. Los MNP@ZIF-8 cargados con CV (MNP@ZIF-8(CV)) no presentaron diferencias morfológicas ni de tamaño con respecto a los MNP@ZIF-8 vacíos. Los MNP@ZIF-8(CV) presentaron un tamaño promedio de  $138 \pm 14$  nm obtenido por microscopía electrónica, forma cúbica y diámetro hidrodinámico promediado en número de  $229 \pm 2$  nm. En cuanto al espectro UV-Vis, se apreció un ligero aumento de la absorbancia en los MNP@ZIF-8(CV) en comparación con los MNP@ZIF-8 vacíos (Figura 56).

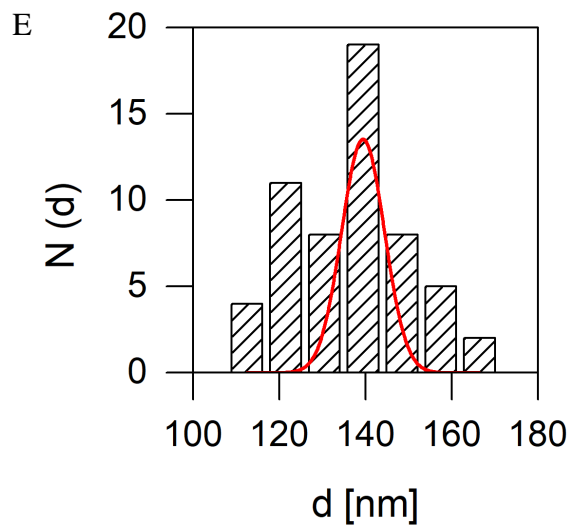
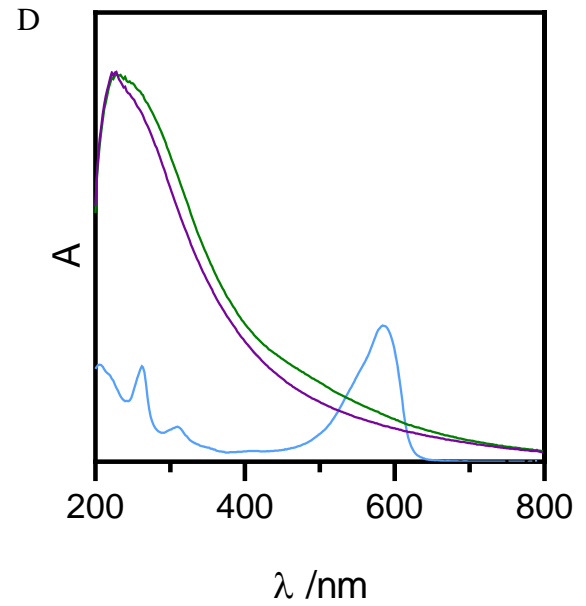
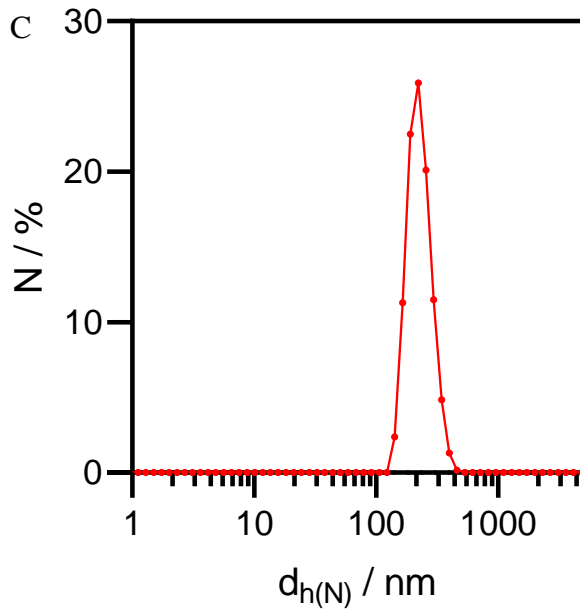
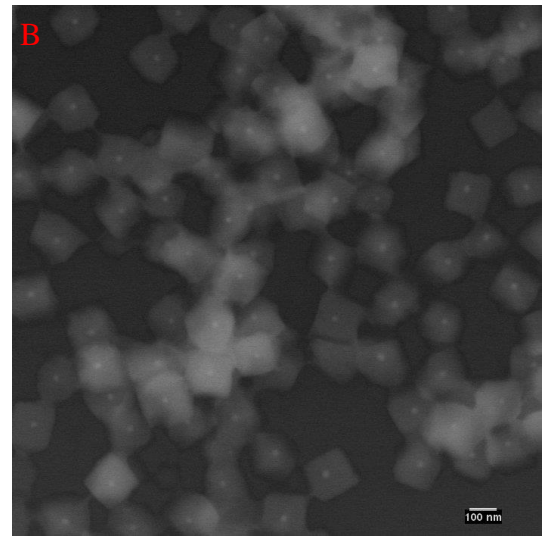
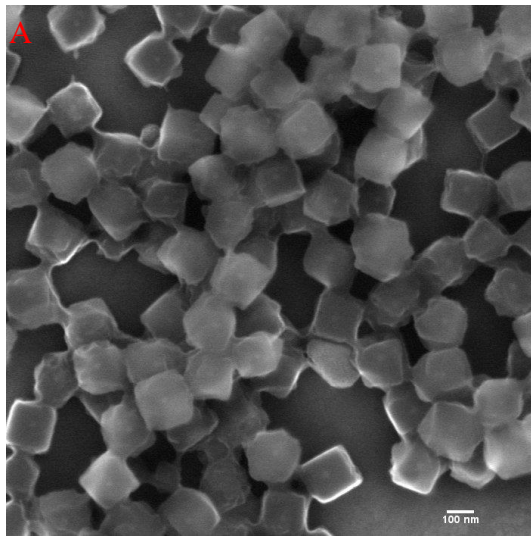


Figura 56: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV) recopiladas con detector InLens a 3 kV (A) y detector AsB a 20 kV (B). Distribución en número del diámetro hidrodinámico de las muestras de MNP@ZIF-8(CV) medidos por DLS (C). Espectro UV-Vis de los MNP@ZIF-8, MNP@ZIF-8(CV) y CV (D). Distribución de tamaño de los MNP@ZIF-8 determinados a partir de la medida del diámetro de, al menos 50 NPs en el software ImageJ (medido de vértice a vértice)(E).

#### 4.3.2. Funcionalización y estabilidad coloidal de los MNP@ZIF8

Como se mencionó en apartados anteriores, el ZIF-8 es estable en MeOH pero se degrada rápidamente en medios acuosos (Figura 57, A). Para prevenir la degradación y evitar la pérdida de CV al redispersar los MNP@ZIF-8(CV) en medio acuoso, estos se recubren con PMA.

Así, se llevó a cabo el recubrimiento con PMA de MNP@ZIF-8 con y sin CV. Para realizar el recubrimiento, fue necesario determinar la concentración de los MNP@ZIF-8 utilizando DLS. En una dilución, la concentración inicial ( $C_i$ ) multiplicada por el volumen inicial ( $V_i$ ) es igual a la multiplicación de la concentración final ( $C_f$ ) por el volumen final ( $V_f$ ):

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f \quad (33)$$

Dividiendo ambos términos por  $V_i$ :

$$C_i = C_f \times \frac{V_f}{V_i} \quad (34)$$

donde  $V_f/V_i$  es el factor de dilución ( $F$ ).

$$C_i = C_f \times F \quad (35)$$

Dividiendo ambos términos por  $F$ :

$$C_i \times F^{-1} = C_f \quad (36)$$

Por lo tanto, representando  $F^{-1}$  frente a  $C_f$ , se obtiene una recta de pendiente  $C_i$ . Para ello, se prepararon una serie de diluciones, se midieron, y se representó la concentración frente a la inversa del factor de dilución para cada una de las diluciones realizadas, ajustándose los datos experimentales mediante regresión lineal. La pendiente de la recta resultante fue la concentración de MNP@ZIF-8(CV), siendo en este caso 1,8 nM (Figura 57, B).

Una vez determinada la concentración, se llevó a cabo el recubrimiento con PMA modificado con un 5% de fluoresceína (PMA-6-AF) utilizando una relación de 600 monómeros de PMA por cada nm<sup>2</sup> de ZIF-8, tal como se describe en el apartado de métodos (2.2.23.d). Esto

permitió evitar la degradación del ZIF-8 al redispersar los NCs en medio acuoso y proteger el CV encapsulado en las mismas.

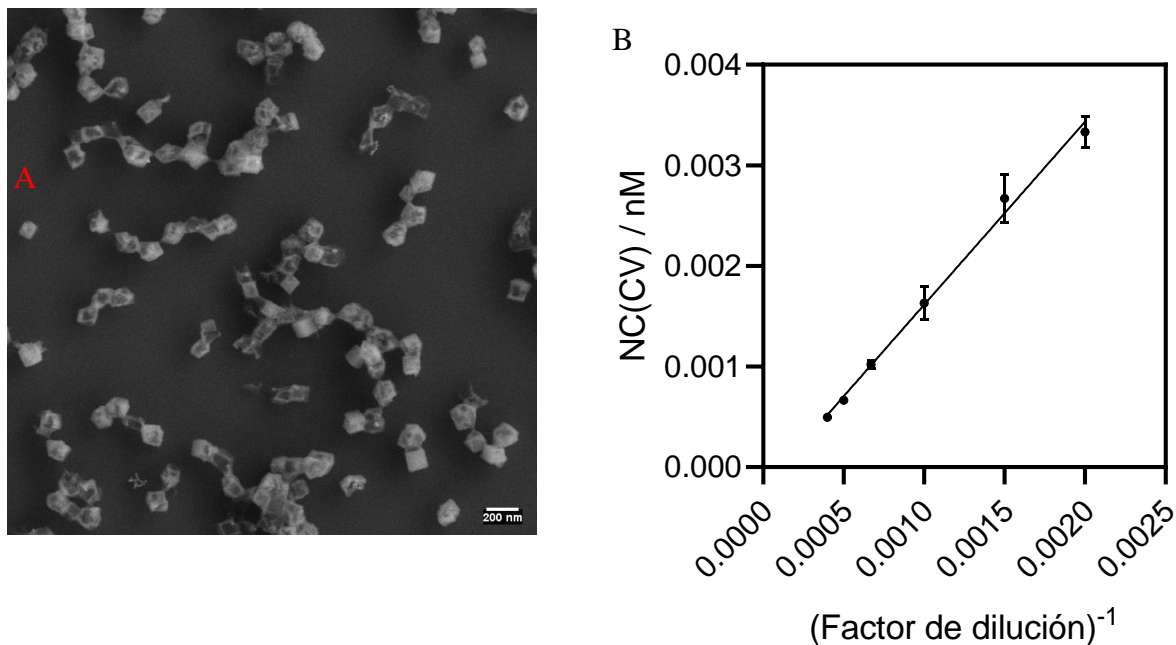


Figura 57: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV) redispersadas en agua (A). Correlación entre la concentración de MNP@ZIF-8(CV) determinada por DLS y el factor de dilución. Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 1,82 x - 2,066 x 10^{-4}$ ,  $r^2 = 0,995$ ) (B).

Tras la funcionalización con PMA, purificación y redispersión de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF en agua, se observó que estos NCs se mantenían estables durante varios días, manteniendo su forma y tamaño originales (Figura 58). El diámetro hidrodinámico medido tras el recubrimiento polimérico fue de  $225 \pm 10$  nm promediado en número y el potencial- $\zeta$  fue de  $-16,4 \pm 1,7$  mV. Esto indicó que el recubrimiento con PMA permitió estabilizar los NCs en medio acuoso y prevenir la degradación del ZIF-8.

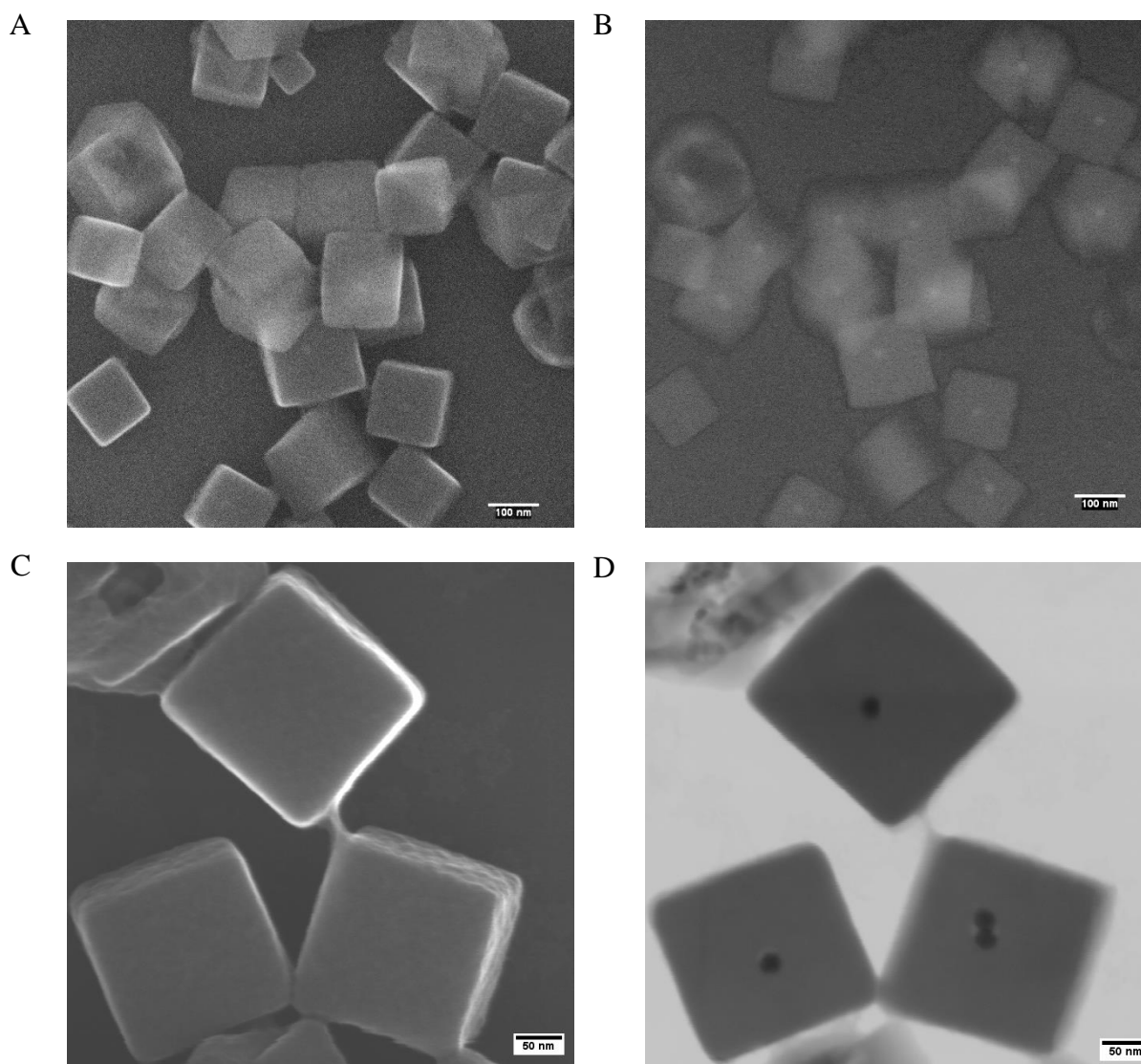


Figura 58: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF recopiladas con un detector InLens a 20 kV (A) y 3 kV (C), y detector AsB a 20 kV (B) e imagen STEM (D).

A continuación, se evaluó la estabilidad coloidal de los MNP@ZIF-8(CV) y los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF mediante DLS en diferentes medios acuosos: agua, tampón de solución salina de fosfato (PBS), medio celular DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), y PSF. Los resultados indicaron que los MNP@ZIF-8(CV) sin PMA son inestables en agua, agregándose en las primeras 24 h de dispersión y no siendo detectados después de 74 h. Por otro lado, los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF fueron coloidalmente estables en agua, PBS, DMEM y PSF hasta 74 horas (Tabla 18).

Por otro lado, se empleó el análisis termogravimétrico para evaluar la estabilidad térmica de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF. Los resultados mostraron que las muestras son estables hasta una temperatura de 400 °C, donde se observó una pérdida pronunciada de masa (50 - 60 %) debido a la combustión del MI. Además, se observó una pequeña pérdida de masa (< 10 %) inicial alrededor de 200-250 °C, que se atribuyó a descarboxilaciones del PMA y una pérdida de masa mayor ( $\approx 20$  %) alrededor de 300-400 °C debido a la descomposición de las cadenas alquílicas de la DDA presente en el PMA (Figura 60, A).

Tabla 18: Diámetros hidrodinámicos promediados en número (valor medio numérico  $\pm$  SD) obtenidos a partir de medidas de DLS de los MNP@ZIF-8(CV) con y sin PMA en diferentes medios (agua, tampón de solución salina de fosfato, medio celular DMEM suplementado con FBS al 10 % (v/v), PSF) y NC en agua.

T / h	Sin PMA H <sub>2</sub> O / nm	H <sub>2</sub> O / nm	PBS / nm	DMEM / nm	PSF / nm
0	195 $\pm$ 4	218 $\pm$ 3	203 $\pm$ 4	219 $\pm$ 4	220 $\pm$ 2
2	206 $\pm$ 8	221 $\pm$ 2	186 $\pm$ 5	216 $\pm$ 6	234 $\pm$ 20
6	185 $\pm$ 4	230 $\pm$ 3	207 $\pm$ 5	239 $\pm$ 10	214 $\pm$ 2
24	674 $\pm$ 474	224 $\pm$ 0	224 $\pm$ 6	235 $\pm$ 4	222 $\pm$ 10
74	0	224 $\pm$ 0	220 $\pm$ 9	236 $\pm$ 4	228 $\pm$ 7,2

Para evaluar la porosidad del MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF se realizó un análisis del área de superficie y la porosidad de Brunauer-Emmett-Teller (BET) del MNP@ZIF-8 y del MNP@ZIF-8-PMA-6-AF, tanto cargados como no cargados con CV, mediante medidas de adsorción de N<sub>2</sub> a 77 K. Los resultados obtenidos indicaron que las isotermas obtenidas fueron de tipo I, lo que confirmó que los MNP@ZIF-8 son materiales microporosos. Las áreas de superficie ( $S_{BET}$ ) de MNP@ZIF-8, MNP@ZIF-8(CV), MNP@ZIF-8-PMA-6-AF y MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF fueron de 1466  $\pm$  22, 1268  $\pm$  18, 962  $\pm$  17 y 683  $\pm$  9 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Así, se observó una gran reducción del área de superficie BET ( $S_{BET}$ ) al comparar el MNP@ZIF-8 con el MNP@ZIF-8(CV), lo cual indicó que el fluoróforo se adsorbió dentro del poro del ZIF-8 (Figura 60, B).

Las mediciones de dispersión de rayos X a ángulo alto (WAXS) se realizaron en modo capilar, el difractograma se normalizó y se comparó con un patrón de ZIF8 ("FAWCEN"). Los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF exhibieron los picos característicos del ZIF-8. El patrón de difracción presentó los picos estrechos típicos de un sistema de alta cristalinidad (Figura 60, C), lo que sugirió que la funcionalización con PMA no afectó a la estructura cristalina de los MNP@ZIF-8.

Adicionalmente, se llevó a cabo la caracterización IR de una muestra de MNP@ZIF-8 seca, pero no fue posible identificar ninguna señal del espectro de CV adsorbida en las cavidades porosas de los ZIF-8 cargados con el principio bioactivo (Figura 60, D). Por otra parte, los picos del espectro MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF detectados entre 2800 y 3000 cm<sup>-1</sup> se debieron a las vibraciones del grupo hidroxilo, metileno y grupos metilo del AF.

El siguiente paso, fue determinar la concentración de NC-PMA-6-AF mediante un análisis de seguimiento de NPs, que se realizó de manera análoga a la determinación por difracción láser (DLS). Es decir, se representó la concentración de diferentes diluciones frente a la inversa del factor de dilución (Figura 61).

Por último, se procedió a examinar la toxicidad de las MNPs, MNP@ZIF-8 y MNP@ZIF-8(CV) recubiertas con PMA en células HeLa, empleando el ensayo de resazurina. Las MNPs no mostraron ninguna señal de toxicidad en las células HeLa en el rango de concentraciones analizado. Este resultado sugiere que las MNP por sí solas no presentan efectos adversos para la viabilidad celular. Los MNP@ZIF-8 y MNP@ZIF-8(CV) mostraron toxicidad en células HeLa, siendo la concentración umbral para la manifestación de toxicidad alrededor de 9 pM. (Figura 59).

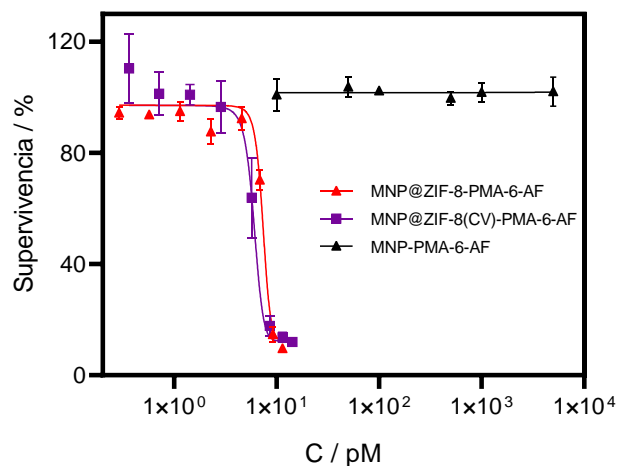


Figura 59: Viabilidad celular usando el ensayo de resazurina de células HeLa expuestas a concentraciones crecientes de MNP, MNP@ZIF-8 y MNP@ZIF-8(CV) recubiertos con PMA.

Una vez sintetizados y caracterizados, los NCs se evaluaron como sistemas potenciales para la liberación controlada de fármacos. La premisa fue que, al someterlos a un AMF, se podría desencadenar la liberación del CV, previamente cargado en los poros del ZIF-8. Estos experimentos fueron llevados a cabo por Ahmed Abdelhamid en el Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse (INSA). Los anexos incluyen una sección que detalla los resultados obtenidos por Abdelhamid. Sin embargo, estos resultados no son parte de esta tesis, sino que se incluyen para ilustrar una posible aplicación de estos NCs.

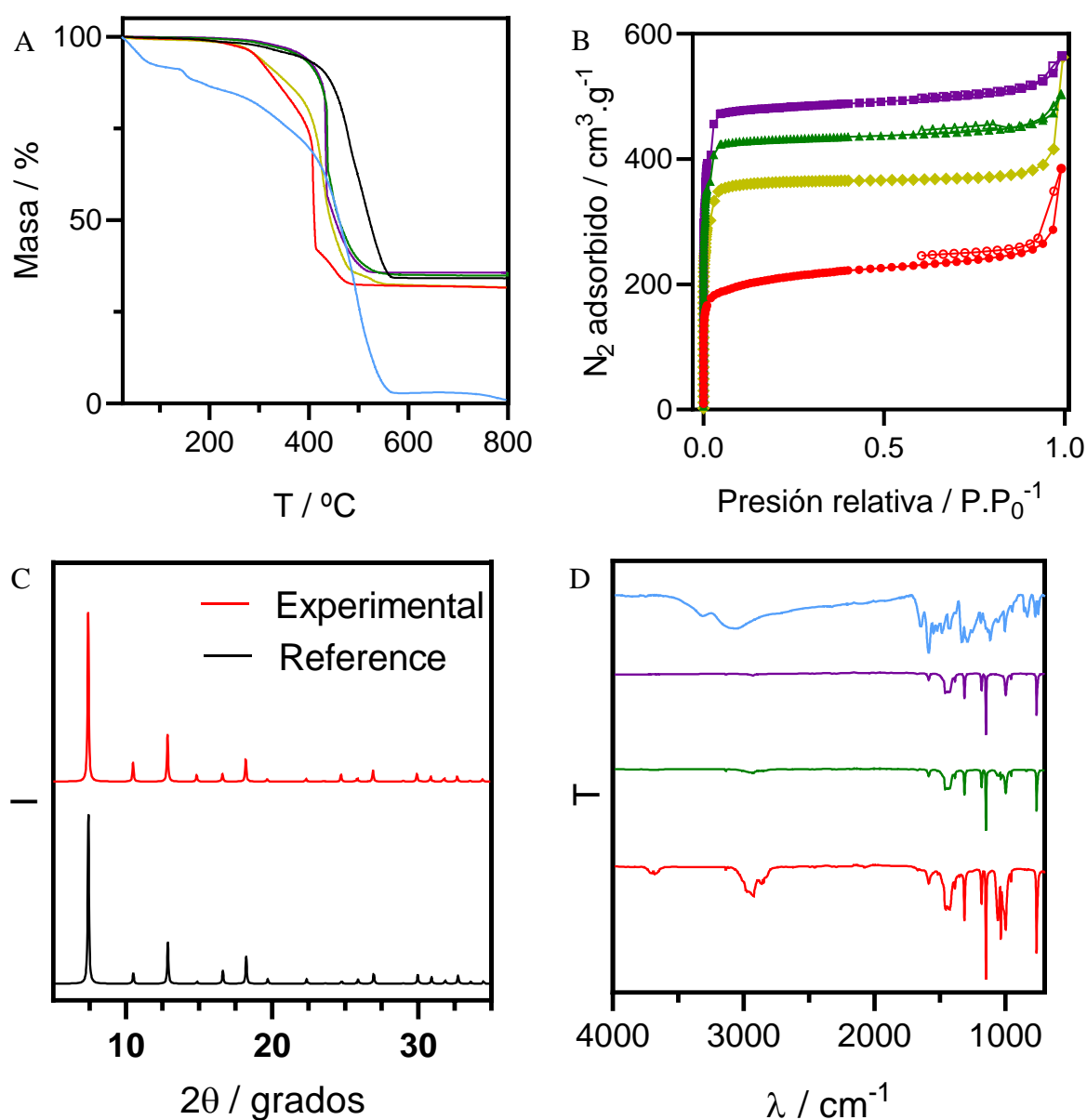


Figura 60: Análisis TGA (A) e Isotermas BET (B) de los MNP@ZIF-8. Análisis WAXS MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF medido a una distancia de muestra a detector de 200 mm en comparación con un patrón de referencia de ZIF8 ("FAWCEN") (C). Caracterización FTIR de los MNP@ZIF-8 y CV (D). Cada muestra se corresponde con los siguientes colores: CV (azul), ZIF-8 (negro), MNP@ZIF-8 (violeta), MNP@ZIF-8(CV) (verde), MNP@ZIF-8-PMA-6-AF (amarillo) y MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (rojo).

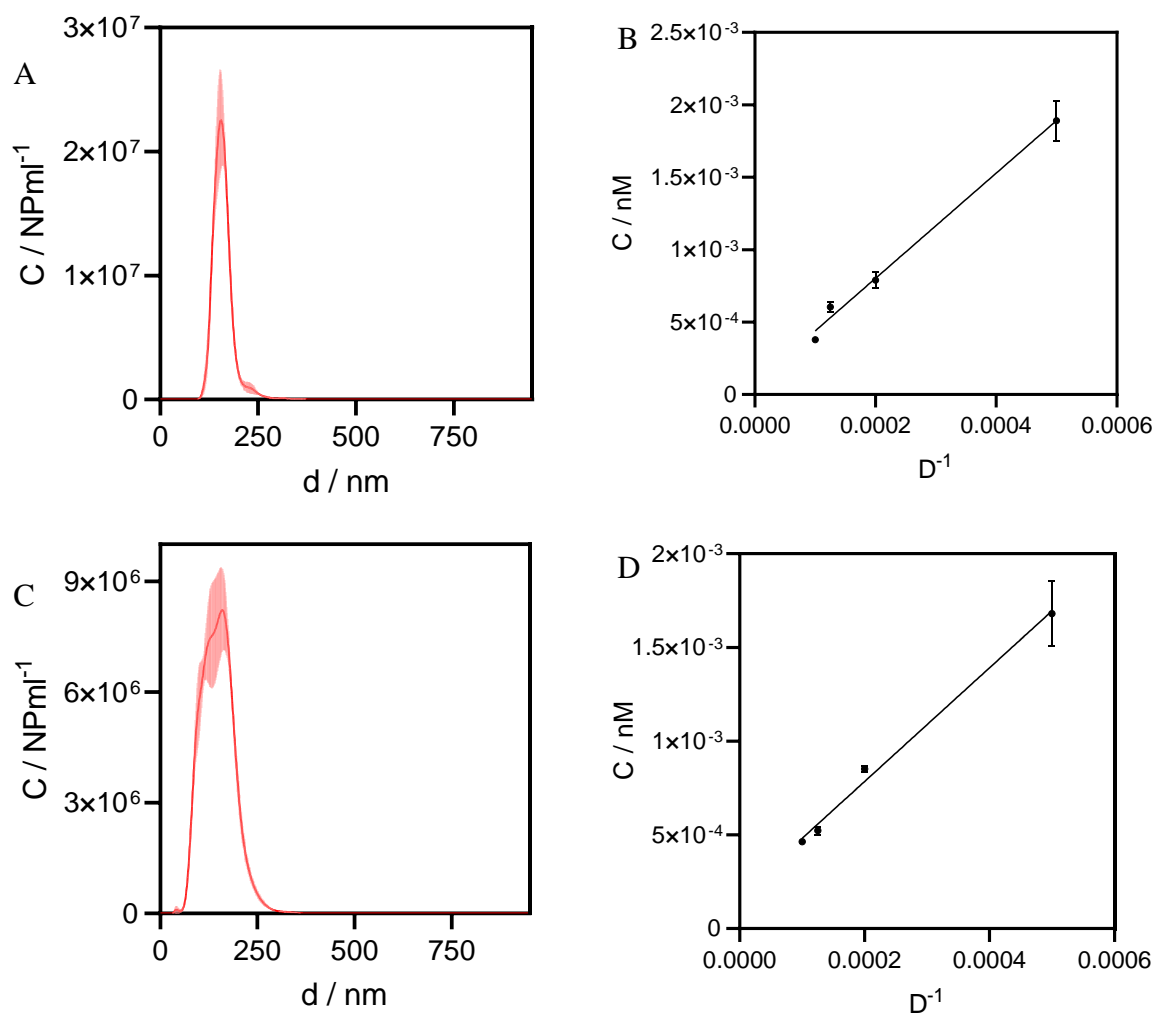


Figura 61: Distribuciones NTA del diámetro hidrodinámico de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (A) y MNP@ZIF-8-PMA-6-AF (C). Correlación entre la concentración de MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF (B) y MNP@ZIF-8-PMA-6-AF determinada por NTA y el factor de dilución. Los puntos se ajustaron con un análisis de regresión lineal ( $y = 3,63 x + 7,6 x 10^{-5}$ ,  $r^2 = 0,993$ ) (B) y ( $y = 3,03 x + 1,8 x 10^{-4}$ ,  $r^2 = 0,993$ ) (D).



# Capítulo 5

## 5. NPS DE PALADIO, DERIVADOS PdNP@ZIF-8 Y SU FUNCIONALIZACIÓN

### 5.1. INTRODUCCIÓN

Las NPs de paladio (PdNP) presentan una alta relación superficie-volumen en comparación con los materiales catalíticos macroscópicos y novedosas propiedades catalíticas, electrónicas, físicas, mecánicas y ópticas, así como una diversidad en forma y tamaño que las hacen especialmente útiles en aplicaciones biológicas.<sup>178</sup> Por ejemplo, su tamaño nanométrico les permite interactuar con las estructuras moleculares y celulares de los organismos vivos, lo que las hace útiles en la entrega de fármacos y el diagnóstico médico. Además, su alta estabilidad química y biocompatibilidad hacen que las NPs de paladio sean seguras para su uso en aplicaciones médicas.<sup>179</sup>

La química bioortogonal es un campo de investigación que se enfoca en el desarrollo y aplicación de reacciones químicas capaces de ocurrir en sistemas biológicos sin interferir ni interactuar con las moléculas o procesos biológicos naturales presentes.<sup>55</sup> Una de las estrategias propuestas consiste en utilizar nanocatalizadores heterogéneos biocompatibles, basados en PdNP, para promover la conversión local de moléculas terapéuticamente inactivas (profármacos) en moléculas citotóxicas.<sup>180</sup> En estas aplicaciones, la estabilización de las PdNP resulta esencial para garantizar su eficacia y seguridad en términos terapéuticos.

Las NPs estabilizadas con CTAB, un surfactante catiónico, presentan citotoxicidad.<sup>181</sup> Antes de desarrollar bioaplicaciones con estas NPs es esencial investigar la posibilidad de reemplazar el CTAB por moléculas no citotóxicas que puedan estabilizar las NPs en medios acuosos. Así, en este trabajo se estudió la estabilización de las NPs de Pd con PEG y MC, así como el impacto de estos recubrimientos en las propiedades catalíticas de las NPs.

Así, se utilizaron tres tipos de PEG, el metoxi-PEG-tiol (MeO-PEG-SH) de 2 kDa, el carboxi-PEG-amina (COOH-PEG-NH<sub>2</sub>) de 5 kDa y el tiol-PEG-carboxi (COOH-PEG-HS) de 5 kDa (Figura 62). En el caso de la MC, se utilizó la de estómago porcino, ya que es altamente estable frente a variaciones de pH y temperatura.<sup>182</sup>

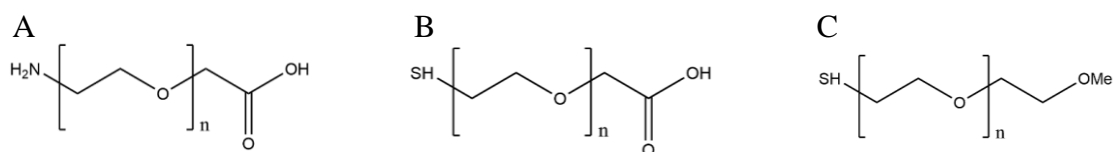


Figura 62: Representación de las diferentes moléculas de PEG utilizadas. COOH-PEG-NH<sub>2</sub> de 5 kDa (A), COOH-PEG-HS de 5 kDa (B) y MeO-PEG-SH de 2 kDa (C).

Las MCs son un grupo de proteínas altamente glicosiladas que se encuentran en una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales en humanos y otros animales.<sup>183</sup> Las MCs presentes en el estómago porcino contienen una alta cantidad de residuos de aminoácidos ricos en serina, treonina y prolina, los cuales son los principales sitios de glicosilación.<sup>184</sup> Esta glicosilación confiere a las MCs una gran resistencia a diferentes condiciones de pH y temperatura. La interacción entre las NPs y las MCs se produce principalmente a través de interacciones

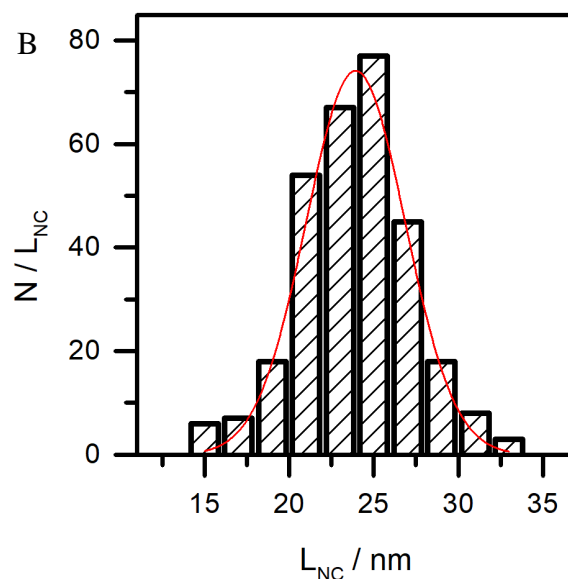
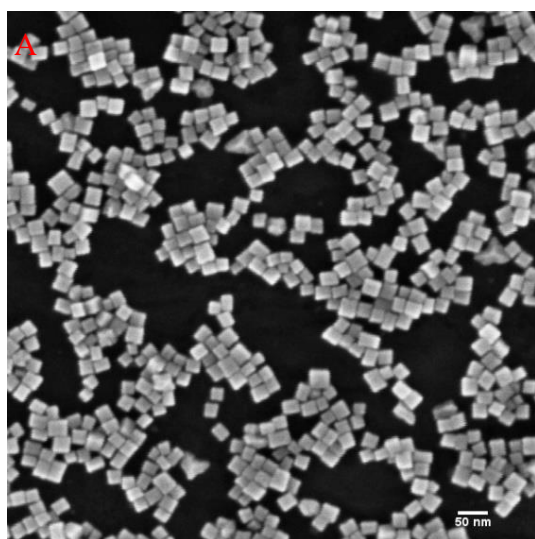
hidrofóbicas, la adsorción de diferentes aminoácidos a la superficie de las NPs, y enlaces S-Pd con el aminoácido cisteína.<sup>183</sup>

De forma alternativa, se examinó también el control del encapsulamiento de PdNC en corazas de ZIF-8 de distintos grosores como una estrategia para lograr la estabilización de los PdNC en entornos fisiológicos. El ZIF-8, además de proporcionar protección a las NPs, permite, debido a sus propiedades porosas, el flujo controlado por difusión de los reactivos hacia el núcleo catalizador del nanocompuesto.<sup>132</sup>

## 5.2. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PdNCs Y PdNDs

Se llevó a cabo en esta parte del trabajo la síntesis de PdNCs cóncavos y PdNDs. Estas NPs de Pd presentan altos rendimientos como catalizadores de diversas reacciones debido a su tamaño y forma.<sup>185</sup>

Los PdNCs se sintetizaron a partir de una sal de paladio ( $K_2PdCl_4$ ) reducida con AA en presencia de un agente estabilizador (CTAB), tal como se describe previamente (2.2.13). Los PdNCs sintetizados presentaron morfología cúbica con un tamaño promedio de  $23,8 \pm 3,3$  nm de lado, tamaño hidrodinámico promediado en número de  $25,9 \pm 0,2$  nm y PDI de 0,253 (Figura 63, A-D). Mediante imágenes de TEM y HRTEM se apreció que los PdNCs no tienen una morfología de cubo perfecto, sino que poseen una forma ligeramente cóncava. Además, en la imagen de HRTEM se distinguieron los planos cristalinos ordenados de forma paralela (Figura 63, E y F), la mayoría de las PdNPs presentan superficies bien definidas formadas por caras de índices bajos, tales como (100), (110) y (111).<sup>186</sup> En este caso, se observó que los planos mayormente expuestos eran los (111). La identificación de este plano cristalino específico se llevó a cabo mediante una medición de la distancia interplanar en las nanopartículas y se comparó con el valor correspondiente en la carta cristalográfica del Pd en el sistema cúbico (98-004-1517). El resultado obtenido fue una distancia interplanar de 2,30 Å, que concordó con el valor tabulado de 2,25 Å, presentando una discrepancia del 2%.



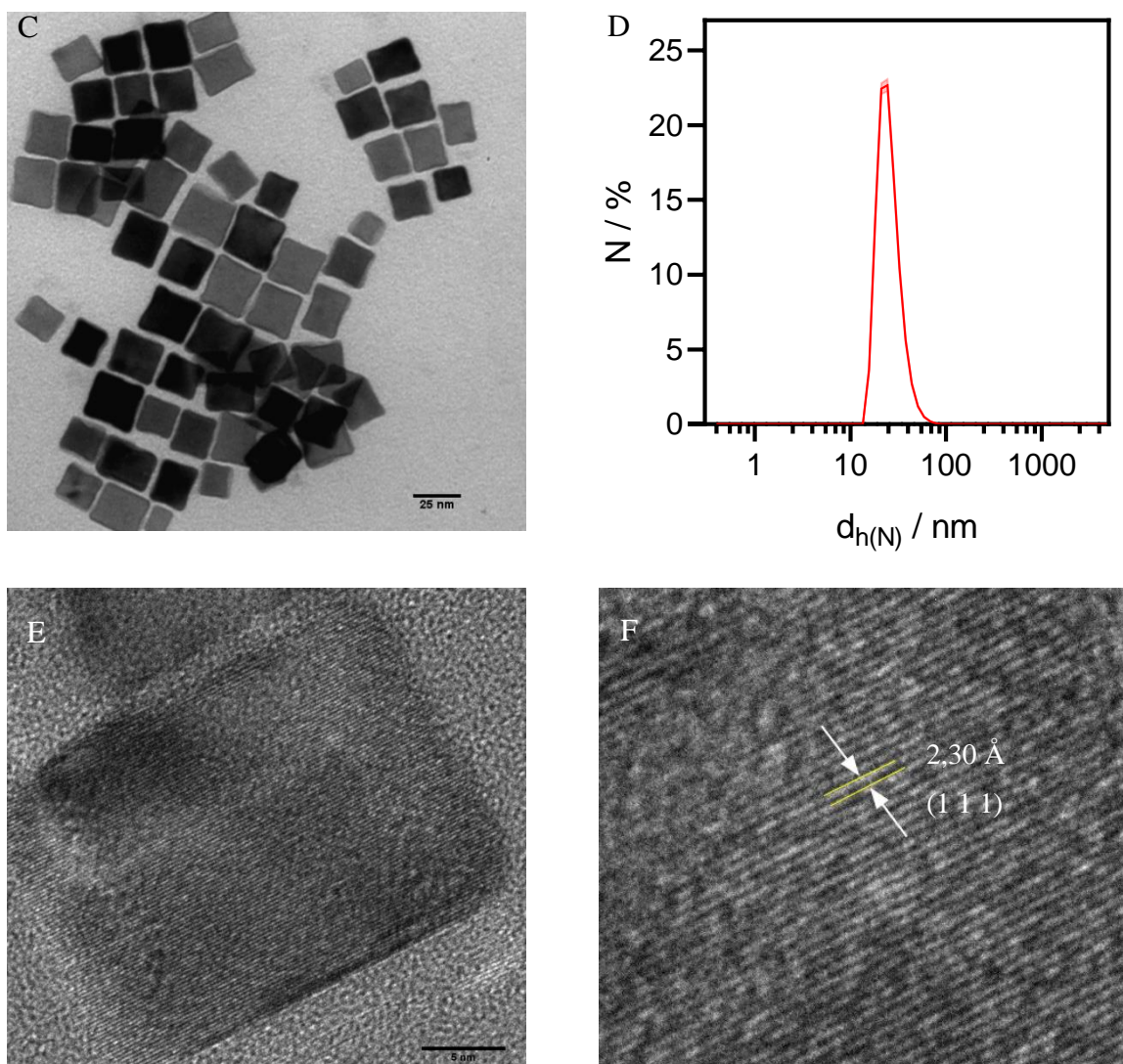
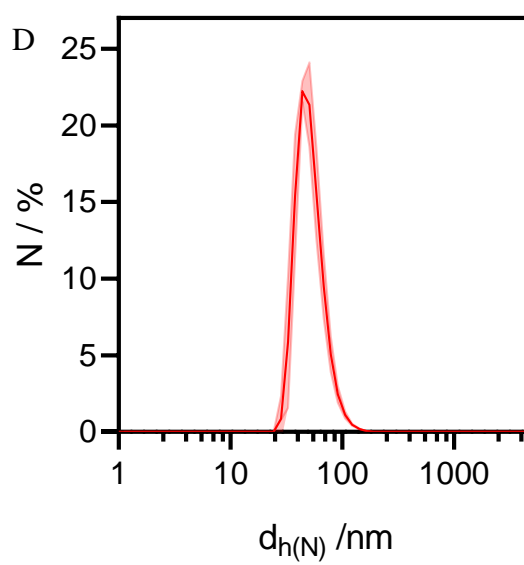
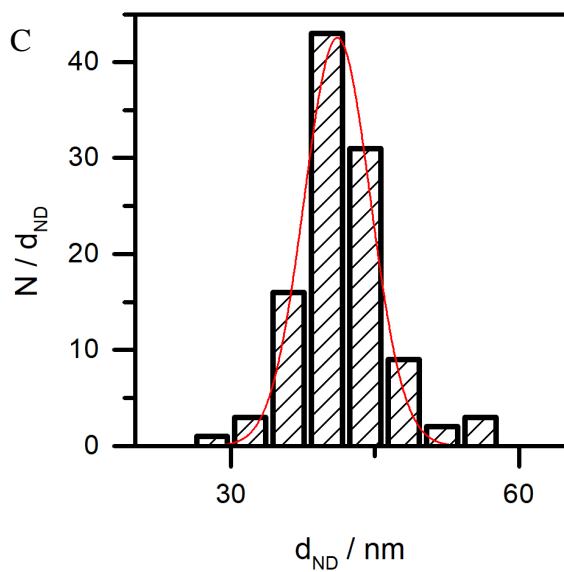
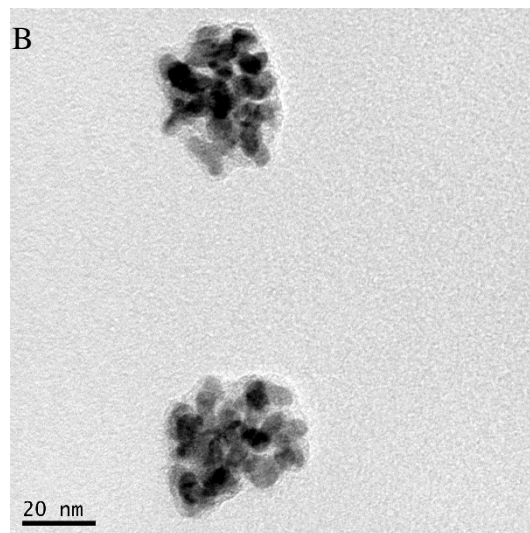
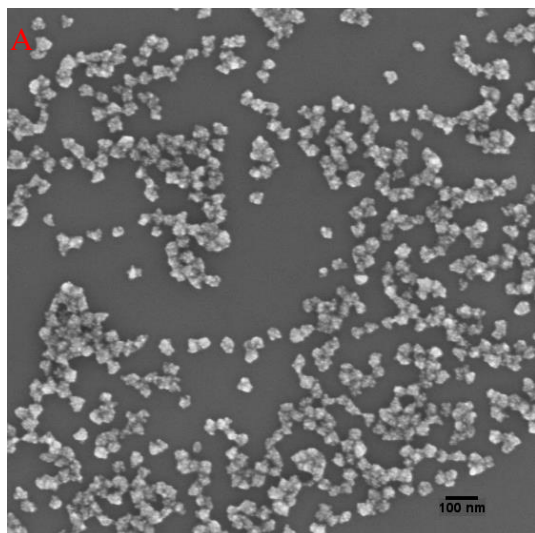


Figura 63: Caracterización de PdNPs: Imagen SEM representativa recogida con detector InLens a 3 kV (A). Distribución de tamaño determinada a partir de la medida del lado de al menos 300 NC con el software ImageJ (medida de vértice a vértice). Imagen TEM de PdNCs (C). Distribuciones promediadas en número del diámetro hidrodinámico de las muestras obtenidas por DLS (D). Imagen TEM de alta resolución (HRTEM) de un PdNC. Detalle de la imagen HRTEM con la medida de un plano cristalográfico expuesto (F).

Por otra parte, se llevó a cabo la síntesis de PdNDs con morfología amorfa, que se correlaciona con una mayor superficie específica y un incremento en el número de átomos con bajo índice de coordinación en comparación con los PdNCs, lo que se traduce en mejores propiedades catalíticas. Así, se sintetizaron dos tipos de PdNDs, denominadas PdND1 y PdND2, siguiendo protocolos previamente establecidos (2.2.14). Las PdND1 se obtuvieron mediante la reducción de Pd(acac)<sub>2</sub> en DMF, mientras que las PdND2 se generaron a partir de la reducción de K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub> en una mezcla de DEG y OLAM, utilizando PEI como agente estabilizador en ambos casos.

Las PdND1 presentaron un tamaño promedio de  $41,4 \pm 4,8$  nm y un tamaño hidrodinámico medio promediado en número de  $54,5 \pm 3,6$  nm., mientras que las PdND2

presentaron un tamaño promedio de  $81,2 \pm 12,2$  nm y un tamaño hidrodinámico también promediado en número de  $105.7 \pm 5.7$  nm.



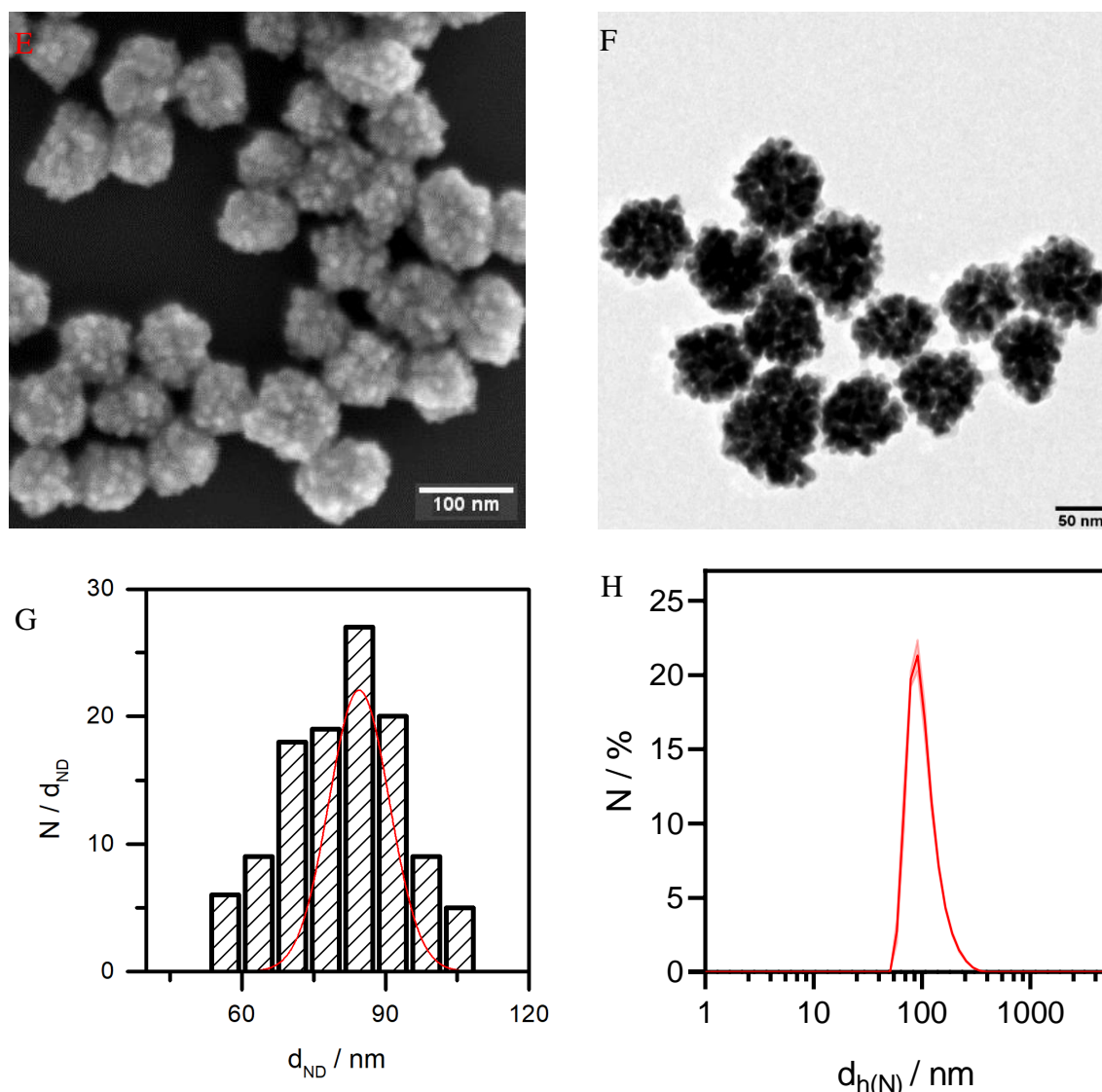


Figura 64: Caracterización de PdND: Imágenes SEM representativas de PdND1s (A) y PdND2s (E). Imágenes TEM representativas de PdND1s (B) y PdND2 (F). Distribución de tamaño determinada a partir de la medida en imágenes de TEM del diámetro de al menos 100 PdNDs con el software ImageJ de los PdND1s (C) y PdND2s (G). Distribuciones promediadas en número de diámetro hidrodinámico obtenidas por DLS de los PdND1 (D) y PdND2 (H).

### 5.2.1. Reacciones catalizadas por PdNP

La funcionalización de los PdNCs con PEG se realizó conforme a lo descrito en la sección de métodos (2.2.23.e). El empleo de NaOH en la funcionalización con PEG de los PdNCs cumple dos propósitos: En primer lugar, favorece la desprotonación de los grupos tiol y amino del PEG; en segundo lugar, neutraliza los amonios cuaternarios del surfactante, facilitando el intercambio del surfactante por PEG. El MeO-PEG-SH se une a la superficie del Pd a través del grupo tiol, estabilizando las NPs por impedimento estérico. En el caso del COOH-PEG-HS, la unión también ocurre mediante el tiol, pero la estabilización se logra a través de la repulsión electrostática además del impedimento estérico, similar al caso del COOH-PEG-NH<sub>2</sub>, donde la unión se efectúa a través del grupo amino.

Los PdNC se funcionalizaron con una densidad de 100 moléculas de PEG.nm<sup>-2</sup>. Esta densidad, que se eligió cuidadosamente, fue suficiente para mantener la estabilidad de los PdNC en agua. Densidades más bajas podrían resultar en la agregación de las nanopartículas debido a la falta de estabilidad, mientras que densidades más altas aumentarían en exceso el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas. Las mediciones de tamaño hidrodinámico realizadas mediante DLS revelaron que, en base a la evolución del tamaño hidrodinámico después de 24 horas, los PdNCs funcionalizados con COOH-PEG-HS presentaron una mayor estabilidad, manteniéndose estables durante al menos 24 horas (Tabla 19). En el caso de los PdNCs funcionalizados con NH<sub>2</sub>-PEG-COOH, a las 24 horas desde la funcionalización, se observó un gran aumento en el tamaño hidrodinámico, posiblemente debido a que el enlace entre el grupo amino y el Pd (N-Pd) es más débil que el formado por el grupo tiol y el Pd (S-Pd). En el caso del PEG con el grupo metoxi, el tamaño hidrodinámico elevado, siendo esta la molécula de PEG más pequeña de las tres ensayadas, es indicativo de la formación de agregados de NP.

El siguiente paso fue la funcionalización de las NPs con MC de estómago porcino (MC). La interacción entre las MCs y la superficie del Pd es más compleja que en el caso de las moléculas de PEG. Con la MC existen diversos tipos de interacciones potenciales (hidrofóbicas, enlaces S-Pd con el aminoácido cisteína, entre otras). El protocolo seguido para la funcionalización fue similar al del PEG; sin embargo, debido al gran tamaño de la MC, en este caso, se emplearon solamente 100 moléculas.NP<sup>-1</sup>, tal como se describe en la sección de métodos (2.2.23.g).

Tabla 19: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido con DLS de los PdNC funcionalizados a una densidad de 100 monómeros/nm<sup>2</sup> con diferentes PEG.

	HS-PEG-COOH		NH <sub>2</sub> -PEG-COOH		HS-PEG-OMe
t (h)	0	24	0	24	0
d <sub>H(N)</sub> (nm)	70,1 ± 0,7	76,4 ± 2,7	74,8 ± 10,5	154 ± 10	182 ± 13

Tras el recubrimiento de las NPs se apreció un significativo aumento del tamaño hidrodinámico pasando de 25,9 ± 0,2 nm en el caso de las NPs estabilizadas con CTAB a 70,1 ± 0,7 nm y 113 ± 5 nm en el caso de las NPs funcionalizadas con PEG y MC, respectivamente (Tabla 20). En cuanto al potencial ζ este cambió de positivo para el caso de los PdNCs estabilizados en CTAB a negativo para el PEG y la MC (Figura 65). En el caso del PEG el valor negativo del potencial ζ se debe a los grupos terminales carboxilo, mientras que en la MC a la presencia de grupos tioles y carboxilo que en medio básico se desprotonan.

Tabla 20: Tamaño hidrodinámico promediado en número obtenido con DLS y potencial ζ de los PdNC sin funcionalizar y funcionalizados con HS-PEG-COOH y MC.

	PdNC	PdNC@PEG	PdNC@MC
d <sub>H(N)</sub> (nm)	25,9 ± 0,2	70,1 ± 0,7	113 ± 5
ζ (mV)	21,3 ± 1,4	-17,4 ± 0,7	-20,1 ± 0,153

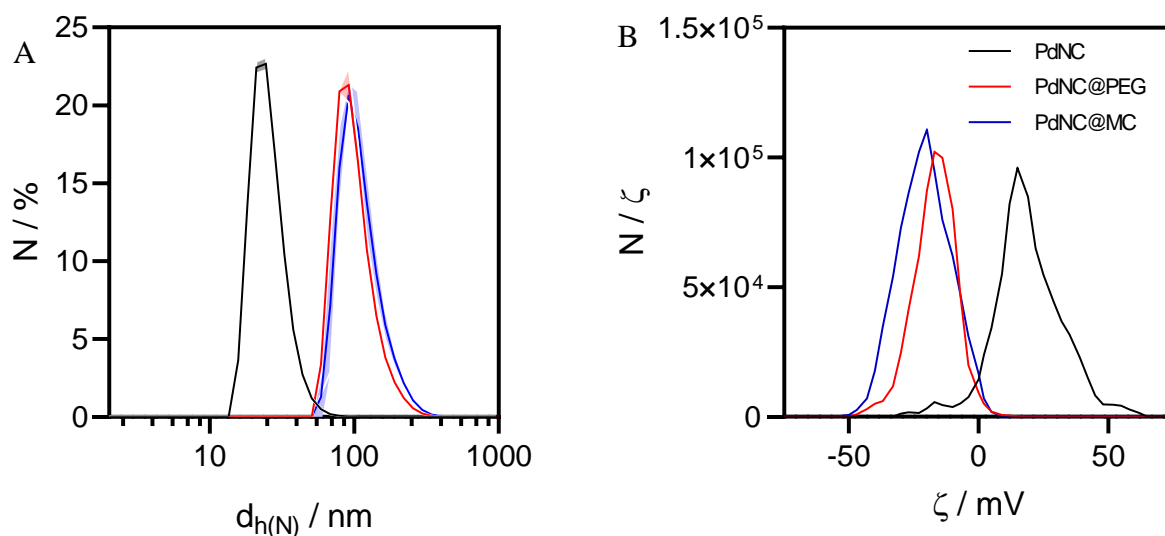


Figura 65: Distribuciones promediadas en número del tamaño hidrodinámico medidas por DLS de los PdNC con diferentes recubrimientos (A). Potenciales  $\zeta$  de los PdNC con diferentes recubrimientos (B).

Por el contrario, en el caso de las PdNDs no fue posible la funcionalización siguiendo el mismo protocolo, sino que estas PdNDs se estabilizan con PEI (Figura 66). Las PEI son polímeros sintéticos lineales o ramificados de pesos moleculares variables. Aunque el enlace Pd-N no es muy fuerte, la PEI presenta una estructura altamente ramificada y un gran número de grupos amino. Esto proporciona múltiples puntos de anclaje de la PEI en la superficie de Pd, resultando en una unión muy fuerte entre el Pd y el PEI. Al intentar funcionalizar los PdND, el PEG no desplazó al PEI y como resultado se obtuvo una dispersión de PdND que acabó precipitando a las pocas horas.

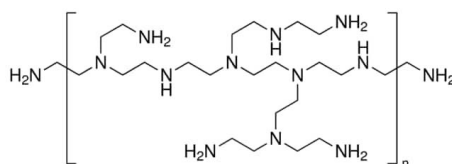


Figura 66: Representación de una molécula de PEI.

### 5.2.2. Propiedades catalíticas

Una vez que las NPs fueron correctamente funcionalizadas, se evaluaron sus propiedades catalíticas. Como modelo de reacción se utilizó la reducción del AM con  $\text{NaBH}_4$  en agua. Así, el AM de color azul fue reducido a azul de leucometileno (incolore) por el  $\text{NaBH}_4$  en presencia de Pd, que actúa como catalizador. Este proceso fue fácilmente monitorizado mediante espectroscopia UV-Vis debido a la pérdida progresiva de color a medida que avanza la reacción.

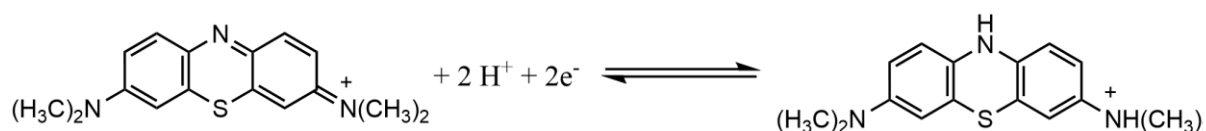


Figura 67: Representación de la reacción de reducción del AM a leucometileno. La forma oxidada presenta coloración azul, mientras que la reducida es incolora.

El modelo de Langmuir-Hinshelwood ha sido ampliamente empleado para describir los mecanismos de reacción en sistemas catalíticos. Este modelo propone que los reactivos involucrados en la reacción se adsorben primero en la superficie del catalizador antes de reaccionar. El NaBH<sub>4</sub>, una vez adsorbido en la superficie de la NP de Pd, puede transferir dos electrones al catalizador. Posteriormente, estos electrones son transmitidos al reactivo AM adsorbido, lo que conduce a la reducción de este último compuesto. Esta reacción de reducción es relativamente rápida debido a la baja barrera energética del Pd. El paso limitante en la velocidad de la reacción está determinado por la adsorción de ambos reactivos.<sup>187</sup>

El AM tiene una absorción máxima ( $\lambda_{\max}$ ) alrededor de  $\lambda = 664$  nm en su forma oxidada, por lo que su reducción pudo monitorizarse observando la disminución de la absorbancia a esta longitud de onda mediante espectrofotometría UV-Vis: La reducción de MB a leucometileno se siguió mediante la detección de la absorbancia a la mencionada longitud de onda durante 80 s (realizando una medición cada 2 s).

Para comparar los diferentes sistemas basados en Pd, se determinó la constante de reacción para cada tipo de catalizador, realizando una comparativa entre los PdNCs, PdNCs@PEG, PdNCs@MC y PdNDs.

Teniendo en cuenta que el NaBH<sub>4</sub> está en exceso, la velocidad de reacción ( $v$ ) se puede expresar como:

$$v = -\frac{d[AM]}{dt} = k \times [AM]^n \quad (37)$$

donde  $[AM]^n$  es la concentración de AM en una reacción de orden  $n$  y  $k$  es la constante de reacción. Suponiendo una reacción de orden  $n = 1$  y reordenado variables tenemos:

$$-\frac{d[AM]}{[AM]} = k dt \quad (38)$$

Integrando entre  $t = 0$  y  $t$ , tenemos:

$$-\int_{[A]_0}^{[AM]} \frac{d[AM]}{[AM]} = k \int_0^t dt \quad (39)$$

$$\ln\left(\frac{[AM]}{[AM]_0}\right) = -k \times t \quad (40)$$

Como la concentración es según la ley de Beer-Lambert proporcional a la absorbancia, esta se sustituye en la ecuación anterior, quedando:

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -k \times t \quad (41)$$

Para cada uno de los sistemas, se ajustó la cantidad de catalizador a añadir que permitió monitorizar la reacción de reducción (Tabla 21) y se midió la absorbancia durante 80 s a 664 nm (tal como se describe en el apartado 2.2.15). La concentración de AM fue lo suficientemente alta para que en  $t_0$  presentase coloración y, así, poder seguir la reacción de reducción a medida que la disolución perdía color. Para cada uno de los sistemas, se representó el  $\ln(A/A_0)$  en función del tiempo, y se ajustaron los puntos obtenidos a una línea recta mediante el empleo de una regresión lineal. La pendiente de dicha recta fue interpretada como el valor negativo de  $k$ . (Figura 68).

Tabla 21: Cantidad de Pd en moles añadido para cada sistema.

	$C_{Pd}$ / moles
<b>PdNC</b>	$4.50 \times 10^{-9}$
<b>PdNC@PEG</b>	$5.30 \times 10^{-9}$
<b>PdNC@MC</b>	$1.10 \times 10^{-7}$
<b>PdND</b>	$5.50 \times 10^{-8}$

Por otra parte, en el ámbito del desarrollo sostenible y la optimización de recursos, la reutilización de sistemas en procesos químicos ha cobrado una relevancia significativa. Así, también se analizó en este trabajo la viabilidad de la reutilización de los cuatro sistemas obtenidos durante tres reacciones consecutivas. Para llevar a cabo esta evaluación, se siguió un protocolo experimental en el cual, tras la finalización de cada reacción, se permitió un tiempo de espera para asegurar la completa descomposición del  $\text{NaBH}_4$  y la consiguiente oxidación del leucometileno a AM. Acto seguido, se añadió nuevamente el agente reductor y se monitorizó el proceso de reacción mediante espectroscopia UV-Vis.

A fin de obtener los valores de la constante de velocidad ( $k$ ) para cada sistema, se analizaron únicamente los primeros 10 s de reacción. Los datos obtenidos se ajustaron mediante un análisis de regresión lineal, como se ilustra en la Figura 69. La Tabla 22 presenta los valores de  $k$  calculados para cada una de las repeticiones efectuadas con los diferentes sistemas. Los valores de  $k$  van desde  $(8,43 \pm 0,08) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  para el caso del PdNCs@PEG hasta  $(1,87 \pm 0,08) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$  para el caso de PdNCs@MC, respectivamente.

Numerosos estudios en la literatura científica han reportado el uso de sistemas basados en PdNP para la reducción de AM. Por ejemplo, el equipo de M. Yaseen desarrolló NPs de paladio ancladas en sílica (1.0PdAS), un sistema reciclable que exhibe una constante de velocidad  $k$  de  $1,04 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  en la reducción de AM.<sup>188</sup> En otra investigación relevante, D. Tian y sus colaboradores idearon una membrana tridimensional de madera, decorada con marcos orgánicos covalentes y NPs de paladio.<sup>189</sup> Este sistema (Pd@COF/madera), fue diseñado específicamente para eliminar eficazmente contaminantes orgánicos aromáticos como el AM, con una  $k$  de  $1,42 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . E. Balali y su equipo fabricaron un catalizador ecológico basado en paladio soportado en óxido de grafeno modificado con extracto de Artemisia abrotanum, (Pd NPs/RGO-A. abrotanum).<sup>190-191</sup> Este catalizador es recuperable y se utiliza para la reducción catalítica de diversos tintes, incluido el AM, y presenta una  $k$  de  $4,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Por su parte, S. Patil y su equipo crearon NPs de paladio decoradas sobre nitruro de carbono grafítico

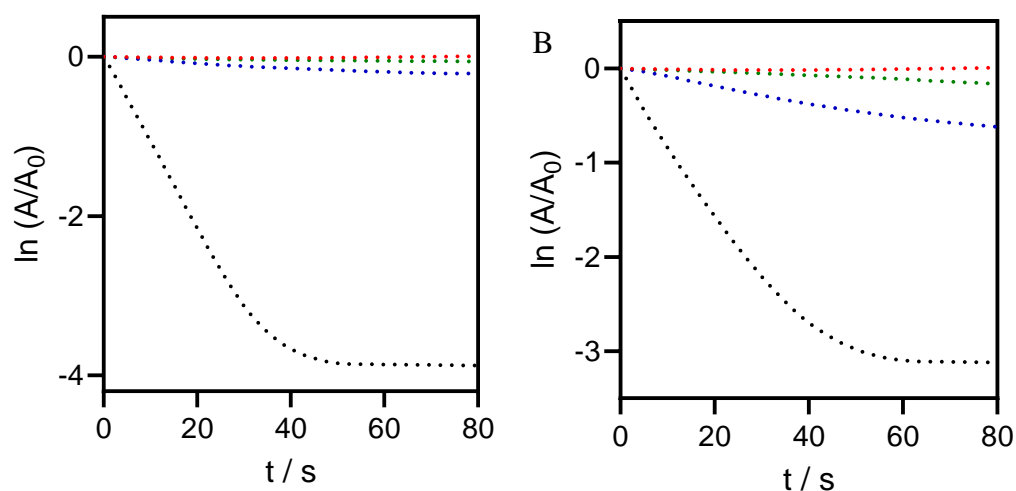
funcionalizado (g-CN-SiNH<sub>2</sub>@Pd), y que tiene una k de  $8,38 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  para la reacción de reducción de AM.<sup>192</sup>

Los catalizadores descritos en esta tesis presentan pues valores de k significativamente superiores a los documentados en la literatura. Dichos catalizadores, por ejemplo, pueden lograr una conversión total en cerca de 40 s, e incluso menos de 10 s en el caso del PdNC@MC. En cambio, los catalizadores citados en los estudios previos requieren, en la mejor de las circunstancias, más de un minuto para lograr una conversión total comparable. Una hipótesis que podría explicar esta observación es que, a diferencia de las PdNPs soportadas, estas NPs son coloidales, lo que podría ofrecer una superficie más accesible a los reactivos, acelerando la conversión del MB. Sin embargo, cabe mencionar que una desventaja de estos sistemas catalíticos es que, al no estar soportados, la eficiencia catalítica disminuye mucho al reutilizarlos tal como muestran los valores de k para la segunda y tercera reacción consecutiva (Tabla 23).

Dado que se emplearon distintas concentraciones de Pd en cada sistema, para llevar a cabo una comparación adecuada de los valores de k, estos fueron normalizados dividiéndolos por la cantidad de moles de Pd utilizados en cada caso. De esta forma, se obtuvieron resultados comparables que permitieron evaluar la eficacia de la reutilización de los sistemas en las reacciones consecutivas analizadas.

Tabla 22: Comparación de los nanocatalizadores de PdNC y PdND en la reducción de MB usando NaBH<sub>4</sub> con otros nanocatalizadores.

Catalizador	Tiempo	k (s <sup>-1</sup> )	Referencia
Catalizador	10 s	$1,07 \times 10^{-1}$	Esta tesis
PdNC	10 s	$8,43 \times 10^{-2}$	Esta tesis
PdNC@PEG	10 s	$1,87 \times 10^{-1}$	Esta tesis
PdNC@MC	10 s	$1,18 \times 10^{-1}$	Esta tesis
g-CN-SiNH <sub>2</sub> @Pd	60 s	$8,383 \times 10^{-2}$	192
Pd NPs/RGO-A. abrotanum	40 s	$4,9 \times 10^{-2}$	190
Pd@COF/madera	3 min	$1,42 \times 10^{-2}$	189
1.0PdAS	5 min	$1,04 \times 10^{-2}$	188



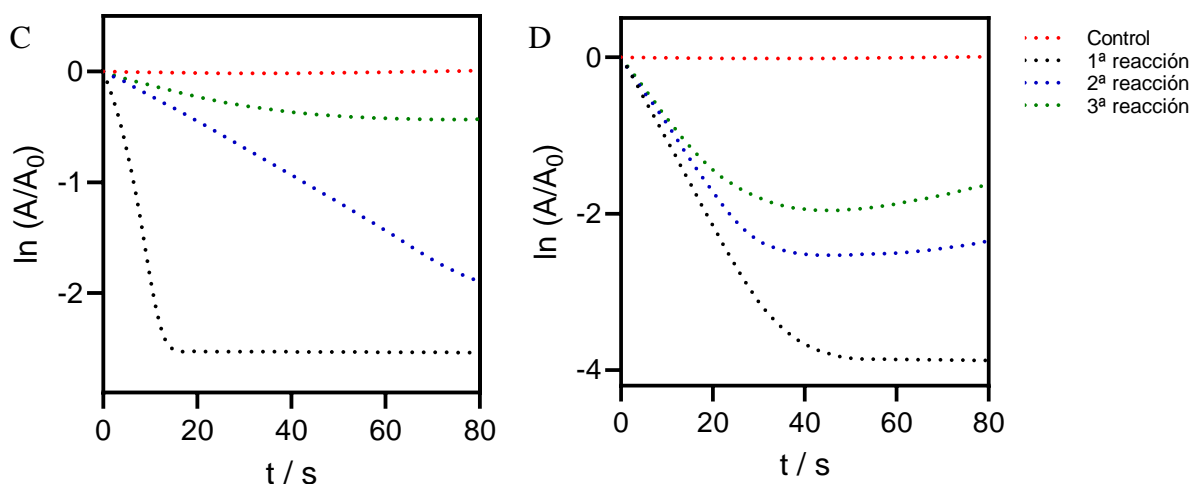


Figura 68: Representación de la absorbancia a 664 nm frente al tiempo para igual masa de Pd de las PdNCs (A), PdNCs@PEG (B), PdNCs@MC (C) y PdNDs (D).  $A_0$  es la absorbión a 664 nm en el tiempo 0 s.

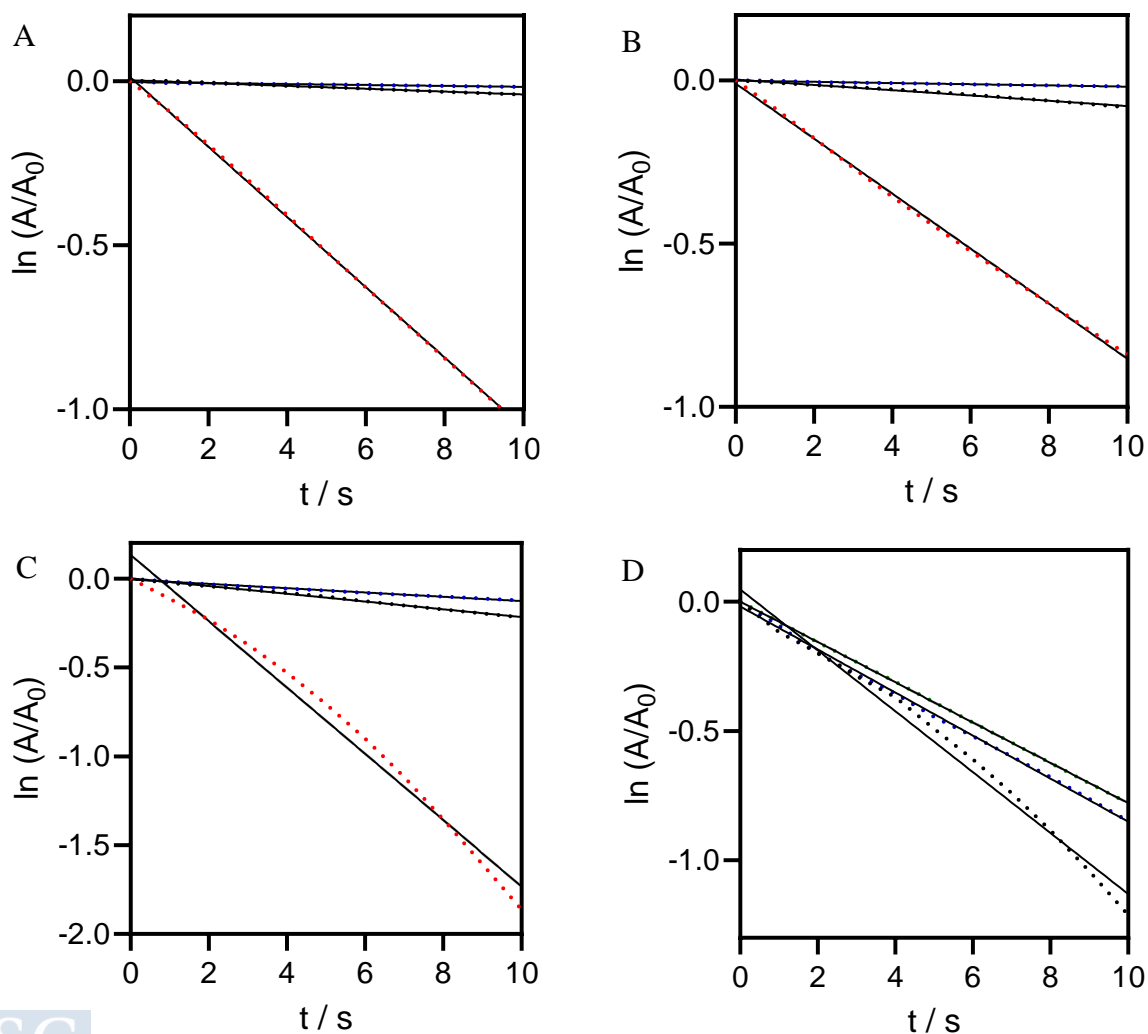


Figura 69: Ajuste cinético (primer orden) de las PdNCs (A), PdNCs@PEG (B), PdNCs@MC (C) y PdNDs (D).

Tabla 23: Valores de la constante de reacción para cada sistema.

k /s <sup>-1</sup>	PdNC	PdNC@PEG	PdNC@MC	PdND
<b>1ª reacción</b>	$(1,07 \pm 0,00) \times 10^{-1}$	$(8,43 \pm 0,08) \times 10^{-2}$	$(1,87 \pm 0,08) \times 10^{-1}$	$(1,18 \pm 0,05) \times 10^{-1}$
<b>2ª reacción</b>	$(4,36 \pm 0,14) \times 10^{-3}$	$(8,13 \pm 0,23) \times 10^{-4}$	$(2,18 \pm 0,03) \times 10^{-2}$	$(8,32 \pm 0,11) \times 10^{-2}$
<b>3ª reacción</b>	$(1,42 \pm 0,11) \times 10^{-3}$	$(1,84 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	$(1,21 \pm 0,02) \times 10^{-2}$	$(7,79 \pm 0,01) \times 10^{-2}$

Al comparar los valores de k normalizados (Tabla 24), se observó que los sistemas PdNCs y PdNCs@PEG presentaron valores superiores de la constante cinética, sin que la funcionalización con PEG implicase una disminución significativa de esta. En principio, se podría prever una mayor reducción de k debido a la funcionalización con PEG; no obstante, esto podría no haber sucedido a causa de la limitada cantidad de PEG necesaria para estabilizar los NCs, permitiendo que gran parte de la superficie de las NPs permanezca así accesible a los reactivos.

En relación con el recubrimiento con MC, la accesibilidad a la superficie de las NPs pareció verse afectada en mayor medida. Esta situación podría atribuirse a que la MC, una proteína de dimensiones considerables, recubrió de manera completa las NPs, obstaculizando la adsorción de los reactivos en su superficie. Cabe destacar que, a pesar de que la reutilización en todos los sistemas que emplean PdNC no fue eficiente, el sistema que incorporó MC presentó los resultados más favorables. La razón podría atribuirse a que las PdNCs@MC son un sistema más estable que los otros. Este sistema presentó un potencial  $\zeta$  muy negativo (estabilización electrostática), de -20,1 mV frente a -17,4 mV en el caso de los PdNCs@PEG. Además, este recubrimiento es el más voluminoso, con un tamaño hidrodinámico de  $113 \pm 5$  nm, en contraste con los tamaños de PdNC ( $25,9 \pm 0,2$  nm) y PdNC@PEG ( $70,1 \pm 0,7$  nm). Esta mayor voluminosidad del recubrimiento de nanocubos de Pd pudo proporcionar una estabilización adicional a través del impedimento estérico.

Otra posible explicación para las diferencias en las constantes de velocidad podría ser el envenenamiento del catalizador. Se plantea la hipótesis de que el recubrimiento de PdNC@MC, al tener una superficie más inaccesible podría experimentar un menor envenenamiento en comparación con los otros catalizadores. Como resultado, la disminución en la actividad catalítica en las reacciones sucesivas podría ser menos pronunciada para el recubrimiento de PdNC@MC.

En el caso de las PdNDs, la velocidad de conversión fue menor en comparación con los PdNCs. A pesar de que las PdNDs poseen una mayor superficie específica, lo que podría resultar en una mayor conversión, es probable que el bajo valor de k se deba al recubrimiento de la superficie de las PdND con la PEI, lo cual dificultó la adsorción de los reactivos en la superficie de Pd. No obstante, este sistema mostró las mejores condiciones en términos de reutilización, con un valor de k que disminuye de  $1,18 \times 10^{-1}$  a  $7,79 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1} \text{ moles}^{-1}$  (Tabla 23) entre la primera y la tercera reacción, respectivamente. Al igual que en el caso del recubrimiento con MC, el PEI se trata de un recubrimiento voluminoso con una alta densidad de cargas positivas.

Por otro lado, al igual que en el caso de la MC, el PEI, al dificultar el acceso a la superficie de la nanopartícula, podría estar previniendo el envenenamiento del catalizador.

Así, sería interesante realizar estudios adicionales en un futuro que podrían proporcionar una mayor claridad sobre las interacciones entre los recubrimientos y las propiedades catalíticas

de las nanopartículas de Pd, lo que contribuiría al diseño y desarrollo de catalizadores más eficientes y estables.

Entre los sistemas examinados, únicamente aquellos funcionalizados con PEG y MC podrían ser clasificados como biocompatibles. Esta afirmación se fundamenta en que los PdNCs incluyen CTAB y las PdNDs contienen PEI como estabilizantes, los cuales han demostrado ser citotóxicos.<sup>193-194</sup>

Tabla 24: Valores de la  $k$  normalizados en función de los moles de Pd ( $k_{norm}=K/\text{moles}_{Pd}$ )

$k / \text{s}^{-1} \text{ moles}^{-1}$	PdNC	PdNC@PEG	PdNC@MC	PdND
1ª reacción	$(2,38 \pm 0,01) \times 10^7$	$(1,59 \pm 0,02) \times 10^7$	$(1,70 \pm 0,08) \times 10^6$	$(2,15 \pm 0,09) \times 10^6$

Se han documentado previamente nanocatalizadores heterogéneos de Pd diseñados para llevar a cabo procesos bioortogonales basados en Pd soportado como, por ejemplo, NPs depositadas en resinas<sup>180, 195</sup>, óxido de titanio<sup>196</sup> y microsferas de poliestireno<sup>197</sup>. Asimismo, existen ejemplos de PdNP biocompatibles funcionalizadas con oligosacárido de quitosano<sup>198</sup>, glutatión reducido<sup>199</sup> aplicados para terapia fototérmica o PdNP PEGiladas<sup>200</sup> sensibles al pH, entre otros muchos ejemplos. La novedad de este trabajo radicó en la funcionalización de las PdNPs con MC, la cual muestra resultados prometedores. Aunque los rendimientos catalíticos puedan ser inferiores, las NPs funcionalizadas con MC podrían resultar relevantes desde una perspectiva de biocompatibilidad e internalización celular.

### 5.2.3. Síntesis de nanocompuestos PdNC@ZIF-8

Alternativamente, en este trabajo también se exploró la posibilidad de encapsular los PdNCs en ZIF-8, dado que esta podría ser una estrategia viable para estabilizar los PdNCs en medios fisiológicos. El procedimiento de síntesis, análogo a los descritos para los AuNS@ZIF-8 y MNP@ZIF-8, consistió en añadir los PdNCs dispersos en CTAB durante la formación del ZIF-8 (2.2.17). A lo largo de la síntesis, se observó la aparición progresiva de una turbidez de color marrón a medida que los compuestos Pd@ZIF-8 se formaban y crecían.

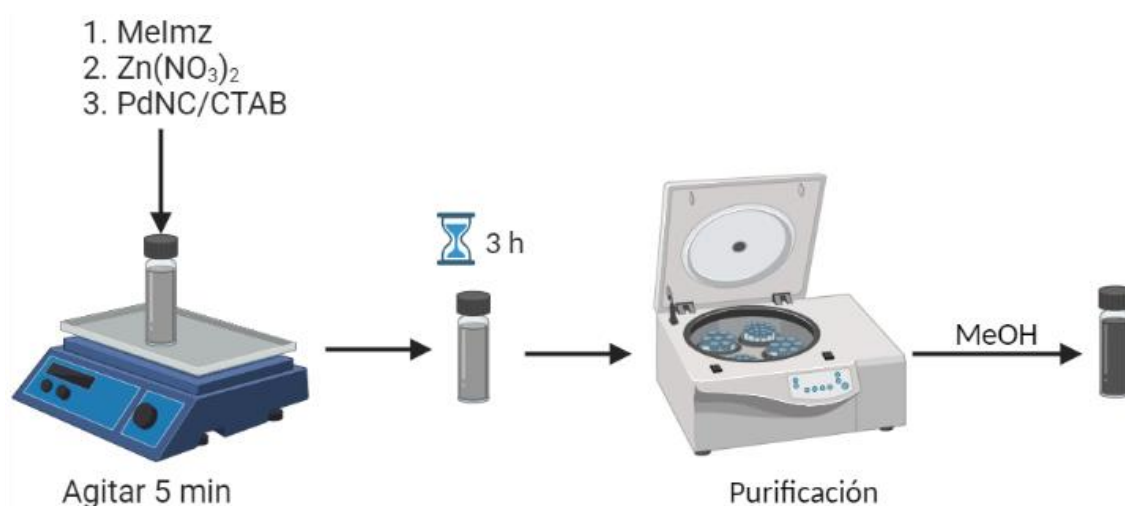
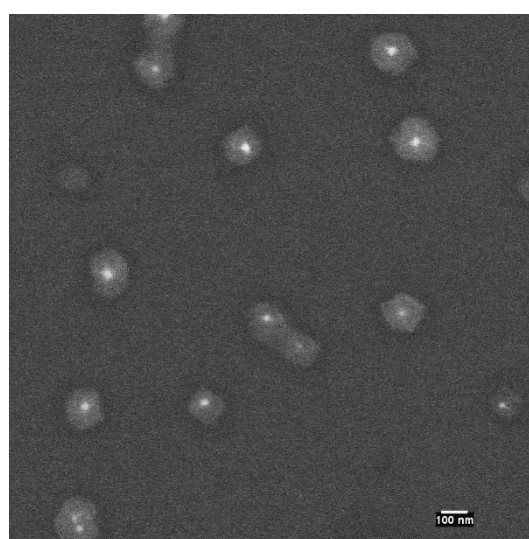
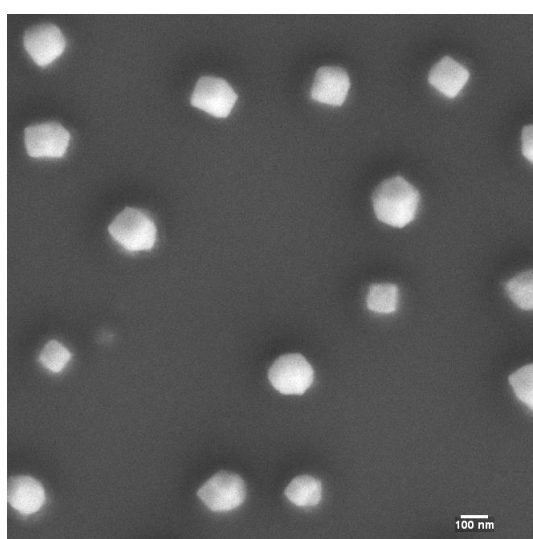


Figura 70: Representación de la síntesis de los PdNC@ZIF-8.

Los PdNC@ZIF-8 exhibieron una morfología cúbica con dimensiones promedio de  $149 \pm 19$  nm, mientras que su diámetro hidrodinámico fue de  $232 \pm 3$  nm y baja polidispersidad (Figura 71). Tanto las imágenes de SEM como las de TEM confirmaron la encapsulación del PdNC en el interior del ZIF-8, evidenciando la incorporación de un único PdNC por cada NC.

El siguiente paso fue estudiar cómo afectan diversas variables sobre el tamaño final de los NCs frente a las condiciones sintéticas “estándar” seguidas en la síntesis de otros NCs. Por ejemplo, la modulación del espesor de la pared de ZIF-8 en los NCs puede incidir en el desempeño de estos últimos en aplicaciones particulares, lo cual subraya la relevancia de ser capaces de controlar dicho espesor. Por consiguiente, se procedió a la síntesis de PdNC@ZIF-8 en diversas condiciones, específicamente variando la concentración del agente estabilizador (CTAB), el tiempo de síntesis y la temperatura. La concentración inicial de PdNC utilizada en todas la síntesis fue de 2 nM.



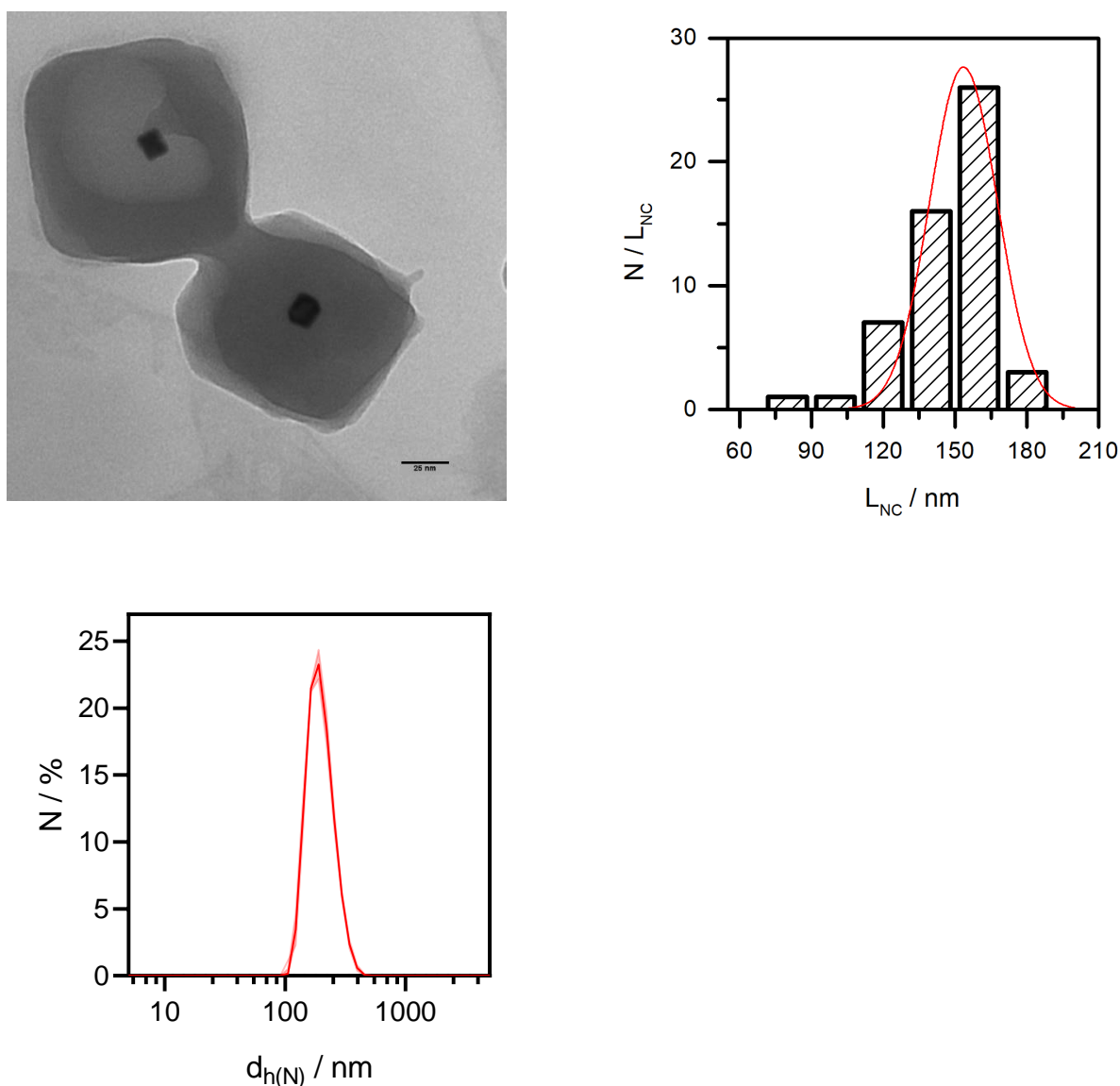


Figura 71: Caracterización de PdNC@ZIF-8. Imágenes representativas de SEM con detectores SE2 a 3 kV (A) y AsB a 30 kV (B) e imagen de TEM (C). Distribución de tamaño determinada (tamaño medio =  $149 \pm 19$  nm) a partir de la medida de imágenes de TEM, midiendo el lado de al menos 50 PdNC@ZIF-8 con el software ImageJ (C). Distribución de tamaño hidrodinámico promediada en número de la muestra realizada con DLS,  $d_h = 232 \pm 3$  nm y  $PDI = 0,02$  (D).

Las imágenes de SEM obtenidas de las diferentes síntesis revelaron que el tiempo de exposición ejerció un impacto importante sobre las dimensiones de los NCs aunque no afectó su forma, dado que en todos los intervalos temporales analizados se preservó la morfología cúbica de los NCs (Figura 73, A-E).

Al ajustar la concentración de CTAB, se constató que, a concentraciones elevadas, la mayoría de los ZIF-8 se encontraban vacíos, en concreto, a concentraciones de 0,6 y 0,7  $\text{mg.l}^{-1}$  (Figura 73, F-I). En relación con los NCs sintetizados a 4 °C, se observó una alteración en la morfología, manifestándose en una transición de la morfología cúbica hacia una conformación más redondeada (Figura 73, J).

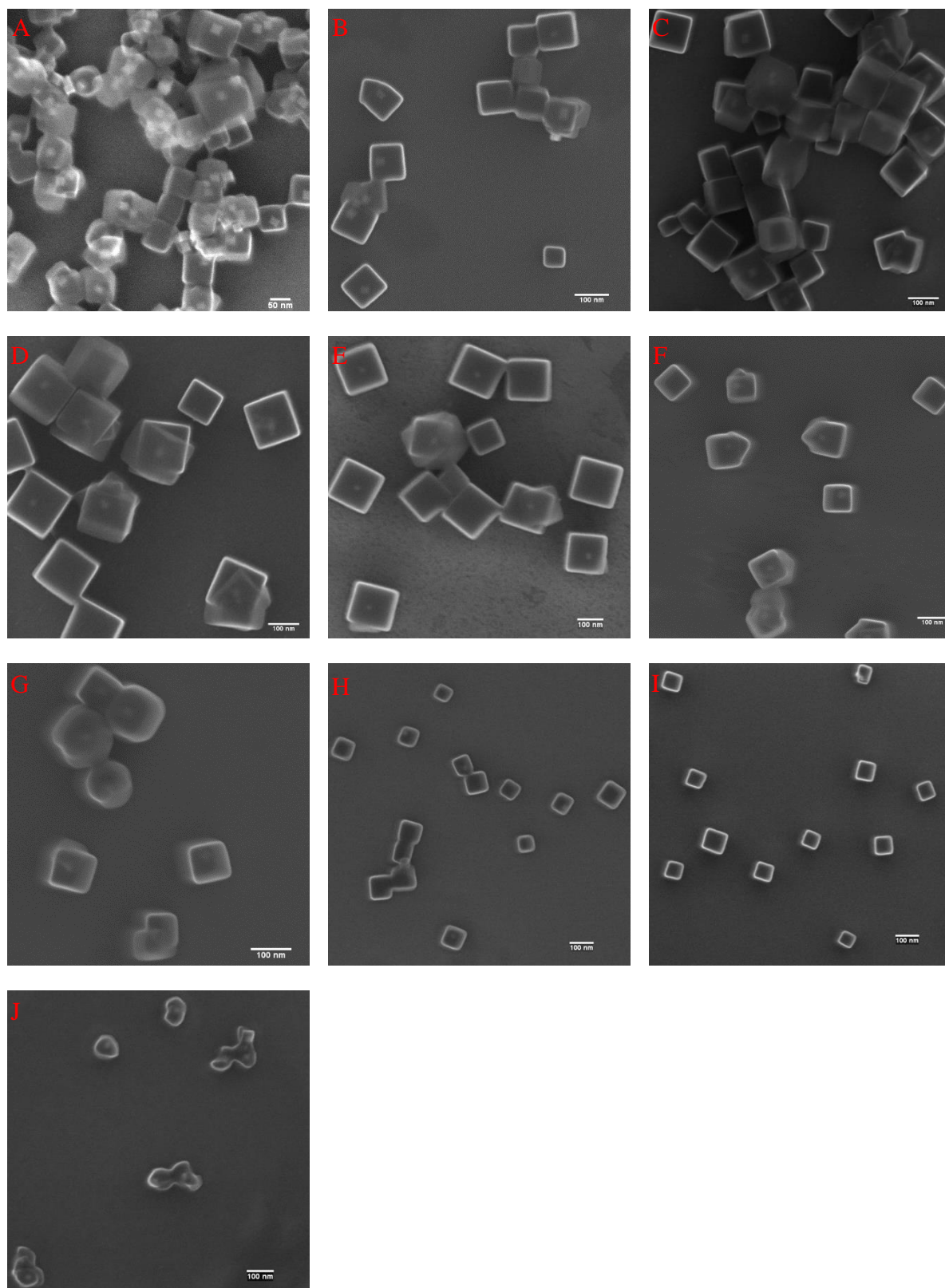


Figura 72: Imágenes de SEM representativas de PdNC@ZIF-8 utilizando diferentes condiciones sintéticas. 0,4 mg.l<sup>-1</sup> de CTAB con diferentes tiempos de síntesis: 30 (A), 60 (B), 90 (C), 180 (D) y 360 min (E). 60 min de tiempo de síntesis a diferentes concentraciones de

CTAB: 0,4 (F), 0,5 (G), 0,6 (H), y 0,7 mg.l<sup>-1</sup> (I). Refrigerando la muestra con CTAB 0,4 mg.l<sup>-1</sup> y 60 min de tiempo de síntesis (J).

Los resultados presentados en la Tabla 25 recogen dos características principales de los NCs resultantes bajo las distintas condiciones de síntesis: el tamaño hidrodinámico, determinado mediante DLS, y el tamaño observado a través de la medida de lado a lado de al menos 50 PdNC@ZIF-8 en las imágenes de SEM.

Tabla 25: Tamaño hidrodinámico de los PdNC@ZIF-8 promediado en número variando las condiciones de síntesis. Todas ellas se llevan a cabo a temperatura ambiente a excepción de la indicada, que se sintetiza a 4 °C.

[Pd] (nM)	[CTAB] (mg/L)	t (min)	Tamaño hidrodinámico / nm	PDI	TEM / nm	Observaciones
2	0,4	30	103 ± 5	0,054	71 ± 11	
2	0,4	60	141 ± 4	0,033	94 ± 12	
2	0,4	90	179 ± 2	0,016	115 ± 17	
2	0,4	180	215 ± 1	0,099	140 ± 19	
2	0,4	360	220 ± 2	0,033	144 ± 23	
2	0,4	60	145 ± 4	0,030	101 ± 10	
2	0,5	60	134 ± 4	0,034	97 ± 21	
2	0,6	60	120 ± 3	0,048	81 ± 13	
2	0,7	60	102 ± 6	0,081	71 ± 10	
2	0,4	60	103 ± 1	0,056	77 ± 11	Se lleva a cabo a 4 °C
2	0,2	180	232 ± 3	0,020	149 ± 19	Condiciones "estándar" de síntesis

La tendencia general observada fue que al mantener constante la concentración de PdNCs y CTAB (0,4 mg.l<sup>-1</sup>) y aumentar el tiempo de síntesis, el tamaño de los NCs aumentó. Este incremento pudo deberse a que, al permitir un mayor tiempo para el proceso de síntesis, se posibilitó el crecimiento del cristal, llegando a completar el crecimiento; a partir de las 3 h, el tamaño permaneció invariable. La relación entre el diámetro hidrodinámico y/o el tamaño de los NCs frente al tiempo presentó una relación exponencial (Figura 73, A, C): A tiempos iniciales el crecimiento fue muy pronunciado y fue moderándose a medida que se consumían los precursores de ZIF-8.

Por otro lado, al analizar los datos cuando se varió la concentración de CTAB, se observó que el tamaño de las NPs disminuyó conforme aumentó la concentración de CTAB (desde 0,4 mg.l<sup>-1</sup> hasta 0,7 mg.l<sup>-1</sup>). En este caso, la relación entre el diámetro hidrodinámico y/o las dimensiones de las NPs frente a la concentración de CTAB presentó una relación lineal (Figura 73, B, D).

Finalmente, hay que destacar el efecto que tuvo la temperatura en la ralentización del crecimiento del ZIF-8. Al llevar a cabo la síntesis a temperaturas bajas, se observó una disminución en el tamaño de las partículas (76,7 ± 10,8 nm) en comparación con el tamaño obtenido bajo las mismas condiciones a temperatura ambiente de 22 °C (101,8 ± 9,7 nm).

Por otra parte, tal y como se observó también en capítulos anteriores, el tamaño hidrodinámico medido por DLS fue mayor que el tamaño observado por TEM. Esto se debe a que el tamaño hidrodinámico incluye tanto el núcleo del nanocompuesto como la capa de solvatación y estabilización alrededor de la misma, mientras que el tamaño observado por TEM se refiere únicamente al tamaño del nanocompuesto.

La reducción en el tamaño de los nanocompuestos al incrementar la concentración de CTAB es un comportamiento previamente descrito por Y. Pan et al.<sup>201</sup> Al aumentar la concentración de CTAB, se afecta la cinética de crecimiento del ZIF-8, limitando el tamaño de las partículas. Las moléculas de CTAB se adsorben en la superficie hidrofóbica de los cristales de ZIF-8 en solución acuosa y actúan como agentes de encapsulamiento, disminuyendo la tasa de crecimiento cristalino.<sup>201</sup>

En relación con la temperatura, J. Jiunn et al.<sup>202</sup> observaron que la temperatura influye en la distribución de tamaños del ZIF-8, pasando de una síntesis con una distribución de tamaños bimodal cuando se realiza a temperatura ambiente a una distribución monomodal sintetizada en un baño de hielo, con un tamaño medio inferior en el caso de la síntesis a menor temperatura. Por el contrario, en los experimentos llevados a cabo en esta tesis, se observó una disminución del tamaño, pero no se evidencia una influencia en la distribución del mismo. La discrepancia en las conclusiones puede deberse a que, a diferencia del procedimiento seguido en la presente tesis, Jiunn et al. llevaron a cabo la síntesis empleando MeOH y utilizando una disolución de  $ZnNO_3$  con una concentración 10 veces mayor.

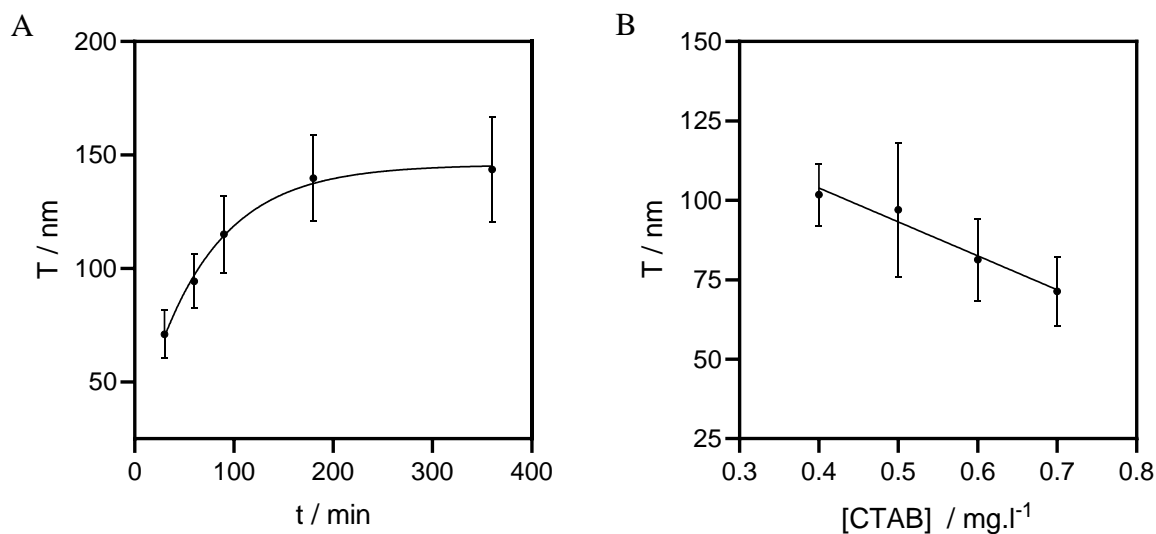


Figura 73: Relación entre el tamaño de los NC con el tiempo (A) y con la concentración de CTAB (B)



# Capítulo 6

## 6. CONCLUSIONS

In the third chapter, the synthesis of Au, Ag, and Cu NPs was carried out, which were stable in an organic medium. These were dispersed in water via a polymeric coating with PMA. The Au and Ag NPs, once transferred to water, demonstrated a significant stability at a temperature of 37 °C for a period of 72 h. However, the Cu NPs exhibited considerable degradation under similar conditions. Furthermore, it was observed that the mixture of AuNPs and AgNPs maintained their stability. However, the incorporation of CuNPs into the mixture resulted in degradation similar as that observed for the individually evaluated CuNPs. Regarding cytotoxicity, it was determined that AuNPs and AgNPs had low toxicity in A549 cell cultures, even at high concentrations. In contrast, CuNPs demonstrated a considerable level of cytotoxicity at the highest concentration analyzed. This phenomenon could be attributed to the release of copper ions ( $\text{Cu}^{2+}$ ) during the degradation of the CuNPs, which have a toxic effect. Ultimately, it was observed that the mixtures of NPs that included CuNPs resulted in a slight reduction in cell viability at the highest concentration investigated. This finding suggests that AgNPs could enhance the toxicity of CuNPs.

AuNRs were also synthesized and subjected to a PEGylation process to modify their surface charge. The charge was altered to be positive, negative, or neutral using different bifunctional thiol ligands. The functionalized AuNRs were used to examine their interaction with BSA as a model of the protein biocorona. It was discovered that the intensity of the interaction and the dissociation constant vary according to the surface charge of the NPs. The internalization of the AuNRs in HeLa cells and how the formation of the biocorona and photothermal treatment influenced this process was studied. Although PEGylation and the protein corona reduced cell internalization, the adsorbed BSA significantly decreased after photothermal treatment, especially in samples with a positive surface charge. However, the internalization of the AuNRs after this treatment turned out to be significantly lower only for the non-PEGylated samples, indicating that surface charges did not significantly affect cellular uptake.

NCs consisting of AuNRs encapsulated in a ZIF-8 were also synthesized, resulting in a core-shell structure. Through a series of controlled experiments, the significant impact that the concentration of CTAB has on the morphology of the nanocomposite has been emphasized. Specifically, when using higher concentrations of CTAB, the formation of two ZIF-8 morphologies was observed. One of them was cubic in shape without encapsulated AuNRs and the other, amorphous and smaller in size, did present encapsulated AuNRs. In addition, the stability of the nanocomposite in different media was explored. These NCs degrade rapidly in aqueous media, necessitating post-functionalization with PMA to stabilize them in these media.

NCs consisting of AuNSs encapsulated in a ZIF-8 were synthesized, and their use as substrates for SERS was studied. This is based on the integration of the plasmonic properties of the AuNSs with the porosity and high surface area of the ZIF-8 into a single nanocomposite. This combination of features has facilitated the detection and characterization of specific molecules. Experiments have confirmed that molecules such as 4-MBA are able to diffuse through the porous channels of the ZIF-8 to reach the AuNSs in the core of the nanocomposite. This process is essential for the detection of these molecules through Raman spectroscopy. A linear relationship was observed between the intensity of the Raman peak at  $1074\text{ cm}^{-1}$  and the

concentration of 4-MBA between  $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M, suggesting that this system can be used for the quantification of analytes.

It is relevant to underline that, although the detection limits reached may be considered modest compared to other SERS substrates reported in the literature, the viability of this type of nanocomposite for SERS detection has been conclusively demonstrated. This point is especially pertinent given that the nanocomposites developed in this study exhibit remarkable colloidal stability, a feature that is not present in many of the ZIF-8 based SERS substrates described in previous studies.

In the fourth chapter, the synthesis of MNPs was carried out by the thermal decomposition of metallic precursors, controlling the proportions of  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{3+}$ . This methodology allowed obtaining MNPs of different sizes with low polydispersity. However, these MNPs had a low SAR value, so an annealing process was applied to improve their magnetic properties.

The functionalization of the MNPs with PMA in an aqueous medium improved their stability; in addition, this functionalization allowed the adhesion of molecules with an amino terminal group to the MNPs, thus, expanding the possible applications of these particles.

MNPs doped with low proportions of Co were synthesized and transferred to water through a coating with PMA. The magnetic properties of these Co-MNPs were studied using SQUID at temperatures of 10 and 295 K. An unusual behavior was observed in the magnetic properties of cobalt-doped nanoparticles at 295 K. As the doping concentration of  $\text{Co}^{2+}$  increased, a transition occurred from a negative cubic anisotropy system ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) to a positive cubic anisotropy one ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). Additionally, nanoparticles doped with 0.08 Co exhibited superparamagnetic behavior.

Procedures for stabilizing MNPs in aqueous media using CTAB were examined and developed. These protocols involved the formation of an oleic acid-CTAB bilayer around the MNPs. By measuring the hydrodynamic size using DLS, the CTAB molecules. $\text{nm}^{-2}$  ratio was optimized to minimize the aggregation of the MNPs in the aqueous medium.

Subsequently, with the MNPs stabilized in water, the synthesis of MNP@ZIF-8 nanocomposites were carried out using a core-shell strategy. These nanocomposites consisted of a core of MNPs encapsulated with a layer of ZIF-8. The MNP@ZIF-8 nanocomposites were characterized by SEM, confirming that their size decreased with the increase in the concentration of MNPs in the synthesis. Furthermore, it was observed that, with a carefully adjusted concentration of MNPs, it was possible to obtain nanocomposites with a single MNP per ZIF-8 crystal.

The encapsulation of CV in MNP@ZIF-8 did not significantly affect the morphology and size of the MNPs. The presence of CV in the MNPs was confirmed by a slight increase in absorbance in the UV-Vis spectrum and a large reduction in SBET compared to bare MNP@ZIF-8. To improve the stability of the MNPs in aqueous media, an additional coating of PMA was applied. WAXS suggested that the functionalization with PMA did not alter the crystalline structure of the MNPs, preserving their crystallinity.

In the fifth chapter, the synthesis and subsequent characterization of PdNCs and PdNDs were performed. The PdNCs underwent a functionalization process with PEG and MC. It was observed that COOH-PEG-HS provided superior stability in water to the nanocomposites compared to COOH-PEG-NH<sub>2</sub>. This phenomenon was attributed to the greater strength of the bond formed between the thiol group and the Pd, as opposed to the less robust bond generated between the amino group and the Pd. Successful functionalization with MC was validated by a

change in the zeta potential from positive to negative and a significant increase in the hydrodynamic size.

Additionally, limitations were identified in the functionalization protocol when attempting to apply it to PdNDs. In this case, the highly branched structure of PEI and the large number of amino groups, which provide multiple anchoring points on the Pd surface, prevented the exchange of PEI for PEG.

The catalytic properties of the functionalized nanocomposites in the reduction process of AM with NaBH<sub>4</sub> in water were evaluated. The reaction mechanism was described using the Langmuir-Hinshelwood model. In the presence of Pd, the NaBH<sub>4</sub> adsorbs onto the surface of the nanocomposites and transfers two electrons to the catalyst. These electrons, in turn, are transmitted to the adsorbed AM resulting in its reduction.

The AM reduction process was monitored by UV-Vis spectroscopy, being observed a progressive decrease in absorbance as the reaction progressed. Functionalization with PEG did not lead to a decrease in catalytic activity. On the contrary, functionalization with MC resulted in a reduction in catalytic activity. In general, the Pd nanocomposite nanosystems examined in this study exhibited reaction constant values higher than those reported in the literature. These nanocomposites demonstrated a rapid conversion of AM, indicating a high catalytic efficiency. However, this significantly decreased when reusing the systems, pointing to the need of optimizing the reuse of the catalysts.

The synthesis and characterization of PdNC@ZIF-8 nanocomposites were performed, in which the PdNCs were encapsulated in the porous structure of ZIF-8. The PdNC@ZIF-8 nanocomposites presented a cubic morphology and a singular encapsulation of PdNC for each nanocomposite. Images obtained by SEM and TEM confirmed this encapsulated structure. The size of the PdNC@ZIF-8 nanocomposites was determined by microscopy techniques, finding an average size of  $149 \pm 19$  nm, with a hydrodynamic diameter of  $232 \pm 3$  nm.

Different variables during the synthesis process were studied to understand their influence on the size of the nanocomposites. It was found that the synthesis time affected the size of the nanocomposites but not their morphology. As the synthesis time increased, the size of the nanocomposites also increased, being stabilized after 3 h. It was also found that the concentration of CTAB had a significant impact on the size of the nanocomposites: With higher concentrations of CTAB, smaller nanocomposites were obtained. The synthesis temperature also influenced the size of the nanocomposites, observing a smaller size at lower temperatures.

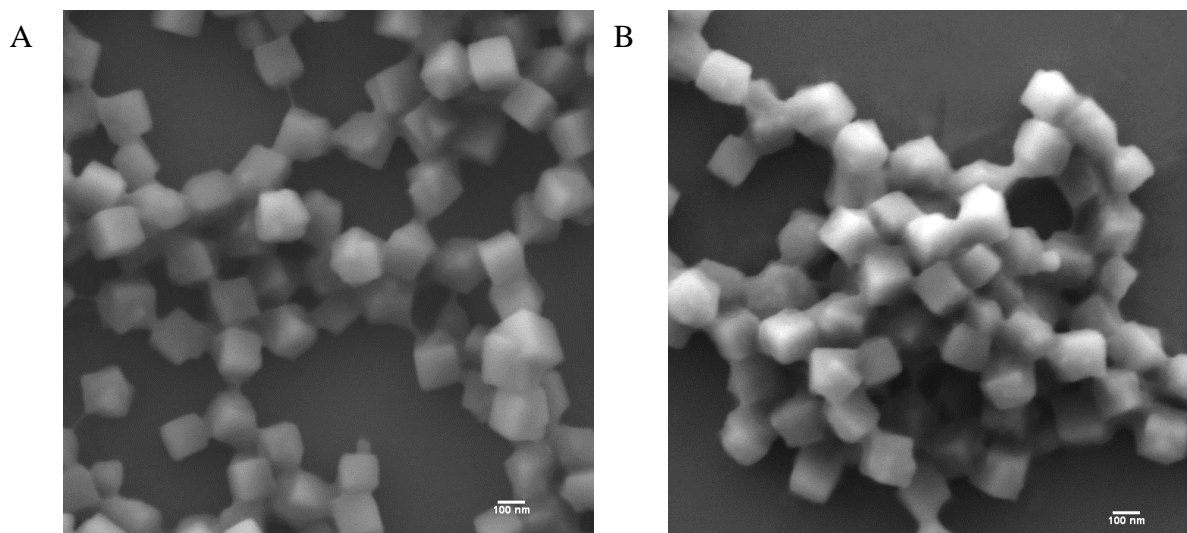


# Capítulo 7

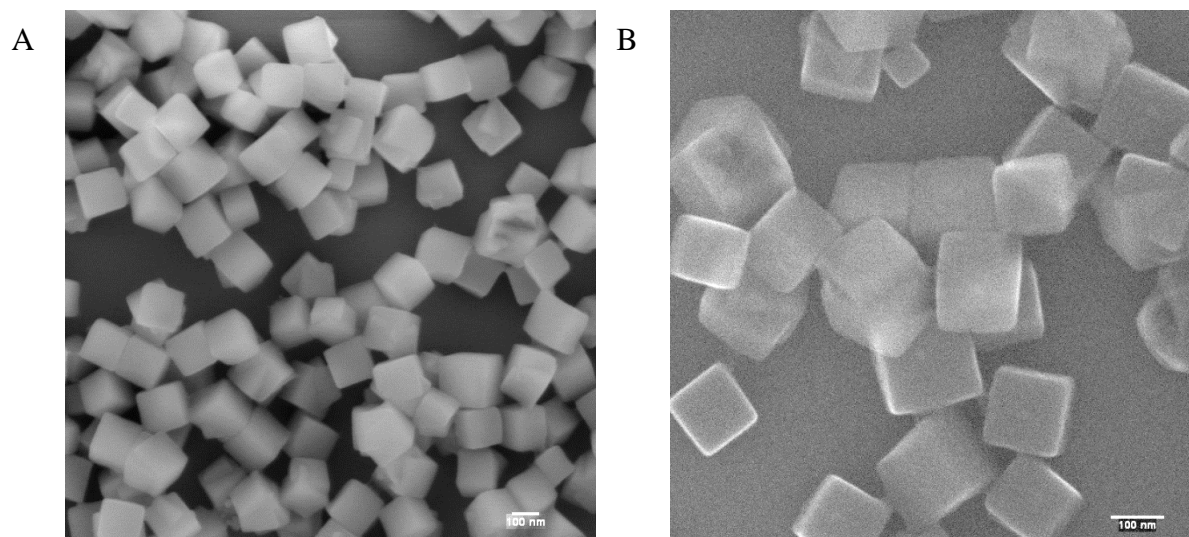
## 7. ANEXOS

### Caracterización morfológica de los MNP@ZIF-8

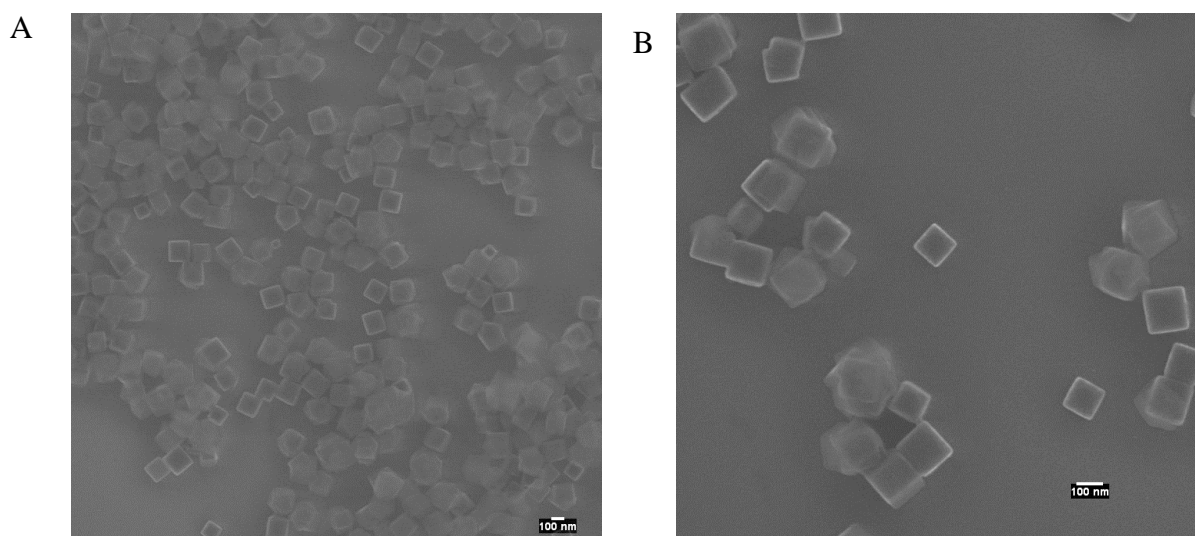
Una vez que los NC-PMA-6-AF han sido sintetizados y caracterizados, se procede a la evaluación de su capacidad para liberar su carga al ser sometidos a un AMF y RMF. MNP-PMA-6-AF y MNP@ZIF-8-PMA-6-AF se emplean como controles. El recubrimiento con PMA se lleva a cabo como se describe en la sección anterior para el caso de los NC(CV). Las imágenes de SEM de estos nanocompuestos pre y post recubrimiento polimérico se muestran en las figuras A1-A4.

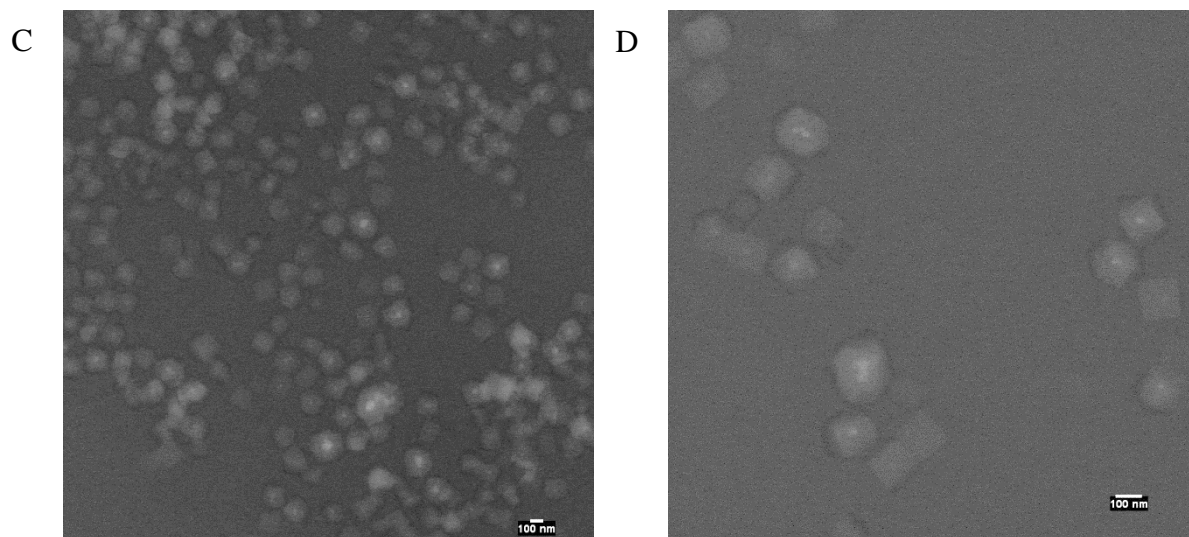


A 1: Imágenes SEM representativas de los MNP@ZIF-8(CV) recopiladas con el detector InLens a 3 kV.

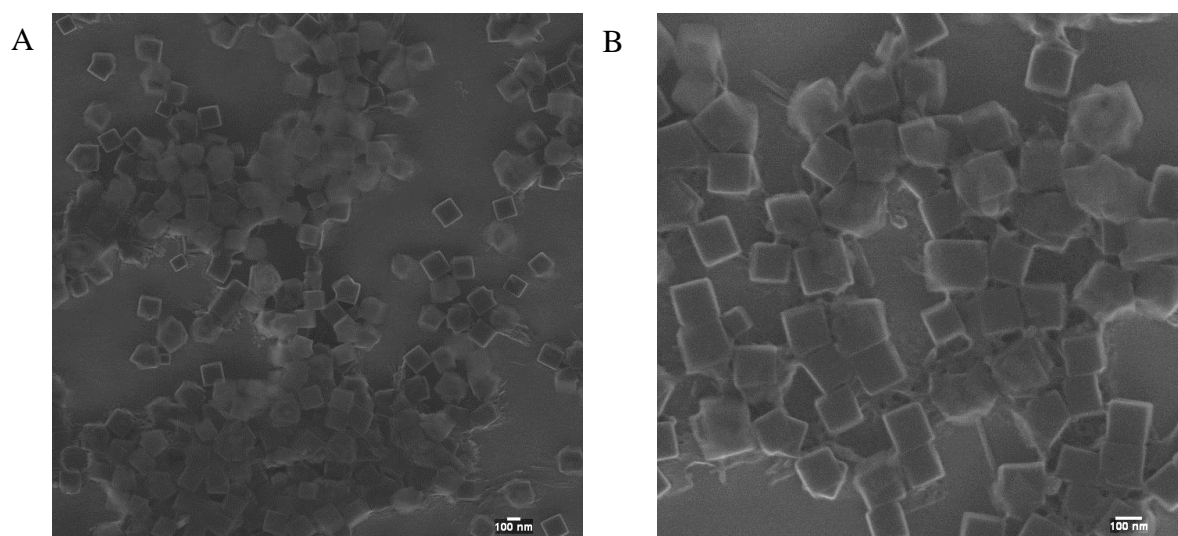


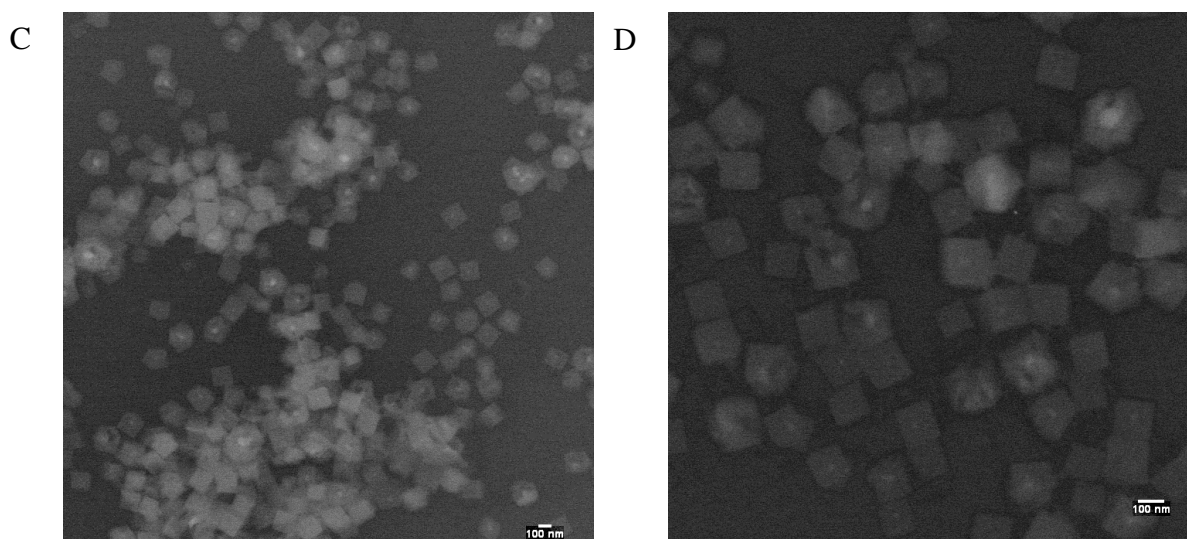
A 2: Imágenes SEM representativas de MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF recopiladas con el detector InLens a 3 kV (A) y 20 kV (B).





A 3: Imágenes de SEM representativas de las MNP@ZIF-8 recogidas con el detector InLens a 20 kV (A-B) y el detector AsB a 20 kV (C-D).





A 4: Imágenes de SEM representativas de las MNP@ZIF-8-PMA-6-AF recogidas con el detector InLens a 20 kV (A-B) y el detector AsB a 20 kV (C-D).

### Caracterización de las propiedades magnéticas de los MNP@ZIF-8

Respecto a la caracterización de las propiedades magnéticas de los materiales en cuestión, la magnetización de saturación a temperatura ambiente se determina mediante el uso de un magnetómetro de muestra vibrante, obteniéndose valores de 66,45 y 66,42  $\text{emu}\cdot\text{g}^{-1}$  de Fe en el caso de las MNP-PMA y NC-PMA, respectivamente (Figura 74, A). La encapsulación de las MNP con ZIF-8 no parece tener efectos significativos en las propiedades magnéticas de las MNP. Para determinar la potencia de calentamiento de las MNP-6-AF, se mide el SAR a diferentes intensidades de campo magnético mediante calorimetría (Figura 74, B). Se observa que el SAR aumenta de manera lineal con la intensidad del campo magnético.

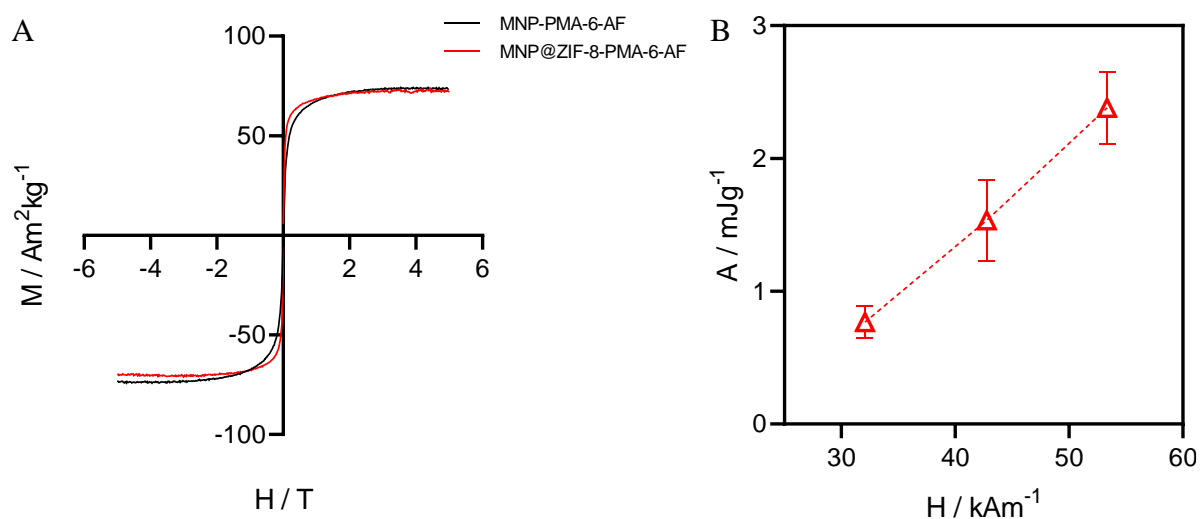


Figura 74: Ciclo de histéresis de las MNPs y los NC recubiertos con PMA medido con magnetómetro de muestra vibrante (A). Áreas correspondientes a los valores SAR de las MNP-6-AF obtenidas mediante medidas calorimétricas usando una frecuencia de 90 kHz (B).

## Lib liberación controlada por campos magnéticos de colorantes encapsulados los MNP@ZIF-8

Por otro lado, se estudia la internalización de los MNP@ZIF-8(CV)-PMA-6-AF en células MiaPaCa-2 a través de la cuantificación de la fluorescencia del CV observándose un incremento en la fluorescencia máxima a las 6 h de incubación (Figura 75, A). Asimismo, se realiza un análisis de viabilidad celular a diferentes concentraciones de MNP@ZIF-8-PMA-AF después de incubar las células durante 24, 48 y 72 h. En el caso de las muestras incubadas durante 24 y 48 h, la viabilidad celular se mantuvo constante por encima del 90%, mientras que, en el caso de las incubaciones de 72 h, se observó una disminución en la viabilidad celular a concentraciones de 2 pM, donde esta fue menor al 80% (Figura 75, B).

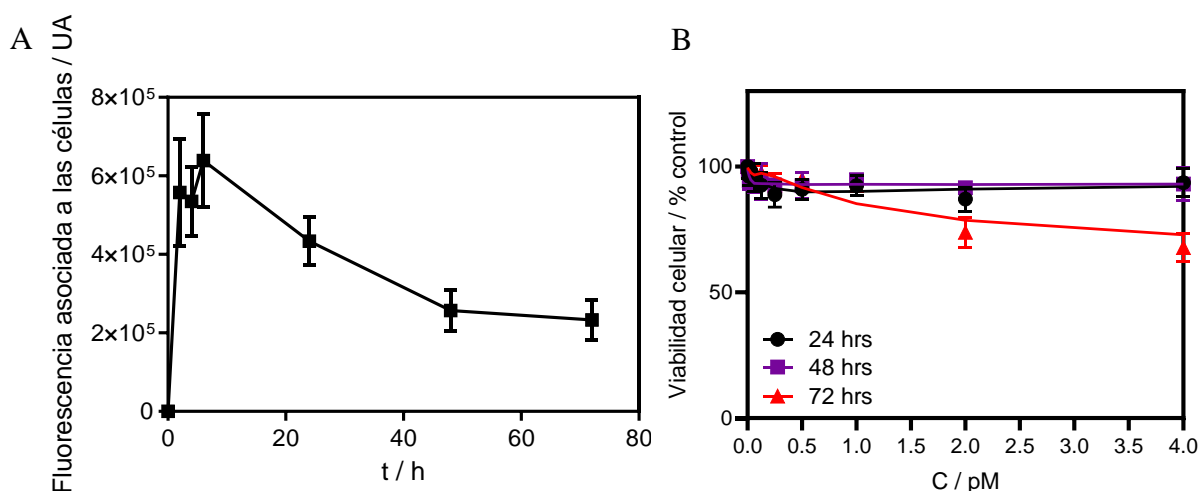


Figura 75: Cinética de captación de los MNP@ZIF-8-PMA-AF a través de la cuantificación de la fluorescencia de CV en células MiaPaCa-2 (A). Viabilidad celular en MiaPaCa-2 incubadas con diferentes concentraciones de MNP@ZIF-8-PMA-AF a 24, 48 y 72 h.

Además, se estudia la proliferación celular para evaluar el uso de los NC como sistemas de liberación de compuestos activos en el interior de células. Para ello, se agregan NC cargados y sin cargar con CV a cultivos celulares de MiaPaCa-2. Las células fueron incubadas con NPs (NCs) a concentraciones de 1 pM durante un período de 72 h. Posteriormente, las células fueron expuestas a campos magnéticos de 300 kHz y 40 mT en el caso de AMF, y 1 Hz y 40 mT en el caso de RFM, durante un período de 2 h. La viabilidad de las células fue afectada de manera similar por ambos sistemas, mostrando el comportamiento esperado de respuesta a la dosis característica. (Figura 76). Se observa como la proliferación celular tras 7 días es mucho menor que en el caso de los cultivos empleados como control, cultivos celulares incubados con NC no cargados, cultivos celulares incubados sin NC y cultivos celulares no expuestos a campos magnéticos.

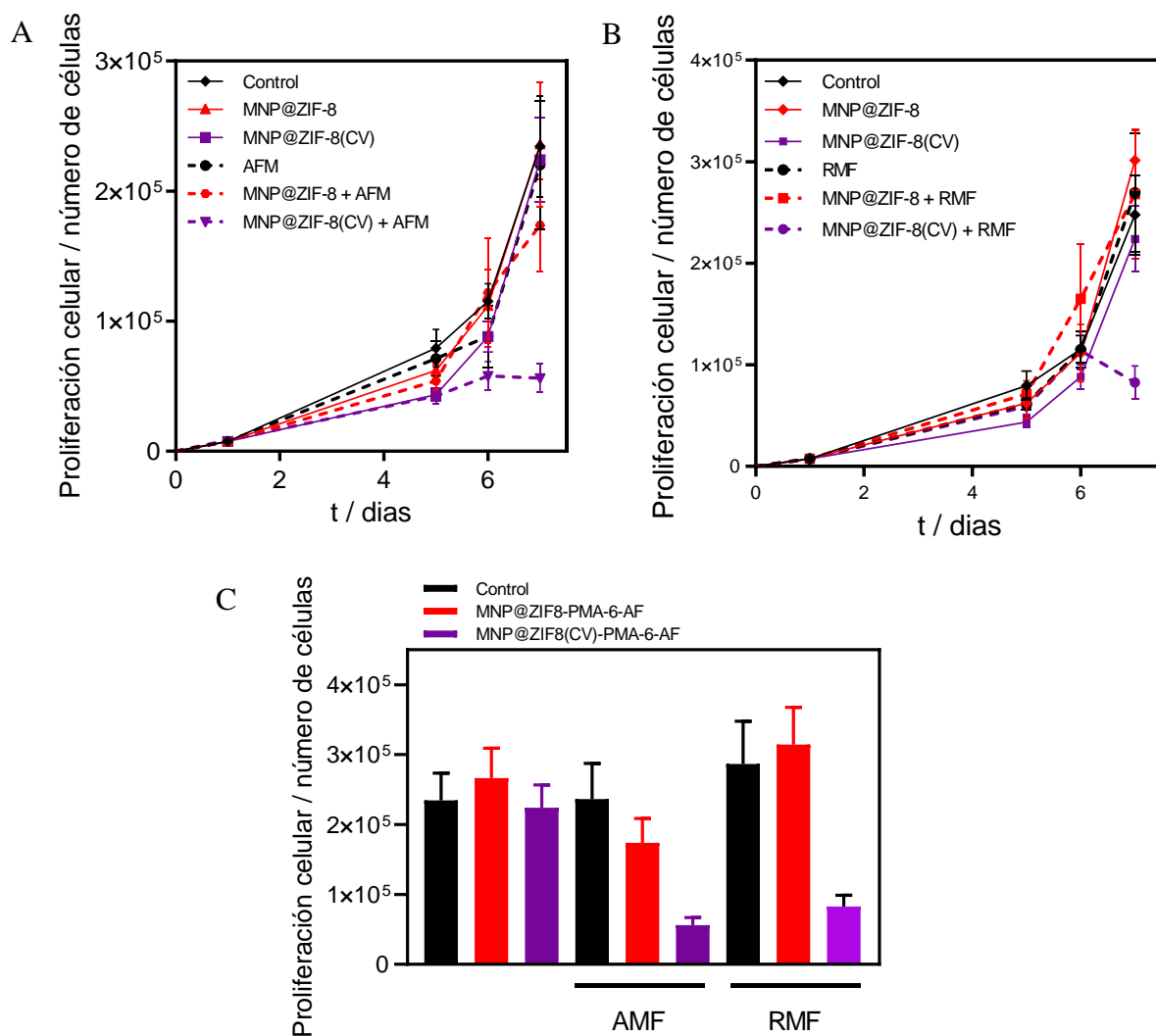
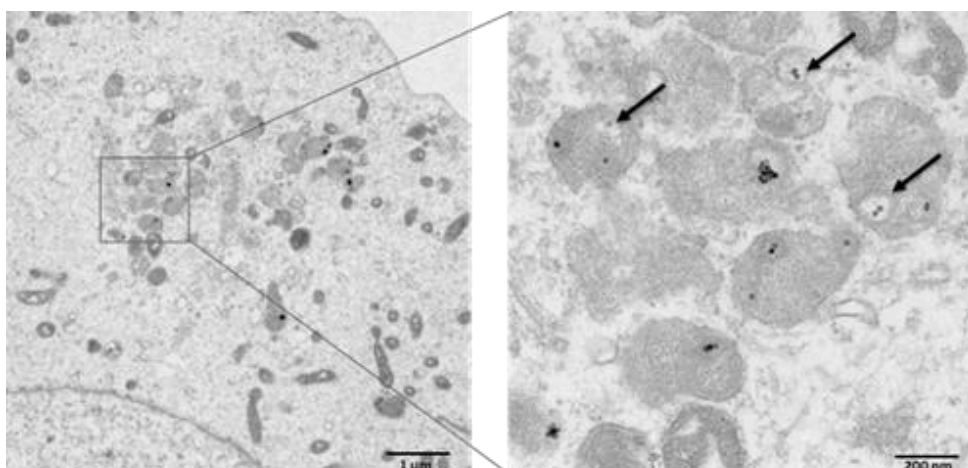
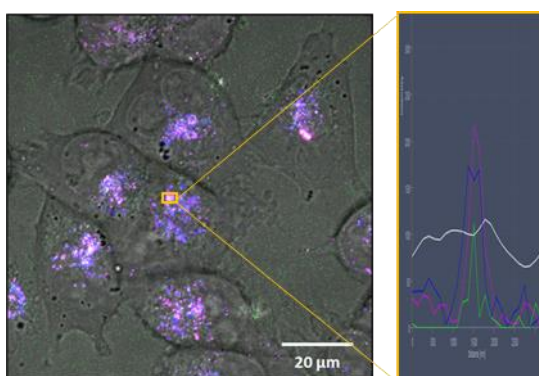


Figura 76: Proliferación celular mediante el recuento de células después de la exposición a AFM (A) y RMF (B) durante 7 días. Comparativa de la proliferación celular a los 7 días (C).



A 5: Imágenes de TEM de células MiaPaCa-2 incubadas durante 72h con MNP@ZIF-8-PMA-6-AM a una concentración 1 pM.



A 6: Imágenes de confocal co-localization en MiaPaCa-2.



## 8. REFERENCIAS

1. Alberti, G.; Zanoni, C.; Magnaghi, L. R.; Biesuz, R., Gold and silver nanoparticle-based colorimetric sensors: New trends and applications. *Chemosensors* **2021**, *9* (11), 305.
2. Schaming, D.; Remita, H., Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Foundations of Chemistry* **2015**, *17* (3), 187-205.
3. Zsigmondy, R., Die chemische Natur des Cassiusschen Goldpurpurs. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* **1898**, *301* (2-3), 361-387.
4. Bayda, S.; Adeel, M.; Tuccinardi, T.; Cordani, M.; Rizzolio, F., The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. *Molecules (Basel, Switzerland)* **2019**, *25* (1).
5. Feynman, R., There's Plenty of Room at the Bottom. 1959.
6. Custance, O.; Perez, R.; Morita, S., Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation. *Nature nanotechnology* **2009**, *4* (12), 803-810.
7. Abid, N.; Khan, A. M.; Shujait, S.; Chaudhary, K.; Ikram, M.; Imran, M.; Haider, J.; Khan, M.; Khan, Q.; Maqbool, M., Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2022**, *300*, 102597.
8. Ealia, S. A. M.; Saravanakumar, M. In *A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application*, IOP conference series: materials science and engineering, IOP Publishing: 2017; p 032019.
9. Ahmed, F.; Discher, D. E., Self-porating polymersomes of PEG-PLA and PEG-PCL: hydrolysis-triggered controlled release vesicles. *Journal of controlled release* **2004**, *96* (1), 37-53.
10. Ahmed, F.; Pakunlu, R. I.; Brannan, A.; Bates, F.; Minko, T.; Discher, D. E., Biodegradable polymersomes loaded with both paclitaxel and doxorubicin permeate and shrink tumors, inducing apoptosis in proportion to accumulated drug. *Journal of Controlled Release* **2006**, *116* (2), 150-158.
11. Xu, J.-P.; Ji, J.; Chen, W.-D.; Shen, J.-C., Novel biomimetic polymersomes as polymer therapeutics for drug delivery. *Journal of controlled release* **2005**, *107* (3), 502-512.
12. Christian, D. A.; Cai, S.; Bowen, D. M.; Kim, Y.; Pajerowski, J. D.; Discher, D. E., Polymersome carriers: from self-assembly to siRNA and protein therapeutics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2009**, *71* (3), 463-474.
13. Park, J.; Joo, J.; Kwon, S. G.; Jang, Y.; Hyeon, T., Synthesis of Monodisperse Spherical Nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (25), 4630-4660.
14. Mer, V.; Dinegar, R., Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *J Am Chem Soc* **1950**, *72*, 4847-4854.
15. Ribeiro, C.; Lee, E. J. H.; Giraldo, T. R.; Longo, E.; Varela, J. A.; Leite, E. R., Study of Synthesis Variables in the Nanocrystal Growth Behavior of Tin Oxide Processed by Controlled Hydrolysis. *The Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (40), 15612-15617.
16. Gentry, S. T.; Kendra, S. F.; Bezpalko, M. W., Ostwald ripening in metallic nanoparticles: stochastic kinetics. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (26), 12736-12741.

17. Ribeiro, C.; Lee, E. J.; Longo, E.; Leite, E. R., A kinetic model to describe nanocrystal growth by the oriented attachment mechanism. *ChemPhysChem* **2005**, *6* (4), 690-696.
18. Zhang, H.; Wang, D., Controlling the growth of charged - nanoparticle chains through interparticle electrostatic repulsion. *Angewandte Chemie* **2008**, *120* (21), 4048-4051.
19. He, W.; Lin, J.; Wang, B.; Tuo, S.; Pantelides, S. T.; Dickerson, J. H., An analytical expression for the van der Waals interaction in oriented-attachment growth: a spherical nanoparticle and a growing cylindrical nanorod. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (13), 4548-4553.
20. He, M.-Q.; Ai, Y.; Hu, W.; Guan, L.; Ding, M.; Liang, Q., Recent Advances of Seed-Mediated Growth of Metal Nanoparticles: from Growth to Applications. *Advanced Materials n/a* (n/a), 2211915.
21. Heuer-Jungemann, A.; Feliu, N.; Bakaimi, I.; Hamaly, M.; Alkilany, A.; Chakraborty, I.; Masood, A.; Casula, M. F.; Kostopoulou, A.; Oh, E., The role of ligands in the chemical synthesis and applications of inorganic nanoparticles. *Chemical reviews* **2019**, *119* (8), 4819-4880.
22. Song, T.; Gao, F.; Guo, S.; Zhang, Y.; Li, S.; You, H.; Du, Y., A review of the role and mechanism of surfactants in the morphology control of metal nanoparticles. *Nanoscale* **2021**, *13* (7), 3895-3910.
23. Iqbal, P.; Preece, J. A.; Mendes, P. M., Nanotechnology: The "Top-Down" and "Bottom-Up" Approaches. In *Supramolecular Chemistry*, 2012.
24. Rane, A. V.; Kanny, K.; Abitha, V. K.; Thomas, S., Chapter 5 - Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites. In *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*, Mohan Bhagyaraj, S.; Oluwafemi, O. S.; Kalarikkal, N.; Thomas, S., Eds. Woodhead Publishing: 2018; pp 121-139.
25. Subbiah, R.; Veerapandian, M.; S. Yun, K., Nanoparticles: Functionalization and Multifunctional Applications in Biomedical Sciences. *Current Medicinal Chemistry* **2010**, *17* (36), 4559-4577.
26. Hühn, J.; Carrillo-Carrion, C.; Soliman, M. G.; Pfeiffer, C.; Valdeperez, D.; Masood, A.; Chakraborty, I.; Zhu, L.; Gallego, M.; Yue, Z.; Carril, M.; Feliu, N.; Escudero, A.; Alkilany, A. M.; Pelaz, B.; del Pino, P.; Parak, W. J., Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. *Chemistry of Materials* **2017**, *29* (1), 399-461.
27. Chen, J.; Spear, S. K.; Huddleston, J. G.; Rogers, R. D., Polyethylene glycol and solutions of polyethylene glycol as green reaction media. *Green Chemistry* **2005**, *7* (2), 64-82.
28. Karakoti, A. S.; Das, S.; Thevuthasan, S.; Seal, S., PEGylated inorganic nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition* **2011**, *50* (9), 1980-1994.
29. Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, P.; Jain, N. K., Pegnology: a review of PEG-ylated systems. *Die Pharmazie* **2002**, *57* (1), 5-29.
30. Zhang, F.; Lees, E.; Amin, F.; Rivera\_Gil, P.; Yang, F.; Mulvaney, P.; Parak, W. J., Polymer - coated nanoparticles: a universal tool for biolabelling experiments. *small* **2011**, *7* (22), 3113-3127.
31. Lin, C. A. J.; Sperling, R. A.; Li, J. K.; Yang, T. Y.; Li, P. Y.; Zanella, M.; Chang, W. H.; Parak, W. J., Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small* **2008**, *4* (3), 334-341.
32. Wadhwa, P.; Sharma, S.; Sahu, S.; Sharma, A.; Kumar, D., A Review of Nanoparticles Characterization Techniques. *Current Nanomaterials* **2022**, *7* (3), 202-214.
33. Filipe, V.; Hawe, A.; Jiskoot, W., Critical Evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the Measurement of Nanoparticles and Protein Aggregates. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27* (5), 796-810.

34. Prime, R. B.; Bair, H. E.; Vyazovkin, S.; Gallagher, P. K.; Riga, A., Thermogravimetric analysis (TGA). *Thermal analysis of polymers: Fundamentals and applications* **2009**, 241-317.
35. Rami, J.; Patel, C.; Patel, C.; Patel, M., Thermogravimetric analysis (TGA) of some synthesized metal oxide nanoparticles. *Materials Today: Proceedings* **2021**, *43*, 655-659.
36. Banfield, J. F.; Zhang, H., Nanoparticles in the environment. *Reviews in mineralogy and geochemistry* **2001**, *44* (1), 1-58.
37. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (3), 668-677.
38. Joudeh, N.; Linke, D., Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *Journal of Nanobiotechnology* **2022**, *20* (1), 262.
39. Salata, O. V., Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of nanobiotechnology* **2004**, *2* (1), 1-6.
40. Stark, W. J.; Stoessel, P. R.; Wohlleben, W.; Hafner, A., Industrial applications of nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (16), 5793-5805.
41. Campelo, J. M.; Luna, D.; Luque, R.; Marinas, J. M.; Romero, A. A., Sustainable preparation of supported metal nanoparticles and their applications in catalysis. *ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials* **2009**, *2* (1), 18-45.
42. Zhang, H.; Han, J.; Yang, B., Structural fabrication and functional modulation of nanoparticle-polymer composites. *Advanced Functional Materials* **2010**, *20* (10), 1533-1550.
43. Rao, C. N. R.; Müller, A.; Cheetham, A. K., Nanomaterials – An Introduction. In *The Chemistry of Nanomaterials*, 2004; pp 1-11.
44. Sajanlal, P. R.; Sreeprasad, T. S.; Samal, A. K.; Pradeep, T., Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano reviews* **2011**, *2* (1), 5883.
45. Auffan, M.; Rose, J.; Bottero, J.-Y.; Lowry, G. V.; Jolivet, J.-P.; Wiesner, M. R., Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology* **2009**, *4* (10), 634-641.
46. Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A. M., Biological applications of quantum dots. *Biomaterials* **2007**, *28* (31), 4717-4732.
47. Huang, X.; El-Sayed, M. A., Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of advanced research* **2010**, *1* (1), 13-28.
48. Sotiriou, G. A., Biomedical applications of multifunctional plasmonic nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2013**, *5* (1), 19-30.
49. Neuberger, T.; Schöpf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 483-496.
50. Xiao, Y.; Du, J., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B* **2020**, *8* (3), 354-367.
51. Lee, K.; Kim, M.; Kim, H., Catalytic nanoparticles being facet-controlled. *Journal of Materials Chemistry* **2010**, *20* (19), 3791-3798.

52. Huang, Y.; Ren, J.; Qu, X., Nanozymes: classification, catalytic mechanisms, activity regulation, and applications. *Chemical reviews* **2019**, *119* (6), 4357-4412.
53. Sengul, A. B.; Asmatulu, E., Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. *Environmental Chemistry Letters* **2020**, *18*, 1659-1683.
54. Shin, S. W.; Song, I. H.; Um, S. H., Role of Physicochemical Properties in Nanoparticle Toxicity. *Nanomaterials* **2015**, *5* (3), 1351-1365.
55. Sletten, E. M.; Bertozzi, C. R., Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (38), 6974-6998.
56. de Aberasturi, D. J.; Serrano-Montes, A. B.; Liz-Marzán, L. M., Modern Applications of Plasmonic Nanoparticles: From Energy to Health. *Advanced Optical Materials* **2015**, *3* (5), 602-617.
57. Khlbtsov, N. G.; Dykman, L. A., Optical properties and biomedical applications of plasmonic nanoparticles. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer* **2010**, *111* (1), 1-35.
58. Pelaz, B.; Alexiou, C.; Alvarez-Puebla, R. A.; Alves, F.; Andrews, A. M.; Ashraf, S.; Balogh, L. P.; Ballerini, L.; Bestetti, A.; Brendel, C.; Bosi, S.; Carril, M.; Chan, W. C. W.; Chen, C.; Chen, X.; Chen, X.; Cheng, Z.; Cui, D.; Du, J.; Dullin, C.; Escudero, A.; Feliu, N.; Gao, M.; George, M.; Gogotsi, Y.; Grünweller, A.; Gu, Z.; Halas, N. J.; Hampp, N.; Hartmann, R. K.; Hersam, M. C.; Hunziker, P.; Jian, J.; Jiang, X.; Jungebluth, P.; Kadhiresan, P.; Kataoka, K.; Khademhosseini, A.; Kopeček, J.; Kotov, N. A.; Krug, H. F.; Lee, D. S.; Lehr, C.-M.; Leong, K. W.; Liang, X.-J.; Ling Lim, M.; Liz-Marzán, L. M.; Ma, X.; Macchiaroni, P.; Meng, H.; Möhwald, H.; Mulvaney, P.; Nel, A. E.; Nie, S.; Nordlander, P.; Okano, T.; Oliveira, J.; Park, T. H.; Penner, R. M.; Prato, M.; Puntès, V.; Rotello, V. M.; Samarakoon, A.; Schaak, R. E.; Shen, Y.; Sjöqvist, S.; Skirtach, A. G.; Soliman, M. G.; Stevens, M. M.; Sung, H.-W.; Tang, B. Z.; Tietze, R.; Udugama, B. N.; VanEpps, J. S.; Weil, T.; Weiss, P. S.; Willner, I.; Wu, Y.; Yang, L.; Yue, Z.; Zhang, Q.; Zhang, Q.; Zhang, X.-E.; Zhao, Y.; Zhou, X.; Parak, W. J., Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano* **2017**, *11* (3), 2313-2381.
59. Kreibig, U.; Vollmer, M., Introduction. In *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1995; pp 1-12.
60. Mayer, K. M.; Hafner, J. H., Localized Surface Plasmon Resonance Sensors. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (6), 3828-3857.
61. Olson, J.; Dominguez-Medina, S.; Hoggard, A.; Wang, L.-Y.; Chang, W.-S.; Link, S., Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (1), 40-57.
62. Polo, E.; Navarro Poupard, M. F.; Guerrini, L.; Taboada, P.; Pelaz, B.; Alvarez-Puebla, R. A.; del Pino, P., Colloidal bioplasmonics. *Nano Today* **2018**, *20*, 58-73.
63. Nehl, C. L.; Hafner, J. H., Shape-dependent plasmon resonances of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, *18* (21), 2415-2419.
64. Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A., Simulation of the Optical Absorption Spectra of Gold Nanorods as a Function of Their Aspect Ratio and the Effect of the Medium Dielectric Constant. *The Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (16), 3073-3077.
65. Mie, G., A contribution to the optics of turbid media, especially colloidal metallic suspensions. *Ann. Phys* **1908**, *25* (4), 377-445.
66. Zhao, J.; Pinchuk, A. O.; McMahon, J. M.; Li, S.; Ausman, L. K.; Atkinson, A. L.; Schatz, G. C., Methods for Describing the Electromagnetic Properties of Silver and Gold Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research* **2008**, *41* (12), 1710-1720.

67. Hanlon, E. B.; Manoharan, R.; Koo, T. W.; Shafer, K. E.; Motz, J. T.; Fitzmaurice, M.; Kramer, J. R.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., Prospects for in vivo Raman spectroscopy. *Physics in Medicine & Biology* **2000**, *45* (2), R1.
68. Sharma, B.; Frontiera, R. R.; Henry, A.-I.; Ringe, E.; Van Duyne, R. P., SERS: Materials, applications, and the future. *Materials today* **2012**, *15* (1-2), 16-25.
69. Jeanmaire, D. L.; Van Duyne, R. P., Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1977**, *84* (1), 1-20.
70. Majewski, M. B.; Noh, H.; Islamoglu, T.; Farha, O. K., NanoMOFs: little crystallites for substantial applications. *Journal of Materials Chemistry A* **2018**, *6* (17), 7338-7350.
71. Yaghi, O. M.; Li, G.; Li, H., Selective binding and removal of guests in a microporous metal-organic framework. *Nature* **1995**, *378* (6558), 703-706.
72. Banerjee, D.; Simon, C. M.; Elsaidi, S. K.; Haranczyk, M.; Thallapally, P. K., Xenon gas separation and storage using metal-organic frameworks. *Chem* **2018**, *4* (3), 466-494.
73. Zhu, L.; Liu, X.-Q.; Jiang, H.-L.; Sun, L.-B., Metal-organic frameworks for heterogeneous basic catalysis. *Chemical reviews* **2017**, *117* (12), 8129-8176.
74. Lin, R.-B.; Xiang, S.; Xing, H.; Zhou, W.; Chen, B., Exploration of porous metal-organic frameworks for gas separation and purification. *Coordination chemistry reviews* **2019**, *378*, 87-103.
75. Sun, C.-Y.; Qin, C.; Wang, X.-L.; Su, Z.-M., Metal-organic frameworks as potential drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery* **2013**, *10* (1), 89-101.
76. Cedrún-Morales, M.; Ceballos, M.; Polo, E.; Del Pino, P.; Pelaz, B., Nanosized metal-organic frameworks as unique platforms for bioapplications. *Chemical Communications* **2023**, *59* (20), 2869-2887.
77. Rangnekar, N.; Mittal, N.; Elyassi, B.; Caro, J.; Tsapatsis, M., Zeolite membranes—a review and comparison with MOFs. *Chemical Society Reviews* **2015**, *44* (20), 7128-7154.
78. Wuttke, S.; Lismont, M.; Escudero, A.; Rungtaweeworanit, B.; Parak, W. J., Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery – A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers. *Biomaterials* **2017**, *123*, 172-183.
79. Bosch, M.; Yuan, S.; Rutledge, W.; Zhou, H.-C., Stepwise Synthesis of Metal-Organic Frameworks. *Accounts of Chemical Research* **2017**, *50* (4), 857-865.
80. Arafat, Y.; Azhar, M. R.; Zhong, Y.; Abid, H. R.; Tadó, M. O.; Shao, Z., Advances in zeolite imidazolate frameworks (ZIFs) derived bifunctional oxygen electrocatalysts and their application in zinc-air batteries. *Advanced Energy Materials* **2021**, *11* (26), 2100514.
81. Ahmadijokani, F.; Molavi, H.; Rezakazemi, M.; Tajahmadi, S.; Bahi, A.; Ko, F.; Aminabhavi, T. M.; Li, J.-R.; Arjmand, M., UiO-66 metal-organic frameworks in water treatment: A critical review. *Progress in Materials Science* **2022**, *125*, 100904.
82. Chui, S. S.-Y.; Lo, S. M.-F.; Charmant, J. P. H.; Orpen, A. G.; Williams, I. D., A Chemically Functionalizable Nanoporous Material [Cu<sub>3</sub>(TMA)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub>]<sub>n</sub>. *Science* **1999**, *283* (5405), 1148-1150.

83. Férey, G.; Serre, C.; Mellot - Draznieks, C.; Millange, F.; Surblé, S.; Dutour, J.; Margiolaki, I., A hybrid solid with giant pores prepared by a combination of targeted chemistry, simulation, and powder diffraction. *Angewandte Chemie* **2004**, *116* (46), 6456-6461.
84. Feng, D.; Gu, Z. Y.; Li, J. R.; Jiang, H. L.; Wei, Z.; Zhou, H. C., Zirconium - metalloporphyrin PCN - 222: mesoporous metal-organic frameworks with ultrahigh stability as biomimetic catalysts. *Angewandte Chemie* **2012**, *124* (41), 10453-10456.
85. Farha, O. K.; Eryazici, I.; Jeong, N. C.; Hauser, B. G.; Wilmer, C. E.; Sarjeant, A. A.; Snurr, R. Q.; Nguyen, S. T.; Yazaydin, A. Ö.; Hupp, J. T., Metal-Organic Framework Materials with Ultrahigh Surface Areas: Is the Sky the Limit? *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (36), 15016-15021.
86. Karagiari, O.; Lalonde, M. B.; Bury, W.; Sarjeant, A. A.; Farha, O. K.; Hupp, J. T., Opening ZIF-8: A Catalytically Active Zeolitic Imidazolate Framework of Sodalite Topology with Unsubstituted Linkers. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (45), 18790-18796.
87. D'Amato, R.; Bondi, R.; Moghdad, I.; Marmottini, F.; McPherson, M. J.; Naili, H.; Taddei, M.; Costantino, F., "Shake 'n Bake" Route to Functionalized Zr-UiO-66 Metal-Organic Frameworks. *Inorganic Chemistry* **2021**, *60* (18), 14294-14301.
88. Cai, Y.; Kulkarni, A. R.; Huang, Y.-G.; Sholl, D. S.; Walton, K. S., Control of Metal-Organic Framework Crystal Topology by Ligand Functionalization: Functionalized HKUST-1 Derivatives. *Crystal Growth & Design* **2014**, *14* (11), 6122-6128.
89. Hsieh, J. O.; Balkus, K. J.; Ferraris, J. P.; Musselman, I. H., MIL-53 frameworks in mixed-matrix membranes. *Microporous and Mesoporous Materials* **2014**, *196*, 165-174.
90. Feng, D.; Gu, Z.-Y.; Li, J.-R.; Jiang, H.-L.; Wei, Z.; Zhou, H.-C., Zirconium-Metalloporphyrin PCN-222: Mesoporous Metal-Organic Frameworks with Ultrahigh Stability as Biomimetic Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51* (41), 10307-10310.
91. Bonnett, B. L.; Smith, E. D.; De La Garza, M.; Cai, M.; Haag, J. V. I. V.; Serrano, J. M.; Cornell, H. D.; Gibbons, B.; Martin, S. M.; Morris, A. J., PCN-222 Metal-Organic Framework Nanoparticles with Tunable Pore Size for Nanocomposite Reverse Osmosis Membranes. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2020**, *12* (13), 15765-15773.
92. Chen, B.; Yang, Z.; Zhu, Y.; Xia, Y., Zeolitic imidazolate framework materials: recent progress in synthesis and applications. *Journal of Materials Chemistry A* **2014**, *2* (40), 16811-16831.
93. Phan, A.; Doonan, C. J.; Uribe-Romo, F. J.; Knobler, C. B.; O'Keeffe, M.; Yaghi, O. M., Synthesis, Structure, and Carbon Dioxide Capture Properties of Zeolitic Imidazolate Frameworks. *Accounts of Chemical Research* **2010**, *43* (1), 58-67.
94. Bux, H.; Liang, F.; Li, Y.; Cravillon, J.; Wiebcke, M.; Caro, J., Zeolitic Imidazolate Framework Membrane with Molecular Sieving Properties by Microwave-Assisted Solvothermal Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131* (44), 16000-16001.
95. Lu, G.; Hupp, J. T., Metal-Organic Frameworks as Sensors: A ZIF-8 Based Fabry-Pérot Device as a Selective Sensor for Chemical Vapors and Gases. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (23), 7832-7833.
96. Jiang, H. L.; Liu, B.; Akita, T.; Haruta, M.; Sakurai, H.; Xu, Q., Au@ZIF-8: CO oxidation over gold nanoparticles deposited to metal-organic framework. *J Am Chem Soc* **2009**, *131* (32), 11302-3.
97. Vasconcelos, I. B.; Silva, T. G. d.; Militão, G. C. G.; Soares, T. A.; Rodrigues, N. M.; Rodrigues, M. O.; Costa, N. B. d.; Freire, R. O.; Junior, S. A., Cytotoxicity and slow release of the anti-cancer drug doxorubicin from ZIF-8. *RSC Advances* **2012**, *2* (25), 9437-9442.

98. Park, K. S.; Ni, Z.; Côté, A. P.; Choi, J. Y.; Huang, R.; Uribe-Romo, F. J.; Chae, H. K.; O'Keeffe, M.; Yaghi, O. M., Exceptional chemical and thermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (27), 10186-10191.
99. Shubayev, V. I.; Pisanic, T. R.; Jin, S., Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (6), 467-477.
100. Buschow, K. J., *Handbook of magnetic materials*. Elsevier: 2003.
101. Lisjak, D.; Mertelj, A., Anisotropic magnetic nanoparticles: A review of their properties, syntheses and potential applications. *Progress in Materials Science* **2018**, *95*, 286-328.
102. Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46* (8), 1222-1244.
103. Hergt, R.; Dutz, S.; Müller, R.; Zeisberger, M., Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2006**, *18* (38), S2919.
104. Deatsch, A. E.; Evans, B. A., Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, *354*, 163-172.
105. Makridis, A.; Curto, S.; Van Rhoon, G.; Samaras, T.; Angelakeris, M., A standardisation protocol for accurate evaluation of specific loss power in magnetic hyperthermia. *Journal of Physics D: Applied Physics* **2019**, *52* (25), 255001.
106. Rosensweig, R. E., Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2002**, *252*, 370-374.
107. Guardia, P.; Di Corato, R.; Lartigue, L.; Wilhelm, C.; Espinosa, A.; Garcia-Hernandez, M.; Gazeau, F.; Manna, L.; Pellegrino, T., Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS Nano* **2012**, *6* (4), 3080-3091.
108. Gavilán, H.; Avugadda, S. K.; Fernández-Cabada, T.; Soni, N.; Cassani, M.; Mai, B. T.; Chantrell, R.; Pellegrino, T., Magnetic nanoparticles and clusters for magnetic hyperthermia: Optimizing their heat performance and developing combinatorial therapies to tackle cancer. *Chemical Society Reviews* **2021**, *50* (20), 11614-11667.
109. Al-Mufachi, N. A.; Rees, N. V.; Steinberger-Wilkens, R., Hydrogen selective membranes: A review of palladium-based dense metal membranes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **2015**, *47*, 540-551.
110. McCue, A. J.; Anderson, J. A., Recent advances in selective acetylene hydrogenation using palladium containing catalysts. *Frontiers of Chemical Science and Engineering* **2015**, *9*, 142-153.
111. Grasa, G. A.; Viciu, M. S.; Huang, J.; Zhang, C.; Trudell, M. L.; Nolan, S. P., Suzuki–Miyaura cross-coupling reactions mediated by palladium/imidazolium salt systems. *Organometallics* **2002**, *21* (14), 2866-2873.
112. Yin; Liebscher, J., Carbon–Carbon Coupling Reactions Catalyzed by Heterogeneous Palladium Catalysts. *Chemical Reviews* **2007**, *107* (1), 133-173.
113. Amali, A. J.; Rana, R. K., Stabilisation of Pd(0) on surface functionalised Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: magnetically recoverable and stable recyclable catalyst for hydrogenation and Suzuki–Miyaura reactions. *Green Chemistry* **2009**, *11* (11), 1781-1786.
114. Zhu, Q. C.; Shen, B. X.; Ling, H.; Gu, R., Cumene hydroperoxide hydrogenation over Pd/C catalysts. *Journal of hazardous materials* **2010**, *175* (1-3), 646-50.

115. Cui, T. L.; Ke, W. Y.; Zhang, W. B.; Wang, H. H.; Li, X. H.; Chen, J. S., Encapsulating palladium nanoparticles inside mesoporous MFI zeolite nanocrystals for shape - selective catalysis. *Angewandte Chemie* **2016**, *128* (32), 9324-9328.
116. Luo, S.; Zeng, Z.; Zeng, G.; Liu, Z.; Xiao, R.; Chen, M.; Tang, L.; Tang, W.; Lai, C.; Cheng, M., Metal organic frameworks as robust host of palladium nanoparticles in heterogeneous catalysis: synthesis, application, and prospect. *ACS applied materials & interfaces* **2019**, *11* (36), 32579-32598.
117. Zhao, M.; Deng, K.; He, L.; Liu, Y.; Li, G.; Zhao, H.; Tang, Z., Core-shell palladium nanoparticle@ metal-organic frameworks as multifunctional catalysts for cascade reactions. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (5), 1738-1741.
118. Li, J.; Chen, W.; Zhao, H.; Zheng, X.; Wu, L.; Pan, H.; Zhu, J.; Chen, Y.; Lu, J., Size-dependent catalytic activity over carbon-supported palladium nanoparticles in dehydrogenation of formic acid. *Journal of Catalysis* **2017**, *352*, 371-381.
119. Guerra, J.; Herrero, M. A., Hybrid materials based on Pd nanoparticles on carbon nanostructures for environmentally benign C-C coupling chemistry. *Nanoscale* **2010**, *2* (8), 1390-1400.
120. Sau, T. K.; Murphy, C. J., Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2004**, *20* (15), 6414-20.
121. Schulz, F.; Homolka, T.; Bastús, N. G.; Puentes, V.; Weller, H.; Vossmeier, T., Little Adjustments Significantly Improve the Turkevich Synthesis of Gold Nanoparticles. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* **2014**, *30* (35), 10779-10784.
122. Bastús, N. G.; Merkoçi, F.; Piella, J.; Puentes, V., Synthesis of Highly Monodisperse Citrate-Stabilized Silver Nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic Control and Catalytic Properties. *Chemistry of Materials* **2014**, *26* (9), 2836-2846.
123. Peng, S.; McMahon, J. M.; Schatz, G. C.; Gray, S. K.; Sun, Y., Reversing the size-dependence of surface plasmon resonances. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (33), 14530-14534.
124. Shi, M.; Kwon, H. S.; Peng, Z.; Elder, A.; Yang, H., Effects of surface chemistry on the generation of reactive oxygen species by copper nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6* (3), 2157-64.
125. Chen, R.; Christiansen, M. G.; Anikeeva, P., Maximizing Hysteretic Losses in Magnetic Ferrite Nanoparticles via Model-Driven Synthesis and Materials Optimization. *ACS Nano* **2013**, *7* (10), 8990-9000.
126. Xie, X.; Gao, G.; Pan, Z.; Wang, T.; Meng, X.; Cai, L., Large-scale synthesis of palladium concave nanocubes with high-index facets for sustainable enhanced catalytic performance. *Scientific reports* **2015**, *5*, 8515.
127. Mourdikoudis, S.; Montes-García, V.; Rodal-Cedeira, S.; Winckelmans, N.; Pérez-Juste, I.; Wu, H.; Bals, S.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I., Highly porous palladium nanodendrites: wet-chemical synthesis, electron tomography and catalytic activity. *Dalton Transactions* **2019**, *48* (11), 3758-3767.
128. Carrillo-Carrión, C.; Martínez, R.; Navarro Poupard, M. F.; Pelaz, B.; Polo, E.; Arenas-Vivo, A.; Olgati, A.; Taboada, P.; Soliman, M. G.; Catalán, Ú.; Fernández-Castillejo, S.; Solà, R.; Parak, W. J.; Horcajada, P.; Alvarez-Puebla, R. A.; del Pino, P., Aqueous Stable Gold Nanostar/ZIF-8 Nanocomposites for Light-Triggered Release of Active Cargo Inside Living Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (21), 7078-7082.

129. Soliman, M. G.; Pelaz, B.; Parak, W. J.; del Pino, P., Phase Transfer and Polymer Coating Methods toward Improving the Stability of Metallic Nanoparticles for Biological Applications. *Chemistry of Materials* **2015**, *27* (3), 990-997.
130. Sukhanova, A.; Bozrova, S.; Sokolov, P.; Berestovoy, M.; Karaulov, A.; Nabiev, I., Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale research letters* **2018**, *13* (1), 44.
131. Carrillo-Carrión, C.; Martínez, R.; Navarro Poupard, M. F.; Pelaz, B.; Polo, E.; Arenas-Vivo, A.; Olgati, A.; Taboada, P.; Soliman, M. G.; Catalán, Ú.; Fernández-Castillejo, S.; Solà, R.; Parak, W. J.; Horcajada, P.; Alvarez-Puebla, R. A.; Del Pino, P., Aqueous Stable Gold Nanostar/ZIF-8 Nanocomposites for Light-Triggered Release of Active Cargo Inside Living Cells. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2019**, *58* (21), 7078-7082.
132. Martínez, R.; Carrillo-Carrión, C.; Destito, P.; Alvarez, A.; Tomás-Gamasa, M.; Pelaz, B.; Lopez, F.; Mascareñas, J. L.; del Pino, P., Core-Shell Palladium/MOF Platforms as Diffusion-Controlled Nanoreactors in Living Cells and Tissue Models. *Cell Reports Physical Science* **2020**, *1* (6), 100076.
133. Ge, X.; Wong, R.; Anisa, A.; Ma, S., Recent development of metal-organic framework nanocomposites for biomedical applications. *Biomaterials* **2022**, *281*, 121322.
134. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; Landfester, K.; Schild, H.; Maskos, M.; Knauer, S. K.; Stauber, R. H., Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature nanotechnology* **2013**, *8* (10), 772-81.
135. Pino, P. d.; Pelaz, B.; Zhang, Q.; Maffre, P.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J., Protein corona formation around nanoparticles – from the past to the future. *Materials Horizons* **2014**, *1* (3), 301-313.
136. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society* **1951**, *11* (0), 55-75.
137. Chatterjee, A. K.; Chakraborty, R.; Basu, T., Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology* **2014**, *25* (13), 135101.
138. Zhang, Q.; Lai, W.; Yin, T.; Zhang, C.; Yue, C.; Cheng, J.; Wang, K.; Yang, Y.; Cui, D.; Parak, W. J., Investigation of the Viability of Cells upon Co-Exposure to Gold and Iron Oxide Nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry* **2018**, *29* (6), 2120-2125.
139. Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W., Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular immunology* **2012**, *52* (3-4), 174-82.
140. Mahmoudi, M.; Lohse, S. E.; Murphy, C. J.; Fathizadeh, A.; Montazeri, A.; Suslick, K. S., Variation of Protein Corona Composition of Gold Nanoparticles Following Plasmonic Heating. *Nano Letters* **2014**, *14* (1), 6-12.
141. Pelaz, B.; del Pino, P.; Maffre, P.; Hartmann, R.; Gallego, M.; Rivera-Fernández, S.; de la Fuente, J. M.; Nienhaus, G. U.; Parak, W. J., Surface Functionalization of Nanoparticles with Polyethylene Glycol: Effects on Protein Adsorption and Cellular Uptake. *ACS Nano* **2015**, *9* (7), 6996-7008.
142. Schöttler, S.; Becker, G.; Winzen, S.; Steinbach, T.; Mohr, K.; Landfester, K.; Mailänder, V.; Wurm, F. R., Protein adsorption is required for stealth effect of poly(ethylene glycol)- and poly(phosphoester)-coated nanocarriers. *Nat Nanotechnol* **2016**, *11* (4), 372-7.

143. Dai, Q.; Walkey, C.; Chan, W. C., Polyethylene glycol backfilling mitigates the negative impact of the protein corona on nanoparticle cell targeting. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53* (20), 5093-6.
144. Jiang, J.-Q.; Yang, C.-X.; Yan, X.-P., Zeolitic Imidazolate Framework-8 for Fast Adsorption and Removal of Benzotriazoles from Aqueous Solution. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2013**, *5* (19), 9837-9842.
145. Khan, N. A.; Jung, B. K.; Hasan, Z.; Jhung, S. H., Adsorption and removal of phthalic acid and diethyl phthalate from water with zeolitic imidazolate and metal-organic frameworks. *Journal of Hazardous Materials* **2015**, *282*, 194-200.
146. Lan, H.; Rönkkö, T.; Parshintsev, J.; Hartonen, K.; Gan, N.; Sakeye, M.; Sarfraz, J.; Riekkola, M.-L., Modified zeolitic imidazolate framework-8 as solid-phase microextraction Arrow coating for sampling of amines in wastewater and food samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1486*, 76-85.
147. Zhu, Y.; Gupta, K. M.; Liu, Q.; Jiang, J.; Caro, J.; Huang, A., Synthesis and seawater desalination of molecular sieving zeolitic imidazolate framework membranes. *Desalination* **2016**, *385*, 75-82.
148. Liu, X.; Li, Y.; Ban, Y.; Peng, Y.; Jin, H.; Bux, H.; Xu, L.; Caro, J.; Yang, W., Improvement of hydrothermal stability of zeolitic imidazolate frameworks. *Chemical Communications* **2013**, *49* (80), 9140-9142.
149. Zhang, H.; Liu, D.; Yao, Y.; Zhang, B.; Lin, Y. S., Stability of ZIF-8 membranes and crystalline powders in water at room temperature. *Journal of Membrane Science* **2015**, *485*, 103-111.
150. Wang, H.; Jian, M.; Qi, Z.; Li, Y.; Liu, R.; Qu, J.; Zhang, X., Specific anion effects on the stability of zeolitic imidazolate framework-8 in aqueous solution. *Microporous and Mesoporous Materials* **2018**, *259*, 171-177.
151. Zhang, H.; Zhao, M.; Lin, Y. S., Stability of ZIF-8 in water under ambient conditions. *Microporous and Mesoporous Materials* **2019**, *279*, 201-210.
152. Zheng, G.; de Marchi, S.; López-Puente, V.; Sentosun, K.; Polavarapu, L.; Pérez-Juste, I.; Hill, E. H.; Bals, S.; Liz-Marzán, L. M.; Pastoriza-Santos, I.; Pérez-Juste, J., Encapsulation of Single Plasmonic Nanoparticles within ZIF-8 and SERS Analysis of the MOF Flexibility. *Small* **2016**, *12* (29), 3935-43.
153. Zhai, Y.; Xuan, T.; Wu, Y.; Guo, X.; Ying, Y.; Wen, Y.; Yang, H., Metal-organic-frameworks-enforced surface enhanced Raman scattering chip for elevating detection sensitivity of carbendazim in seawater. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2021**, *326*, 128852.
154. Singh, S.; Singh, N.; Kumar, V.; Datta, S.; Wani, A. B.; Singh, D.; Singh, K.; Singh, J., Toxicity, monitoring and biodegradation of the fungicide carbendazim. *Environmental chemistry letters* **2016**, *14*, 317-329.
155. Zhao, J.; Wu, C.; Zhai, L.; Shi, X.; Li, X.; Weng, G.; Zhu, J.; Li, J.; Zhao, J.-W., A SERS-based immunoassay for the detection of  $\alpha$ -fetoprotein using AuNS@Ag@SiO<sub>2</sub> core-shell nanostars. *Journal of Materials Chemistry C* **2019**, *7* (27), 8432-8441.
156. Zorlu, T.; Becerril-Castro, I. B.; Puertolas, B.; Giannini, V.; Correa-Duarte, M. A.; Alvarez-Puebla, R. A., Yolk-Shell Nanostars@Metal Organic Frameworks as Molecular Sieves for Optical Sensing and Catalysis. *Angewandte Chemie International Edition n/a* (n/a), e202305299.
157. Kou, L.; Bhutia, Y. D.; Yao, Q.; He, Z.; Sun, J.; Ganapathy, V., Transporter-guided delivery of nanoparticles to improve drug permeation across cellular barriers and drug exposure to selective cell types. *Frontiers in pharmacology* **2018**, *9*, 27.

158. Blanco, E.; Shen, H.; Ferrari, M., Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology* **2015**, *33* (9), 941-951.
159. Mitchell, M. J.; Billingsley, M. M.; Haley, R. M.; Wechsler, M. E.; Peppas, N. A.; Langer, R., Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery* **2021**, *20* (2), 101-124.
160. Raouf, I.; Khalid, S.; Khan, A.; Lee, J.; Kim, H. S.; Kim, M.-H., A review on numerical modeling for magnetic nanoparticle hyperthermia: Progress and challenges. *Journal of thermal biology* **2020**, *91*, 102644.
161. Fantechi, E.; Innocenti, C.; Albino, M.; Lottini, E.; Sangregorio, C., Influence of cobalt doping on the hyperthermic efficiency of magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *380*, 365-371.
162. Kefeni, K. K.; Msagati, T. A. M.; Nkambule, T. T. I.; Mamba, B. B., Spinel ferrite nanoparticles and nanocomposites for biomedical applications and their toxicity. *Materials Science and Engineering: C* **2020**, *107*, 110314.
163. Chen, J.; Hsu, H.-S.; Huang, Y.-H.; Huang, D.-J., Spin-dependent optical charge transfer in magnetite from transmitting optical magnetic circular dichroism. *Physical Review B* **2018**, *98* (8), 085141.
164. Kemp, S. J.; Ferguson, R. M.; Khandhar, A. P.; Krishnan, K. M., Monodisperse magnetite nanoparticles with nearly ideal saturation magnetization. *RSC Advances* **2016**, *6* (81), 77452-77464.
165. Rousseau, A.; Tellier, M.; Marin, L.; Garrow, M.; Madelaine, C.; Hallali, N.; Carrey, J., Influence of medium viscosity on the heating power and the high-frequency magnetic properties of nanobeads containing magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2021**, *518*, 167403.
166. Serantes, D.; Faílde, D.; Baldomir, D.; Pelaz, B.; del Pino, P.; Chantrell, R. W., Effective macrospin model for  $\text{Co}_x\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$  nanoparticles: decreasing the anisotropy by Co-doping? *arXiv preprint arXiv:1909.10643* **2019**.
167. Zhang, L.; He, R.; Gu, H.-C., Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science* **2006**, *253* (5), 2611-2617.
168. Lee, S. S.; Li, W.; Kim, C.; Cho, M.; Lafferty, B. J.; Fortner, J. D., Surface functionalized manganese ferrite nanocrystals for enhanced uranium sorption and separation in water. *Journal of Materials Chemistry A* **2015**, *3* (43), 21930-21939.
169. Ramos Guivar, J. A.; Sanches, E. A.; Magon, C. J.; Ramos Fernandes, E. G., Preparation and characterization of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)-stabilized  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles for electrochemistry detection of citric acid. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**, *755*, 158-166.
170. Sheng, Y.; Li, S.; Duan, Z.; Zhang, R.; Xue, J., Fluorescent magnetic nanoparticles as minimally-invasive multi-functional theranostic platform for fluorescence imaging, MRI and magnetic hyperthermia. *Materials Chemistry and Physics* **2018**, *204*, 388-396.
171. Wu, Y.-n.; Zhou, M.; Li, S.; Li, Z.; Li, J.; Wu, B.; Li, G.; Li, F.; Guan, X., Magnetic Metal–Organic Frameworks:  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ @MOFs via Confined In Situ Pyrolysis Method for Drug Delivery. *Small* **2014**, *10* (14), 2927-2936.
172. Sheng, D.; Ying, X.; Li, R.; Cheng, S.; Zhang, C.; Dong, W.; Pan, X., Polydopamine-mediated modification of ZIF-8 onto magnetic nanoparticles for enhanced tetracycline adsorption from wastewater. *Chemosphere* **2022**, *308*, 136249.

173. Zhang, T.; Zhang, X.; Yan, X.; Kong, L.; Zhang, G.; Liu, H.; Qiu, J.; Yeung, K. L., Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ZIF-8 magnetic core-shell microspheres and their potential application in a capillary microreactor. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *228*, 398-404.
174. Wang, B.; Liu, B.; Yan, Y., Facile Preparation of ZIF-8 MOF Coated Mesoporous Magnetic Nanoarticles to Provide a Magnetic Solid Phase Extraction Platform. *Journal of Analytical Chemistry* **2021**, *76* (4), 430-441.
175. Lee, Y.-R.; Jang, M.-S.; Cho, H.-Y.; Kwon, H.-J.; Kim, S.; Ahn, W.-S., ZIF-8: A comparison of synthesis methods. *Chemical Engineering Journal* **2015**, *271*, 276-280.
176. Zheng, J.; Lin, Z.; Lin, G.; Yang, H.; Zhang, L., Preparation of magnetic metal-organic framework nanocomposites for highly specific separation of histidine-rich proteins. *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3* (10), 2185-2191.
177. Ostrowski, P. P.; Fairn, G. D.; Grinstein, S.; Johnson, D. E., Cresyl violet: a superior fluorescent lysosomal marker. *Traffic* **2016**, *17* (12), 1313-1321.
178. Phan, T. T. V.; Huynh, T.-C.; Manivasagan, P.; Mondal, S.; Oh, J., An up-to-date review on biomedical applications of palladium nanoparticles. *Nanomaterials* **2019**, *10* (1), 66.
179. Yaqoob, S. B.; Adnan, R.; Rameez Khan, R. M.; Rashid, M., Gold, silver, and palladium nanoparticles: a chemical tool for biomedical applications. *Frontiers in chemistry* **2020**, *8*, 376.
180. Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Macleod, K. G.; Rybski, W.; Fraser, C.; Torres-Sánchez, C.; Patton, E. E.; Bradley, M.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A., Extracellular palladium-catalysed dealkylation of 5-fluoro-1-propargyl-uracil as a bioorthogonally activated prodrug approach. *Nature communications* **2014**, *5*, 3277.
181. Wan, J.; Wang, J.-H.; Liu, T.; Xie, Z.; Yu, X.-F.; Li, W., Surface chemistry but not aspect ratio mediates the biological toxicity of gold nanorods in vitro and in vivo. *Scientific reports* **2015**, *5* (1), 11398.
182. Walker, D.; Käs Dorf, B. T.; Jeong, H.-H.; Lieleg, O.; Fischer, P., Enzymatically active biomimetic micropropellers for the penetration of mucin gels. *Science Advances* **2015**, *1* (11), e1500501.
183. Petrou, G.; Crouzier, T., Mucins as multifunctional building blocks of biomaterials. *Biomaterials science* **2018**, *6* (9), 2282-2297.
184. Kufe, D. W., Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nature Reviews Cancer* **2009**, *9* (12), 874-885.
185. Zhang, H.; Jin, M.; Xiong, Y.; Lim, B.; Xia, Y., Shape-Controlled Synthesis of Pd Nanocrystals and Their Catalytic Applications. *Accounts of Chemical Research* **2013**, *46* (8), 1783-1794.
186. Xie, X.; Gao, G.; Pan, Z.; Wang, T.; Meng, X.; Cai, L., Large-Scale Synthesis of Palladium Concave Nanocubes with High-Index Facets for Sustainable Enhanced Catalytic Performance. *Scientific Reports* **2015**, *5* (1), 8515.
187. Ncube, P.; Bingwa, N.; Baloyi, H.; Meijboom, R., Catalytic activity of palladium and gold dendrimer-encapsulated nanoparticles for methylene blue reduction: A kinetic analysis. *Applied Catalysis A: General* **2015**, *495*, 63-71.
188. Subhan, F.; Aslam, S.; Yan, Z.; Yaseen, M., Unusual Pd nanoparticle dispersion in microenvironment for p-nitrophenol and methylene blue catalytic reduction. *Journal of Colloid and Interface Science* **2020**, *578*, 37-46.

189. Cui, Z.; Wu, J.; Wu, T.; Xu, Y.; Li, H.; Yu, Y.; Kang, L.; Cai, Y.; Li, J.; Tian, D., Novel wood membrane decorated with covalent organic frameworks and palladium nanoparticles for reduction of aromatic organic contaminants. *Separation and Purification Technology* **2023**, *319*, 124112.
190. Hashemi Salehi, M.; Yousefi, M.; Hekmati, M.; Balali, E., Application of palladium nanoparticle-decorated Artemisia abrotanum extract-modified graphene oxide for highly active catalytic reduction of methylene blue, methyl orange and rhodamine B. *Applied Organometallic Chemistry* **2019**, *33* (10), e5123.
191. Sandhya, K.; Reddy, G. B.; Ayodhya, D.; Noorjahan, M.; Mangatayaru, K. G., Phytoconstituents mediated fabrication of palladium nanoparticles using Butea Monosperma flower extract by autoclaving treatment towards the degradation of noxious organic dyes. *Results in Chemistry* **2023**, *5*, 100969.
192. Antony, A. M.; Yelamaggad, C. V.; Patil, S. A., Palladium nanoparticles decorated on functionalized graphitic carbon nitride as an efficient and retrievable nanocatalyst for organic dye degradation and hydrogen peroxide sensing. *Materials Chemistry and Physics* **2023**, *297*, 127370.
193. Xue, L.; Yan, Y.; Kos, P.; Chen, X.; Siegwart, D. J., PEI fluorination reduces toxicity and promotes liver-targeted siRNA delivery. *Drug Delivery and Translational Research* **2021**, *11* (1), 255-260.
194. Jia, Y. P.; Shi, K.; Liao, J. F.; Peng, J. R.; Hao, Y.; Qu, Y.; Chen, L. J.; Liu, L.; Yuan, X.; Qian, Z. Y.; Wei, X. W., Effects of Cetyltrimethylammonium Bromide on the Toxicity of Gold Nanorods Both In Vitro and In Vivo: Molecular Origin of Cytotoxicity and Inflammation. *Small Methods* **2020**, *4* (3), 1900799.
195. Weiss, J. T.; Dawson, J. C.; Fraser, C.; Rybski, W.; Torres-Sánchez, C.; Bradley, M.; Patton, E. E.; Carragher, N. O.; Unciti-Broceta, A., Development and Bioorthogonal Activation of Palladium-Labile Prodrugs of Gemcitabine. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *57* (12), 5395-5404.
196. Chen, Z.; Li, H.; Bian, Y.; Wang, Z.; Chen, G.; Zhang, X.; Miao, Y.; Wen, D.; Wang, J.; Wan, G.; Zeng, Y.; Abdou, P.; Fang, J.; Li, S.; Sun, C.-J.; Gu, Z., Bioorthogonal catalytic patch. *Nature Nanotechnology* **2021**, *16* (8), 933-941.
197. Lozhkin, B.; Ward, T. R., Bioorthogonal strategies for the in vivo synthesis or release of drugs. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2021**, *45*, 116310.
198. Rubio-Ruiz, B. n.; Pérez-López, A. M.; Bray, T. L.; Lee, M.; Serrels, A.; Prieto, M.; Arruebo, M.; Carragher, N. O.; Sebastián, V.; Unciti-Broceta, A., High-precision photothermal ablation using biocompatible palladium nanoparticles and laser scanning microscopy. *ACS applied materials & interfaces* **2018**, *10* (4), 3341-3348.
199. Tang, S.; Chen, M.; Zheng, N., Sub-10-nm Pd Nanosheets with Renal Clearance for Efficient Near-Infrared Photothermal Cancer Therapy. *Small* **2014**, *10* (15), 3139-3144.
200. Shanthi, K.; Vimala, K.; Gopi, D.; Kannan, S., Fabrication of a pH responsive DOX conjugated PEGylated palladium nanoparticle mediated drug delivery system: an in vitro and in vivo evaluation. *Rsc Advances* **2015**, *5* (56), 44998-45014.
201. Pan, Y.; Heryadi, D.; Zhou, F.; Zhao, L.; Lestari, G.; Su, H.; Lai, Z., Tuning the crystal morphology and size of zeolitic imidazolate framework-8 in aqueous solution by surfactants. *CrystEngComm* **2011**, *13* (23), 6937-6940.
202. Beh, J. J.; Lim, J. K.; Ng, E. P.; Ooi, B. S., Synthesis and size control of zeolitic imidazolate framework-8 (ZIF-8): From the perspective of reaction kinetics and thermodynamics of nucleation. *Materials Chemistry and Physics* **2018**, *216*, 393-401.



## 9. CONFLICTOS DE INTERÉS, DERECHOS Y PERMISOS

### ANEXO I: Conflictos de interés

El doctorando, Aitor Álvarez Lorenzo, declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

Santiago de Compostela, 20 de julio de 2023

### ANEXO II: Derechos y permisos

**Figura 3:** Hidrofobización de NPs de Au mediante su funcionalización en dos etapas: (1) PEGilación en agua (panel superior) mediante el desplazamiento de ligandos hidrofílicos (representados en azul) por moléculas de PEG-SH (representadas en rojo claro), seguido de la transferencia de fase a una solución de cloroformo que contiene alquilaminas (representadas en rojo oscuro). (Adaptado con permiso de la referencia Hühn, J.; Carrillo-Carrion, C.; Soliman, M. G.; Pfeiffer, C.; Valdeperez, D.; Masood, A.; Chakraborty, I.; Zhu, L.; Gallego, M.; Yue, Z.; Carril, M.; Feliu, N.; Escudero, A.; Alkilany, A. M.; Pelaz, B.; del Pino, P.; Parak, W. J., Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. Chemistry of Materials 2017, 29 (1), 399-461.).

**Figura 4:** Los núcleos de las NPs (representados en gris), que están cubiertos con ligandos hidrofóbicos (representados en rojo), son modificados con un polímero anfifílico (el esqueleto hidrofílico dibujado en azul y las cadenas laterales hidrofóbicas dibujadas en rojo). El núcleo de la NP se incrusta en la micela de polímero resultante, lo que da como resultado una superficie de NP hidrofílica. (Adaptado con permiso de la referencia Hühn, J.; Carrillo-Carrion, C.; Soliman, M. G.; Pfeiffer, C.; Valdeperez, D.; Masood, A.; Chakraborty, I.; Zhu, L.; Gallego, M.; Yue, Z.; Carril, M.; Feliu, N.; Escudero, A.; Alkilany, A. M.; Pelaz, B.; del Pino, P.; Parak, W. J., Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles. Chemistry of Materials 2017, 29 (1), 399-461.).

Selected Standard Protocols for the Synthesis, Phase Transfer, and Characterization of Inorganic Colloidal Nanoparticles



Author: Jonas Hühn, Carolina Carrillo-Carrion, Mahmoud G. Soliman, et al

Publication: Chemistry of Materials

Publisher: American Chemical Society

Date: Jan 1, 2017

Copyright © 2017, 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.

**Figura 7:** Rotación de Néel vs. rotación browniana. (A) Rotación de Néel: el momento magnético rota mientras la partícula permanece fija. (B) Rotación Browniana: el momento magnético permanece fijo con respecto a los ejes cristalinos mientras la partícula rota. (Adaptado con permiso de la referencia Deatsch, A. E.; Evans, B. A., Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2014**, 354, 163-172.)

---

LSEVIER  
TERMS AND CONDITIONS

LICENSE

May 27, 2023

---



---

This Agreement between Aitor Álvarez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5557290562160
License date	May 27, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Magnetism and Magnetic Materials
Licensed Content Title	Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia
Licensed Content Author	Alison E. Deatsch, Benjamin A. Evans
Licensed Content Date	Mar 1, 2014
Licensed Content Volume	354
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	10
Start Page	163
End Page	172
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	NPs plasmónicas para manipulación en célula viva
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Jul 2023
Order reference number	1
Portions	Fig. 1
Specific Languages	"Spanish"
Requestor Location	Aitor Álvarez Avenida de Vilagarcía, 14 7d
Publisher Tax ID	Santiago De Compostela, La Coruña 15706 Spain Attn: Aitor Álvarez
Total	GB 494 6272 12 0.00 USD

**ANEXO IV:**

**El resto de las figuras** mostradas en esta tesis doctoral han sido personalmente elaboradas por el autor de esta tesis.



**ANEXO V:**

**Los resultados del capítulo 3 (apartado 3.3.1) han sido publicados en:**

Photothermal effects on protein adsorption dynamics of PEGylated gold nanorods. *Applied Materials Today*, Volume 15, Pages 599-604 (2019). ISSN 2352-9407.

*Ester Polo*<sup>a\*</sup>, *Vida Araban*<sup>a,b</sup>, *Beatriz Pelaz*<sup>a</sup>, *Aitor Alvarez*<sup>a</sup>, *Pablo Taboada*<sup>c</sup>, *Morteza Mahmoudi*<sup>d</sup>, *Pablo del Pino*<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> *Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CiQUS), Departamento de Física de Partículas, Universidade de Santiago de Compostela, 15782, Santiago de Compostela, Spain*

<sup>b</sup> *Department of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

<sup>c</sup> *Departamento de Física de Partículas, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

<sup>d</sup> *Department of Anesthesiology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, USA*

Factor de impacto 8.3. Q1 en ciencias de los materiales. No son necesarios permisos escritos de Elsevier.

Principal contribución del autor de la tesis a este estudio:

Contribución experimental: Síntesis, funcionalización y caracterización de los AuNRs.



Photothermal effects on protein adsorption dynamics of PEGylated gold nanorods

Author: Ester Polo, Vida Araban, Beatriz Pelaz, Aitor Alvarez, Pablo Taboada, Morteza Mahmoudi, Pablo del Pino

Publication: *Applied Materials Today*

Publisher: Elsevier

Date: June 2019

© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>





En esta tesis se investiga la síntesis, funcionalización y degradación de nanopartículas (NPs) plasmónicas con posibles aplicaciones en biomedicina. Se analiza su interacción con proteínas y su encapsulación en la Estructura Zeolítica de Imidazolato-8 (ZIF-8) para utilizarlas como sustratos en la Espectroscopía Raman Intensificada en Superficie. Además, se aborda la síntesis de NPs magnéticas, estudiando el impacto del dopaje con Co en sus propiedades magnéticas y la encapsulación de estas NPs magnéticas en ZIF-8, lo que da lugar a nanocompuestos que podrían servir como portadores de fármacos activados por campos magnéticos alternos. Por último, se investiga la influencia de la funcionalización de NPs de Pd, evaluando su eficacia catalítica en la reducción de azul de metileno y su posterior encapsulación en ZIF-8.