

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2021

331

Adán Mateu Roldán

Nanopartículas magnéticas de hierro y carbono para aplicaciones en Biomedicina

Director/es

MARQUINA GARCÍA, CLARA ISABEL
IBARRA GARCÍA, MANUEL RICARDO

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE HIERRO Y
CARBONO PARA APLICACIONES EN
BIOMEDICINA**

Autor

Adán Mateu Roldán

Director/es

**MARQUINA GARCÍA, CLARA ISABEL
IBARRA GARCÍA, MANUEL RICARDO**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Física

2021



Departamento de
Física de la
Materia Condensada
Universidad Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

Tesis Doctoral

Nanopartículas magnéticas de hierro y carbono para aplicaciones en Biomedicina

Autor

Adán Mateu Roldán

Directores

Dr. Ricardo Ibarra García

Dra. Clara Marquina Garcia

Facultad de Ciencias/Departamento de Física de la
Materia Condensada

2020



La victoria siempre es posible para la persona que niega a dejar de pelear.

Napoleón Hill

Índice

Índice	5
Agradecimientos	13
Resumen	19
Referencias	23
Abreviaturas	25
Capítulo I: Introducción	31
1.1 Nanotecnología, nanociencia y nanopartículas magnéticas	33
1.2 Conceptos básicos de magnetismo en sistemas de nanopartículas	36
1.2.1 – Tipos de comportamiento magnético-Superparamagnetismo	36
1.2.2 Mecanismos de relajación en nanopartículas magnéticas	42
1.3 Aplicaciones en biomedicina.....	44
1.3.1 Hipertermia e hipertermia magnética	45
1.3.2 Liberación de fármacos.....	48
1.3.2.1 Portadores magnéticos para liberación local de fármacos.....	49
1.4 Nanopartículas magnéticas de hierro y carbono	53
1.5 Objetivos de la tesis	57
Referencias	58
Capítulo II: Materiales y métodos	75
2.1 Técnicas experimentales.....	77
2.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM).....	77
2.1.2 Difracción de rayos X.....	79
2.1.3 Caracterización magnética mediante medidas de imanación.....	81
2.1.3.1 Magnetometría SQUID	81
2.1.3.2 Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)	83
2.1.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	84
2.1.5 Dispersión dinámica de luz (<i>Dynamic Light Scattering</i> , DLS)	86
2.1.6 Espectroscopia Raman.....	88
2.1.7 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)	92
2.1.8 Potencial Z.....	94

2.1.9 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (X-ray Photon Spectroscopy, XPS)	95
2.1.10 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS)	97
2.1.11 Análisis termogravimétrico (TGA)	99
2.1.12 Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES)	100
2.1.13 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).....	101
2.1.14 Citometría de flujo	104
2.2 Síntesis de nanopartículas.....	106
2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Fe@C.....	106
2.2.2 Síntesis de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ @C	107
2.2.3 Síntesis de nanopartículas de Fe _{2.2} C.....	108
2.2.3.1 Síntesis de nanopartículas de Fe (0).....	108
2.2.3.2 Síntesis de nanopartículas de Fe _{2.2} C.....	109
2.3 Funcionalización de nanopartículas.....	110
2.3.1. Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C con dopamina/Poly-L-Lisina	110
2.3.2 Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C con dopamina/PEG-NH ₂	112
2.3.3 Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C con ácido caféico/NH ₂ -PEG-NH ₂	113
2.3.4 Funcionalización de nanopartículas de Fe _{2.2} C con ácido caféico/NH ₂ -PEG-NH ₂	114
2.3.5 Funcionalización de nanopartículas de Fe _{2.2} C con catecol-PEG	115
2.4 Experimentos <i>in-vitro</i>	116
2.4.1 Ensayos de viabilidad celular con células de la línea BV2.....	117
2.4.2 Ensayos de viabilidad con células A431 y A549.....	118
2.4.3 Cultivos de células HeLa y J774.....	119
2.4.4 Estudio de adsorción y desorción de fármacos	121
Referencias	122
Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C.....	131
3.1 Nanopartículas obtenidas mediante síntesis física (Fe@C)	133

3.1.1 Difracción de rayos X.....	133
3.1.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	136
3.1.3 Espectroscopia Raman.....	139
3.1.4 Determinación de hierro en las nanopartículas de Fe@C por ICP-OES	146
3.1.5 Caracterización magnética – medidas de imanación	146
3.1.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (XPS).....	148
3.1.7 Dispersión dinámica de luz (DLS).....	153
3.1.8 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)	154
3.2 Nanopartículas obtenidas mediante síntesis química (Fe ₃ O ₄ @C).....	156
3.2.1 Difracción de rayos X.....	157
3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	158
3.2.3 Espectroscopia Raman.....	160
3.2.4 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS)	162
3.2.5 Caracterización magnética – medidas de imanación	163
3.2.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (XPS).....	167
3.2.8 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)	175
3.3 Conclusiones.....	176
Referencias	177
Capítulo IV: Caracterización fisico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas	187
Introducción.....	189
4.1 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L- Lisina	192
4.1.1 Nanopartículas Fe@C	192
4.1.2 Nanopartículas Fe ₃ O ₄ @C	199
4.2 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂	203
4.2.1 Nanopartículas Fe@C	203
4.2.2 Nanopartículas Fe ₃ O ₄ @C	207
4.3 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico/NH₂- PEG-NH₂	213
4.3.1 Nanopartículas Fe@C	213

4.3.2 Nanopartículas Fe ₃ O ₄ @C	218
4.4 Conclusiones.....	223
Referencias	225
Capítulo V: Experimentos <i>in vitro</i>	235
Introducción.....	237
5.1 Ensayos de viabilidad celular	239
5.1.1 Ensayos de viabilidad celular con las líneas celulares A431 (células de carcinoma epidermoide) y A549 (células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas)	239
5.1.2 Ensayos de viabilidad celular con la línea celular BV2 (macrófagos murinos)	242
5.1.2.1 Ensayos de viabilidad celular con las nanopartículas de Fe@C y Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina	244
5.1.2.2 Ensayos de viabilidad celular de las nanopartículas de Fe ₃ O ₄ @C y Fe ₃ O ₄ @C-ácido caféico/NH ₂ -PEG-NH ₂	245
5.1.3 Ensayos de viabilidad de las líneas celulares HeLa (células epiteliales de cáncer cérvico-uterino) y J774 (macrófagos reticulares de ratón BALB/c)	247
5.1.3.1 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C en macrófagos reticulares murinos BALB/c (línea celular J774).....	250
5.1.3.2 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C en células HeLa	254
5.2 Internalización de las nanopartículas de Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C por macrófagos murinos J774.....	259
5.2.1 Estudio de la internalización celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)	259
5.2.2 Estudio de la degradación del recubrimiento de las nanopartículas Fe@C y Fe ₃ O ₄ @C por macrófagos mediante espectroscopía Raman.....	269
5.3 Experimentos de adsorción y desorción de fármacos.....	277
5.4 Conclusiones.....	279
Referencias	281
Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro Fe _{2.2} C y su funcionalización	289
Introducción.....	291
6.1 Caracterización de nanopartículas de carburo de hierro Fe _{2.2} C	294

6.1.1 Caracterización de nanopartículas de Fe (0).....	295
6.1.1.1 Difracción de rayos X.....	295
6.1.1.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	296
6.1.1.3 Caracterización magnética	296
6.1.1.4 Medida del coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)	297
6.1.2 Caracterización de nanopartículas de Fe _{2.2} C	299
6.1.2.1 Difracción de rayos X.....	299
6.1.2.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM).....	300
6.1.2.3 Caracterización magnética	300
6.1.2.4 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR).....	302
6.1.2.5 Análisis termogravimétrico (TGA)	303
6.2 Caracterización de nanopartículas Fe _{2.2} C funcionalizadas con polímeros orgánicos.....	304
6.2.1 Caracterización de nanopartículas Fe _{2.2} C funcionalizadas con ácido caféico/NH ₂ -PEG-NH ₂	304
6.2.2 Caracterización de nanopartículas Fe _{2.2} C funcionalizadas con Catecol-PEG.....	307
6.3 Síntesis del polímero Catecol-(CH ₂) ₈ -PEG para la funcionalización de nanopartículas magnéticas Fe _{2.2} C	309
6.3.1 Oxidación PEG-OCH ₃	310
6.3.2 Síntesis del ligando Catecol-(CH ₂) ₈	311
6.4 Conclusiones.....	320
Referencias	321
Capítulo VII: Conclusiones generales y perspectivas de trabajo futuro	327

Agradecimientos

La tesis se acaba...o eso parece. Ha sido un camino muy largo y duro (con una pandemia de por medio) y todo esto, no se puede hacer solo. Por eso, ahora toca agradecer a todas las personas que en mayor o en menor medida han estado durante este camino y han hecho que todo fuera más fácil.

En primer lugar tengo que agradecer a mis dos directores de tesis, Clara Marquina y Ricardo Ibarra por su apoyo, esfuerzo y paciencia que han tenido conmigo durante toda la tesis doctoral. Sin su compromiso hace ya más de cinco años (con un primer contrato de iniciación a la investigación en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA), no podría haber comenzado, ni tampoco terminado, esta aventura que ahora termina. Así que solo puedo agradecerles el trabajo y el tiempo que han invertido en mí durante estos años. También doy las gracias por el apoyo financiero recibido, a través de los distintos proyectos de investigación de mis directores en la Universidad de Zaragoza y en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Agradecer también a todo el personal de administración y a todos los técnicos del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA (hoy Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, INMA), de la Facultad de Ciencias y del Instituto de Nanociencia de Aragón, INA. Gracias a Alfonso y Rodrigo por las horas de paciencia en las sesiones de TEM, a Íñigo por estar y enseñarme en todas las sesiones de tantos equipos que he solicitado, a Concha por conseguir hacer medidas de muestras imposibles, a Pavel por permitirme trabajar con total libertad en sus equipos, a Ana por el uso del SQUID, a Guillermo por el trabajo realizado en sus equipos para obtener información para mi tesis. Al grupo de la Profesora Teresa Sierra, del Laboratorio de Cristales Líquidos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza), y al grupo de los Profesores Babil Menjón y José María Casas, del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea-ISQCH (CSIC-Universidad de Zaragoza) y del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza por poder trabajar con total libertad utilizando sus instalaciones, que me han permitido desarrollar sin ninguna pega mi trabajo y también

dar las gracias a los estudiantes de los dos grupos que me han ayudado en todo el momento y han sido de gran ayuda en los momentos en los que las cosas no iban bien.

En esta tesis, he tenido que viajar más que el baúl de la Piquer y por tanto, no me puedo olvidar tampoco de agradecer a todas las personas con las que he compartido laboratorio por el mundo.

Donde más tiempo he estado ha sido en Toulouse (Francia). En dos ocasiones he tenido que estar allí y no me he podido sentir más en casa como allí. Gracias al Profesor Bruno Chaudret por el apoyo educativo y económico, que me ha permitido seguir adelante en más de una ocasión en esta tesis y también gracias a todos los compañeros del laboratorio del LPCNO en especial a Juanma que más que un “jefe” ha sido un gran compañero dentro y fuera del laboratorio, enseñándome muchos conocimientos sobre las nanopartículas y también adentrándome en la cultura francesa, a pesar de no ser muy fan de ella (sigo pensando que Francia está bien si no fuera por los franceses...)

También agradecer a todo el personal de mi última estancia realizada en Barcelona. Gracias al Profesor Daniel Ruiz-Molina y al Profesor Fernando Novio por darme la oportunidad de ir al Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y utilizar los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de la Universidad Autónoma de Barcelona, así como todo el soporte material que se me ha ofrecido para rematar esta tesis. También a todos los compañeros del laboratorio del Profesor Félix Busqué que me han ayudado con sus conocimientos a mejorar mi trabajo durante la estancia.

Y por último la más corta pero no la menos importante la estancia en Santander en el laboratorio de la Profesora Mónica López Fanarraga de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria. Gracias a ella y a todo su equipo por su apoyo científico y las facilidades puestas para trabajar allí para mí, sin ser una persona experta en el mundo biológico y por todo el trabajo realizado allí por todos ellos que me han ayudado a la hora de obtener unos grandes resultados.

Tampoco puedo olvidarme de nuestros colaboradores de Hong Kong. Tengo que dar las gracias al Profesor King Lun Yeung del Departamento de Ingeniería Química y Biológica y de la División de Medio Ambiente y Sostenibilidad de la Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong (HKUST), en China y a sus estudiantes Opera Zhong y Liu Zhang con los que he trabajado estrechamente en Zaragoza y también desde la distancia obteniendo grandes resultados que luego han abierto la puerta a nuevas investigaciones en esta tesis. Sin su colaboración, no hubiera sido posible.

Pero como he dicho anteriormente todo esto no se hace solo. Gracias a todos mis compañeros de despacho que he tenido en mis innumerables idas y venidas de un lado a otro en la Facultad de Ciencias. También a mis compañeros becarios físicos de la Facultad de Ciencias y del INA que he ido conociendo durante mis años de tesis y con los que hemos ido formando una gran piña. Tantos cafés, y alguna que otra celebración también ha contribuido a hacer un poco más fácil estos años. Gracias por todo a todos.

Y este apoyo viene de lejos, no solo de esta tesis. No podría haber llegado aquí si no es por el apoyo y aguante de mis compañeros de carrera: Antonio, Belén, Marta, Mongrell, Fierro, Leal, Carlos, Gimeno, Irene, Andrés, Delegao, Eva, Jarauta, Joaquín y Paula. (Ahí va ese VAAAAAAAAAAAAASA!!!!) que me aguantan y me soportan desde hace más de 10 años.

Quien me iba a decir que gracias a Estudiabantes (un grupo de jugadores de baloncesto que es *Més que un club*) iba a conocer a gente como: Elena, Fer, Bernad, Javi, Amanda, Diego, Pol, Jorge, Joaquín (Dame un premio!), Marcos, Ba y Juan. Vosotros también debéis estar aquí presentes. Después de tantos años y tantas aventuras universitarias (noches de Kenbo, Babia, Salou en Pol's, Los Premios Toquero...) no puedo más que daros las gracias y que las aventuras no terminen.

Y en especial a mis grandes amigos de siempre, mi tontería infinita: Raquel, María, Ana, Laura B., Elisa, Ari, Pablo, Jesús y Laura. Ellos que aunque no entienden nada de lo que hago, hacen muchos esfuerzos con mucho humor para intentar comprenderlo y que sin

ellos nada hubiera sido igual (¡Por el alcohol! Causa y a la vez solución, de todos los problemas de la vida).

En la soledad de la escritura de la tesis delante del ordenador y de tantas semanas encerrado por una pandemia, ha habido muchos programas de televisión, radio, podcast, internet, que me han acompañado y que también quiero agradecer. A todo el humor de la SER: Comedia Perpetua, Si sí o si no, Nadie Sabe Nada (*samanté*) y como no a La Vida Moderna. A muchos programas de Movistar + como: LocoMundo, Ilustres Ignorantes, Late Motiv y La Resistencia. Y por último al gran descubrimiento futbolístico de mi tesis La media Inglesa (Youtube y Podcast). Todos ellos juntos me animan y hacen que los ratos menos agradecidos de esta tesis hayan sido mucho más llevaderos.

Para finalizar y no menos importante a mi familia. A mis tíos que desde pequeño me han cuidado y todavía no he podido devolver todo lo que ellos han hecho por mí. A mis abuelos que me han visto nacer, crecer, me han educado, me han dado todo su cariño y que durante esta tesis me han visto empezar y que ahora, estéis donde estéis, sé que estáis muy orgullosos de mí. A mis padres que con paciencia y cariño me han hecho ser el hombre que soy hoy: mi madre, la que se ha sacado de nuevo la ESO, bachiller y parte de la carrera conmigo y a mi padre, que aunque se quiso ir, algo le hizo estar aquí para ver todo lo bueno que le queda.

Y por último a ti, Patri. Que has llegado justo al inicio de esta tesis y me has aguantado todo. Mis buenos y mis malos momentos, mis ausencias en mis estancias y en las que siempre has estado a mi lado estuviera donde estuviera. En todos mis agobios y lloros, que no son pocos, y que sabes sacarme una sonrisa cuando más lo necesito. Que en casa aguantas la que más, a mí y al *cuñadísimo* que con tanta paciencia tenemos que aguantar (aunque lo queremos). Con solo tu presencia y tu sonrisa, todo es más fácil. Te quiero.

Resumen

Las nanopartículas forman una nueva clase de materiales que poseen unas propiedades únicas que sobrepasan los límites moleculares y el estado sólido masivo. Poseen un amplio rango de tamaños y de variedad formas, con diferentes propiedades magnéticas, electrónicas, ópticas y químicas (Klabunde and Richards 2009). Las nanopartículas se han convertido en el foco fundamental de muchas investigaciones debido a sus numerosas y relevantes aplicaciones en áreas como la catálisis homogénea, comunicaciones ópticas, detección de gases, nanoelectrónica, medicina etc.

El trabajo de investigación que se presenta en esta tesis doctoral está dirigido a la síntesis y caracterización fisicoquímica de nanopartículas magnéticas, para aplicaciones en Biomedicina. Por ello se ha dedicado un importante esfuerzo al estudio de su citotoxicidad y de su adecuación como portadores de fármacos guiados magnéticamente. Las nanopartículas estudiadas están compuestas de hierro y carbono. En concreto, se han estudiado dos tipos de nanopartículas *core-shell* con núcleo de hierro y óxidos de hierro magnéticos recubiertas de carbono (nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C), y unas nanopartículas de carburo de hierro.

Este trabajo se divide en dos partes: en la primera se presenta un estado del arte sobre los temas centrales de esta tesis doctoral, así como las técnicas experimentales y los materiales utilizados para la síntesis y funcionalización de las nanopartículas magnéticas. En la segunda parte se expone una caracterización exhaustiva de las nanopartículas magnéticas y una comparación de cómo cambian sus propiedades antes y después de su funcionalización con polímeros orgánicos. Por último, se presentan los ensayos *in vitro* para el estudio de su citotoxicidad y de su capacidad para la adsorción/liberación de fármacos.

En el *Capítulo I: Introducción* se presenta un breve resumen sobre la historia de la nanociencia y la nanotecnología hasta nuestros días, conceptos básicos de magnetismo de nanopartículas y un resumen sobre la síntesis y usos de nanopartículas magnéticas, y del carbono como recubrimiento de nanopartículas. Al final del capítulo se exponen la motivación y los objetivos del estudio llevado a cabo con las nanopartículas *core-shell* y con las de carburo de hierro.

En el *Capítulo II: Materiales y métodos* se presentan las técnicas experimentales utilizadas para la caracterización de las nanopartículas magnéticas y los ensayos *in vitro* realizados. También se describen los métodos de síntesis y funcionalización de estas nanopartículas.

El *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C* recoge la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C.

En el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas* se presenta la caracterización de las nanopartículas una vez funcionalizadas con los polímeros orgánicos seleccionados.

El *Capítulo V: Experimentos in vitro* abarca los resultados de los experimentos *in vitro* realizados con las nanopartículas magnéticas de Fe@C y Fe₃O₄@C (con y sin funcionalización), así como el estudio de su internalización celular, la degradación en el interior de las células y su citotoxicidad. Se presentan también los experimentos de adsorción y desorción de fármacos.

En el *Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro Fe_{2.2}C y su funcionalización* se presenta el trabajo realizado durante la estancia predoctoral en el LPCNO (*Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets*, Toulouse, Francia) donde se desarrolló la síntesis, caracterización, funcionalización y puesta a punto de nanopartículas magnéticas de carburo de hierro (Fe_{2.2}C) con el objetivo de utilizarlas para aplicaciones en Biomedicina.

Para finalizar, en el *Capítulo VII: Conclusiones generales y perspectivas de futuro* se presenta un resumen de los objetivos alcanzados y las posibles líneas de trabajo que quedan abiertas a partir de esta tesis doctoral.

Las referencias se encuentran ordenadas alfabéticamente al final de cada capítulo para un manejo más sencillo de la bibliografía. También se incluye una lista de abreviaturas tras esta sección.

Referencias

Klabunde, K.J., and R.M. Richards. 2009. *Nanoscale Materials In Chemistry*.
2nd ed.

Abreviaturas

η : Viscosidad dinámica del solvente	DIPEA: N,N-Diisopropiletilamina
τ_B : Tiempo de relajación de Brown	DLS: Dispersión dinámica de la luz
τ_{eff} : Tiempo de relajación efectivo	DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium
τ_N : Tiempo de relajación de Néel	DMF: Dimetilformamida
μ : Momento magnético	DMPI: Peryodano de Dess-Martin
μl : Microlitros	E_a : Energía de anisotropía magnetocristalina
χ_v : Susceptibilidad magnética de volumen	EDTA: Ácido tetraacético
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$: Maghemita	eV: Electronvoltio
a.c.: Corriente alterna	ESCA: Espectroscopia electrónica para análisis químico
ACF: Función de autocorrección	Et_3N : Trietilamina
ADN: Ácido desoxirribonucleico	FBS: Suero fetal bobino
AF: Ácido ferúlico	Fe: Hierro
Ar: Argón	Fe@C: Nanopartículas de hierro recubiertas de carbono grafitico
ARN: Ácido ribonucleico	$\text{Fe}_{2,2}\text{C}$: Carburo de hierro
Br: Bromo	Fe_3C : Cementita
CH_2Cl_2 : Diclorometano	$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: Cloruro de hierro (II) tetrahidratado
C_{LIQ} : Capacidad de calor específicas del medio líquido	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: Cloruro de hierro (III) hexahidratado
C_{MNPs} : Capacidad de calor de las nanopartículas magnéticas	Fe_3O_4 : Magnetita
Co: Cobalto	$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@C}$: Nanopartículas de magnetita recubiertas de carbono amorfo
COVID-19: Coronavirus Disease 2019	
Cu: Cobre	

FTIR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier	K_V : Constante de anisotropía correspondiente al volumen de la nanopartícula
Gd: Gadolinio	L: Longitud del cristal
H ₂ : Hidrógeno	M: Concentración Molar
H ₂ O: Agua	MeOH: Metanol
HBSS: Solución salina de Hanks	mg: Miligramos
HCl: Ácido clorhídrico	MgSO ₄ : Sulfato de magnesio
H _c Campo coercitivo	mL: Mililitros
HDA: Hexadecilamina	mmol: Milimoles
HRTEM: Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución	Mn: Manganeseo
I: Yodo	MPS: Sistema fagocítico mononuclear
ICP-OES: Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado	M _r : Imanación remanente
IR: Infrarojo	MRI: Resonancia magnética por imagen
K _a : Constante de anisotropía magnetocristalina	M _s : Imanación de saturación
k _B : Constante de Boltzmann	mT: Militesla
K _{eff} : Constante de anisotropía efectiva	MTT: Bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio
KSCN: Tiocianato de potasio	NaHCO ₃ /Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O: Hidrogeno carbonato de sodio/Tiosulfato de sodio pentahidratado
K _{surf} : Constante anisotropía de superficie	Na ₂ SO ₃ : Sulfato de sodio
kHz: Kilohercios	NH ₃ : Amoniac
kOe: KiloOersted	nm: Nanometro
	O: Oxígeno

Oe: Oersted	V _h : Volumen hidrodinámico
PCS: Espectroscopia de correlación fotónica	VSM: Magnetómetro de vibración de muestra
PEG: Polietilenglicol	XPS: Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
PPh ₃ : Trifenilfosfina	XRD: Difracción por rayos X
RES: Sistema retículo endotelial	W/g: Vatio/gramo
RMN: Resonancia magnética nuclear	ZFC/FC: Enfriamiento a campo cero y enfriamiento con campo magnético
RF: Radiofrecuencia	Zn: cinc
rpm: Revoluciones por minuto	
ROS: Especies reactivas de oxígeno	
SAR: Coeficiente de absorción específica de potencia	
SARS-CoV 2: Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2	
SQUID: Superconductor de interferencia cuántica	
T: Temperatura	
TEM: Microscopía de transmisión electrónica	
TGA: Análisis termogravimétrico	
THF: Tetrahidrofurano	
ToF-SIMS: Espectroscopia de masas de iones secundarios de tiempo de vuelo	
UV-vis: Espectroscopía de ultravioleta-visible	
V: Volumen	

Capítulo I: Introducción

Esta tesis doctoral se centra en el estudio de diferentes tipos de nanopartículas magnéticas constituidas de hierro y carbono, teniendo como último objetivo su utilización en aplicaciones biomédicas.

En este capítulo se describen algunas aplicaciones que las nanopartículas magnéticas tienen en el campo de la biomedicina, en particular las relacionadas con el trabajo que se presentará en los capítulos posteriores. Por ello el capítulo incluye un breve resumen sobre conceptos básicos de magnetismo, centrándonos en los relacionados con las aplicaciones en las cuales se pretenden utilizar las nanopartículas magnéticas que se estudian en esta tesis.

El este capítulo se exponen también la motivación y los objetivos concretos de esta tesis doctoral.

1.1 Nanotecnología, nanociencia y nanopartículas magnéticas

La nanotecnología es un nuevo campo interdisciplinar, en el que concurren diferentes ámbitos científicos (física, química, biología, medicina, ingeniería, etc.), con gran auge en los últimos años.

La definición de nanotecnología como “el procesamiento de separación, consolidación y deformación de materiales por un átomo o una molécula” (Taniguchi 1974) fue acuñada por Norio Taniguchi a finales de los 70, aunque la idea de construir cosas “pequeñas” se le atribuye a Richard Feynman en una charla dada en 1959. Feynman, sugirió que debería ser posible, en principio, hacer máquinas a nanoescala que “dispongan los átomos de la manera que nosotros queramos” un proceso que luego se denominó fabricación molecular (Feynman 1959).

Actualmente, *The national nanotechnology initiative* da una definición más actual de la nanotecnología como “la comprensión y el control de la materia en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros”^{†*} (NNI 2013).

La nanociencia, estudia los fenómenos, las propiedades y la respuesta de los materiales a escala atómica, molecular y macromolecular, mientras que la nanotecnología es el diseño, manipulación, construcción, producción y aplicación de estructuras, dispositivos, y sistemas con tamaños menores a 100 nm. A esta escala, y especialmente cuando las dimensiones son menores de 5 nm, las propiedades ópticas, eléctricas y estructurales de la materia difieren significativamente de las del material masivo (Bonnazi 2010).

La investigación en nanociencia y nanotecnología está en continuo crecimiento por lo que las agencias de financiación apoyan la explotación de sus potencialidades en las áreas de química, materiales, ingeniería y medicina. La nanociencia y nanotecnología

^{†*} un nanómetro es la billonésima parte de un metro, i.e., 10^{-9} m. El prefijo nano es una palabra griega que significa “pequeño”.

están alimentando una nueva revolución industrial respaldada por la capacidad científica para fabricar, modelar y manipular objetos con un pequeño número de átomos, y el descubrimiento casi diario de nuevos fenómenos a nanoescala (Koch et al. 2007)(Roco 2003).

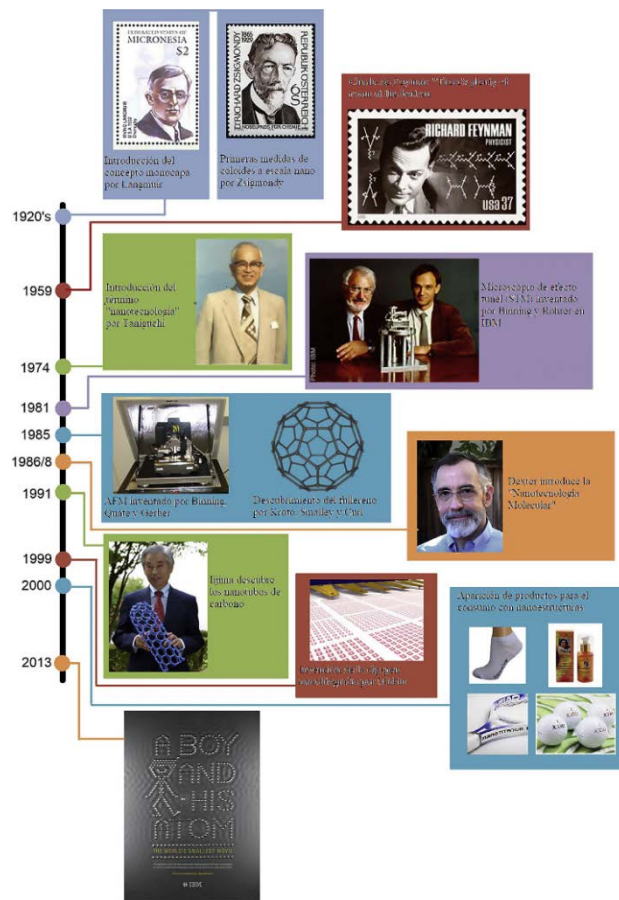


Imagen 1.1. Mayores eventos históricos de la nanociencia y la nanotecnología (imagen modificada de Taniguchi 1974).

La nanotecnología se considera como una tecnología emergente debido a la posibilidad que ofrece de mejorar productos ya existentes y de crear nuevos productos y dispositivos con características totalmente nuevas, lo que representa un enorme potencial para una amplia gama de aplicaciones. Las aplicaciones significativas de la nanotecnología ya se perciben en los campos de la farmacia, cosmética, procesamiento de alimentos, ingeniería

química, materiales de alto rendimiento, electrónica, óptica, producción de energía y medio ambiente (Nunes et al. 2019). Además, la nanotecnología, abre nuevas vías de investigación y conduce a nuevas útiles y a veces inesperadas aplicaciones. Los aparatos electrónicos están contruidos con componentes a nanoescala y mejorar su rendimiento depende de reducir estas dimensiones aún más.

Estas enormes aspiraciones se unen a los desarrollos nanotecnológicos en la moderna medicina. Las posibles aplicaciones en medicina son predominantes en cuanto a técnicas de diagnóstico y, monitoreo de enfermedades, fabricación de prótesis mejores y más duraderas y nuevos sistemas de suministro de medicamentos para enfermedades potencialmente dañinas (S. Logothetidis 2012). También, están surgiendo nuevos tratamientos médicos para tumores cerebrales, enfermedades como Alzheimer, Parkinson, etc.

Entre los numerosos materiales a escala nanométrica, uno de los más prometedores para su utilización en medicina son las nanopartículas magnéticas. Las nanopartículas magnéticas son unos materiales muy prometedores debido a las funcionalidades asociadas al hecho de que poseen momento magnético y a la posibilidad de obtenerlas por diversos métodos con tamaños controlados, desde escasos nanómetros hasta decenas de nanómetros (Roca et al. 2009). Además, hasta la fecha se ha realizado un gran esfuerzo para obtener coloides magnéticos con nanopartículas estables en agua, siguiendo diferentes métodos de síntesis, como, por ejemplo, síntesis hidrotermal, coprecipitación, microemulsión, hidrólisis forzada, y métodos de oxidación-reducción (Lei et al. 2017). Además, al igual que otros tipos de nanopartículas, las nanopartículas magnéticas se pueden recubrir con moléculas orgánicas para hacerlas interactuar con compuestos biológicos (Goesmann and Feldmann 2010). También, se puede hacer uso de su capacidad de interactuar con campos magnéticos continuos o alternos, lo que junto con la permeabilidad de los tejidos humanos a los campos magnéticos abren un amplio campo de aplicaciones.

Las nanopartículas magnéticas más utilizadas son las de óxidos magnéticos de hierro, en concreto la magnetita (Fe_3O_4), la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y algunas ferritas, recubiertas

con diferentes materiales (inorgánicos como la sílica u orgánicos, como algunos polímeros) (Tashkin et al. 2008). En el caso concreto de la medicina, se pueden usar tanto para diagnóstico como para terapia. Por ejemplo, pueden utilizarse como agentes de contraste en imágenes obtenidas mediante resonancia magnética nuclear (*Magnetic Resonance Imaging*, MRI). Las nanopartículas magnéticas también se pueden usar como vehículos para el suministro de medicamentos dirigido magnéticamente al tejido/órgano deseado (Panyam and Labhasetwar 2012)(Allen and Cullis 2004) y como agentes de calentamiento para hipertermia magnética (Andreas Jordan et al. 1999)(Hergt et al. 1998)(Hiergeist et al. 1999)(Andreas Jordan et al. 2001).

Antes de plantear los objetivos concretos de esta tesis, trataremos brevemente aquellos conceptos básicos de magnetismo relacionados con el comportamiento de partículas en la nanoescala, en particular en los relacionados con las dos aplicaciones que hemos mencionado. En las siguientes secciones haremos también una breve introducción a las dos aplicaciones concretas a las cuales va dirigido el estudio que se ha llevado a cabo en esta tesis.

1.2 Conceptos básicos de magnetismo en sistemas de nanopartículas

1.2.1 – Tipos de comportamiento magnético-Superparamagnetismo

La mayoría de las propiedades magnéticas de los materiales, están determinadas por la configuración electrónica de los átomos que lo componen. Solo los electrones desapareados de las capas incompletas contribuyen al momento magnético atómico. Por el hecho de tener espín, los electrones tienen un momento magnético que se conoce como momento magnético de espín (μ_{spin}) (Torres Molina 2015). Además, el movimiento orbital de los electrones alrededor del núcleo produce el llamado momento orbital (μ_{orb}). Desde el punto de vista básico, la suma de los momentos magnéticos orbitales y de spin determina la magnetización del material, que se denota por el vector \vec{M} . El comportamiento magnético de cualquier tipo de material viene dado por la respuesta del vector \vec{M} a un campo magnético externo \vec{H} , la temperatura, tiempo o cualquier otra variable de interés. La imanación \vec{M} representa el momento dipolar

magnético por unidad de volumen. La relación entre la intensidad de M y la del campo magnético H se expresa por (*ecuación 1.1*) (Torres Molina 2015):

$$M = \chi_v H \quad (1.1)$$

donde χ_v es la susceptibilidad magnética de volumen.

La interacción entre los distintos momentos magnéticos atómicos puede dar como resultado diferentes respuestas del material a un campo magnético externo. Atendiendo a estos diferentes comportamientos, los materiales se pueden clasificar en: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos, y ferrimagnéticos. En la *figura 1.1* se muestra esquemáticamente el ordenamiento de los momentos magnéticos para cada uno de estos materiales, así como la respuesta de su imanación a un campo magnético externo (Goya, Grazú, and Ibarra 2008).

Los materiales diamagnéticos son los materiales que tienen una susceptibilidad negativa y muy débil, de manera que “repelen” los campos magnéticos. Por eso la curva M vs H es una recta de pendiente negativa (*ver figura 1.1*) Ejemplos de materiales diamagnéticos son por ejemplo: el agua, bismuto, hidrógeno, helio, gases nobles, cloruro de sodio, cobre, oro, silicio, germanio, grafito, bronce o el azufre (Hummel 2011).

Los restantes tipos de comportamientos magnéticos se dan en aquellos materiales con átomos que contienen electrones desapareados. En los materiales paramagnéticos, en ausencia de campo magnético aplicado, los momentos magnéticos están orientados al azar. Cuando estos materiales se someten a un campo magnético los momentos magnéticos se alinean paralelamente al campo magnético y la imanación aumenta linealmente con el campo. Si están fuertemente acoplados entre sí, por debajo de una cierta temperatura crítica podrá aparecer el ordenamiento ferromagnético, antiferromagnético o ferrimagnético (Hummel 2011).

Los materiales ferromagnéticos son aquellos en los que se produce un ordenamiento de todos los momentos magnéticos en la misma dirección y sentido. Los materiales de este tipo están divididos en dominios magnéticos, regiones del material separadas por las

llamadas paredes de dominio, de manera que todos los momentos magnéticos en un dominio están alineados de la misma manera, independientemente de que esta dirección pueda cambiar de un dominio a otro (Hummel 2011). Al someter un material ferromagnético a un campo magnético intenso, los dominios tienden a alinearse con éste, de forma que aquellos dominios en los que los dipolos están orientados con el mismo sentido y dirección que el campo magnético inductor aumentan su tamaño mientras que los otros disminuyen. De este modo, si el campo magnético es lo suficientemente intenso, estos últimos desaparecen, dando lugar al final a un monodominio. Cuando la imanación de este dominio es totalmente paralela al campo magnético se dice que la imanación ha alcanzado la saturación. Otra característica de los materiales ferromagnéticos es que presentan histéresis, es decir, una vez alcanzado un cierto valor de imanación, si el campo magnético se aplica en sentido contrario, la curva M vs H no se recorre por el mismo camino en sentido inverso. En este caso, al eliminar el campo magnético, la imanación no es cero (como en el estado inicial), sino que tiene un cierto valor conocido como imanación remanente o remanencia. Esto es debido a que la estructura de dominios no recupera su estado inicial y para que esto ocurra es necesario aplicar un determinado campo que se conoce como campo coercitivo. Por todo ello se dice que la curva de imanación típica de un material ferromagnético es un ciclo de histéresis, en los que la imanación de saturación, la remanencia y la coercitividad dependen de cada material (de la interacción entre momentos magnéticos, de su estructura de dominios y de su anisotropía principalmente). Además de en la *figura 1.1*, un ejemplo de ciclo de histéresis se presenta en la *figura 1.2*. El área de esta curva representa el trabajo/la energía invertido/a en la el proceso de magnetización, y es un comportamiento característico de cada material. Ejemplos de materiales ferromagnéticos son el hierro, el cobalto, o el níquel. Los materiales ferromagnéticos dejan de serlo a una cierta temperatura que se conoce como temperatura de Curie, por encima de la cual pasan a estado paramagnético (Fernández-Pacheco Chicón 2008).

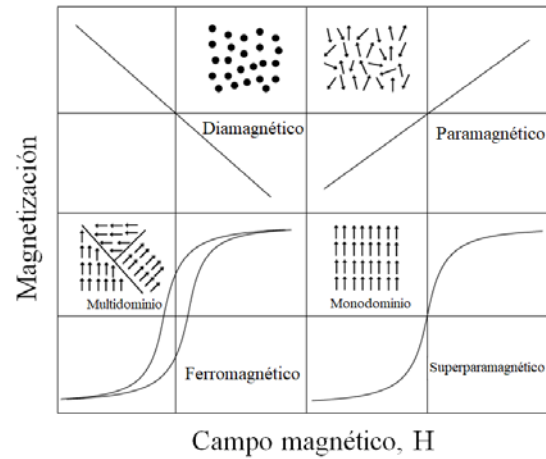


Figura 1.1. Variación de M vs. H para materiales ferromagnéticos, paramagnéticos, diamagnéticos y superparamagnéticos (imagen modificada de Goya, Grazú e Ibarra, 2008).

Por su parte, los materiales antiferromagnéticos pueden considerarse como formados por dos redes de átomos ordenadas cada una de ellas ferromagnéticamente pero en dirección opuesta una respecto de la otra, de manera que en ausencia de campo magnético no se observa imanación neta (Hummel 2011). Al someter el material a un campo magnético, algunos de los momentos magnéticos se alinean paralelamente con él, alineándose también paralelo a sus vecinos, venciendo la interacción antiferromagnética. Generalmente, se requiere un campo magnético muy intenso para conseguir alinear todos los momentos magnéticos en la misma dirección, alcanzando la saturación del material. El orden antiferromagnético desaparece por encima de la temperatura de Néel. El ferrimagnetismo aparece cuando las dos subredes interactúan antiferromagnéticamente pero los momentos magnéticos de cada una de ellas son de diferente magnitud (Hummel 2011).

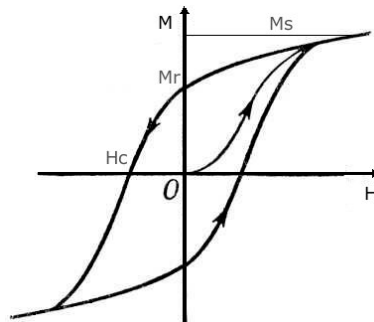


Figura 1.2. Curva de histéresis de un material ferromagnético mostrando la magnetización de saturación M_s , remanencia, M_r , y coercitividad, H_c (figura modificada de Torres Molina, 2015).

Los cuatro tipos de orden magnético mencionados hasta ahora son los más comunes que pueden presentarse en materiales masivos (o materiales *bulk*). Sin embargo, cuando las dimensiones del material se reducen hasta la escala nanométrica puede aparecer un nuevo tipo de comportamiento magnético conocido como superparamagnetismo. Para ello es necesario que el tamaño del material esté por debajo de un cierto tamaño crítico, menor a su vez que el tamaño de un monodominio, dimensión que es característica de cada material. En el caso de nanopartículas magnéticas, es común suponerlas esféricas, por lo que hablamos de diámetro crítico y del diámetro de un monodominio; este suele estar entre 3-50 nm. Como en un monodominio todos los momentos magnéticos están alineados, el momento magnético de cada nanopartícula es la suma de los momentos magnéticos de cada uno de los átomos que la componen, lo que da lugar a un momento magnético muy elevado (Marghussian 2015).

En ausencia de campo magnético, los momentos magnéticos de las nanopartículas están orientados al azar, por efecto de la agitación térmica. Por otra parte, además de la energía térmica la otra contribución a la energía de un sistema de nanopartículas es su energía de anisotropía. El caso más sencillo es suponer que las nanopartículas solo tienen anisotropía uniaxial, es decir que su imanación se orienta indistintamente en uno de los dos sentidos de una única dirección preferencial (Cullity and Graham 1972). En este caso la energía de anisotropía de las partículas, E_a es la energía de anisotropía magnetocristalina, que a su vez es proporcional al producto $K_a V$, donde K_a es la

constante de anisotropía magnetocristalina (que es propia de cada material) y V es el volumen de la nanopartícula. La expresión de la energía de anisotropía es (*ecuación 1.2*) (Torres Molina 2015):

$$E_a(\theta) = K_a V \sin^2(\theta) \quad (1.2)$$

donde θ es el ángulo entre la dirección preferencial (i.e., el eje de anisotropía) y el momento magnético de la partícula. No obstante cuando se trata de nanopartículas muy pequeñas (aproximadamente de unos 2 nm o más pequeñas), la fracción de átomos en su superficie es elevada. Estos momentos magnéticos superficiales pueden no estar alineados con respecto a los átomos que se encuentran en su volumen interno, o bien la superficie de la nanopartícula puede presentar vacantes o defectos etc. (Coey 1971)(Batlle and Labarta 2002). De este modo, los momentos magnéticos en la superficie pueden ser la fuente de anisotropía superficial, lo que da lugar a otra contribución a la energía de anisotropía (Bodker, Morup, and Linderoth 1994). Por ello, la *ecuación 1.3* se puede generalizar para incluir otras fuentes de anisotropía, considerando en vez de K_a una constante de anisotropía efectiva, K_{eff} como la suma de todas las posibles contribuciones:

$$K_{eff} = K_V + K_{surf} \quad (1.3)$$

donde K_V es la constante de anisotropía correspondiente al volumen de la nanopartícula y K_{surf} correspondiente a la anisotropía de superficie.

Para pequeñas desviaciones de la imanación respecto de una dirección favorable, la anisotropía actúa como un campo magnético que trata de mantener la magnetización paralela a ese eje favorable. Este campo se llama campo de anisotropía, H_K , y es paralelo a la dirección favorable (Cullity and Graham 1972).

De acuerdo con la *ecuación 1.3* para un sistema de nanopartículas existen dos posibles estados equivalentes en energía, que corresponden a las dos posibles orientaciones de su momento magnético respecto al eje de anisotropía (i.e., paralela y antiparalela). Estos estados equivalentes están separados por una barrera de energía cuya altura viene dada

por el producto de K_a (o K_{eff}) por el volumen V de la nanopartícula. Si el sistema se encuentra a una temperatura a la cual la energía térmica es mayor que la altura de la barrera, las nanopartículas fluctúan constantemente entre los dos posibles estados, de manera que la imanación total del sistema es cero. Por ello se dice que las nanopartículas se encuentran en estado superparamagnético (Torres Molina 2015). Si por el contrario, la energía de térmica es menor, las nanopartículas están en uno u en otro estado y se dice que están bloqueadas. En esta situación sí se observa imanación en el sistema y la curva M vs H es como la curva típica de un ferromagnético. En estado superparamagnético la curva de imanación frente a campo no presenta ni remanencia ni coercitividad, tal y como se representa en la *figura 1.1*. En el caso ideal de partículas esféricas isótropas y sin interacción entre ellas, la curva M vs H se describe mediante una función de Langevín (Cullity and Graham 1972)(Bean and Livingston 1959). La temperatura a la cual las nanopartículas pasan de estar en estado superparamagnético a estar bloqueadas se llama temperatura de bloqueo, T_B .

1.2.2 Mecanismos de relajación en nanopartículas magnéticas

Consideremos ahora un conjunto de nanopartículas magnéticas con anisotropía uniaxial que se encuentran en un estado inicial con una cierta imanación, resultado de haber aplicado un campo H a una cierta temperatura T . Cuando el campo se lleva a cero, debido a la agitación térmica, las nanopartículas tenderán a invertir su imanación hasta alcanzar el estado de imanación cero. Este proceso tiene lugar con un tiempo característico que es proporcional al factor de Boltzmann $e^{\frac{K_{eff}V}{k_B T}}$, donde k_B es la constante de Boltzmann), ya que esta exponencial da la probabilidad de que una partícula tenga suficiente energía térmica requerida para la inversión superando la barrera de energía de anisotropía. Este proceso activado térmicamente se describe por el modelo Néel-Arrhenius, y este tiempo característico se llama tiempo de relajación de Néel (*ecuación 1.4*) (Torres et al. 2015):

$$\tau = \tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_{eff}V}{k_B T}} \quad (1.4)$$

donde τ_0 es una constante cuyo valor es aproximadamente 10^{-9} segundos. De acuerdo con la *ecuación 1.4*, el tiempo de relajación de Néel depende por tanto del volumen de las partículas V y de la temperatura absoluta T (Brown 1959)(Bean and Livingston 1959). Por tanto, en el proceso conocido como relajación de Néel, lo que tiene lugar es un cambio en la dirección del vector de momento magnético de las nanopartículas, sin que haya una rotación mecánica de las mismas, tal como se representa en la *figura 1.3*.

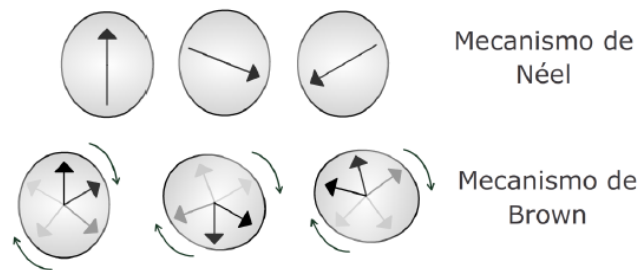


Figura 1.3. Representación de los mecanismos de Néel y de Brown (figura modificada de Morrish, 2001).

Por otra parte, el momento magnético de las nanopartículas también puede cambiar su orientación debido a la rotación de estas, como sucede por ejemplo si se dispersan en un líquido. En este proceso la dirección del momento magnético está fija en la nanopartícula, tal y como se representa en la *figura 1.3*. Este mecanismo se conoce como relajación de Brown y se caracteriza por el tiempo de relajación de Brown τ_B dado por (*ecuación 1.5*) (Torres Molina 2015):

$$\tau_B = \frac{3\eta V_h}{k_B T} \quad (1.5)$$

donde η es la viscosidad dinámica del solvente, V_h es el volumen hidrodinámico de las partículas, k_B corresponde a la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

Como veremos más adelante, al hablar de la hipertermia magnética, la relajación de Brown y la relajación de Néel, juegan un papel importante en la descripción de la

absorción de energía por un fluido que contiene nanopartículas magnéticas bajo un campo magnético alterno.

El tamaño de la partícula es un factor determinante del valor del tiempo de relajación, como puede verse en la *figura 1.4*, que muestra la variación de los tiempos de relajación en función del radio de una partícula de magnetita, para unos valores de anisotropía magnetocristalina y volumen hidrodinámico dados (Rosensweig 2002).

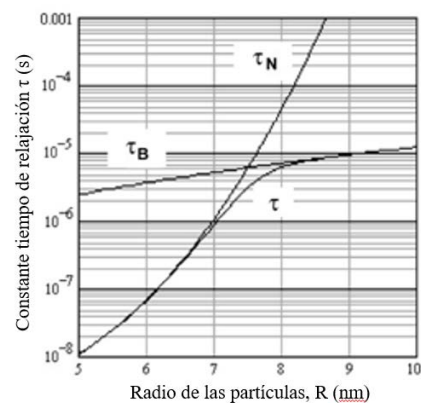


Figura 1.4. Gráfica de la constante de tiempo de relajación frente al radio de las nanopartículas (figura modificada de Rosensweig, 2002).

1.3 Aplicaciones en biomedicina

Las excelentes propiedades magnéticas y la escasa toxicidad demostrada por las nanopartículas de magnetita hacen de las nanopartículas magnéticas en general unas idóneas candidatas para utilizarlas en diferentes aplicaciones en medicina y en otras ciencias de la vida (Fernández-Pacheco Chicón 2008). Debido a su pequeño tamaño, permiten la interacción con estructuras celulares, subcelulares y moleculares, ofreciendo una herramienta de trabajo muy útil para manipular diferentes funciones (Ramos and Castillo 2011). Por otra parte, la capacidad de su momento magnético para interactuar con campos magnéticos, tanto continuos como alternos, amplía su campo de aplicación. Por todo ello las nanopartículas magnéticas se están estudiando para ser utilizadas, por ejemplo, como agentes terapéuticos para el transporte de fármacos a zonas específicas

del organismo (Dobson 2006), y para producir muerte celular mediante hipertermia en respuesta a la aplicación de un campo magnético externo (A. Jordan et al. 1999).

1.3.1 Hipertermia e hipertermia magnética

La hipertermia, es un tratamiento dirigido a elevar la temperatura, por ejemplo, de tejidos cancerosos del cuerpo, a unos 40-43°C, lo que puede llegar a inducir la muerte de las células cancerosas, e incluso en algunos casos, a mejorar los efectos citotóxicos de la quimioterapia y radioterapia. Mediante esta elevación de la temperatura se busca destruir las células cancerígenas mediante la desnaturalización del citoplasma o de las membranas de las proteínas, produciendo también cambios en la organización del citoesqueleto, reduciendo la síntesis de ADN, ARN, o proteínas. (Andreas Jordan et al. 2001)(Baronzio 2006)(DeNardo et al. 2005)(Wust et al. 2002)(Pankhurst et al. 2003)(Hergt et al. 2006)(Fortin et al. 2007)(Colombo et al. 2012)(Fernández-Pacheco Chicón 2008). Por ejemplo, desde hace varios años se está llevando a cabo una amplia investigación preclínica y clínica con una serie de ensayos aleatorios que demuestran que, cuando la hipertermia se combina con radioterapia, tiene el poder potencial de mejorar los resultados de varios tipos de cáncer sin aumentar significativamente la toxicidad (Lutgens et al. 2010)(De Haas-Kock et al. 2009). A pesar de estos resultados prometedores, la hipertermia rara vez se incorpora en la gestión oncológica moderna, debido a su ineficacia cuando se aplica como un tratamiento de modalidad única y a la falta de ensayos clínicos cuando se combina con quimioterapia y radioterapia (van der Zee 2002). Además, una desventaja importante de la hipertermia convencional es que, en general, tanto las células malignas como las no malignas son igualmente sensibles al calentamiento (Dewey et al. 1977)(Roizintowle and Pirro 1991). Por ello, una alternativa a la hipertermia convencional y que ha suscitado un gran interés es el concepto de “*hipertermia magnética dirigida biológicamente*”, mediante la cual las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro, que son las que se van a utilizar para calentar tumores bajo un campo magnético alterno, se administran por vía intravenosa pero de manera dirigida, es decir, de forma que se localicen solamente en el tejido que queremos tratar (Chang et al. 2018).

En el caso de la hipertermia magnética, el calor se genera cuando se aplica un campo magnético alterno a las células que previamente se han cargado de manera selectiva con nanopartículas magnéticas. Es decir, esta terapia se basa en hacer llegar un fluido conteniendo nanopartículas magnéticas solo a las células que se quiere destruir, de manera que la energía absorbida por las nanopartículas cuando interaccionan con el campo magnético a.c., se transfiera solo a aquellas células conteniendo nanopartículas, elevando su temperatura y causando su muerte, sin afectar a las células sanas en el entorno. Como veremos más adelante, la capacidad de calentamiento de las nanopartículas magnéticas

A finales de la década de los 50 (Gilchrist et al. 1957), cuando se introdujo este concepto, se inyectaron nanopartículas magnéticas (de entre 20-100 nm) en canales linfáticos, para calentar células cancerosas residuales bajo un campo magnético alterno. En la década de los 90 (A. Jordan et al. 1993) se demostró que mediante la inyección directa de nanopartículas magnéticas en el tumor podría resultar mucho más efectivo y selectivo en comparación con el calentamiento mediante otras técnicas tales como el calentamiento por radiofrecuencia y ultrasonido.

Además, existen numerosos estudios de ablación térmica *in vitro*. Las nanopartículas se introducen en los cultivos celulares, para probar su biocompatibilidad y su citotoxicidad, y para determinar la interacción de diferentes tipos de nanopartículas con las células en diferentes suspensiones acuosas donde algunas las células no absorben la misma cantidad de nanopartículas que otras, aunque el mecanismo exacto no se conoce por completo (A. Jordan et al. 1999). Desde entonces, se han realizado importantes esfuerzos en el desarrollo de un sistema clínico para el estudio de esta técnica. En las dos últimas décadas, existen estudios clínicos en fase 1 y fase 2 con nanopartículas magnéticas administradas por vía intratumoral y la posterior aplicación de un campo magnético, que están teniendo éxito con pacientes con glioblastoma y cánceres de próstata (M. Johanssen et al. 2005)(M. Johanssen et al. 2007)(Maier-Hauff et al. 2011)(Manfred Johanssen et al. 2007). En estudios clínicos en fase 1 con pacientes con cáncer de próstata se demostró la viabilidad de esta técnica incluso cuando el cáncer ha

sido detectado de manera tardía. Se espera que el tratamiento de hipertermia en tales pacientes pueda controlar el componente más agresivo del tumor y prevenir o retrasar la necesidad de utilizar radioterapia o cirugía.

Hasta la fecha, las nanopartículas más utilizados para la hipertermia magnética son las nanopartículas de ferrita de tamaño nanométrico (10-100 nm), magnetita o maghemita ambas con una alta imanación espontánea (Chang et al. 2018). Aunque la investigación en la utilización de la hipertermia magnética para aplicaciones biomédicas, así como la investigación dirigida a la síntesis y caracterización de nuevas nanopartículas para explorar su potencial uso en hipertermia, ha empezado hace ya varios años, solo se han propuesto algunos modelos teóricos para explicar los mecanismos físicos de absorción de potencia cuando nanopartículas magnéticas dispersadas en medio líquido se someten un campo magnético a.c, como por ejemplo los desarrollados en las referencias (Mamiya 2013)(Carreya, Mehdaoui, and Respaud 2011)(Usov and Liubimov 2012)(Torres et al. 2019).

Cuando un fluido conteniendo nanopartículas magnéticas se expone a un campo magnético alterno, las nanopartículas pueden absorber energía que luego liberarán al medio en forma de calor. Una manera de caracterizar esta capacidad de absorber energía es mediante el llamado factor de absorción de potencia o SAR (Specific Absorption Rate). Las nanopartículas absorben esta energía a través de dos mecanismos principales: las pérdidas por histéresis y por las pérdidas por relajación. Las pérdidas por histéresis ocurren en el caso de nanopartículas suficientemente grandes como para poseer múltiples dominios magnéticos. La energía absorbida por las nanopartículas es la correspondiente al área del ciclo de histéresis que se obtiene como respuesta de la imanación al campo a.c. aplicado. A medida que disminuye el tamaño de las nanopartículas, los mecanismos dominantes son la relajación de Néel y la relajación de Brown descritos en las secciones anteriores, gobernados por sus respectivos tiempos de relajación (*ver ecuaciones 1.4 y 1.5*).

De acuerdo con el modelo de Rosensweig, conocido como *Linear Response Theory* (LRT), si la anisotropía de las nanopartículas es alta (es decir, si el campo de anisotropía

H_K es mayor que el campo aplicado en un experimento de absorción de potencia), la relajación de Néel y la relajación de Brown pueden considerarse como procesos independientes. En este caso puede definirse un tiempo de relajación efectivo, que viene dado por la expresión (ecuación 1.6) (Rosensweig 2002):

$$\tau_{eff}^{-1} = \tau_N^{-1} + \tau_B^{-1} \quad (1.6)$$

Sin embargo, incluso en los casos de nanopartículas con elevada anisotropía, este no es el único parámetro que hay que tener en cuenta al estudiar la absorción de potencia en suspensiones de nanopartículas y a la hora de diseñar/sintetizar dichas nanopartículas para obtener un SAR elevado. Un reciente estudio llevado a cabo por Torres et. al. en suspensiones acuosas de nanopartículas de ferrita de cobalto, ha puesto de manifiesto la estrecha relación que existe entre la imanación, la anisotropía, el diámetro y el volumen hidrodinámico de las nanopartículas y la viscosidad del medio en que se encuentren, con la amplitud y la frecuencia del campo magnético aplicado (Torres et al. 2019).

1.3.2 Liberación de fármacos

La liberación controlada de fármacos es una estrategia no invasiva para tratar ciertas enfermedades. La utilización de nanopartículas magnéticas para suministro de fármacos se basa en cargarlas con el fármaco y dirigir las a hacia la zona deseada, como puede ser un tumor, mediante un gradiente de campo magnético. El objetivo es aumentar la eficacia del tratamiento, de manera que sea posible administrar dosis menores. Por otra parte, el dirigir las selectivamente al lugar donde el fármaco debe actuar, podría idealmente disminuir los efectos secundarios asociados por ejemplo a la quimioterapia. Una vez en el órgano o tejido deseado, el campo magnético podría utilizarse para concentrar allí las nanopartículas (por ejemplo utilizando un implante magnético) y liberar el fármaco de manera controlada, durante la duración del tratamiento. La carga de fármaco o bien se absorbe en la superficie de las nanopartículas magnéticas o se encuentra en el interior de estos nanosistemas. La liberación de fármacos se puede realizar de diferentes maneras: por difusión simple, por mecanismos que requieren actividad enzimática, activación magnética o cambios en condiciones

fisiológicas como el pH, osmolalidad o la temperatura (Alexiou et al. 2000). Cuando las nanopartículas se utilizan para liberación de los fármacos, se deben tener en cuenta dos aspectos muy importantes: el primero es la elección de los portadores magnéticos adecuados y el segundo es cómo dirigirlos hacia el objetivo. Esto último puede llevarse a cabo mediante la aplicación de un campo magnético externo o bien mediante un implante magnético en el órgano diana (Fernández-Pacheco et al. 2007).

1.3.2.1 Portadores magnéticos para liberación local de fármacos

Debido a su biocompatibilidad y a sus propiedades magnéticas, las nanopartículas de magnetita y maghemita, son las más utilizadas como portadores de fármacos. Una posibilidad es utilizarlas encapsuladas en matrices orgánicas (Massart and Cabuil 1987)(Carmen Bautista et al. 2005) o inorgánicas (Fernández-Pacheco et al. 2006) (lo que se conoce como nanopartículas *core-shell*), almacenando el fármaco deseado en su superficie, bien por adsorción o bien mediante algún tipo de enlace químico (Fernández-Pacheco Chicón 2008). Otra alternativa, es su uso en forma de nanocápsulas magnéticas, donde los fármacos están confinados dentro de una cavidad rodeada por una membrana inorgánica (Arruebo et al. 2006) o una capa bilipídica como en el caso de los liposomas magnéticos (Gonzales and Krishnan 2005).

El uso de micro y nanopartículas magnéticas para la administración de fármacos ha evolucionado desde sus orígenes en los años 70 (Arruebo et al. 2006). Los primeros ensayos, se realizaron con partículas de tamaño micrométrico, usando eritrocitos magnéticos para la entrega de fármacos citotóxicos (Zimmermann and Pilwat 1976), y también microesferas de albúmina magnética que encapsulan doxorubicina, un agente de quimioterapia (Widder, Senyei, and Scarpelli 1978). En la década de los 80, se desarrollaron diferentes estrategias para administrar diferentes medicamentos usando microcápsulas y microesferas magnéticas (Kato et al. 1984)(Gupta and Rao 1989)(Widder et al. 1983)(Nakakuki 1986). En los 90 se desarrollaron técnicas para el uso de microesferas de poli (ácido láctico) biodegradables, que incorporaron magnetita y el emisor β ^{90}Y para radioterapia dirigida, y se aplicaron con éxito a tumores subcutáneos (Häfeli et al. 1995).

A mediados de los años 90, se comenzaron a utilizar nanopartículas magnéticas en modelos animales (Lübbe, Bergemann, Huhnt, et al. 1996). El primer ensayo clínico en fase I se realizó con pacientes con cánceres avanzados y pre-tratados sin éxito, utilizando nanopartículas magnéticas cargadas con epirubicina (Lübbe, Bergemann, Riess, et al. 1996). En este primer ensayo se descubrió el mayor problema que tienen las nanopartículas magnéticas como portadores magnéticos: la mayoría acaban localizándose en el hígado, al ser atrapadas por los macrófagos.

El comportamiento de las nanopartículas en el interior del organismo depende de varios factores claves: la química de la superficie, el tamaño (incluido el del núcleo magnético), el volumen hidrodinámico y la distribución de tamaño, y las propiedades magnéticas, especialmente su momento magnético, remanencia y coercitividad.

La química de la superficie es muy importante para dificultar la acción del sistema retículo endotelial (RES) y evitar una eliminación rápida por parte de los macrófagos (Gaur et al. 2000). Dependiendo de su hidrofiliidad o hidrofobicidad, tras su administración, las nanopartículas tienen más probabilidad de ser absorbidas por el sistema fagocítico mononuclear (MPS) y llevadas al hígado, bazo y médula ósea. Las nanopartículas, por lo general, deben recubrirse con un compuesto neutro e hidrófilo, que aumente la circulación en sangre y permanencia en el organismo. Por otra parte, cuando las nanopartículas están en el sistema circulatorio, las diferentes proteínas (anticuerpos) del suero sanguíneo, se unen a la superficie de la nanopartícula (opsonización) de manera que aumenta su tamaño (Fernández-Pacheco Chicón 2008). Por norma general, las nanopartículas con un tamaño más grande tienen mayor toxicidad que las pequeñas y son detectadas antes por los macrófagos (Yin, Too, and Chow 2005). En la *figura 1.5* se representa la dependencia del tiempo de residencia de las nanopartículas en la sangre en función de su tamaño. Por ello muchas veces es conveniente modificar la química de su superficie para evitar la opsonización. Además, uno de los requerimientos más importantes de las nanopartículas magnéticas necesario para aplicaciones médicas es la uniformidad de su tamaño o monodispersidad de la distribución de tamaños. Además, la elección de las nanopartículas para una

determinada aplicación (que a su vez suele determinar la elección del método para su síntesis) se hace en función de un parámetro físico (por ejemplo, la imanación y la susceptibilidad) y tener una dispersión de tamaños daría lugar a un rango de valores de este parámetro característico.

Otro aspecto a evitar, porque puede dificultar su grado de aplicación, es la aglomeración de las nanopartículas. La formación de aglomerados, muy común cuando las nanopartículas se transfieren a un medio líquido, no solo cambia el tamaño sino que también puede cambiar su comportamiento. Esto es especialmente importante en el caso de nanopartículas magnéticas, ya que puede tener influencia, por ejemplo, en procesos de absorción de potencia en campos magnéticos a.c. (y por tanto en su aplicación para hipertermia magnética); o en su relajatividad (determinando su potencial aplicación como agente de contraste para imagen obtenida por resonancia magnética nuclear (Issa and Obaidat 2016).

Todo esto pone de manifiesto la importancia de controlar el estado de agregación de las nanopartículas. Esto, generalmente se hace modificando la superficie de la nanopartículas magnéticas, bien mediante la adición de un recubrimiento (dando lugar a las llamadas nanopartículas *core-shell*), la adición de tensioactivos o bien mediante cambios en la carga superficial, lo que dará lugar a un radio hidrodinámico efectivo. Estos procesos de funcionalización llevan consigo la modificación de la distancia entre partículas individuales dentro del *cluster*, lo que afecta a sus propiedades físicas. El recubrimiento, por ejemplo, puede conducir una cierta ambigüedad en la determinación de la imanación.

Además de depender de su tamaño y de las propiedades químicas de su superficie, el destino y la toxicidad de las nanopartículas, depende de la dosis y vía de administración al cuerpo (Neuberger et al. 2005). La forma de administración puede ser oral o parenteral (incluyendo administración intravenosa, pulmonar, transdérmica, u ocular) siendo las más comunes la administración oral y con inyección intravenosa y, en el caso de tratamiento de tumores cancerígenos, inyección directa en el tumor (Arruebo, Fernández-Pacheco, et al. 2007).

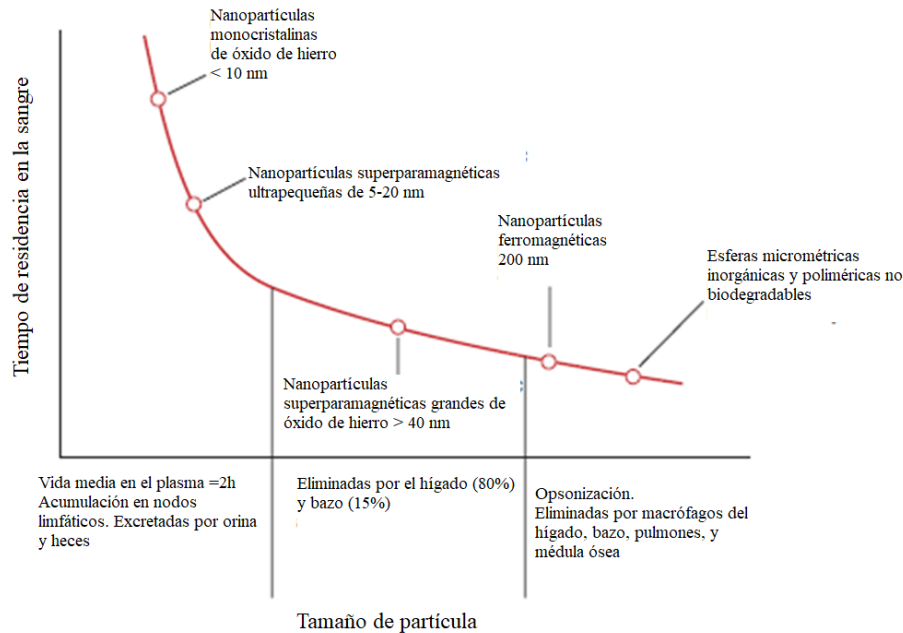


Figura 1.5. Evolución del tiempo de residencia en la sangre de las nanopartículas magnéticas en función del tamaño (figura modificada de Arruebo, Fernández-Pacheco, et al. 2007).

Las nanopartículas magnéticas deben poseer una serie de propiedades para poder ser administradas. Deben ser no tóxicas, no inmunogénicas y, en el caso de administración intravenosa tienen que tener un tamaño que evite la formación de trombos en los conductos capilares. Cuando una nanopartícula magnética ingresa en el torrente sanguíneo, se activan una serie de respuestas que activan el sistema retículo endotelial (RES) que hacen activar a los monocitos para eliminar las nanopartículas magnéticas al hígado, bazo y médula ósea donde se encuentran células residentes (como las células Kupffer en el hígado) que capturan las nanopartículas magnéticas antes de su degradación, si es posible.

Dependiendo de la biodegradabilidad y tamaño, algunas de las nanopartículas magnéticas presentes en los lisosomas de las células Kupffer, pueden incorporarse a la bilis y ser eliminadas en las heces. Otras nanopartículas magnéticas se filtran por los

riñones y se incorporan a la orina. En general, las nanopartículas magnéticas más pequeñas, están sujetas a una rápida eliminación renal, mientras que las más grandes, muestran una absorción por el hígado, el bazo y la médula ósea (Weissleder et al. 1990)(Bonnemain 1998)(Lu et al. 2006)(Gould 2006)(Mornet et al. 2004)(Fernández-Pacheco et al. 2006)(Vonarbourg et al. 2006). Las células eliminarán las partículas más grandes, capaces de ser fagocitadas (por los macrófagos o las células dendríticas), mientras que las nanopartículas magnéticas más pequeñas, se eliminan por las células capaces de endocitarlas (como son los linfocitos B y T). Finalmente, si las nanopartículas magnéticas son biodegradables, sus productos de descomposición, se absorben por cualquier célula mediante pinocitosis.

En nuestros días, se está diseñado un amplio arsenal de materiales para superar los problemas y barreras fisiológicas y asegurar que los fármacos alcancen sus objetivos específicos (Chertok et al. 2013). Además, se conocen una gran variedad de métodos de síntesis química y física para la preparación de nanopartículas magnéticas, con diversos grados de control sobre sus propiedades.

1.4 Nanopartículas magnéticas de hierro y carbono

En esta tesis se han estudiado tres tipos de nanopartículas con el hierro y carbono como constituyentes en común. Estas nanopartículas contienen respectivamente hierro metálico (Fe^0), magnetita (Fe_3O_4), y un carburo de hierro de composición $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$, elegidos por sus relevantes propiedades magnéticas. Todas ellas se han obtenido mediante métodos de síntesis diferentes. Las nanopartículas conteniendo Fe^0 y magnetita son nanopartículas de tipo *core-shell* y en cada caso su recubrimiento consiste en una estructura diferente de carbono. Las nanopartículas de carburo de hierro se han obtenido mediante una carburación de nanopartículas de Fe^0 .

Para las aplicaciones que estamos buscando, en concreto para su aplicación como portadores de fármacos las, nanopartículas tipo *core-shell* tienen grandes ventajas frente a las nanopartículas no recubiertas: el recubrimiento puede elegirse de manera que disminuya su toxicidad (Law et al. 2008), proporcione mayor biocompatibilidad y

citocompatibilidad, y permita la conjugación con otras moléculas bioactivas. Además, el recubrimiento puede aumentar la estabilidad química preservando las propiedades del material en el núcleo (Sounderya and Zhang 2010)(Chatterjee et al. 2014).

La utilización de materiales orgánicos (como polímeros, liposomas, micelas) para recubrir o encapsular los núcleos magnéticos presenta algunos inconvenientes en comparación con los recubrimientos inorgánicos como sílice o carbono. Además de su mayor costo, los materiales orgánicos tienen una menor estabilidad química y mecánica y son propensos a variar su tamaño y contaminarse microbiológicamente (Arruebo et al. 2006). Respecto a los materiales inorgánicos, aunque las ventajas del uso de la sílice, tanto en forma de nanopartículas como de recubrimiento de nanopartículas, son bien conocidas (Yu, Malugin, and Ghandehari 2011)(Arruebo, Fernandez-Pacheco, et al. 2007), los materiales a base de carbono se han aplicado en medicina durante más de cincuenta años en las áreas cardiovascular, ortopédica y dental, como implantes transcutáneos en los que se exigía su durabilidad a largo plazo (Bohem 1966)(Arru et al. 1987)(Jockisch et al. 1992)(Vallana et al. 1993)(Blazewicz, Blazewicz, and Wajler 1994)(Carranza-Bencano et al. 2000). También se han utilizado, por ejemplo, en cultivos *in vitro* para la proliferación y regeneración de células madre mesenquimales multipotenciales (Bokros, Lagrange, and Schoen 1972)(Buttazoni 1987)(Feng and Andrade 1994)(Louis and Dabadie 1990)(Santis et al. 2000)(Blazewicz 2001)(Penalver et al. 2009). En cuanto a la administración de fármacos, uno de los primeros intentos de utilizar nanopartículas de hierro junto con carbón activado se remonta a finales de la década de 1990 (Bittner et al. 1997)(Goodwin et al. 2001). Desde entonces, numerosos grupos de investigación están trabajando en el uso de las múltiples estructuras del carbono en la nanoescala para esta aplicación en particular (Kuznetsov et al. 1999)(Hua, Bao, and Wu 2018)(D. Wang, Y. Ren, Y. Shao, D. Yu 2017).

Trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo de investigación en el campo de la administración de fármacos con nanopartículas de hierro metálico recubiertas de carbono, probaron su capacidad para adsorber y desorber doxorubicina (un fármaco quimioterápico) *in vitro* y estudiaron la cinética de ambos procesos (Teresa et al.

2005)(Fernández-Pacheco et al. 2007). También se sintetizaron con éxito fluidos magnéticos conteniendo nanopartículas magnéticas recubiertas de carbono, que se administraron *in vivo* de forma intravenosa en conejos de Nueva Zelanda (Fernández-Pacheco et al. 2007). Estos experimentos demostraron la idoneidad de estas nanopartículas magnéticas para ser concentradas en una región del organismo (en concreto en un riñón del animal) colocando allí un implante magnético. Diferentes estudios *in vivo* permitieron estudiar la biocompatibilidad de estas nanopartículas y su distribución en el organismo (Marquina and Ibarra 2020)(Escribano et al. 2012), así como la potencialidad de estas nanopartículas como agentes de contraste para diagnóstico mediante resonancia magnética (Marquina and Ibarra 2020). También se llevaron a cabo experimentos similares con las mismas nanopartículas en plantas vivas, para estudiar la penetración y transporte de las nanopartículas *in planta*, y para explorar la posibilidad de utilizar nuestras nanopartículas para el suministro localizado de pesticidas y biomoléculas de interés (Gonzalez-Melendi et al. 2008)(E. Corredor, P.S. Testillano, M.-J. Coronado et al. 2009)(Cifuentes et al. 2010), en analogía con el suministro localizado de fármacos guiando los portadores mediante un gradiente de campo magnético.

Todos estos estudios han demostrado la buena calidad de nuestras nanopartículas, tanto desde el punto de vista de sus propiedades magnéticas (en particular su magnetización) como en cuanto a su biocompatibilidad. Esto se debe principalmente al recubrimiento de carbono que también protege el núcleo magnético evitando su oxidación, evitando la degradación de sus propiedades magnéticas. A lo largo de los años que han durado nuestros estudios hemos comprobado que las nanopartículas mantienen sus propiedades magnéticas incluso en suspensión acuosa, lo que sugiere que el recubrimiento de carbono forma una capa continua no porosa alrededor del núcleo magnético. Nuestra hipótesis es que estas excelentes propiedades del recubrimiento de carbón se deben a las altas temperaturas alcanzadas (alrededor de 3000 °C) en el proceso de síntesis (en un horno de descarga de arco mediante un procedimiento de síntesis física basado en el método de Krätschmer-Huffmann para la producción de fullerenos (Krätschmer et al. 1990). La alta temperatura obtenida con este método propiciaría la formación de capas

de grafeno en la interfaz de pasivación del metal cuando se condensa en una atmósfera inerte.

Los prometedores resultados de nuestro estudio preliminar en el campo de la liberación de fármacos con nuestras nanopartículas recubiertas de carbono (Teresa et al. 2005)(Fernández-Pacheco et al. 2007) y la posibilidad que ofrecen como portadores multifuncionales para aplicaciones *in vivo* han puesto de relieve la necesidad de un estudio detallado de su citotoxicidad. Por otro lado, estudios recientes sobre nanotubos de carbono han demostrado la importancia que tiene la aparición de defectos en su superficie sobre la degradabilidad bioquímica de estas nanoestructuras cuando se encuentran dentro de macrófagos (Gonzalez-Lavado et al. 2018). Por lo tanto, también es necesario profundizar en la investigación del recubrimiento de carbono a nivel sub-nanométrico y en las implicaciones que el recubrimiento puede tener sobre la viabilidad celular. Con la idea de ahondar en este aspecto, en esta tesis doctoral también hemos sintetizado nanopartículas magnéticas recubiertas de carbono amorfo, lo que ha permitido comparar este recubrimiento en forma de matriz de carbono altamente defectuoso y con el recubrimiento en forma de capas concéntricas tipo grafeno. Una de las desventajas del recubrimiento con carbono es que, debido a naturaleza hidrofóbica de su superficie, las nanopartículas son rápidamente detectadas por el sistema del retículo endotelial (RES) (Blazewicz 2001), tal y como mostraron los experimentos llevados a cabo en conejos de Nueva Zelanda. En este estudio se comprobó que, aún en ausencia de implante magnético, las nanopartículas se acumulaban mayoritariamente en el hígado del animal, quince minutos después de su administración intravenosa. Por ello, parte del trabajo desarrollado en esta tesis ha consistido en funcionalizar el recubrimiento de las partículas con algún compuesto con grupos funcionales que eviten la opsonización y que disminuyan el tamaño de los agregados que se forman cuando las nanopartículas están en medio líquido, y en consecuencia impedir la activación del sistema inmunológico.

Por su parte, tanto las nanopartículas magnéticas de Fe_2C como sus predecesoras, las nanopartículas magnéticas de Fe^0 se utilizan desde hace más de 10 años como

catalizadores metálicos de reacciones que tienen lugar a altas temperaturas (Lacroix et al. 2009)(Meffre et al. 2011)(A Bordet et al. 2016)(Alexis Bordet et al. 2016). Las nanopartículas de Fe^0 poseen un elevado valor de imanación de saturación y también altos valores de SAR. Al realizar una carburación con una mezcla *syngas* de CO y H_2 , se obtienen las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$, que, cuando están dispersas en mesitileno, presentan un SAR mucho más elevado que el de las nanopartículas de Fe^0 (Me et al. 2012)(Alexis Bordet et al. 2016)(A Bordet et al. 2016), lo que hace de las nanopartículas de carburo unas buenas candidatas para ser utilizadas como agentes de calentamiento para terapia mediante hipertermia magnética. Sin embargo, las nanopartículas de carburo de hierro son tóxicas y pueden causar daños en tejidos y órganos. Además no son estables al aire por lo que pierden sus propiedades magnéticas (Lacroix et al. 2009)(A Bordet et al. 2016)(Meffre et al. 2011)(Asensio et al. 2019). Por tanto, es imprescindible un buen recubrimiento de los núcleos magnéticos que evite todos estos problemas y que permita además obtener suspensiones estables de estas nanopartículas en agua o en otro fluido biocompatible preservando sus excelentes propiedades magnéticas. Así pues, en esta tesis doctoral se ha dedicado un gran esfuerzo a la síntesis de un polímero biocompatible que permita la futura utilización de las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ para hipertermia magnética y otras aplicaciones en biomedicina.

1.5 Objetivos de la tesis

El estudio de los tres tipos diferentes de nanopartículas magnéticas de hierro y carbono que se presenta en esta tesis tiene como objetivo final su posible utilización como portadores para el suministro de fármacos vectorizados magnéticamente; además, se ha llevado también a cabo un estudio preliminar para explorar su utilización como agentes de calentamiento para hipertermia magnética. De acuerdo con esto se han planteado los siguientes objetivos:

- Estudiar a escala sub-nanométrica el recubrimiento de carbono de las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$ utilizadas previamente por el grupo de investigación en experimentos *in vivo*.

- Desarrollar un nuevo método de síntesis para obtener nanopartículas magnéticas recubiertas de carbono, que sea simple y escalable, para obtener una cantidad de nanopartículas mayor que la obtenida en la síntesis de las nanopartículas de Fe@C.
- Realizar un estudio comparativo de la influencia del tipo de recubrimiento carbonoso en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas obtenidas por ambos métodos.
- Obtener suspensiones de ambos tipos de nanopartículas en medio acuoso, para su utilización en experimentos *in vitro* y futuros experimentos *in vivo*.
- Estudiar la interacción entre las nanopartículas sintetizadas y células de distintas líneas celulares para evaluar la toxicidad *in vitro* de las nanopartículas. Este estudio se llevará a cabo en macrófagos murinos, células murinas de microglía BV2, en células humanas de cáncer cervico-uterino HeLa y también en células de pulmón y piel humanos (seleccionadas por estar involucradas en la interacción con las nanopartículas por inhalación y contacto).
- Investigar la naturaleza de la capa de carbono y su papel en la biocompatibilidad de las nanopartículas.
- Estudiar la influencia del recubrimiento de carbono en la capacidad de adsorción y liberación de un fármaco.
- Sintetizar y caracterizar un polímero orgánico para funcionalizar nanopartículas de carburo de hierro de composición Fe_2C , y obtener de suspensiones estables en medio acuoso, para su futura utilización en hipertermia magnética.

Referencias

- Alexiou, C., W. Arnold, R.J. Klein, F.G. Parak, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, and A.S. Lübbe. 2000. "Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting." *Cancer Research* 60 (23): 6641–48.
- Allen, Theresa M., and Pieter R. Cullis. 2004. "Drug Delivery Systems: Entering the

- Mainstream.” *Science* 303 (5665): 1818–22.
<https://doi.org/10.1126/science.1095833>.
- Arru, P., M. Santi, F. Vallana, G. Majni, and G. Ottaviani. 1987. “A New Pyrolytic Film for Biomedical Applications.” *High Tech Ceramics.*, 117–26.
- Arruebo, M., R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría. 2007. “Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery.” *Nanotoday* 2 (3): 22–32.
<https://pdfs.semanticscholar.org/1844/8eb43dc235f82cb591983bc8df5ed799984c.pdf>.
- Arruebo, M., R. Fernandez-Pacheco, B. Velasco, C. Marquina, J. Arbiol, S. Irusta, M.R. Ibarra, and J. Santamaria. 2007. “Antibody-Functionalized Hybrid Superparamagnetic Nanoparticles.” *Advanced Functional Materials* 17 (9): 1473–79.
- Arruebo, M., M. Galán, N. Navascués, C. Téllez, C. Marquina, M. Ricardo Ibarra, and J. Santamaría. 2006. “Development of Magnetic Nanostructured Silica-Based Materials as Potential Vectors for Drug-Delivery Applications.” *Chemistry of Materials* 18 (7): 1911–19. <https://doi.org/10.1021/cm051646z>.
- Asensio, Juan M., Julien Marbaix, Nicolas Mille, Lise Marie Lacroix, Katerina Soulantica, Pier Francesco Fazzini, Julian Carrey, and Bruno Chaudret. 2019. “To Heat or Not to Heat: A Study of the Performances of Iron Carbide Nanoparticles in Magnetic Heating.” *Nanoscale* 11 (12): 5402–11.
<https://doi.org/10.1039/c8nr10235j>.
- Baronzio, G.F. 2006. “Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer.” *Springer*.
- Battle, X., and A. Labarta. 2002. “Finite-Size Effects in Fine Particles: Magnetic and Transport Properties.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 35 (6): R15–42.
- Bean, C. P., and J. D. Livingston. 1959. “Superparamagnetism.” *Journal of Applied Physics* 30 (4): S120–29. <https://doi.org/10.1063/1.2185850>.

- Bittner, C.A., S.C. Goodwin, C.K. Hoh, and J.W. Sayre. 1997. "Feasibility of Magnetically Directing a Novel Iron and Activated Carbon Drug-Carrier Microparticle as a Potential Method to Enhance Intra-Arterial Chemotherapy." *Radiology* 205: 1025–1025.
- Blazewicz, M. 2001. "Carbon Materials in the Treatment of Soft and Hard Tissue Injuries." *European Cells and Materials* 2: 21–29.
- Blazewicz, M., S. Blazewicz, and C. Wajler. 1994. "Mechanical and Implant Behavior of Chemically-Modified Carbon Braids." *Ceramics International* 20 (2): 99–103.
- Bodker, X., S. Morup, and S. Linderoth. 1994. "Surface Effects in Metallic Iron Nanoparticles." *Physical Review Letters* 72 (2): 282.285.
- Bohem, H.P. 1966. "Quantitative Analysis of Basic and Acid Groups on the Carbon Surface." *Advances in Catalysis*, 179–81.
- Bokros, J.C., L.D. Lagrange, and F. Schoen. 1972. "Control of Structure Carbon for Use in Bioengineering." *Chemistry and Physics of Carbon*.
- Bonnazi, M. 2010. *Why, to Whom, Saying What and How? Communicating Nanotechnology*. Luxembourg - Publications Office of the European Union.
- Bonnemain, Bruno. 1998. "Superparamagnetic Agents in Magnetic Resonance Imaging: Physicochemical Characteristics and Clinical Applications A Review - Journal of Drug Targeting | Taylor & Francis Online." *Journal of Drug Targeting* 6 (3): 167–74.
<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.3109/10611869808997890>.
- Bordet, A, L. M. Lacroix, K. Soulantica, and B. Chaudret. 2016. "A New Approach to the Mechanism of Fischer-Tropsch Syntheses Arising from Gas Phase NMR and Mass Spectrometry." *ChemCatChem* 8 (9): 1727–31.
<https://doi.org/10.1002/cctc.201600245>.

- Bordet, Alexis, Lise-marie Lacroix, Pier-francesco Fazzini, Julian Carrey, Katerina Soulantica, and Bruno Chaudret. 2016. "Magnetically Induced Continuous CO₂ Hydrogenation Using Composite Iron Carbide Nanoparticles of Exceptionally High Heating Power." *Angewandte Chemie - International Edition* 55: 1–6. <https://doi.org/10.1002/anie.201609477>.
- Brown, William Fuller. 1959. "Relaxational Behavior of Fine Magnetic Particles." *Journal of Applied Physics* 30 (4): S130–32. <https://doi.org/10.1063/1.2185851>.
- Buttazzoni, B. 1987. "Les Applications Des Composite Carbones En Chirurgie Orthopedique (Applications of Composite Carbons in Orthopedic Surgery)." *Biomechanique Orthopedique (Orthopedic Biomechanics)*, 106–18.
- Carmen Bautista, M., Oscar Bomati-Miguel, María Del Puerto Morales, Carlos J. Serna, and Sabino Veintemillas-Verdaguer. 2005. "Surface Characterisation of Dextran-Coated Iron Oxide Nanoparticles Prepared by Laser Pyrolysis and Coprecipitation." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1): 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.038>.
- Carranza-Bencano, A., J.R. Armas-Padron, M. Gili-Miner, and M.A. Lozano. 2000. "Carbon Fiber Implants in Osteochondral Defects of the Rabbit Patella." *Biomaterials* 21 (21): 2171–76.
- Carreya, J., B. Mehdaoui, and M. Respaud. 2011. "Simple Models for Dynamic Hysteresis Loop Calculations of Magnetic Single-Domain Nanoparticles: Application to Magnetic Hyperthermia Optimization." *Journal of Applied Physics* 109.
- Chang, David, May Lim, Jeroen A.C.M. Goos, Ruirui Qiao, Yun Yee Ng, Friederike M. Mansfeld, Michael Jackson, Thomas P. Davis, and Maria Kavallaris. 2018. "Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations." *Frontiers in Pharmacology* 9 (AUG). <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00831>.

- Chatterjee, Krishnendu, Sreerupa Sarkar, K. Jagajjanani Rao, and Santanu Paria. 2014. "Core/Shell Nanoparticles in Biomedical Applications." *Advances in Colloid and Interface Science* 209: 8–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>.
- Chertok, Beata, Matthew J. Webber, Marc D. Succi, and Robert Langer. 2013. "Drug Delivery Interfaces in the 21st Century: From Science Fiction Ideas to Viable Technologies." *Molecular Pharmaceutics* 10 (10): 3531–43. <https://doi.org/10.1021/mp4003283>.
- Cifuentes, Z., L. Custardoy, J.M. de la Fuente, C. Marquina, M. Ricardo Ibarra, D. Rubiales, and A. Perez-de-Luque. 2010. "Absorption and Translocation to the Aerial Part of Magnetic Carbon-Coated Nanoparticles through the Root of Different Crop Plants." *Journal of Nanobiotechnology* 8.
- Coey, J. M. D. 1971. "Noncollinear Spin Arrangement in Ultrafine Ferrimagnetic Crystallites." *Physical Review Letters* 27 (17): 1140.
- Colombo, Miriam, Susana Carregal-Romero, Maria F. Casula, Lucía Gutiérrez, María P. Morales, Ingrid B. Böhm, Johannes T. Heverhagen, Davide Prosperi, and Wolfgang J. Parak. 2012. "Biological Applications of Magnetic Nanoparticles." *Chemical Society Reviews* 41 (11): 4306–34. <https://doi.org/10.1039/c2cs15337h>.
- Cullity, B.D., and C.D. Graham. 1972. *Introduction To Magnetic Materials*. Wiley.
- D. Wang, Y. Ren, Y. Shao, D. Yu, L. Meng. 2017. "Facile Preparation of Doxorubicin-Loaded and Folic Acid-Conjugated Carbon Nanotubes@Poly(N-Vinyl Pyrrole) for Targeted Synergistic Chemo Photothermal Cancer Treatment." *Bioconjugate Chemistry* 28 (11): 2815–22.
- DeNardo, Sally J., Gerald L. DeNardo, Laird A. Miers, Arutselvan Natarajan, Alan R. Foreman, Cordula Gruettner, Grete N. Adamson, and Robert Ivkov. 2005. "Development of Tumor Targeting Bioprobes (111In-Chimeric L6 Monoclonal Antibody Nanoparticles) for Alternating Magnetic Field Cancer Therapy."

- Clinical Cancer Research* 11 (19 II): 7087–93. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1004-0022>.
- Dewey, W. C., L. E. Hopwood, S. A. Sapareto, and L. E. Gerweck. 1977. “Cellular Responses to Combinations of Hyperthermia and Radiation.” *Radiology* 123 (2): 463–74. <https://doi.org/10.1148/123.2.463>.
- Dobson, J. 2006. “Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery.” *Drug Development Research* 67: 55–60.
- E. Corredor, P.S. Testillano, M.-J. Coronado, P. Gonzalez-Melendi, R. Fernandez-Pacheco, C. Marquina, M. Ricardo Ibarra, J.M. de la Fuente, D. Rubiales, A. Perez-de-Luque, and M.-C. Risueno. 2009. “Nanoparticle Penetration and Transport in Living Pumpkin Plants: In Situ Subcellular Identification.” *Bmc Plant Biology* 9.
- Escribano, E., R. Fernandez-Pacheco, J. Gabriel Valdivia, M. Ricardo Ibarra, C. Marquina, and J. Queralt. 2012. “Effect of Magnet Implant on Iron Biodistribution of Fe@C Nanoparticles in the Mouse.” *Archives of Pharmacal Research* 35 (1): 93–100.
- Feng, L., and J.D. Andrade. 1994. “Protein Adsorption on Low-Temperature Isotropic Carbon. 2. Effects of Surface-Charge of Solids.” *Journal of Colloid and Interface Science* 166 (2): 419–26.
- Fernández-Pacheco Chicón, Rodrigo. 2008. “Synthesis, Characterization and Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.” Universidad de Zaragoza.
- Fernández-Pacheco, Rodrigo, Manuel Arruebo, Clara Marquina, Ricardo Ibarra, Jordi Arbiol, and Jesús Santamaría. 2006. “Highly Magnetic Silica-Coated Iron Nanoparticles Prepared by the Arc-Discharge Method.” *Nanotechnology* 17 (5): 1188–92. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/5/004>.

- Fernández-Pacheco, Rodrigo, Clara Marquina, J. Gabriel Valdivia, Martín Gutiérrez, M. Soledad Romero, Rosa Cornudella, Alicia Laborda, et al. 2007. "Magnetic Nanoparticles for Local Drug Delivery Using Magnetic Implants." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1 SPEC. ISS.): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.192>.
- Feynman, R.P. 1959. "There's Plenty of Room at the Bottom." *Annual Meeting of the American Physical Society*.
- Fortin, Jean Paul, Claire Wilhelm, Jacques Servais, Christine Ménager, Jean Claude Bacri, and Florence Gazeau. 2007. "Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia." *Journal of the American Chemical Society* 129 (9): 2628–35. <https://doi.org/10.1021/ja067457e>.
- Gaur, Upasna, Sanjeeb Kumar Sahoo, Tapas K. De, Prahlad C. Ghosh, Amarnath Maitra, and P. K. Ghosh. 2000. "Biodistribution of Fluoresceinated Dextran Using Novel Nanoparticles Evading Reticuloendothelial System." *International Journal of Pharmaceutics* 202 (1–2): 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(99\)00447-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(99)00447-0).
- Gilchrist, R. K., R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, and C. B. Taylor. 1957. "Selective Inductive Heating of Lymph Nodes." *Annals of Surgery* 146 (4): 596–606. <https://doi.org/10.1097/0000658-195710000-00007>.
- Goesmann, Helmut, and Claus Feldmann. 2010. "Nanoparticulate Functional Materials." *Angewandte Chemie - International Edition* 49 (8): 1362–95. <https://doi.org/10.1002/anie.200903053>.
- Gonzales, Marcela, and Kannan M. Krishnan. 2005. "Synthesis of Magnetoliposomes with Monodisperse Iron Oxide Nanocrystal Cores for Hyperthermia." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1): 265–70. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.02.020>.

- Gonzalez-Lavado, E., N. Iturrioz-Rodriguez, E. Padin-Gonzalez, J. Gonzalez, L. Garcia-Hevia, J. Heuts, C. Pesquera, et al. 2018. "Biodegradable Multi-Walled Carbon Nanotubes Trigger Anti-Tumoral Effects." *Nanoscale* 10 (23): 11013–20.
- Gonzalez-Melendi, P., R. Fernandez-Pacheco, M.J. Coronado, E. Corredor, P.S. Testillano, M.C. Risueno, C. Marquina, M.R. Ibarra, D. Rubiales, and A. Perez-De-Luque. 2008. "Nanoparticles as Smart Treatment-Delivery Systems in Plants: Assessment of Different Techniques of Microscopy for Their Visualization in Plant Tissues." *Annals of Botany* 101 (1): 187.195.
- Goodwin, S.C., C.A. Bittner, C.L. Peterson, and G. Wong. 2001. "Single-Dose Toxicity Study of Hepatic Intra-Arterial Infusion of Doxorubicin Coupled to a Novel Magnetically Targeted Drug Carrier." *Toxicological Sciences* 60 (1): 177–83.
- Gould, Paula. 2006. "Nanomagnetism Shows in Vivo Potential." *Nano Today* 1 (4): 34–39. [https://doi.org/10.1016/S1748-0132\(06\)70115-3](https://doi.org/10.1016/S1748-0132(06)70115-3).
- Goya, G.F., V. Grazú, and M.R. Ibarra. 2008. "Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy." *Current Nanoscience* 4: 1–16.
- Gupta, K, and S Rao. 1989. "Ultrastructural Disposition of Adriamycin-associated Magnetic Albumin Microspheres in Rats." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 78 (4): 1–5.
- Haas-Kock, D.F.M. De, J . Buijsen, M. Pijls-Johannesma, L. Lutgens, G. Lammering, G.A.P.G.. Van Mastrikt, D.K.M. De Ruyscher, P. Lambin, and J. Van der Zee. 2009. "Concomitant Hyperthermia and Radiation Therapy for Treating Locally Advanced Rectal Cancer." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3.
- Häfeli, Urs O., Siobhan M. Sweeney, Beverly A. Beresford, John L. Humm, and Roger M. Macklis. 1995. "Effective Targeting of Magnetic Radioactive⁹⁰Y-Microspheres to Tumor Cells by an Externally Applied Magnetic Field. Preliminary in Vitro and in Vivo Results." *Nuclear Medicine and Biology* 22 (2):

147–55. [https://doi.org/10.1016/0969-8051\(94\)00124-3](https://doi.org/10.1016/0969-8051(94)00124-3).

Hergt, Rudolf, Wilfried Andrä, Carl G. D’Ambly, Ingrid Hilger, Werner A. Kaiser, Uwe Richter, and Hans Georg Schmidt. 1998. “Physical Limits of Hyperthermia Using Magnetite Fine Particles.” *IEEE Transactions on Magnetism* 34 (5 PART 2): 37453754.

Hergt, Rudolf, Silvio Dutz, Robert Müller, and Matthias Zeisberger. 2006. “Magnetic Particle Hyperthermia: Nanoparticle Magnetism and Materials Development for Cancer Therapy.” *Journal of Physics Condensed Matter* 18 (38). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/38/S26>.

Hiergeist, R., W. Andrä, N. Buske, R. Hergta, I. Hilger, U. Richter, and W. Kaiser. 1999. “Application of Magnetite Ferrofluids for Hyperthermia.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201 (1–3): 420–22. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(99\)00145-6](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(99)00145-6).

Hua, X.-W., Y.-W. Bao, and F.-G. Wu. 2018. “Fluorescent Carbon Quantum Dots with Intrinsic Nucleolus-Targeting Capability for Nucleolus Imaging and Enhanced Cytosolic and Nuclear Drug Delivery.” *ACS Applied Materials & Interfaces* 10 (13): 10664–67.

Hummel, R.E. 2011. *Electronic Properties of Materials*. 4th ed. Springer US.

Issa, B., and Ihab M. Obaidat. 2016. “Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents.” In *IntechOpen*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.

Jockisch, K.A., S.A. Brown, T.W. Bauer, and K. Merritt. 1992. “Biological Response to Chopped-Carbon-Fiber-Reinforced Peek.” *Journal of Biomedical Materials Research* 26 (2): 133–46.

Johannsen, M., U. Gneveckow, K. Taymoorian, B. Thiesen, N. Waldofner, R. Scholz, K. Jung, A. Jordan, P. Wust, and S.A. Loening. 2007. “Morbidity and Quality of Life during Thermotherapy Using Magnetic Nanoparticles in Locally Recurrent

- Prostate Cancer: Results of a Prospective Phase I Trial.” *International Journal of Hyperthermia* 23: 315–23.
- Johannsen, M ., U. Gneveckow, L. Eckelt, A. Feussner, N. Waldofner, R. Scholz, S. Deger, P . Wust, S.A. Loening, and A. Jordan. 2005. “Clinical Hyperthermia of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Presentation of a New Interstitial Technique.” *International Journal of Hyperthermia* 21.
- Johannsen, Manfred, Uwe Gneveckow, Burghard Thiesen, Kasra Taymoorian, Chie Hee Cho, Norbert Waldöfner, Regina Scholz, Andreas Jordan, Stefan A. Loening, and Peter Wust. 2007. “Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution.” *European Urology* 52 (6): 1653–62. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.11.023>.
- Jordan, A., R. Scholz, P. Wust, H. Schirra, T. Schiestel, H. Schmidt, and R. Felix. 1999. “Endocytosis of Dextran and Silan-Coated Magnetite Nanoparticles and the Effect of Intracellular Hyperthermia on Human Mammary Carcinoma Cells in Vitro.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194 (1-3): 185–96.
- Jordan, A., P. Wust, H. Fahling, W . John, A. Hinz, and R. Felix. 1993. “Inductive Heating of Ferrimagnetic Particles and Magnetic Fluids-Physical Evaluation of Theris Potential for Hyperthermia.” *International Journal of Hyperthermia* 9: 51–68.
- Jordan, Andreas, Regina Scholz, Klaus Maier-Hauff, Manfred Johannsen, Peter Wust, Jacek Nadobny, Hermann Schirra, et al. 2001. “Presentation of a New Magnetic Field Therapy System for the Treatment of Human Solid Tumors with Magnetic Fluid Hyperthermia.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 225 (1–2): 118–26. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(00\)01239-7](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(00)01239-7).
- Jordan, Andreas, Regina Scholz, Peter Wust, Horst Föhling, and Roland Felix. 1999. “Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer Treatment with AC Magnetic

- Field Induced Excitation of Biocompatible Superparamagnetic Nanoparticles.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 201 (1–3): 413–19. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(99\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(99)00088-8).
- Kato, Tetsuro, Ryosuke Nemoto, Hisashi Mori, Ryoetsu Abe, Katsuo Unno, Akio Goto, Hideyuki Murota, Masaoki Harada, and Motofumi Homma. 1984. “Magnetic Microcapsules for Targeted Delivery of Anticancer Drugs.” *Applied Biochemistry and Biotechnology* 10 (1–3): 199–211. <https://doi.org/10.1007/BF02783752>.
- Koch, C.C., I.A. Ovid’ko, S. Seal, and S. Veprek. 2007. *Structural Nanocrystalline Materials: Fundamentals and Applications*. Cambridge University Press.
- Krätschmer, W., Lowell D. Lamb, K. Fostiropoulos, and Donald R. Huffman. 1990. “Solid C60: A New Form of Carbon.” *Nature* 347 (6291): 354–58. <https://doi.org/10.1038/347354a0>.
- Kuznetsov, A.A., V.I. Filippov, O.A. Kuznetsov, E.K. Dobrinsky V.G. Gerlivanov, and S.I. Malashin. 1999. “New Ferro-Carbon Adsorbents for Magnetically Guided Transport of Anti-Cancer Drugs.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194 (1–3): 22–30.
- Lacroix, Lise Marie, Sébastien Lachaize, Andrea Falqui, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2009. “Iron Nanoparticle Growth in Organic Superstructures.” *Journal of the American Chemical Society* 131 (2): 549–57. <https://doi.org/10.1021/ja805719c>.
- Law, Wing Cheung, Ken Tye Yong, Indrajit Roy, Gai Xia Xu, Hong Ding, Earl J. Bergey, Hao Zeng, and Paras N. Prasad. 2008. “Optically and Magnetically Doped Organically Modified Silica Nanoparticles as Efficient Magnetically Guided Biomarkers for Two-Photon Imaging of Live Cancer Cells.” *Journal of Physical Chemistry C* 112 (21): 7972–77. <https://doi.org/10.1021/jp712090y>.
- Lei, Wei, Yongsheng Liu, Xiaodong Si, Juan Xu, Wenlong Du, Jie Yang, Tao Zhou,

- and Jia Lin. 2017. "Synthesis and Magnetic Properties of Octahedral Fe₃O₄ via a One-Pot Hydrothermal Route." *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics* 381 (4): 314–18. <https://doi.org/10.1016/j.physleta.2016.09.018>.
- Logothetidis, S. 2012. *Nanostructured Materials and Their Applications. Nanotechnology: Principles and Applications*. Edited by Stergios Logothetidis. Springer US.
- Louis, J.P., and M. Dabadie. 1990. "Fibrous Carbon Implants for the Maintenance of Bone Volume After Tooth Avulsion - 1st Clinical - Results." *Biomaterials* 11 (7): 525–28.
- Lu, Jun, Shihe Yang, Ka Ming Ng, Chia Hao Su, Chen Sheng Yeh, Ya Na Wu, and Dar Bin Shieh. 2006. "Solid-State Synthesis of Monocrystalline Iron Oxide Nanoparticle Based Ferrofluid Suitable for Magnetic Resonance Imaging Contrast Application." *Nanotechnology* 17 (23): 5812–20. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/23/017>.
- Lübbe, A. S., C. Bergemann, W. Huhnt, T. Fricke, H. Riess, J. W. Brock, and D. Huhn. 1996. "Preclinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: Tolerance and Efficacy." *Cancer Research* 56 (20): 4694–4701.
- Lübbe, A.S., C. Bergemann, H. Riess, F. Schriever, P. Reichardt, K. Possinger, M. Matthias, et al. 1996. "Clinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors." *Cancer Research* 56 (20): 4686–93.
- Lutgens, L., J. Van der Zee, M. Pijls-Johannesma, D.F.M. De Haas-Kock, J. Buijsen, G.A.P.G. Van Mastrigt, G. Lammering, D.K.M. De Ruyscher, and P. Lambin. 2010. "Combined Use of Hyperthermia and Radiation Therapy for Treating Locally Advanced Cervix Carcinoma." *Cochrane Database of Systematic Reviews* 3.

- Maier-Hauff, Klaus, Frank Ulrich, Dirk Nestler, Hendrik Niehoff, Peter Wust, Burghard Thiesen, Helmut Orawa, Volker Budach, and Andreas Jordan. 2011. "Efficacy and Safety of Intratumoral Thermotherapy Using Magnetic Iron-Oxide Nanoparticles Combined with External Beam Radiotherapy on Patients with Recurrent Glioblastoma Multiforme." *Journal of Neuro-Oncology* 103 (2): 317–24. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0389-0>.
- Mamiya, Hiroaki. 2013. "Recent Advances in Understanding Magnetic Nanoparticles in AC Magnetic Fields and Optimal Design for Targeted Hyperthermia." *Journal of Nanomaterials* 2013: 17.
- Marghussian, Vahak. 2015. *Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. Nano-Glass Ceramics*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35386-1.00004-9>.
- Marquina, C., and M.R. Ibarra. 2020. *Carbon Encapsulated Functional Magnetic Nanoparticles for Life Sciences*. Edited by P.K. Zarzycki. Pure and Functionalized Carbon Based Nanomaterial.
- Massart, R., and V. Cabuil. 1987. "Effect of Some Parameters on the Formation of Colloidal Magnetite-Medium-Yield and Particle-Size Control." *Jornal de Chimie Physique et de Physico-Chimie Biologique* 84: 7–8.
- Me, Anca, Boubker Mehdaoui, Vinciane Kelsen, Pier Francesco Fazzini, Julian Carrey, Sebastien Lachaize, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2012. "A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties." *Nano Letters* 12: 4722–28. <https://doi.org/10.1021/nl302160d>.
- Meffre, Anca, Sébastien Lachaize, Christophe Gatel, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2011. "Use of Long Chain Amine as a Reducing Agent for the Synthesis of High Quality Monodisperse Iron(0) Nanoparticles." *Journal of Materials Chemistry* 21 (35): 13464–69. <https://doi.org/10.1039/c1jm12127h>.

- Mornet, Stéphane, Sébastien Vasseur, Fabien Grasset, and Etienne Duguet. 2004. "Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy." *Journal of Materials Chemistry* 14 (14): 2161–75. <https://doi.org/10.1039/b402025a>.
- Nakakuki, Shoichi. 1986. "NII-Electronic Library Service." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34 (1): 430–33.
- Neuberger, Tobias, Bernhard Schöpf, Heinrich Hofmann, Margarete Hofmann, and Brigitte Von Rechenberg. 2005. "Superparamagnetic Nanoparticles for Biomedical Applications: Possibilities and Limitations of a New Drug Delivery System." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 293 (1): 483–96. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064>.
- NNI. 2013. "The National Nanotechnology Initiative Supplement to the President's 2014 Budget," 88.
- Nunes, Daniela, Ana Pimentel, Lidia Santos, Pedro Barquinha, Luis Pereira, Elvira Fortunato, and Rodrigo Martins. 2019. "Introduction." *Metal Oxide Nanostructures*, 1–19. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811512-1.00001-1>.
- Pankhurst, Q.A., J. Connolly, S.K. Jones, and J. Dobson. 2003. "Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 36 (13): 167–81.
- Panyam, Jayanth, and Vinod Labhasetwar. 2012. "Biodegradable Nanoparticles for Drug and Gene Delivery to Cells and Tissue." *Advanced Drug Delivery Reviews* 64 (SUPPL.): 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.023>.
- Penalver, J. Lopez, V. de Araujo Farias J.-L. Linares-Fernandez, M. Victoria Lopez-Ramon, M. Tassi, F. Javier Oliver, C. Moreno-Castilla, and J. Mariano Ruiz de Almodovar. 2009. "Activated Carbon Cloth as Support for Mesenchymal Stem Cell Growth and Differentiation to Osteocytes." *Carbon* 47 (15): 3574–77.
- Ramos, M., and C. Castillo. 2011. "Aplicaciones Biomédicas de La Nanopartículas

- Magnéticas.” *Ide@s Concyteg* 6 (72): 629–46.
- Roca, A. G., R. Costo, A. F. Rebolledo, S. Veintemillas-Verdaguer, P. Tartaj, T. González-Carreño, M. P. Morales, and C. J. Serna. 2009. “Progress in the Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine.” *Journal of Physics D: Applied Physics* 42 (22). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/42/22/224002>.
- Roco, M.C. 2003. “Broader Societal Issues of Nanotechnology.” *Journal of Nanoparticle Research* 5: 181–89.
- Roizintowle, L., and J.P . Pirro. 1991. “The Response of Human and Rodent Cells to Hyperthermia.” *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 20: 751–56.
- Rosensweig, R.E. 2002. “Heating Magnetic Fluid with Alternating Magnetic Field.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 252: 370–74.
- Santis, R. De, D. Prisco, A. Apicella, L. Ambrosio, S. Rengo, and L. Nicolais. 2000. “Carbon Fiber Post Adhesion to Resin Luting Cement in the Restoration of Endodontically Treated Teeth.” *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 11 (4): 201–6.
- Sounderya, Nagarajan, and Yong Zhang. 2010. “Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications.” *Recent Patents on Biomedical Engineering* 1 (1): 34–42. <https://doi.org/10.2174/1874764710801010034>.
- Taniguchi, N. 1974. “On the Basic Concept of Nano Technology.” *International Conference on Production Engineering, Part II, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo*, 5–10.
- Tashkin, Donald P., Bartolome Celli, Stephen Senn, Deborah Burkhart, Steven Kesten, Shailendra Menjoge, Marc Decramer, and Uplift Study. 2008. “New England Journal Medicine” 359: 1543–54.

- Teresa, J.M. De, C. Marquina, D. Serrate, R. Fernandez-Pacheco, L. Morellon, P.A. Algarabel, and M.R. Ibarra. 2005. "From Magnetoelectronic to Biomedical Applications Based on the Nanoscale Properties of Advanced Magnetic Materials." *International Journal of Nanotechnology* 2 (1–2): 3–22.
- Torres Molina, T.E. 2015. *Power Absorption Mechanism in High- Anisotropy CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticle*. Universidad de Zaragoza.
- Torres, T. E., Enio Lima Jr, M Pilar Calatayud, Beatriz Sanz, Alfonso Ibarra, Rodrigo Fernández-pac, Alvaro Mayoral, Clara Marquina, M Ricardo Ibarra, and Gerardo F Goya. 2019. "The Relevance of Brownian Relaxation as Power Absorption Mechanism in Magnetic Hyperthermia." *Nature Scientific Reports* 9: 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40341-y>.
- Torres, T E, E Lima Jr, A Mayoral, A Ibarra, C Marquina, M R Ibarra, G F Goya, et al. 2015. "Validity of the Néel-Arrhenius Model for Highly Anisotropic CoFe₃-XO₄ Nanoparticles." *Journal of Applied Physics* 118 (183902): 1–11. <https://doi.org/10.1063/1.4935146>.
- Usov, N. A., and B. Ya. Liubimov. 2012. "Dynamics of Magnetic Nanoparticle in a Viscous Liquid: Application to Magnetic Nanoparticle Hyperthermia." *Journal of Applied Physics* 112.
- Vallana, F., E. Pasquino, S. Rinaldi, M. Galloni, A.M. Gatti, F. Modica, and A. Benech. 1993. "Carbonfilm(TM) - Present and Future Applications In Biomedical Devices." *Ceramics International* 19 (3): 169–79.
- Vonarbourg, Arnaud, Catherine Passirani, Patrick Saulnier, and Jean Pierre Benoit. 2006. "Parameters Influencing the Stealthiness of Colloidal Drug Delivery Systems." *Biomaterials* 27 (24): 4356–73. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.039>.
- Weissleder, Ralph, G Elizondo, J Wittenberg, C Rabito, H Bengel, and L Josephson.

1990. "Ultrasmall Agents for Superparamagnetic of a New Class Iron Oxide : Of Contrast." *Radiology* 175: 489–93.
- Widder, Kenneth J., Robert M. Morris, Gerald A. Poore, Donald P. Howard, and Andrew E. Senyei. 1983. "Selective Targeting of Magnetic Albumin Microspheres Containing Low-Dose Doxorubicin: Total Remission in Yoshida Sarcoma-Bearing Rats." *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 19 (1): 135–39. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(83\)90408-X](https://doi.org/10.1016/0277-5379(83)90408-X).
- Widder, Kenneth J., Andrew E. Senyei, and Dante G. Scarpelli. 1978. "Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 158 (2): 141–46. <https://doi.org/10.3181/00379727-158-40158>.
- Wust, P., B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, and Pm Schlag. 2002. "Hyperthermia in Combined Treatment of Cancer." *Lancet Oncology* 3 (8): 487–97. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(02\)00818-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(02)00818-5).
- Yin, H., H. P. Too, and G. M. Chow. 2005. "The Effects of Particle Size and Surface Coating on the Cytotoxicity of Nickel Ferrite." *Biomaterials* 26 (29): 5818–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.036>.
- Yu, T., A. Malugin, and H. Ghandehari. 2011. "Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic." *ACS Nano* 5: 5717–28.
- Zee, J. van der. 2002. "Heating the Patient: A Promising Approach?" *Annals of Oncology* 13 (8): 1173–84. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdf280>.
- Zimmermann, U., and G. Pilwat. 1976. "Organspezifische Applikation von Pharmazeutisch Aktiven Substanzen Über Zellulare Trägersysteme." *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* 31 (11–12): 732–36. <https://doi.org/10.1515/znc-1976-11-1219>.

Capítulo II: Materiales y métodos

En este capítulo se exponen los métodos desarrollados para la síntesis de las nanopartículas magnéticas estudiadas en esta tesis doctoral, que incluyen dos tipos de nanopartículas *core-shell* con diferente núcleo y diferente recubrimiento de carbono (nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C), y nanopartículas de carburo de hierro Fe_{2.2}C. Se detallan también los protocolos seguidos para la funcionalización de las superficies de estas nanopartículas. Así mismo, en este capítulo se presentan las técnicas experimentales utilizadas en la caracterización estructural, química y magnética, prestando especial atención al estudio de la absorción de radiación electromagnética en suspensiones acuosas. Se describen también las técnicas utilizadas en los ensayos *in-vitro* realizados para estudiar la internalización de las nanopartículas en diferentes líneas celulares y su citotoxicidad, así como para estudiar la capacidad de estas nanopartículas para la adsorción y desorción de fármacos.

2.1 Técnicas experimentales

2.1.1 Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM)

Mediante la microscopía de transmisión electrónica, podemos obtener una detallada caracterización morfológica y estructural a nivel sub-micrométrico de manera muy detallada de nuestras nanopartículas. La cantidad y calidad de información que podemos obtener mediante esta técnica depende de cuatro parámetros: el primero es el poder de resolución del microscopio, el segundo es la energía del haz de electrones, en tercer lugar el espesor de la muestra (al menos siempre menor a 1 μm) y por último la composición y estabilidad de la muestra (Goodhew 2011).

El equipo utilizado para la caracterización morfológica de las nanopartículas sintetizadas durante este trabajo ha sido un microscopio termoiónico LaB₆ 200 kV Tecnai T20 (FEI Company), del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA, Universidad de Zaragoza). Este microscopio trabaja a un voltaje de aceleración de 200 kV. Para las medidas de alta resolución (HRTEM) se utilizó un microscopio FEI Tecnai F30 del Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Instalación Científico Técnica Singular situada en la Universidad de Zaragoza. El microscopio trabaja a 300 kV y está equipado con un filamento de emisión y unas lentes objetivo SuperTwin®, dando una capacidad espacial con una resolución menor que 0,19 nm.

Las muestras se prepararon colocando una gota de la suspensión que contiene las nanopartículas (agua destilada en nuestro caso) en una microrejilla de cobre con recubrimiento de carbono *Holey*. Cuando la muestra está completamente seca (después de la evaporación del disolvente), se procede a la medida de la muestra en el microscopio tomando imágenes en diferentes zonas de la microrejilla a diferentes aumentos.

La microscopía electrónica de transmisión se ha utilizado también para estudiar la internalización de las nanopartículas en la línea celular de macrófagos murinos J774, así como la distribución de las nanopartículas en el interior de la célula. Estos ensayos

se realizaron en el laboratorio de la Prof. Mónica López Fanarraga del *Dpto. Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander)*. Para ello se utilizó un microscopio Jeol JEM 1011. Las condiciones en las que se realizaron los cultivos de los macrófagos J774 con las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C, a partir de los cuales se obtuvieron los pellets para el análisis mediante TEM, se describen en la *sección 2.4.3 Ensayos de viabilidad con células HeLa y J774*.

La preparación de la muestra se llevó a cabo realizando cortes de 70 nm de espesor en pellets de células, fijadas con adhesivo (Araldite) y con una disolución 0,12 M de buffer fosfato al 1% en glutaraldehído y lavadas con una disolución 0,12 M de buffer fosfato. Posteriormente, las células se vuelven a fijar con un buffer al 1% en tetraóxido de osmio, se deshidratan con acetona, y se sumergen en Araldite. Por último, se seccionan y se tiñen con citrato de plomo y acetato de uranilo (González- et al. 2017)(García-hevia et al. 2016).

Un microscopio TEM, consiste en una columna en la que se encuentra la fuente que emite un haz electrones que pasa a través de diferentes tipos de lentes magnéticas (lentes condensadoras, lentes objetivo y lentes proyectoras).

El haz de electrones pasa en primer lugar por las lentes condensadoras, las cuales desvían la trayectoria de los electrones formando un haz condensado que atraviesa la muestra. Los electrones transmitidos son recogidos por las lente objetivo y después, al pasar por las lentes proyectoras, se genera una imagen que es recogida en nuestro caso es una cámara CCD (Charge Coupled Device) al final de la columna.

La energía de los electrones incidentes es entre 200-300 kV pudiendo penetrar en la muestra y así se puede conseguir información de la morfología, tamaño y cristalinidad de la muestra.

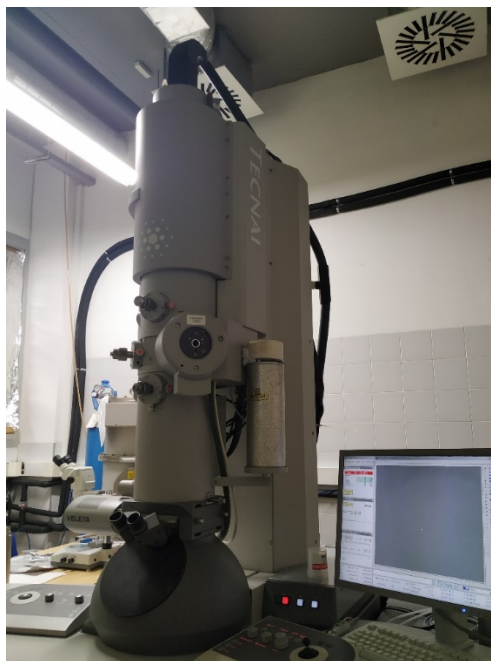


Imagen 2.1. Microscopio Tecnai T20.

2.1.2 Difracción de rayos X

Las medidas de difracción de rayos X se realizaron en el Servicio de Difracción de Rayos X y Análisis por Fluorescencia del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza. El equipo utilizado es un difractómetro de polvo D-Max Rigaku Ru300, provisto de un ánodo rotante de Cu. (ver *imagen 2.2*) El difractómetro funciona a 40 kV y 80 mA y se utiliza un monocromador de grafito para seleccionar la radiación Cu K α . Además, se utilizó un difractómetro modelo PANalytical Empyrean con ánodo de Co ($\lambda_{Co}=0.1789$ nm), perteneciente del grupo del Profesor Bruno Chaudret, en el Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO), del CNRS-INSA-Université Paul Sabatier de Toulouse (Francia). El difractómetro opera a 45 kV y 40 mA y se utilizó para la caracterización de las nanopartículas de Fe (0) y de Fe_{2.2}C (ver *Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro Fe_{2.2}C y su funcionalización*) sintetizadas durante la estancia llevada a cabo en dicho laboratorio.

Mediante la difracción de rayos X (*X ray diffraction*, XRD) se obtiene información sobre los parámetros de red de la estructura cristalina de un material y por tanto de las diferentes fases cristalográficas presentes en la muestra, tanto en su aspecto cualitativo como cuantitativo. Cada estructura cristalográfica posee un patrón de difracción (o difractograma) de rayos X característico.



Imagen 2.2. Equipo Rayos X provisto de un difractómetro D-Max Rigaku, Ru300, con un ánodo rotante de Cu.

Mediante la difracción de rayos X podemos estimar el grado de cristalinidad del material. Cuando la cristalinidad disminuye, los picos del difractograma de rayos X se ensanchan. Midiendo la anchura correspondiente a una determinada reflexión dada por los índices de Miller, podemos determinar el tamaño de los granos cristalinos en la muestra (i.e., el tamaño de partícula en el caso de sistemas nanoparticulados) (en Å), mediante la fórmula de Scherrer (*ecuación 2.1*):

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (2.1)$$

donde k es una constante entre 0,8-1,39 (habitualmente, cercana a la unidad, 0,9) λ es la longitud de onda de radiación ($\lambda_{\text{Cu}} = 1,54056 \text{ \AA}$), β es la anchura a media altura del pico correspondiente a la reflexión del plano correspondiente a los índices de Miller (medida en radianes) que aparece en el ángulo 2θ del patrón de difracción (Patterson 1939).

2.1.3 Caracterización magnética mediante medidas de imanación

Las medidas de magnetización frente a un campo magnético a una temperatura dada nos dan información sobre la respuesta de las nanopartículas frente a un campo magnético. En sistemas de tamaño nanométrico (por ejemplo en nanopartículas) es también particularmente interesante la medida de la magnetización en función del incremento de la temperatura, después de haber enfriado la muestra en ausencia de campo magnético (proceso *Zero Field Cooling*, ZFC) y después de haberla enfriado aplicando campo magnético (proceso *Field Cooling*, FC). Estas medidas nos permiten estimar el tamaño del núcleo magnético y la dispersión de tamaño, así como calcular la temperatura de bloqueo de la muestra (temperatura por encima de la cual nuestro material es superparamagnético).

Para caracterización magnética de las muestras se han utilizado dos equipos diferentes de medida con alta sensibilidad: un magnetómetro con detección SQUID (*Superconductor Quantum Interference Device*) (perteneciente al Servicio de Medidas Físicas, del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza), y un magnetómetro de muestra vibrante (*Vibrating Sample Magnetometer*, VSM), del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) de la Universidad de Zaragoza. La utilización de este tipo de magnetómetros es necesaria en el estudio del comportamiento magnético de sistemas de nanopartículas ya que por lo general se trabaja con volúmenes muy pequeños, lo que implica detectar momentos magnéticos muy pequeños.

2.1.3.1 Magnetometría SQUID

Para la realización de las medidas de magnetización se ha utilizado un equipo SQUID MPMS-XL, de Quantum Design (ver *imagen 2.3*). Es un equipo integrado, que consiste en un imán superconductor en el interior de un baño de helio que produce un campo magnético axial de 0 a 5 Teslas y a temperaturas desde 1,8 a 400 K, junto a un magnetómetro DC SQUID y un susceptómetro AC. Las muestras se pueden medir tanto

en sólido como en líquido. En el caso de suspensiones de nanopartículas las muestras líquidas se deben congelar, por debajo del punto de fusión del medio líquido para evitar que las nanopartículas roten en la dirección del campo magnético. En el magnetómetro DC la muestra se mueve con un movimiento periódico a lo largo de la dirección del campo magnético en una serie de pasos utilizando un pequeño motor. Las variaciones de flujo generadas por este movimiento periódico del momento magnético de la muestra en el detector superconductor se transforman luego en voltaje, gracias al sensor SQUID. Este voltaje es proporcional al momento magnético de la muestra problema. La sensibilidad del magnetómetro utilizado en nuestros experimentos del orden de 10^{-7} - 10^{-9} emu, dependiendo del modo de operación elegido.



Imagen 2.3. Magnetómetro SQUID MPMS-XL, Quantum Design, del Servicio de Medidas Físicas, del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

2.1.3.2 Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

Las medidas de imanación también se han llevado a cabo en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM). El equipo utilizado es un modelo 7400 de Lakeshore CRYOTRONICS Company. Con él medimos el momento magnético de la muestra cuando vibra perpendicularmente a un campo magnético uniforme creado entre las piezas polares de un electroimán en las que están colocadas las bobinas captadoras (ver esquema *figura 2.1*). Con este instrumento podemos detectar pequeños cambios de momento magnético entre 10^{-3} hasta 10^{-4} emu (Foner 1959)(Jeng 2004). En nuestro caso las medidas se realizan a temperatura ambiente y hasta un campo magnético máximo de 1.5 Tesla. La sensibilidad del magnetómetro es del orden de 10^{-5} emu.

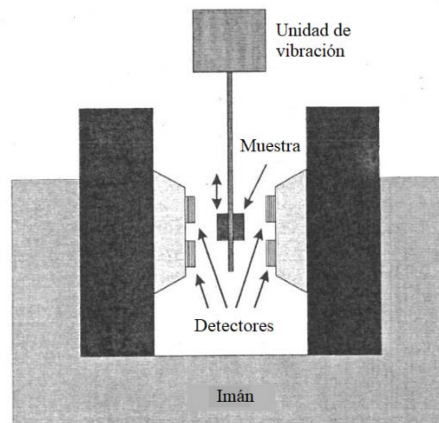


Figura 2.1. Esquema equipo VSM.

En el equipo de VSM, la muestra se conecta a través de una varilla a una fuente de vibración. Cuando la muestra magnética vibra periódicamente en medio de las bobinas captadoras se genera una variación de flujo magnético, que induce un voltaje proporcional al momento magnético de la muestra problema.



Imagen 2.4. Equipo VSM modelo 7400 de Lakeshore CRYOTRONICS Company, en el Instituto de Nanociencia de Aragón (Universidad de Zaragoza).

2.1.4 Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja se lleva a cabo en un equipo Bruker VERTEX 70 (Bruker 2018), perteneciente al Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) de la Universidad de Zaragoza (ver figura 2.2 e imagen 2.5).

La espectroscopia infrarroja (IR) es una técnica no destructiva que permite determinar los grupos funcionales que existen en los diferentes compuestos químicos presentes en la muestra a analizar. Se basa en la interacción entre la luz y la materia en la condición de resonancia que involucra la transición mediada por dipolo eléctrico entre los niveles de energía vibracional de las moléculas, como resultado de la absorción de la radiación IR media.

Las bandas vibratorias infrarrojas se caracterizan por su frecuencia (energía), intensidad (carácter polar o polarización) y forma de banda (entorno de enlaces). Dado que los niveles de energía vibracional son únicos para cada molécula, el espectro infrarrojo proporciona una "huella digital" de una molécula en particular. Las frecuencias de estas vibraciones moleculares dependen de las masas de los átomos, su disposición geométrica y la fuerza de sus enlaces químicos. Los espectros proporcionan información sobre estructura molecular, dinámica y entorno (Larkin 2011).

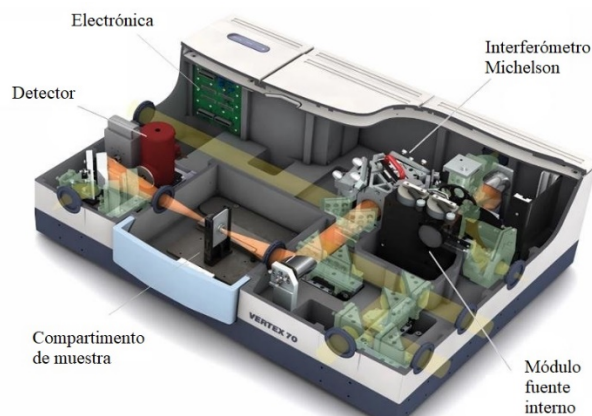


Figura 2.2. Componentes equipo FTIR VERTEX 70 (ref: Bruker, 2018).

En una medida un haz de luz infrarroja pasa a través de la muestra, y se detecta la energía absorbida por cada longitud de onda. Esto se realiza haciendo un escáner a través del espectro con un haz monocromático, el cual cambia la longitud de onda con el tiempo, o usando un instrumento con transformada de Fourier para medir todas las longitudes de onda a la vez. De aquí podemos sacar una gráfica de transmitancia o de absorbancia, la cual nos permite ver a que longitudes de onda la muestra absorbe en el infrarrojo, y de aquí deducir que grupos funcionales están presentes en la muestra problema.

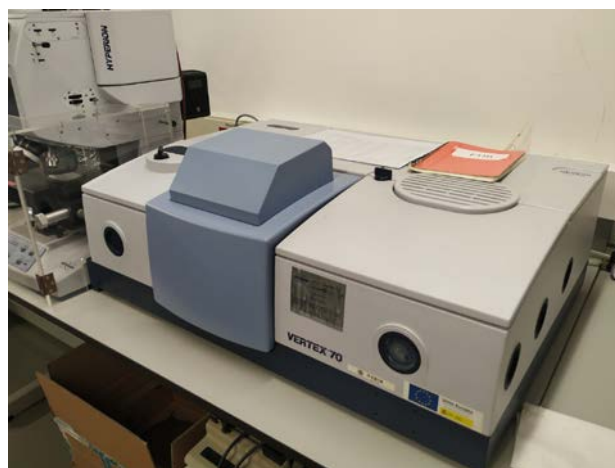


Imagen 2.5. Equipo FTIR VERTEX 70.

2.1.5 Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering, DLS)

Las medidas de dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) se realizaron en el equipo Brookhaven Instruments 90 plus Nanoparticle Size Analyzer, del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA, Universidad de Zaragoza).

Esta técnica hace uso de la dispersión de la luz por parte de las partículas en un fluido y nos permite obtener el radio hidrodinámico de las partículas. Esta dispersión depende de la temperatura del fluido, la viscosidad y el tamaño de partícula. La estimación del tamaño hidrodinámico de partícula se obtiene a partir del análisis del movimiento Browniano de las partículas haciendo uso de la espectroscopia de correlación fotónica (*Photon Correlation Spectroscopy*, PCS).

Cuando las partículas se dispersan en un líquido, se mueven al azar en todas las direcciones. El principio del movimiento browniano es que las partículas interactúan con las moléculas de solvente. Estas colisiones provocan que se transfiera una cierta cantidad de energía, lo que induce el movimiento aleatorio de las partículas suspendidas que se difunde a través de la solución. La transferencia de energía es más o menos constante y, por lo tanto, tiene un mayor efecto en las partículas más pequeñas. Como resultado, las partículas más pequeñas se mueven a velocidades más altas que las partículas más grandes. Si se conocen la viscosidad y temperatura del medio líquido (parámetros que influyen en el movimiento de las partículas), se puede determinar el diámetro hidrodinámico midiendo la velocidad de las partículas (“The Principles of Dynamic Light Scattering” 2017)(“ISO 22412-Particle Size Analysis – Dynamic Light Scattering (DLS)” 2017)(Torres Molina 2015)(Fernández-Pacheco Chicón 2008).

La relación entre la velocidad de las partículas y el tamaño de partículas viene dado por la ecuación de Stokes-Einstein (*ecuación 2.2*). La velocidad de las partículas viene dada por el coeficiente de difusión traslacional (D). Además, la ecuación incluye la viscosidad del disolvente y la temperatura porque ambos parámetros influyen directamente en el movimiento de las partículas.

En una disolución con una viscosidad η dada, a una temperatura constante T , el coeficiente de difusión (D) es inversamente proporcional al tamaño de partícula, D_h , como se observa en la *ecuación 2.2*:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_h} \quad (2.2)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann. D_h es el tamaño hidrodinámico, que es el tamaño de la partícula solvatada por las moléculas del líquido en el fluido.

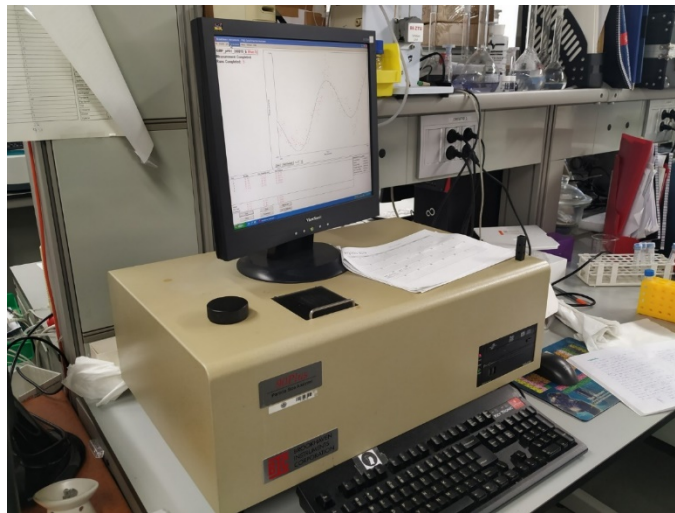


Imagen 2.6. Equipo DLS Brookhaven Instruments 90 plus Nanoparticle Size Analyzer.

La espectroscopia de correlación fotónica (PCS) se basa en medir las fluctuaciones de la dispersión de una luz láser cuando esta ilumina una muestra de nanopartículas. Estas fluctuaciones se traducen en cambios de la intensidad de la luz. Para calcular el coeficiente de difusión traslacional, y por tanto el tamaño de partícula, a partir de los cambios en la intensidad de la luz, esta señal debe ser transformada matemáticamente haciendo uso de la llamada función de autocorrelación (*Auto Correlation Function*, ACF). La función de autocorrelación es una descripción matemática de las fluctuaciones de la luz dispersada. Para hacer ello, la intensidad de la luz dispersada en un momento

t se compara con la intensidad de la misma cantidad de intensidad desplazada por el tiempo de retardo τ (figura 2.3).

Estos cálculos, se realizan a tiempo real y se representan en función de una escala logarítmica de tiempo. Todas las medidas acumuladas, se utilizan para ajustar la función de correlación. El coeficiente de difusión se determina, por tanto, a partir de estas medidas y el diámetro hidrodinámico (es decir, el tamaño de partícula) se obtiene mediante la ecuación Stokes-Einstein (ecuación 2.2) (“The Principles of Dynamic Light Scattering” 2017)(“ISO 22412-Particle Size Analysis – Dynamic Light Scattering (DLS)” 2017).

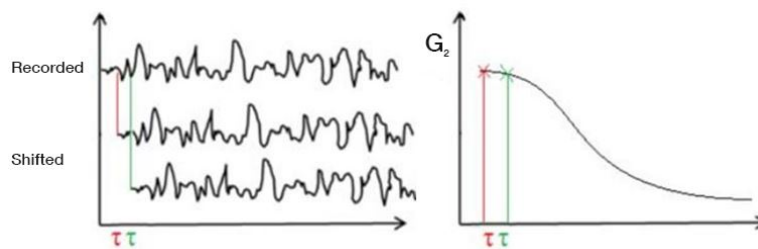


Figura 2.3. Intensidad de la luz (izquierda) en función del tiempo, y función de correlación (derecha) (ref. The principles of dynamic light scattering, 2017).

2.1.6 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman y Micro-Raman es una técnica muy adecuada para la caracterización de materiales. En primer lugar, es una técnica no destructiva que proporciona información estructural y electrónica de un material con alta resolución y de manera rápida. Por ello es la técnica ideal para la caracterización del grafeno y de una amplia variedad de estructuras de carbono (Ferrari and Basko 2013)(Landsberg and Mandelshtam 1928)(Raman and Krishnan 1928). En esta tesis doctoral, la espectroscopia Raman se ha utilizado para la caracterización del recubrimiento de las nanopartículas sintetizadas, antes y después de su funcionalización. Se ha utilizado también para analizar el recubrimiento de las nanopartículas una vez que han sido internalizadas por células de la línea de macrófagos murinos J744.

El equipo donde se han realizado las medidas de espectroscopia Raman para la caracterización del recubrimiento de las nanopartículas sintetizadas, antes y después de su funcionalización, ha sido un equipo Raman Confocal Alpha 300 M+ de WITec en el Instituto de Nanociencia de Aragón. Las medidas, se han llevado a cabo con un láser de 532 nm, a una intensidad de 0,5 mW, realizando 25 acumulaciones por medida, durando 3 segundos cada acumulación. Los componentes del equipo, se muestran en la *figura 2.4* (WITec 2018).

Las medidas de espectroscopía Raman en co-cultivos de nanopartículas y macrófagos J774, se realizaron en un espectrómetro Raman (T64000) Infraestructura MALTA CONSIDER de la Universidad de Cantabria que dispone de un láser de 514 nm, operando a una intensidad de 3 mW, realizando 3 acumulaciones por medida, durando 30 segundos cada acumulación. Estas medidas se realizaron en el marco de la colaboración con el Prof. Jesús González del *Departamento de Ciencias de la tierra y Física de la Materia Condensada de la Universidad de Cantabria*. La preparación de las muestras para estos experimentos se describe en la *sección 2.4.3 Ensayos de viabilidad con células HeLa y J774*.

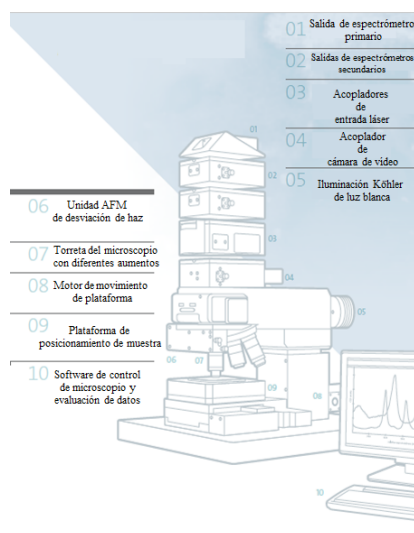


Figura 2.4. Componentes principales del equipo Raman Confocal Alpha 300 M+ de WITec (ref: WITec Alpha300 Series).

La espectroscopia Raman se basa en el proceso inelástico de dispersión de la luz por parte de la muestra irradiada, a diferencia de la dispersión de Rayleigh, que es un proceso de colisión elástico. El *scattering* Raman es mucho menos probable que la dispersión de Rayleigh, y se debe a la dispersión inelástica de los fotones por los fonones (Landsberg and Mandelshtam 1928)(Raman and Krishnan 1928)

La dispersión Raman puede clasificarse en dos tipos, Stokes y anti-Stokes (ver *figura 2.5*). En la dispersión Raman Stokes, los fotones incidentes pierden parte de su energía en el proceso de interacción con la muestra y la radiación dispersada es de una frecuencia inferior que la de la radiación incidente dando lugar a una excitación vibracional (creación de fonones en sólidos). Como la muestra debe recobrar su estado estacionario, ésta diferencia de energía se emite en forma de fotones. En la dispersión Raman anti-Stokes, los fotones inciden en la muestra cuando esta se encuentra en un estado vibracional excitado y después de esta interacción el sistema vuelve al estado de equilibrio; entonces el fotón emitido adquiere una energía mayor que la inicial (en este proceso en sólidos, se destruyen fonones cuya energía es la diferencia entre las energías de la radiación dispersada e incidente). (Ferrari and Basko 2013)(Landsberg and Mandelshtam 1928)(Raman and Krishnan 1928).

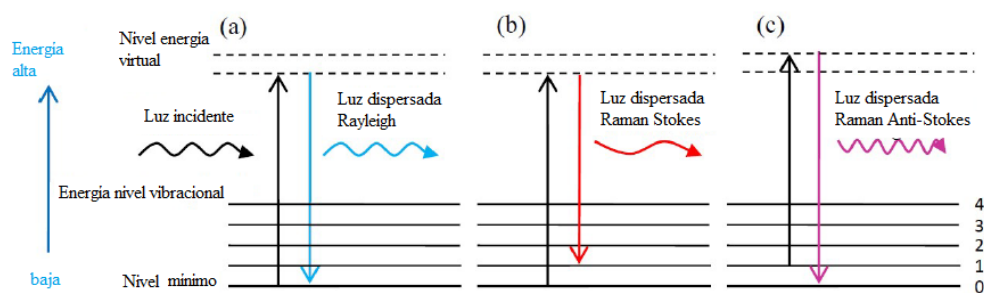


Figura 2.5. Diagrama de los procesos de dispersión Rayleigh y Raman: a) Dispersión Rayleigh, b) Dispersión Raman Stokes y c) Dispersión Raman Anti-Stokes (ref: Xu, 2018).

Los procesos Raman Stokes son más probables que los anti-Stokes (Yu and Cardona

2005), por lo que lo más usual en un espectro Raman es representar la intensidad de la luz dispersada frente a lo que se conoce como desplazamiento Raman (*Raman shift*, en cm^{-1}) (Ferrari and Basko 2013). Este se determina como:

$$\text{Raman shift} = \left(\frac{1}{\lambda \text{ incidente}} - \frac{1}{\lambda \text{ dispersión}} \right) \times 10^7 \quad (2.3)$$

donde la $\lambda \text{ incidente}$ y la $\lambda \text{ dispersión}$ es la longitudes de onda (en nm) de la luz incidente y de la dispersada, respectivamente. Esto hace que en un espectro, el desplazamiento Raman (*Raman shift*) sea normalmente independiente de la longitud de onda incidente.

El análisis de los procesos Raman nos proporciona por tanto información acerca de los estados vibracionales de un material. Cuando la longitud de onda de los fotones incidentes se encuentra en el rango entre el infrarrojo (IR) y el ultravioleta (UV), esta energía es grande en comparación con la energía de los fonones (Born and Huang 1954). Por ello el principal mecanismo de dispersión necesita de estados intermedios, lo que implica excitaciones electrónicas, en lugar de un acoplamiento directo fotón-fonón. Por lo tanto, la espectroscopia Raman puede también dar información acerca de los estados electrónicos (Ferrari and Basko 2013)(Basko, Piscanec, and Ferrari 2009)(Faugeras et al. 2010).

Durante la caracterización mediante espectroscopia Raman, se detecta la luz dispersada por la muestra analizada, y el correspondiente espectro Raman obtenido nos da información acerca de las vibraciones moleculares características de la estructura del material analizado (Z. Xu et al. 2018).



Imagen 2.7. Equipo Raman Confocal Alpha 300 M+ de WITec.

2.1.7 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)

La capacidad de una suspensión de nanopartículas magnéticas para generar calor a partir del acoplamiento magnético entre el momento magnético de las nanopartículas y un campo magnético alterno aplicado viene dada por coeficiente de absorción específico de potencia (*Specific Absorption Rate*, SAR). Dicho coeficiente da cuenta de la energía absorbida por unidad de masa de las partículas magnéticas, que luego es transferida a la suspensión, elevando su temperatura. Para realización de la medida de este coeficiente se ha utilizado un equipo DM1 de la serie DM100, de la empresa nB Nanoscale Biomagnetics, (España), como el mostrado en la *imagen 2.8* y cuyos componentes se muestran en la *figura 2.6*. Este equipo permite aplicar campos magnéticos desde 5 a 300 Gauss a diferentes frecuencias, desde 229 a 828 kHz. El SAR se determina a partir del incremento de temperatura de la suspensión, medida durante un cierto intervalo de tiempo.

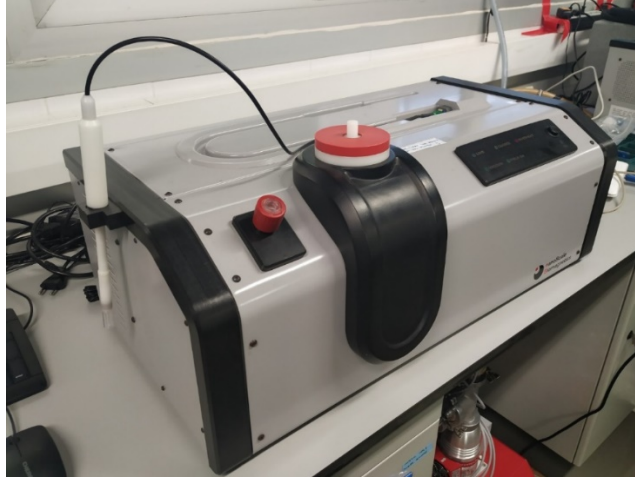


Imagen 2.8. Equipo DM1 de la serie DM100, de la empresa nB Nanoscale Biomagnetics, en el laboratorio del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA, Universidad de Zaragoza).

Para la medida la suspensión de nanopartículas se introduce en un vial de 1 mL que se coloca en el centro de la bobina generadora de campo magnético, en una cavidad en la que se hace vacío (10^{-7} mbar) para aislar la muestra de las variaciones de temperatura del exterior. Un termómetro de fibra óptica se coloca en el centro del vial para medir la temperatura de la muestra durante un cierto intervalo de tiempo. Antes de cada medida es necesario esperar unos segundos para estabilizar la temperatura inicial de la muestra.

El SAR se calcula a partir de la potencia (P) absorbida por unidad de masa de nanopartículas, a partir del incremento de temperatura (ΔT) producido por una masa de partículas (m_{NP}), diluidas en una cierta masa de líquido (m_{liq}), durante el intervalo de tiempo (Δt) que dura el experimento. La expresión del SAR viene dada por la *ecuación 2.4*:

$$SAR = \frac{P}{m_{NP}} = \frac{m_{LIQ}c_{LIQ} + m_{NP}c_{NP}}{m_{NP}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (2.4)$$

donde c_{liq} y c_{np} son las capacidades caloríficas del líquido y de las nanopartículas utilizadas, respectivamente. Como la concentración de las nanopartículas es, normalmente, menor que 1% en peso, la *ecuación 2.4* se puede aproximar a:

$$SAR = \frac{c_{LIQ} \delta_{LIQ}}{\Phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (2.5)$$

donde δ_{liq} y Φ son la densidad del líquido y la concentración de las nanopartículas, respectivamente (Gonzalez-Fernandez et al. 2009).

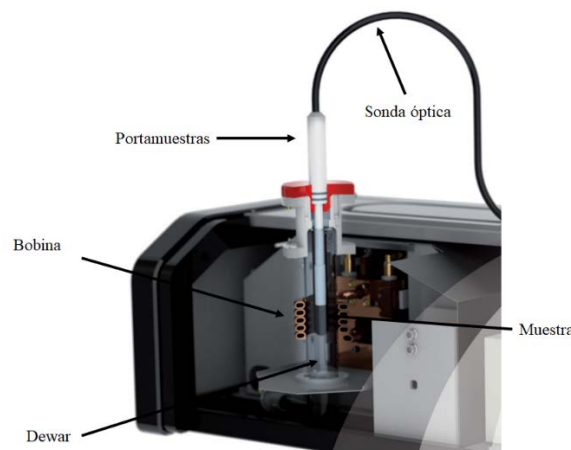


Figura 2.6. Sección de un aplicador DM con los detalles sobre el equipamiento (ref: Nanoscale Biomagnetics).

2.1.8 Potencial Z

Las medidas de determinación del Potencial Z se realizaron en el equipo Brookhaven Instruments 90 plus Nanoparticle Size Analyzer del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA, Universidad de Zaragoza).

El potencial zeta es una propiedad física que se utiliza para medir la carga de cualquier partícula en suspensión o macromolécula. Se puede utilizar para optimizar la composición de las suspensiones, emulsiones y disoluciones proteicas, prediciendo las interacciones con la superficie, y optimizando la formación láminas y recubrimientos. Puede también usarse como guía para optimizar la estabilidad de las partículas, ya que la medida dada por el potencial zeta nos da una indicación de la estabilidad potencial del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta muy negativo o muy positivo, éstas van a tender a repelerse disminuyendo la tendencia de las partículas de juntarse. Sin embargo, si las partículas tienen un potencial zeta

pequeño, las partículas no van a tener tendencia a repelerse sino a aglomerarse y flocular.

Los valores que determinan si una suspensión es estable o no estable están entre los +30 mV y los -30 mV. Las partículas con un potencial zeta mayor a estos valores, se les considera estables. Sin embargo, si las partículas tienen una densidad mayor que el líquido en el que están dispersas, aunque estén bien dispersas, lo harán formando un sedimento. El potencial zeta depende tanto de la naturaleza del líquido en el que las nanopartículas están dispersas como de la superficie del material. Por tanto para cada valor de potencial zeta se debe precisar en qué líquido se está realizando la medida. Los factores que más afectan al potencial zeta son: el pH, la conductividad y la concentración, en nuestro caso, de nanopartículas (Limited 2011).

2.1.9 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (X-ray Photon Spectroscopy, XPS)

La espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) se ha utilizado para estudiar la composición de las distintas nanopartículas sintetizadas en esta tesis.

La espectroscopia de fotoelectrones inducidos por rayos X, también llamada espectroscopia electrónica para análisis químico, (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, ESCA), es una técnica de caracterización que proporciona información acerca del estado químico y la estructura electrónica de los elementos que existen en un material.

Esta técnica, desarrollada por el físico sueco K. Siegbahn, se basa en el efecto fotoeléctrico, fenómeno por el cual un haz de fotones de suficiente energía incide en un material y provoca la emisión de (foto) electrones (fotoemisión). En concreto, la espectroscopia XPS consiste en excitar los electrones en niveles más internos de los átomos con la energía suministrada por un haz de rayos-X. La energía de los fotoelectrones emitidos proporciona información sobre la energía de los niveles

electrónicos entre los que ha tenido lugar la transición y, por tanto, sobre la naturaleza de cada átomo emisor (Skoog, Holler, and Crouch 2007). La energía cinética (E_K) del foto-electrón emitido viene dada por la relación de Einstein:

$$E_K = h\nu - E_B \quad (2.6)$$

donde $h\nu$ es la energía de radiación incidente y E_B es la energía de enlace del electrón en un determinado nivel de energía. A su vez E_B , puede expresarse en función de:

$$E_B = E_I - E_F \quad (2.7)$$

Donde E_I y E_F es la energía total del estado inicial (neutro) y final (ionizados) respectivamente. Analizando la energía de los fotoelectrones emitidos al irradiar una determinada muestra se obtiene un espectro con una serie de picos que corresponden a la energía de enlace característica de cada elemento químico constituyente. Las áreas de cada pico se usan para determinar la composición química del material. Como la forma de cada pico y la energía de enlace dependen del estado de valencia del electrón emitido, la técnica de XPS nos proporciona también información sobre los enlaces químicos. La técnica de XPS es aplicable sólo para átomos más pesados que el helio.

Los experimentos se realizaron en un equipo Axis Ultra DLD (Kratos Tech.) del Instituto de Nanociencia de Aragón (Universidad de Zaragoza). En la *figura 2.7* se representa un esquema de un equipo de XPS. En general, este consiste en un espectrómetro de ultra-alto vacío (UHV). La fuente de rayos X utilizada dispone de un ánodo de aluminio Mono Al $K\alpha$ 120 W (8 mA, 15 kV, $h\nu = 1486,6$ eV) que suministra un haz monocromático (Diplas 2013)(Manchester et al. 2013).

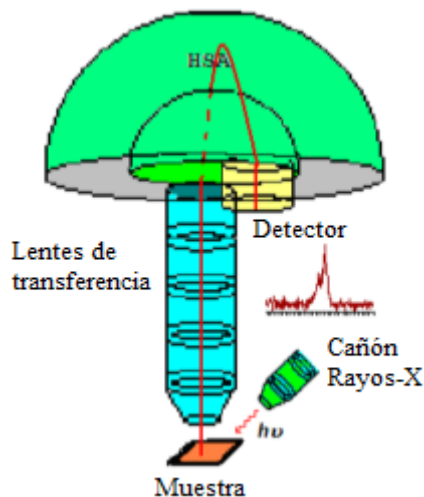


Figura 2.7. Esquema equipo XPS (ref: Casa-XPS, 2013).

La energía de los fotoelectrones se determina mediante un analizador electrostático, y los fotoelectrones se detectan con un detector multicanal, con una placa microcanal.

2.1.10 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS)

Esta técnica se basa en la absorción de radiación ultravioleta–visible por las moléculas de un determinado compuesto químico. Cuando se produce la absorción de luz ultravioleta, se produce una excitación de los electrones desde el estado fundamental hasta un estado de mayor energía. Esta energía absorbida es igual a la diferencia de energía entre el estado de mayor energía y el estado fundamental, que son característicos de la estructura de las moléculas de dicho compuesto químico. De esta manera, la absorción ocurre para ciertas longitudes de onda o frecuencias de la radiación por lo que cada sustancia química posee un espectro característico de absorción.

La espectrofotometría de ultravioleta visible se basa en que cuando una radiación monocromática pasa a través de una disolución que contiene una sustancia absorbente, la disminución de la intensidad de la luz es proporcional a la concentración de la disolución y la radiación incidente.

Esto se expresa mediante de la Ley Beer-Lambert según la siguiente ecuación:

$$A = \left(\frac{I_0}{I} \right) = \varepsilon cl \quad (2.8)$$

donde A representa la absorbancia, I_0 es la intensidad de la luz que incide sobre la muestra, I es la intensidad de la luz después de atravesar la muestra, c es la concentración de la especie absorbente, l es la longitud de la celda de medida y ε es la capacidad de absorción molar.

De la ley de Beer-Lambert se puede deducir que cuanto mayor sea el número de moléculas que son capaces de absorber la luz a una determinada longitud de onda, mayor será el grado de absorción de la luz (Choudhary 2017).

La espectroscopia de ultravioleta visible se ha utilizado para la determinación de la cantidad de hierro en el núcleo de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ y de las nanopartículas funcionalizadas. Para ello, se coloca la muestra entre el haz de luz y el fotodetector y la intensidad de la luz UV/Visible se mide antes y después de pasar por la muestra, y así obtenemos el espectro de extinción en función de la longitud de onda.

En cada experimento se debe medir con anterioridad un blanco que consiste en los mismos disolventes en los que se va a diluir la muestra, para eliminar los posibles problemas e interferencias que el disolvente pueda dar. La concentración de hierro se ha determinado tras disolver la muestra de nanopartículas en ácido clorhídrico (HCl) para oxidar todo el hierro a Fe^{3+} . Tras esto se añade una disolución de 1,5 M de KSCN para formar un complejo hierro-tiocianato, que tiene una fuerte absorbancia a 478 nm. La concentración de hierro se determina comparando el valor obtenido de la muestra en absorbancia, frente a una curva de calibración (Adams 1995). Las medidas de espectroscopia de ultravioleta-visible se realizaron en un espectrofotómetro Uv-Visible Shimadzu UV 1280, del Instituto de Nanociencia de Aragón (INA-Universidad de Zaragoza).



Imagen 2.9. Equipo UV/Vis Shimadzu UV 1280.

2.1.11 Análisis termogravimétrico (TGA)

El contenido en hierro de las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ se determinó mediante análisis termogravimétrico, en un equipo TGA/DSC 1 STAR del *Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets* (LPCNO) de la Universidad Paul Sabatier de Toulouse (Francia) en el marco de colaboración con este grupo. El equipo tiene un sistema equipado con una microbalanza UMX5, un controlador de flujo de gas GC200 y sensores DTA y DSC. Un diagrama típico de las partes que componen un equipo de TGA es el que se puede observar en la *figura 2.8* (Jürgen Buschow et al. 2001).

El análisis termogravimétrico consiste en la determinación de la masa de una muestra (desde miligramos hasta gramos) a una temperatura constante o que varía linealmente en una atmósfera dada. En el equipo utilizado la temperatura de medida puede variar desde temperatura ambiente hasta temperaturas superiores a los 2700 K.

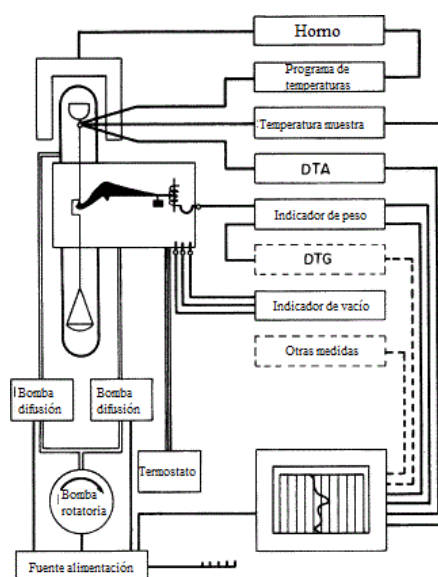


Figura 2.8. Esquema equipo TGA (ref. Jürgen Buschow et al. 2001).

En un experimento se mide el peso de la muestra en función del tiempo y de la temperatura aplicada en las condiciones atmosféricas fijadas. Mediante TGA podemos observar cambios en la masa en la muestra del orden de microgramos,

2.1.12 Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES)

El contenido en hierro del núcleo de las nanopartículas de Fe@C se ha determinado mediante la técnica de ICP-OES en un equipo Spectroblue de la casa Ametek (Modelo Spectroblue-EOP-TI FMT26) del servicio de análisis del Instituto de Carboquímica de la Universidad de Zaragoza.

La técnica ICP-OES es una técnica de análisis multielemental que utiliza una fuente de plasma de acoplamiento inductivo para producir la excitación de los electrones de un determinado elemento químico a niveles de energía superiores. Tras dicha excitación, los electrones regresan a su estado inicial, emitiendo radiación con una longitud de onda característica para cada elemento. La intensidad de la luz emitida es proporcional al número de átomos de dicho elemento (Aylón 2016).



Imagen 2.10. Equipo Spectroblue de la casa Ametek para el análisis ICP-OES (ref: Aylón 2016).

Para la determinación de hierro en muestras en polvo de nanopartículas se les somete a una fusión con peróxido de sodio y posterior disolución con HCl concentrado. Tras estos pasos, se realiza la medida de la concentración en hierro por espectroscopía de emisión atómica en el equipo ICP-OES.

2.1.13 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protones (^1H RMN), se utilizó para la caracterización del polímero catecol-(CH_2)₈-PEG sintetizado para la funcionalización de las nanopartículas $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$. Dicha caracterización se llevó a cabo en diferentes espectrómetros de resonancia magnética nuclear. El primero de ellos es un espectrómetro Bruker Avance DPX que opera a 250 MHz (5,8 T). Dispone una sonda QNP $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}$ con intercambiador automático y posibilidad de temperatura variable (Barcelona and Nuclear 2020). Otro equipo es un espectrómetro Bruker Avance DPX que opera a 360 MHz (8,4 T), equipado con una sonda de banda amplia, por lo que es particularmente interesante tanto para la caracterización de moléculas orgánicas como inorgánicas, y en particular con núcleos poco comunes como: ^6Li , ^7Li , ^{15}N , ^{23}Na , ^{29}Si , ^{31}P , ^{195}Pt . Ofrece también la posibilidad de realizar experimentos a diferentes

temperaturas (Barcelona and Magnética 2020). Ambos equipos pertenecen a la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) y se utilizaron en el marco de la colaboración con los Profesores Fernando Novio y Félix Busque, del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y de la Universidad Autónoma de Barcelona. Por último, se utilizó también un espectrómetro Bruker AVANCE 400 MHz de dos canales equipado con una sonda QNP (^{13}C - ^{19}F - ^{31}P / ^1H) y con un dispensador de muestras automático del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH) de la Universidad de Zaragoza (Zaragoza 2020). El equipo se muestra en la *imagen 2.11*.



Imagen 2.11. Equipo Bruker AVANCE 400 MHz del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea (ISQCH) de la Universidad de Zaragoza (ref: Zaragoza, 2020).

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear permite el estudio de la estructura molecular a partir del estudio de la interacción de un campo electromagnético oscilante de radio frecuencia con los núcleos atómicos cuando están sometidos a un fuerte campo magnético externo. Se comenzó a desarrollar a mitad del siglo XX y se utiliza para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica permite estudiar

núcleos atómicos con un número impar de protones, neutrones o de ambos. Estos núcleos son magnéticamente activos, es decir, tienen un momento magnético distinto de cero, caracterizado por su número de spin nuclear (Macomber 1998).

La aplicación de un campo magnético da lugar a que el estado fundamental de los spines nucleares se desdoble en dos niveles entre los cuales existe una diferencia de energía proporcional al campo magnético aplicado.

Cuando se irradia una muestra con una onda electromagnética (en este caso en la banda de radiofrecuencias) de energía igual a la diferencia entre los niveles (condición de resonancia), los spines en el estado de más baja energía son excitados al estado de mayor energía, absorbiendo la energía de la onda electromagnética que es captada por el detector del espectrómetro, lo que da lugar a la aparición de un pico en el espectro RMN. Representando estas señales en una gráfica de intensidad frente a frecuencia se obtiene el llamado espectro de RMN. Cuando los spines vuelven a su estado inicial se libera esta energía.

En función del núcleo analizado ($^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{19}\text{F}/^{31}\text{P}$), la resonancia se da a diferentes frecuencias y el pico va a aparecer en diferentes posiciones. Dependiendo del entorno químico del núcleo las señales emitidas no aparecen exactamente a la frecuencia de resonancia, sino desplazadas una cantidad que se conoce como desplazamiento químico. Esto es debido a que los protones de los núcleos están apantallados por los electrones de su entorno. Por ello en el espectro de RMN la intensidad se representa en función del desplazamiento químico, en partes por millón (ppm o δ). Además, si un núcleo dado tiene en su entorno otros núcleos iguales que él, la señal se va a desdoblar, apareciendo dobletes, tripletes etc. separados una distancia característica conocida como constante de acoplamiento. Por tanto, un espectro de RMN, muestra las diferentes señales a diferentes frecuencias correspondientes a los grupos funcionales de la molécula, dando una información detallada sobre la estructura molecular, mucho más precisa que la obtenida por otras técnicas (Macomber 1998)(Peter, Vollhardt, and Schore 2005).

2.1.14 Citometría de flujo

Los ensayos de viabilidad celular con células de las líneas HeLa y J774 se realizaron en un equipo de citometría de flujo Becton Dickinson FACS Cantoll y los resultados fueron analizados por el software FACS Diva (Becton Dickinson, NJ, USA). Los experimentos se realizaron en los laboratorios del grupo de la Prof. Mónica López Fanarraga del *Dpto. Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander)* en el marco de colaboración con este grupo.

La citometría de flujo es una técnica utilizada en muy diversas aplicaciones en Biología y Biomedicina, como por ejemplo en estudios de inmunofenotipo (estudio de proteínas de membrana expresadas por las células), análisis de ADN, viabilidad y proliferación celular, conteo de células, entre otras. Permite obtener información a partir de un estudio individualizado de un gran número de células (entre 500 y 1000) que por tanto serán una muestra lo suficientemente representativa del conjunto poblacional. Básicamente consiste en que la suspensión de células a analizar se hace pasar a través de un pequeño orificio, de modo que cuando salen lo hacen una a una formando parte de una corriente continua o flujo cilíndrico. Este pasa a través de uno o varios rayos láser cuya dispersión y reflexión se analiza a diferentes ángulos y emisiones de fluorescencia.

Un citómetro de flujo consta de tres partes como el que se muestra en la *figura 2.9*: la primera parte consta de un sistema de fluido unitario que permite el paso de células una a una; la segunda es una fuente de excitación y un sistema de emisión óptica formado por un láser, detectores y espejos reflectores que llevan la señal hasta la tercera parte, un sistema electrónico que digitaliza la señal para ser analizado con un software informático específico (Picot et al. 2012)(Madrid 2020).

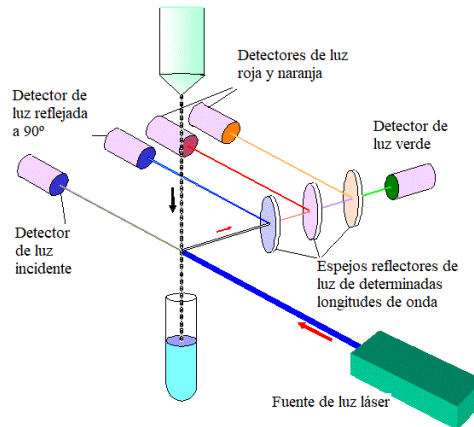


Figura 2.9. Esquema básico de un citómetro de flujo (ref. Citometría de flujo CNB).

Mediante citometría de flujo se puede estudiar el ciclo celular, representando la cantidad de ADN por cada célula o fragmento de ésta que pasa por el detector frente al número de eventos contados por el citómetro. Esta técnica se ha utilizado para determinar el bloqueo en la proliferación celular (el contenido de ADN por célula se duplica durante el ciclo celular) y también para cuantificar el contenido fraccional de ADN (pico "sub- G_0 "), indicativo de apoptosis (Villegas et al. 2014). De esta manera se obtienen los perfiles de ciclo celular mediante los cuales se ha estudiado la citotoxicidad de las nanopartículas sintetizadas esta tesis, que se describen con más detalle en el capítulo dedicado a los experimentos *in vitro*. Las condiciones en las que se realizaron los cultivos de las células con las nanopartículas para este estudio de viabilidad celular, se describen en la sección 2.4.3 *Ensayos de viabilidad con células HeLa y J774*.

La citometría de flujo se realizó en una suspensión de células fijadas, teñidas con Hoechst, un colorante que produce una tinción cuantitativa de ADN. El análisis en el equipo Becton Dickinson FACS CantoII se realizó en un promedio de 10.000 células por medición.

2.2 Síntesis de nanopartículas

La síntesis de las nanopartículas magnéticas se ha realizado por dos métodos diferentes, método físico y método químico, para obtener diferentes tipos de partículas, con características y propiedades diferentes. La síntesis de las nanopartículas por el método físico (nanopartículas core-shell: Fe@C) se ha realizado por el método de *top-down*. Mediante este método se parte de un blanco (grafito y Fe) que es sometido a una elevada temperatura mediante un plasma de He. El material del blanco se sublima y en proceso de condensación se forman nanopartículas de Fe en una matriz de carbono. Las nanopartículas obtenidas presentan una dispersión de tamaños difícil de controlar. Los procedimientos químicos siguen el método *bottom-up*. Mediante la realización de reacciones químicas se obtienen nanopartículas (por ejemplo las nanopartículas Fe₃O₄@C) con un buen control de su tamaño y composición (Cornejo 2015).

2.2.1 Síntesis de nanopartículas de Fe@C

La síntesis de nanopartículas de hierro recubiertas de carbono se lleva a cabo en un horno de descarga de arco, por un método diseñado por Krätschmer-Huffman en 1990 (Krätschmer et al. 1990). El método Krätschmer se basa en la utilización de un horno de descarga por arco en una atmósfera de gas inerte. Este consiste en una cámara cilíndrica, refrigerada por agua, en la cual hay dos electrodos, cada uno conectado a los terminales de una fuente de corriente d.c. Uno de estos electrodos es un ánodo de grafito estacionario, que forma la base inferior del horno; en él se coloca un pequeño cilindro de grafito en el que se perfora un hueco que contiene en su interior hierro micrométrico (10 micras, ALFA-AESAR); el otro electrodo es un cátodo intercambiable en forma de barra que atraviesa la parte superior del cilindro, y que en algunas ocasiones es de grafito (ALDRICH) y en otras, es de wolframio. El arco se produce al aplicar una corriente eléctrica entre el cátodo (intercambiable debido a su desgaste en el proceso de descarga) y el ánodo, al ponerlos en contacto en una atmósfera de helio o argón. Esta corriente origina un arco que ioniza el gas y genera un plasma a alta temperatura (próxima a los 3000 – 3400° C). El cilindro de grafito y el polvo de hierro se subliman y posteriormente condensan formando nanopartículas. Estas, junto con otras estructuras carbonosas

forman un depósito en forma de hollín en la cara interna de la cámara. Entre el material recolectado en la cámara encontramos: nanoestructuras de carbono, carbono amorfo y nanopartículas de hierro encapsuladas en capas de grafito (Fernández-Pacheco et al. 2007)(Pérez-de-luque et al. 2012). Para muchas aplicaciones en Biología, Biotecnología, Biomedicina etc. es necesario que las nanopartículas sean biocompatibles y por lo tanto, en este caso deben estar completamente recubiertas. Las partículas magnéticas no recubiertas o recubiertas parcialmente, se eliminan mediante ataque químico. Este proceso seguido ha consistido en introducir las nanopartículas obtenidas en HCl 3M calentando a 80 °C durante 90 minutos. Tras este tiempo, el material magnético no recubierto se elimina, y sólo las nanopartículas totalmente recubiertas permanecen en la solución. En este proceso se forman grupos hidroxilo y, en algunas ocasiones, carboxilo en su superficie (Fernández-Pacheco Chicón 2008). Estas partículas se lavan con agua destilada y se separan magnéticamente con un imán, descartando el sobrenadante. Este proceso se repite varias veces con las nanopartículas que resultan de la separación.

2.2.2 Síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄@C

La síntesis de nanopartículas de Fe₃O₄@C se ha realizado siguiendo un método original basado en la combinación y modificación de dos métodos previamente publicados. (De Matteis et al. 2012) (Zhao, Cui, and Fu 2016). Un esquema del proceso se muestra en la *figura 2.10*:

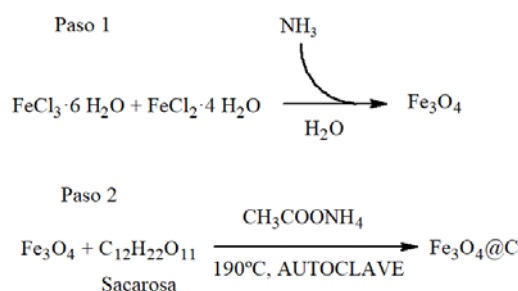


Figura 2.10. Esquema del proceso para la obtención de nanopartículas de Fe₃O₄@C mediante síntesis química.

El primer paso consiste en la síntesis por coprecipitación de nanopartículas de magnetita. Para ello se prepara una disolución en relación 1:3 molar de dos sales de hierro ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en 10 ml de agua destilada, a la que luego se añade NH_3 (6 mL) gota a gota con agitación. El color de la disolución cambia de naranja a marrón oscuro/negro, lo que indica la formación de las nanopartículas. La suspensión se sonica durante unos segundos y se deja reposar 10 minutos. Posteriormente las nanopartículas se separan magnéticamente y se lavan con agua tres o cuatro veces, hasta que las nanopartículas son estables durante minutos en agua. Finalmente las nanopartículas magnéticamente separadas se resuspenden en 10 mL de agua.

El segundo paso es la síntesis hidrotérmal para el recubrimiento con carbono de las nanopartículas de magnetita obtenidas en el paso 1. Para ello se prepara una disolución de sacarosa y acetato de amonio en relación 1:237 molar en agua destilada (15 mL) que se mezcla con la disolución de magnetita preparada anteriormente (10 mL) y se calienta a 190 °C en un autoclave de Teflón durante 24 horas. El producto obtenido se somete a separación magnética y se lava tres veces con agua destilada (3 x 10 mL). Finalmente, el polvo negro obtenido se resuspende en 10 mL de agua destilada.

2.2.3 Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$

La síntesis de las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ se realiza en dos pasos. En primer lugar se obtienen las nanopartículas de Fe (0) y posteriormente, se produce la carburación de las nanopartículas de Fe (0) hasta la obtención de las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$.

2.2.3.1 Síntesis de nanopartículas de Fe (0)

La síntesis de nanopartículas de Fe (0) se llevó a cabo mediante la modificación de un método puesto a punto en el Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets- (CNRS-Université Paul Sabatier), en Toulouse (Francia) (Lacroix et al. 2009), en el marco de una estancia predoctoral en dicho laboratorio. Trabajando en caja seca debido a la inestabilidad a la atmósfera del precursor de hierro y siguiendo el esquema

representado en la *figura 2.11*, a una disolución incolora de ácido palmítico (666,4 mg, 2,6 mmol, 1,3 equivalentes por mol de hierro) en mesitileno (10 mL) se le añade una disolución verde de $\{\text{Fe}[\text{N}(\text{SiMe}_3)_2]_2\}_2$ (753,2 mg, 2 mmol) en mesitileno (5 mL). La mezcla, se agita con un agitador magnético, y el color cambia inmediatamente a amarillo. Después de esto, se añade una disolución de hexadecilamina (HDA) (483 mg, 2 mmol, 1 equivalente) en mesitileno (10 mL). La mezcla, en el interior de un reactor Fischer Porter, empieza a oscurecerse y se convierte a negro tras 10 minutos de agitación a temperatura ambiente. La disolución se pone en una atmósfera de H_2 a una presión de 2 bar durante 3 minutos y se deja reaccionar en un baño de silicona a 150°C durante 72 horas con agitación magnética (400 rpm). La reacción se para y las nanopartículas se recogen por decantación ayudándose de un imán. La mezcla se introduce de nuevo en la caja seca y se lava 3 veces (3×10 mL) con tolueno y 3 veces (3×10 mL) con THF. Después, se seca a vacío.

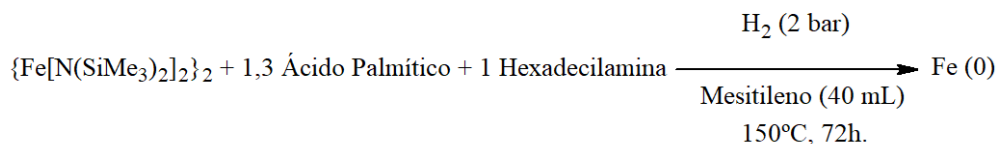


Figura 2.11. Esquema del proceso para la obtención de nanopartículas de Fe(0) mediante síntesis química.

2.2.3.2 Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}_{2,2}\text{C}$

La síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}_{2,2}\text{C}$ se lleva a cabo siguiendo el método previamente puesto a punto en el LPCNO (A. Bordet et al. 2016) con pequeñas modificaciones. Las nanopartículas de $\text{Fe}_{2,2}\text{C}$ se obtienen por carburación de las nanopartículas de Fe (0) previamente sintetizadas, según el esquema de la *figura 2.12*. De nuevo, es necesario trabajar en el interior de una caja seca, debido a la inestabilidad de las nanopartículas de Fe (0) previamente sintetizadas. Por ello 50 mg (0,67 mmol de hierro) de estas

nanopartículas se redispersan en mesitileno (10 mL), se añaden 30 mg de ácido palmítico y la mezcla se presuriza con CO/H₂ (2 bar/ 2 bar) en un reactor Fischer Porter. La disolución se calienta a 150 °C durante 96 horas. Al final de la reacción, las nanopartículas se recuperan por decantación con la ayuda de un imán y se lavan 3 veces con tolueno (3 x 10 mL). Las nanopartículas se secan a vacío hasta obtener un polvo negro.

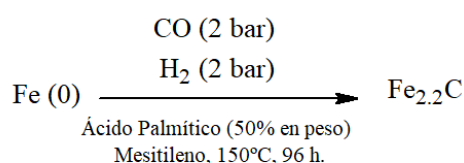


Figura 2.12. Esquema del proceso para la obtención de nanopartículas de Fe_{2,2}C mediante síntesis química.

2.3 Funcionalización de nanopartículas

En el caso de las partículas Fe@C y Fe₃O₄@C la funcionalización de su superficie tuvo como objetivo mejorar su estabilidad en suspensiones acuosas, uno de los requerimientos para su posible posterior aplicación en Biomedicina. En el caso de las nanopartículas Fe_{2,2}C la funcionalización era también necesaria para hacer estas nanopartículas biocompatibles. En todos los casos, la funcionalización de las nanopartículas se llevó a cabo recubriéndolas con diferentes polímeros orgánicos.

2.3.1. Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C con dopamina/Poly-L-Lisina

A una disolución de 10 mg (0,058 mmol, 0,2 equivalentes) de dopamina, se añaden 2 mL (10 μg/ml) de Poly-L-Lisina y 595 μl Et₃N. Se pone a reaccionar durante una noche a 100 °C a reflujo (H₂O destilada 5 ml como disolvente) y al día siguiente se añaden 20 mg (0,29 mmol) de nanopartículas de Fe@C que se dejan reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

Finalizada la reacción, el producto obtenido se recoge con un imán y se lava tres veces con agua destilada (3 x 10 mL). Finalmente, el polvo negro obtenido se resuspende en 10 mL de agua destilada. La estructura del polímero que se pretende sintetizar para funcionalizar las nanopartículas de Fe@C con dopamina/Poly-L-Lisina tiene una estructura como el de la *figura 2.13* y que posteriormente se confirmará mediante diferentes técnicas de caracterización. Los resultados se presentan en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*. El uso de dopamina y Poly-L-Lisina dota a las nanopartículas de Fe@C unas nuevas propiedades. Por un lado la dopamina es un compuesto orgánico biocompatible que mejora la estabilidad de las nanopartículas en suspensiones acuosas (Gao et al. 2014) y la Poly-L-Lisina es un polímero con un aminoácido esencial que favorece la internalización celular de las nanopartículas magnéticas (Riggio et al. 2012).

El protocolo seguido para la funcionalización de las nanopartículas de Fe₃O₄@C es el mismo que para las nanopartículas de Fe@C, sustituyendo éstas por las nanopartículas de Fe₃O₄@C.

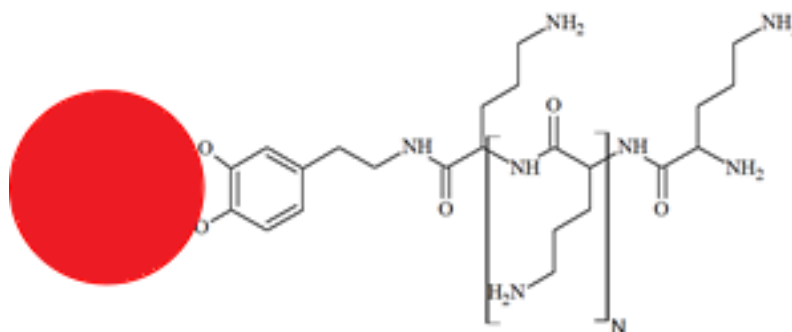


Figura 2.13. Esquema de la posible estructura del polímero dopamina/Poly-L-Lisina para las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C.

2.3.2 Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C con dopamina/PEG-NH₂

A una disolución de 10 mg (0,058 mmol, 0,2 equivalentes) de dopamina (H₂O destilada 5 ml como disolvente), se añaden 18 mg (0,058 mmol, 0,2 equivalentes) de PEG-NH₂ y Et₃N (595 µl) que se pone a reaccionar durante una noche a 100 °C a reflujo. Al día siguiente, se añaden 20 mg (0,29 mmol) de nanopartículas de Fe@C que se dejan reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

Una vez terminada la reacción, el producto obtenido se recoge con un imán y se lava tres veces con agua destilada (3 x 10 mL). Finalmente, el polvo negro obtenido se resuspende en 10 mL de agua destilada. La estructura del polímero que se pretende sintetizar para funcionalizar las nanopartículas de Fe@C con dopamina/PEG-NH₂ tiene una estructura como el de la *figura 2.14* y que posteriormente se confirmará mediante diferentes técnicas de caracterización. Los resultados se presentan en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*. En este caso, como en la funcionalización de las nanopartículas de Fe@C con dopamina y Poly-L-Lisina, la dopamina mejora la suspensión de las nanopartículas en suspensión. La molécula de PEG-NH₂, como otras moléculas de PEG, permite que las nanopartículas puedan ser utilizadas en diferentes aplicaciones biológicas como terapia contra el cáncer (Chen et al. 2018) (Mu et al. 2017) o como agentes de contraste para el diagnóstico mediante imagen obtenida por resonancia magnética nuclear (Smolensky et al. 2011) y además la molécula de PEG-NH₂ elegida tiene una estructura similar a otras moléculas probadas con éxito en nanopartículas magnéticas para la estabilidad en suspensiones acuosas (Alexis Bordet et al. 2019).

El protocolo seguido para la funcionalización de las nanopartículas de Fe₃O₄@C con dopamina y PEG-NH₂ es el mismo que para las nanopartículas de Fe@C, sustituyendo éstas por las nanopartículas de Fe₃O₄@C.

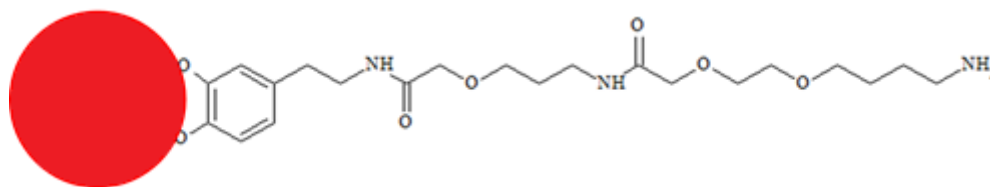


Figura 2.14. Esquema de la posible estructura del polímero dopamina/PEG-NH₂ para las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C.

2.3.3 Funcionalización de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂

A una disolución de 10 mg (0,058 mmol, 0,2 equivalentes) de ácido caféico (H₂O destilada 5 ml como disolvente), se añaden 121 mg (0,058 mmol, 0,2 equivalentes) de NH₂-PEG-NH₂ y Et₃N (595 μl) y se pone a reaccionar durante una noche a 100 °C a reflujo. Transcurridas 24 h. se añaden 20 mg (0,29 mmol) de nanopartículas de Fe@C que se dejan reaccionar durante una noche a temperatura ambiente.

Transcurridas 24 h., el producto obtenido se recoge con un imán y se lava tres veces con agua destilada (3 x 10 mL). Finalmente, el polvo negro obtenido se resuspende en 10 mL de agua destilada. La estructura del polímero que se pretende sintetizar para funcionalizar las nanopartículas de Fe@C con dopamina/NH₂-PEG-NH₂ tiene una estructura como el de la *figura 2.15*, que posteriormente se confirmará mediante diferentes técnicas de caracterización. Los resultados se presentan en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*. El ácido caféico, como la dopamina, permite la estabilización de las nanopartículas magnéticas en suspensiones acuosas. Los grupos catecoles se unen muy bien a la superficie de las nanopartículas magnéticas (Amstad et al. 2009)(C. Xu et al. 2004)(De Montferrand et al. 2013).

El protocolo seguido para la funcionalización de las nanopartículas de Fe₃O₄@C con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ es el mismo que para las nanopartículas de Fe@C, sustituyendo éstas por las nanopartículas de Fe₃O₄@C.

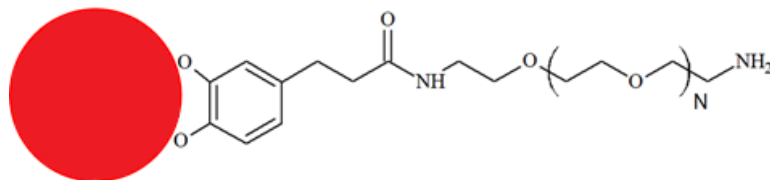


Figura 2.15. Esquema de la posible estructura del polímero ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2 para las nanopartículas de Fe@C y $\text{Fe}_3\text{O}_4@C$.

2.3.4 Funcionalización de nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ con ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2

En un matraz *schlenk*, se prepara una disolución de ácido caféico y NH_2 -PEG- NH_2 (0,052 mmol, 0,5 equivalentes) en diclorometano/metanol (5/1) anhidro, a la que se añade una disolución de trietilamina (40 μl) y se deja en agitación una noche a 80 °C a reflujo. Tras 24 h., se añaden 0,26 mmol de nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ y se deja 3 días en agitación bajo atmósfera inerte de nitrógeno a temperatura ambiente. Finalizada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida y el material obtenido se disuelve en agua destilada a una concentración de 5 mg/mL. La estructura del polímero que se pretende sintetizar para funcionalizar las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ con dopamina/ NH_2 -PEG- NH_2 tiene una estructura como el de la figura 2.16. La caracterización del polímero y de las nanopartículas funcionalizadas se presenta en el Capítulo VI: *Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ y su funcionalización.*

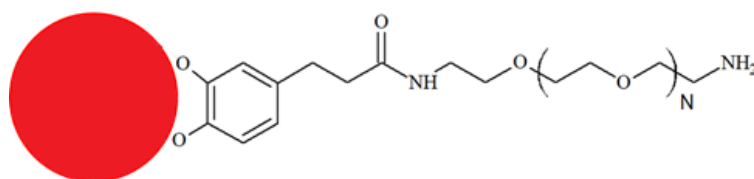


Figura 2.16. Esquema de la posible estructura del polímero ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2 para las nanopartículas de $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$.

2.3.5 Funcionalización de nanopartículas de Fe_{2.2}C con catecol-PEG

En este caso, la funcionalización de las nanopartículas se llevó a cabo con un polímero sintetizado por el grupo de investigación de Profesores Fernando Novio y Félix Busque, del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y de la Universidad Autónoma de Barcelona en el marco de la colaboración con dicho grupo, mediante la modificación de un método puesto a punto en el grupo del Prof. Vicent M. Rotello, (Alexis Bordet et al. 2019). Para ello, en un matraz *schlenk* se añaden 5 equivalentes en masa de un polímero catecol-PEG en diclorometano/metanol (5/1) anhidro, al que seguidamente se añade una disolución de trietilamina (250 µl). Tras la disolución del polímero, se añade 1 equivalente en masa de nanopartículas de Fe_{2.2}C y se deja una noche en agitación bajo atmósfera inerte de nitrógeno. Finalizada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida y el material obtenido se disuelve en agua destilada a una concentración de 5 mg/mL. La estructura del polímero que se pretende sintetizar para funcionalizar las nanopartículas de Fe_{2.2}C con el polímero catecol-PEG tiene una estructura como la representada en la *figura 2.17*. La caracterización del polímero y de las nanopartículas funcionalizadas se presenta en el *Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro Fe_{2.2}C y su funcionalización*.

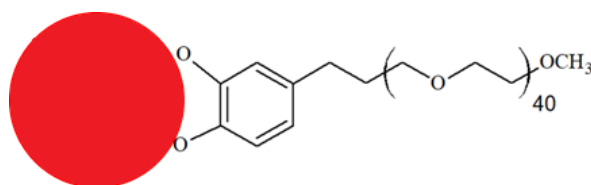


Figura 2.17. Esquema de la posible estructura del polímero catecol-PEG para las nanopartículas de Fe_{2.2}C.

También con el objetivo de hacer las nanopartículas Fe_{2.2}C biocompatibles y estables en suspensión acuosa, se sintetizó un nuevo polímero, el catecol-(CH₂)₈-PEG. Este nuevo polímero fue diseñado expresamente para la funcionalización de estas nanopartículas, basándonos en el trabajo previo de Rotello et al. (Alexis Bordet et al. 2019). La síntesis se llevó a cabo en el marco de la colaboración con el grupo del Prof. Bruno Chaudret, del Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-Objets- (CNRS-

Université Paul Sabatier) en Toulouse (Francia), y de los Profesores Fernando Novio y Félix Busque, del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y de la Universidad Autónoma de Barcelona. La estructura de este nuevo polímero se representa en la *figura 2.18*, y su síntesis y caracterización se presenta en el *Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro $Fe_{2.2}C$ y su funcionalización*. Para la funcionalización de las nanopartículas ello se siguió el mismo procedimiento pero sustituyendo el polímero catecol-PEG por el nuevo polímero sintetizado.

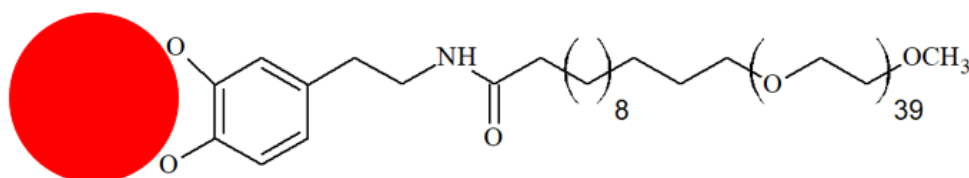


Figura 2.18. Esquema de la posible estructura del polímero catecol- $(CH_2)_8$ -PEG para las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$.

2.4 Experimentos *in-vitro*

La utilización de las nanopartículas en aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, como vehículos portadores de fármacos, como agentes de contraste para imagen obtenida mediante resonancia magnética nuclear, como agentes de calentamiento para hipertermia magnética etc.) exige que las nanopartículas sean biocompatibles. Por ello se estudió la citotoxicidad tanto de las nanopartículas $Fe@C$ y $Fe_3O_4@C$ como de las nanopartículas funcionalizadas. Este estudio se ha llevado a cabo en varias líneas celulares y por diversos métodos que se describen a continuación. En esta sección se incluyen también los experimentos de adsorción y desorción *in vitro* de un fármaco modelo (ácido ferúlico) en las diferentes nanopartículas, ya que este es un paso esencial para estudiar si estas partículas son adecuadas como vectores transportadores de fármaco.

2.4.1 Ensayos de viabilidad celular con células de la línea BV2

Para los ensayos de viabilidad de células de la línea celular BV2 (línea celular de microglial), se utilizó el método del azul de tripán, también conocido como método de tinción por exclusión. El azul de tripán (*Trypan blue*), cuya molécula se representa en la *figura 2.19* puede traspasar la membrana celular cuando la célula ha muerto, tiñéndola de color azul. Así podemos saber el porcentaje de células vivas que tenemos tras el experimento contando las células teñidas y células no teñidas, y calcular el porcentaje de viabilidad celular con la expresión (*ecuación 2.9*):

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100 \quad (2.9)$$

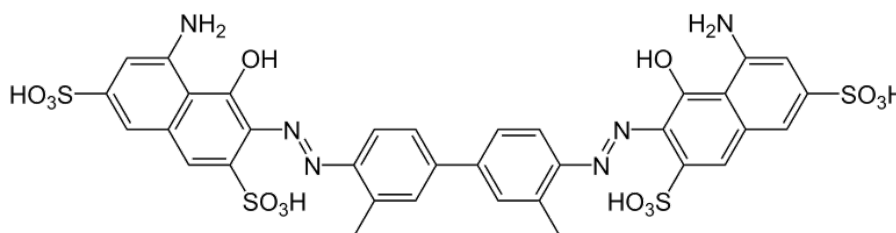


Figura 2.19. Molécula de Trypan-Blue.

Para los ensayos de viabilidad celular las células BV2 se cultivan en medio celular DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) modificado con un 5% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico y 1% de gentamicina. Las células, se colocan en una estufa a 37 °C en una atmósfera húmeda que contiene un 5% de CO₂. Tras 24 horas con las células en la estufa, se añaden las nanopartículas magnéticas en diferentes concentraciones (0/0,1/1/10/100 µg/mL) y se dejan incubar durante 72 horas. Después de las 72 horas incubadas con las nanopartículas, se toman 100 µl de la suspensión de células con nanopartículas que se añaden a una disolución de 100 µl de azul de tripán y las células se cuentan manualmente al ser depositadas en un portamuestras y observadas mediante un microscopio de la marca Nikon, modelo Eclipse TE2000-S.

2.4.2 Ensayos de viabilidad con células A431 y A549

Los ensayos de viabilidad celular con las líneas celulares A431 y A549 se realizaron en el laboratorio del Prof. King-Lu Yeung de la *Hong Kong University of Science and Technology (HKUST)* en el marco de colaboración con este grupo. La línea celular A549 pertenece a células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas y la línea celular A431, son células de carcinoma epidermoide.

Para determinar la viabilidad de las nanopartículas se utilizó el método MTT o test de Mosmann (Mosmann 1983). El MTT es el bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio y se utiliza en un ensayo basado en estudiar la actividad mitocondrial. Las células vivas tienen la capacidad de reducir este compuesto en un producto azul de formazán, lo cual es indicativo de la función mitocondrial. Una mayor intensidad de la coloración del azul de formazán representa una mayor cantidad de células vivas. A pesar de ser un ensayo muy utilizado para determinar la citotoxicidad de muchos compuestos, se pueden producir resultados falsos debido a la interacción de algunos nanomateriales, en nuestro caso, las nanopartículas con los productos del ensayo (Monteiro-Riviere, Inman, and Zhang 2009)(Moros Caballero 2012).

Las células de las respectivas líneas celulares se cultivaron en matraces de 25 cm³ con DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El subcultivo se realizó usando tripsina al 0,05%, etilendiamina 0,53 mM-ácido tetraacético (EDTA) en solución salina de Hanks libre de calcio y magnesio (HBSS).

Para el ensayo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos con 2x10⁵ células/pocillo. Después de seis horas, el medio se cambió para eliminar las células no adherentes. Las placas se usaron para los ensayos durante 24 h. Después de cuatro horas expuestas a una concentración de nanopartículas, el medio se retiró y se lavó con DMEM libre de suero y se añadieron 200 µL de MTT (1 mg/mL en HBSS) a cada pocillo y se incubó durante 4 horas. El medio se reemplazó con 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 20 minutos. Para determinar la concentración de azul

de formazán se determinó la absorbancia (densidad óptica) a 595 nm utilizando un lector de microplacas. Cada grupo consta de 4 pozos y el experimento se llevó a cabo tres veces.

La inhibición de la viabilidad celular se ha calculado de acuerdo con la siguiente expresión (ecuación 2.10):

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{[(C - B) - (M - B)]}{(C - B)} \quad (2.10)$$

siendo:

B=blanco; densidad óptica del medio de cultivo sin células

C=control; densidad óptica de solo células en medio de cultivo sin nanopartículas magnéticas (células no tratadas)

M=muestra; densidad óptica de células en medio de cultivo con una concentración conocida de nanopartículas magnéticas (células tratadas).

2.4.3 Cultivos de células HeLa y J774.

La citotoxicidad de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C se ha estudiado analizando la viabilidad de células de las líneas HeLa y J774. Además, se ha estudiado la internalización de ambos tipos de partículas en el medio celular y su distribución en el mismo. Ambos estudios se llevaron a cabo en el marco de colaboración con el laboratorio del grupo de la Prof. Mónica López Fanarraga de la *Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria*.

Las células epiteliales HeLa pertenecen a una modificación de una muestra de cáncer cérvico-uterino (Rahbari et al. 2009)(Scherer, Syverton, and Gey 1953) obtenida de una paciente llamada Henrietta Lacks (**Henrietta Lacks**). A diferencia de las células no cancerosas, las células HeLa se pueden cultivar en el laboratorio de manera continuada (“HeLa” 2019).

Las células J774 corresponden a macrófagos reticulares de ratón BALB/c. Las líneas celulares de macrófagos se pueden mantener fácilmente y manipularse genéticamente (Lam et al. 2009). También son cada vez más reconocidas como modelos preferidos para estudios biofísicos cuantitativos de la motilidad e inmunomecánica de las células eucariotas. Este enfoque común de áreas de investigación, tradicionalmente separadas, es particularmente evidente en los esfuerzos interdisciplinarios para dilucidar los fundamentos mecanicistas de la fagocitosis (Aderem 2002)(Hallett and Dewitt 2007) (Marc Herant, Heinrich, and Dembo 2005)(M. Herant et al. 2006)(Swanson 2008)(Touret et al. 2005).

En nuestro caso, las células HeLa se obtuvieron del Banco de células del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL). La línea celular J774 fue proporcionada por la Dra. Carmen Álvarez-Domínguez, del Instituto de Investigación Sanitaria Valdecilla (IDIVAL), en Santander.

Las células se cultivaron en condiciones estándar, en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero al 10% con antibióticos (Gibco, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. Las células se incubaron durante 96 h. con 50 µg/ml de partículas Fe@C y Fe₃O₄@C, se resuspendieron y se funcionalizaron mediante sonicación suave en medio de cultivo de tejidos estándar que contenía suero.

El estudio de la toxicidad de las nanopartículas (*ver sección 5.1.3 Ensayos de viabilidad de las líneas celulares HeLa (células epiteliales de cáncer cérvico uterino) y J774 (macrófagos reticulares de ratón BALB/c)*) se llevó a cabo analizando la viabilidad celular mediante el análisis del ciclo celular por citometría de flujo (*ver secciones 5.1.3.1 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C en macrófagos reticulares murinos BALB/c (línea celular J774) y 5.1.3.2 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C en células HeLa*).

Además, estos cultivos se utilizaron para estudiar la influencia del medio celular en la degradación del recubrimiento de las nanopartículas (*ver sección 5.2.2 Estudio de la*

degradación del recubrimiento de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C por macrófagos mediante espectroscopía Raman). Estos experimentos se llevaron a cabo mediante espectroscopía Raman (*ver sección 2.1.6 Espectroscopía Raman*).

El estudio de internalización de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C y de su distribución en el medio celular se llevó a cabo en células J774 después de 72h. de incubación (*ver sección 5.2 Estudio de la internalización celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)*). La preparación de los pellets de células para microscopía de transmisión se describe en la *sección 2.1.1 Microscopía de transmisión (Transmission Electron Microscopy TEM)*.

2.4.4 Estudio de adsorción y desorción de fármacos

El fármaco utilizado para el ensayo de adsorción y desorción en las nanopartículas ha sido el ácido ferúlico de la casa Sigma-Aldrich.

Para los ensayos de adsorción 10 mg de nanopartículas en 1 ml de etanol se mezclan con una disolución de ácido ferúlico de concentración igual a 2 mg/mL cuando el experimento se realiza con las nanopartículas de Fe@C, e igual a 1 mg/ml cuando el experimento se realiza con las nanopartículas de Fe₃O₄@C. La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 5, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos. Una vez transcurrido cada uno de estos tiempos, las nanopartículas se separan mediante un imán que produce un campo magnético de 3 kOe. La concentración de fármaco adsorbido por las nanopartículas se calcula midiendo la intensidad de los picos obtenidos en el espectro de UV-Vis del sobrenadante. Los picos a estudiar son las señales del ácido ferúlico a 321 y 278 nm (Pan, Thomson, and Leary 2002).

El ensayo de desorción se prepara resuspendiendo 1 mg de las nanopartículas ya cargadas con ácido ferúlico en 1 ml de PBS. La suspensión se incuba a 36 °C con agitación suave durante de 1, 5, 10, 20 y 30 días. Tras cada intervalo de tiempo las nanopartículas se separan con un imán para analizar el sobrenadante por espectroscopía UV-Vis. La concentración de ácido ferúlico en el sobrenadante se obtiene de la intensidad de los picos a 278 nm y 321 nm.

Referencias

- Adams, Paul E. 1995. "Determining Iron Content in Foods by Spectrophotometry." *Journal of Chemical Education* 72 (7): 649. <https://doi.org/10.1021/ed072p649>.
- Aderem, Alan. 2002. "How to Eat Something Bigger than Your Head." *Cell* 110 (1): 5–8. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00819-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00819-X).
- Amstad, Esther, Torben Gillich, Idalia Bilecka, Marcus Textor, and Erik Reimhult. 2009. "Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups." *Nano Letters* 9 (12): 4042–48.
- Aylón, E. 2016. "Análisis Químico Por ICP-OES." 2016. <https://www.icb.csic.es/servicio-de-analisis/caracterizacion-de-combustibles/analisis-quimico-por-icp-oes/>.
- Barcelona, Universitat Autònoma de, and Servei de Ressonància Magnètica. 2020. "Espectròmetre Bruker Avance DPX de 360 MHz (8.4 T)." 2020. <https://sct.uab.cat/sermn/equipament/espectrometres/360MHz>.
- Barcelona, Universitat Autònoma de, and Servei de Ressonància Magnètica Nuclear. 2020. "Espectròmetre Bruker Avance DPX de 250 MHz (5.8 T)." 2020. <https://sct.uab.cat/sermn/equipament/espectrometres/250MHz>.
- Basko, D. M., S. Piscanec, and A. C. Ferrari. 2009. "Electron-Electron Interactions and Doping Dependence of the Two-Phonon Raman Intensity in Graphene." *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 80 (165413).
- Bordet, A., L.M. Lacroix, K. Soulantica, and B. Chaudret. 2016. "A New Approach to the Mechanism of Fischer-Tropsch Syntheses Arising from Gas Phase NMR and Mass Spectrometry." *ChemCatChem* 8 (9): 1727–31. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600245>.

- Bordet, Alexis, Ryan F. Landis, Yi Wei Lee, Gulen Y. Tonga, Juan M. Asensio, Cheng Hsuan Li, Pier Francesco Fazzini, Katerina Soulantica, Vincent M. Rotello, and Bruno Chaudret. 2019. "Water-Dispersible and Biocompatible Iron Carbide Nanoparticles with High Specific Absorption Rate." Research-article. *ACS Nano* 13 (3): 2870–78. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05671>.
- Born, M., and K. Huang. 1954. *Dynamical Theory of Crystal Lattices*. Edited by Oxford University Press. New York.
- Bruker. 2018. "Advanced Research FTIR Spectrometers VERTEX Series Innovation with Integrity." https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/OpticalSpectroscopy/FT-IR/VERTEX/Brochures/VERTEXseries_Brochure_EN.pdf.
- Chen, Yuhua, Feng Zhang, Qian Wang, Huiming Lin, Ruihan Tong, Na An, and Fengyu Qu. 2018. "The Synthesis of LA-Fe₃O₄@PDA-PEG-DOX for Photothermal Therapy-Chemotherapy." *Dalton Transactions* 47 (7): 2435–43. <https://doi.org/10.1039/c7dt04080f>.
- Choudhary, Ankur. 2017. "The Principle of Ultra Violet (UV) Spectrophotometer No Title." 2017. <https://medium.com/@ankur1857/principle-of-ultra-violet-uv-spectrophotometer-e6a1c435d258>.
- Cornejo, Laureano. 2015. "Métodos de Síntesis de Las Nanopartículas." 2015. <http://nuevatecnologiasymateriales.com/metodos-de-sintesis-de-las-nano-particulas/>.
- Diplas, Spyros. 2013. "X-Ray Photoelectron Spectroscopy - An Introduction." *SINTEF Materials & Chemistry*, no. March.
- Faugeras, C, P Kossacki, D M Basko, M Amado, M Sprinkle, C Berger, W A De Heer, and M Potemski. 2010. "Effect of a Magnetic Field on the Two-Phonon Raman Scattering in Graphene." *Physical Review B - Condensed Matter and Materials*

Physics 81: 1–10. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.81.155436>.

Fernández-Pacheco Chicón, Rodrigo. 2008. “Synthesis, Characterization and Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.” Universidad de Zaragoza.

Fernández-Pacheco, Rodrigo, Clara Marquina, J. Gabriel Valdivia, Martín Gutiérrez, M. Soledad Romero, Rosa Cornudella, Alicia Laborda, et al. 2007. “Magnetic Nanoparticles for Local Drug Delivery Using Magnetic Implants.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1 SPEC. ISS.): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.192>.

Ferrari, Andrea C., and Denis M. Basko. 2013. “Raman Spectroscopy as a Versatile Tool for Studying the Properties of Graphene.” *Nature Nanotechnology* 8 (4): 235–46. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.

Foner, Simon. 1959. “Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer.” *Review of Scientific Instruments* 30 (7): 548–57. <https://doi.org/10.1063/1.1716679>.

Gao, Fan, Hua Qu, Yangyang Duan, Jing Wang, Xiao Song, Tianjiao Ji, Lixin Cao, Guangjun Nie, and Shuqing Sun. 2014. “Dopamine Coating as a General and Facile Route to Biofunctionalization of Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles for Magnetic Separation of Proteins.” *RSC Advances* 4 (13): 6657–63. <https://doi.org/10.1039/c3ra46938g>.

García-hevia, Lorena, Rafael Valiente, Rosa Martín-rodríguez, Carlos Renero-lecuna, Jesús González, Lidia Rodríguez-fernández, Fernando Aguado, Juan C Villegas, and Mónica L Fanarraga. 2016. “Nano-ZnO Leads to Tubulin Microtubule Assembly and Actin Bundling, Triggering Cytoskeletal Catastrophe and Cell Necrosis.” *Nanoscale* 8: 10963–73. <https://doi.org/10.1039/c6nr00391e>.

González-, Elena, Juan Villegas, Lorena García-hevia, Moisés Pérez-lorenzo, and

- Miguel A Correa-duarte. 2017. “Carbon Nanotubes Gathered onto Silica Particles Lose Their Biomimetic Properties with the Cytoskeleton Becoming Biocompatible.” *International Journal of Nanomedicine* 12: 6317–28.
- Gonzalez-Fernandez, M. A., T. E. Torres, M. Andrés-Vergés, R. Costo, P. de la Presa, C. J. Serna, M. P. Morales, C. Marquina, M. R. Ibarra, and G. F. Goya. 2009. “Magnetic Nanoparticles for Power Absorption: Optimizing Size, Shape and Magnetic Properties.” *Journal of Solid State Chemistry* 182 (10): 2779–84. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2009.07.047>.
- Goodhew, Peter J. 2011. “General Introduction to Transmission Electron Microscopy TEM.” *Aberration-Corrected Analytical Transmission Electron Microscopy*, July 26, 2011. <https://doi.org/10.1002/9781119978848.ch1>.
- Hallett, Maurice B., and Sharon Dewitt. 2007. “Ironing out the Wrinkles of Neutrophil Phagocytosis.” *Trends in Cell Biology* 17 (5): 209–14. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.03.002>.
- “HeLa.” 2019. 2019. <https://es.wikipedia.org/wiki/HeLa>.
- Herant, M., H. Volkmar, M. Dembo, Marc Herant, Volkmar Heinrich, and Micah Dembo. 2006. “Mechanics of Neutrophil Phagocytosis: Experiments and Quantitative Models.” *Journal of Cell Science* 119 (9): 1903–13. <https://doi.org/10.1242/jcs.02876>.
- Herant, Marc, Volkmar Heinrich, and Micah Dembo. 2005. “Mechanics of Neutrophil Phagocytosis: Behavior of the Cortical Tension.” *Journal of Cell Science* 118 (9): 1789–97. <https://doi.org/10.1242/jcs.02275>.
- “ISO 22412-Particle Size Analysis – Dynamic Light Scattering (DLS).” 2017.
- Jeng, Jen-tzong. 2004. “Vibrating Sample Magnetometer.”
- Jürgen Buschow, K.H., Robert W. Cahn, Merton C. Flemings, Bernhard Ilschner,

- Edward J. Kramer, Subhash Mahajan, and Patrick Veyssi re. 2001. *Encyclopedia of Materials: Science and Technology*.
- Krätschmer, W., Lowell D. Lamb, K. Fostiropoulos, and Donald R. Huffman. 1990. "Solid C60: A New Form of Carbon." *Nature* 347 (6291): 354–58. <https://doi.org/10.1038/347354a0>.
- Lacroix, Lise Marie, Sébastien Lachaize, Andrea Falqui, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2009. "Iron Nanoparticle Growth in Organic Superstructures." *Journal of the American Chemical Society* 131 (2): 549–57. <https://doi.org/10.1021/ja805719c>.
- Lam, Jonathan, Marc Herant, Micah Dembo, and Volkmar Heinrich. 2009. "Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages." *Biophysical Journal* 96 (1): 248–54. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.139154>.
- Landsberg, G. S., and L. I. Mandelshtam. 1928. "Eine Neue Erscheinung Bei Der Lichtzerstreuung in Krystallen." *Naturwissenschaften* 16: 557–58.
- Larkin, Peter. 2011. *Infrared and Raman Spectroscopy*.
- Limited, Malvern Instruments. 2011. "Zeta Potential: An Introduction in 30 Minutes." *Zetasizer Nano Serles Technical Note. MRK654-01* 2: 1–6. <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Zeta+Potential+An+Introduction+in+30+Minutes#0>.
- Macomber, Roger S. 1998. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley.
- Madrid, Universidad Aut noma de. 2020. "CITOMETRIA DE FLUJO." Centro Nacional de Biotecnología Universidad Aut noma de Madrid. 2020. http://wwwuser.cnb.csic.es/~fotonica/Photonic_en/Review/citometria_de_flujo.htm.

Manchester, University of, University of Nottingham, Peking University, Max Plank Insitute Düsseldorf, Umeå University, Lehigh University, Nashville Vanderbilt Universtity, Technical University of Eindhoven, and University of Nantes. 2013. *CasaXPS-XPS Spectra*.

Matteis, Laura De, Laura Custardoy, Rodrigo Fernández-Pacheco, César Magén, Jesús M. De La Fuente, Clara Marquina, and M. Ricardo Ibarra. 2012. “Ultrathin MgO Coating of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Combined Coprecipitation and Sol-Gel Synthesis.” *Chemistry of Materials* 24 (3): 451–56. <https://doi.org/10.1021/cm202306z>.

Monteiro-Riviere, N.A., A.O. Inman, and L.W. Zhang. 2009. “Limitations and Relative Utility of Screening Assays to Assess Engineered Nanoparticle Toxicity in a Human Cell Line.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 234 (2): 222–35. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.09.030>.

Montferrand, Caroline De, Ling Hu, Irena Milosevic, Vincent Russier, Dominique Bonnin, Laurence Motte, Arnaud Brioude, and Yoann Lalatonne. 2013. “Iron Oxide Nanoparticles with Sizes, Shapes and Compositions Resulting in Different Magnetization Signatures as Potential Labels for Multiparametric Detection.” *Acta Biomaterialia* 9 (4): 6150–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.025>.

Moros Caballero, María. 2012. “Síntesis de Gliconanopartículas Magnéticas Para Aplicaciones Biomédicas.” Universidad de Zaragoza.

Mosmann, Tim. 1983. “Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays.” *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

Mu, Xupeng, Fuqiang Zhang, Chenfei Kong, Hongmei Zhang, Wenjing Zhang, Rui Ge, Yi Liu, and Jinlan Jiang. 2017. “EGFR-Targeted Delivery of DOX-Loaded Fe₃O₄@ Polydopamine Multifunctional Nanocomposites for MRI and Antitumor Chemo-Photothermal Therapy.” *International Journal of Nanomedicine* 12:

- 2899–2911. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131418>.
- Pan, George X., Cameron I. Thomson, and Gordon J. Leary. 2002. “UV-Vis. Spectroscopic Characteristics of Ferulic Acid and Related Compounds.” *Journal of Wood Chemistry and Technology* 22 (2–3): 137–46. <https://doi.org/10.1081/WCT-120013358>.
- Patterson, A. L. 1939. “The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination.” *Physical Review* 56 (10): 978–82. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>.
- Pérez-de-luque, Alejandro, Zuny Cifuentes, Clara Marquina, Jesús M De Fuente, and M Ricardo Ibarra. 2012. *Synthesis , Application , and Tracking of Magnetic Carbon-Coated Nanoparticles in Plants. Nanoparticles in Biology and Medicine. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 906. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-953-2_20.
- Peter, K., C. Vollhardt, and Neil Eric Schore. 2005. *Organic Chemistry: Structure and Function*. 5th ed.
- Picot, Julien, Coralie L Guerin, Caroline Le, and Van Kim Chantal. 2012. “Flow Cytometry: Retrospective , Fundamentals and Recent Instrumentation.” *Cytotechnology* 64: 109–30. <https://doi.org/10.1007/s10616-011-9415-0>.
- Rahbari, Raheleh, Tom Sheahan, Vasileios Modes, Pam Collier, and Catriona Macfarlane. 2009. “A Novel L1 Retrotransposon Marker for HeLa Cell Line Identification.” *Biotechniques* 46 (4): 277–84. <https://doi.org/doi/10.2144/000113089>.
- Raman, C. V., and K. S. Krishnan. 1928. “A New Type of Secondary Radiation.” *Nature* 121: 501–2.
- Riggio, Cristina, Maria Pilar Calatayud, Clare Hoskins, Josephine Pinkernelle, Beatriz Sanz, Teobaldo Enrique Torres, Manuel Ricardo Ibarra, et al. 2012. “Poly-L-Lysine-Coated Magnetic Nanoparticles as Intracellular Actuators for Neural

- Guidance.” *International Journal of Nanomedicine* 7: 3155–66. <https://doi.org/10.2147/ijn.s28460>.
- Scherer, William F., Jerome T. Syverton, and George O. Gey. 1953. “Studies on the Propagation in Vitro of Poliomyelitis Viruses: IV. Viral Multiplication in a Stable Strain of Human Malignant Epithelial Cells (Strain Hela) Derived from an Epidermoid Carcinoma of the Cervix.” *Journal of Experimental Medicine* 97 (5): 695–710. <https://doi.org/10.1084/jem.97.5.695>.
- Skoog, Douglas A, F. James Holler, and Stanley R. Crouch. 2007. *Principles of Instrumental Analysis*. Edited by S. Kiselica and L. Oliveira. Sixth Edit. David Harris.
- Smolensky, Eric D., Hee Yun E. Park, Thelma S. Berquó, and Valérie C. Pierre. 2011. “Surface Functionalization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI Applications - Effect of Anchoring Group and Ligand Exchange Protocol.” *Contrast Media and Molecular Imaging* 6 (4): 189–99. <https://doi.org/10.1002/cmmi.417>.
- Swanson, Joel A. 2008. “Shaping Cups into Phagosomes and Macropinosomes.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (8): 639–49. <https://doi.org/10.1038/nrm2447>.
- “The Principles of Dynamic Light Scattering.” 2017. 2017. <https://wiki.anton-paar.com/en/the-principles-of-dynamic-light-scattering/>.
- Torres Molina, T.E. 2015. “Power Absorption Mechanism in High- Anisotropy CoFe₂O₄ Magnetic Nanoparticle.” Universidad de Zaragoza.
- Touret, Nicolas, Paul Paroutis, Mauricio Terebiznik, Rene E. Harrison, Sergio Trombetta, Marc Pypaert, Amy Chow, et al. 2005. “Quantitative and Dynamic Assessment of the Contribution of the ER to Phagosome Formation.” *Cell* 123 (1): 157–70. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.018>.
- Villegas, Juan C., Laura Álvarez-Montes, Lidia Rodríguez-Fernández, Jesús González,

- Rafael Valiente, and Mónica L. Fanarraga. 2014. "Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering with Cell Migration and Phagocytosis." *Advanced Healthcare Materials* 3 (3): 424–32. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300178>.
- WITec. 2018. "WITec Alpha300 Series."
- Xu, Chenjie, Keming Xu, Hongwei Gu, Rongkun Zheng, Hui Liu, Xixiang Zhang, Zhihong Guo, and Bing Xu. 2004. "Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles." *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 126 (32): 9938–39.
- Xu, Zongwei, Zhongdu He, Ying Song, Xiu Fu, Mathias Rommel, Xichun Luo, Alexander Hartmaier, Junjie Zhang, and Fengzhou Fang. 2018. "Topic Review: Application of Raman Spectroscopy Characterization in Micro/Nano-Machining." *Micromachines* 9 (7). <https://doi.org/10.3390/mi9070361>.
- Yu, P., and M. Cardona. 2005. *Fundamentals of Semiconductors*. Springer.
- Zaragoza, Universidad de. 2020. "SERVICIO DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR." 2020. <http://www.isqch.unizar-csic.es/ISQCHportal/servicios.do?pag=54%7C55>.
- Zhao, Huan, Hao Jie Cui, and Ming Lai Fu. 2016. "A General and Facile Method for Improving Carbon Coat on Magnetic Nanoparticles with a Thickness Control." *Journal of Colloid and Interface Science* 461: 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.029>.

Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C

En este capítulo se expone la caracterización fisicoquímica de las diferentes nanopartículas magnéticas sintetizadas en esta tesis. En primer lugar se expone la caracterización de las nanopartículas sintetizadas, según se ha detallado en el capítulo anterior, mediante el método físico, utilizando un horno de descarga de arco; este método consiste en una pequeña modificación del método de Krätschmer-Huffman (Krätschmer et al. 1990), y nos permitió obtener nanopartículas de hierro recubiertas de carbono grafitico (Fe@C). Posteriormente se expone la caracterización de nanopartículas sintetizadas por método químico desarrollado en esta tesis doctoral, consistente en la co-precipitación de un núcleo magnético y una posterior síntesis hidrotermal con el fin de obtener su recubrimiento; este método está inspirado en procedimientos previos (Zhao, Cui, and Fu 2016)(De Matteis et al. 2012) y como se verá en este capítulo, nos permitió obtener nanopartículas de magnetita recubiertas de carbono amorfo (Fe₃O₄@C).

3.1 Nanopartículas obtenidas mediante síntesis física (Fe@C)

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de estas nanopartículas se realiza en un horno de descarga de arco, siguiendo el método Krätshmer-Huffman modificado (Krätshmer et al. 1990)(Fernández-Pacheco et al. 2007). Tras la síntesis y recolecta del material (polvo) obtenido, este se purifica según el procedimiento descrito en el *Capítulo II: Materiales y métodos* hasta obtener las nanopartículas libres de cualquier material ajeno a las nanopartículas deseadas.

3.1.1 Difracción de rayos X

Las muestras obtenidas por este procedimiento presentan varias fases cristalógicas, que han podido ser identificadas mediante difracción de rayos X.

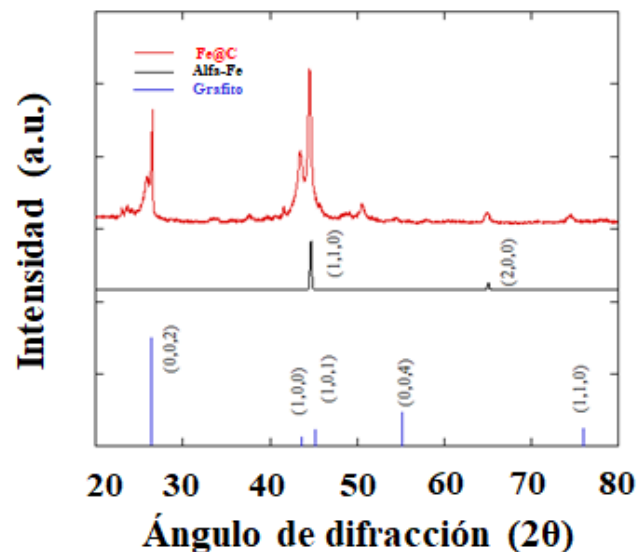


Figura 3.1. Difractograma de rayos X de las nanopartículas de Fe@C. El espectro obtenido experimentalmente (rojo) está comparado con el patrón de con el α -Fe (negro ref: ICSD-Karlsruhe-631724) y el grafito (azul ref: JCPDS 43-1308).

Según podemos ver en la *figura 3.1* la fase mayoritaria corresponde a la fase α -Fe (pico a 44,5°) que constituye el núcleo. El pico intenso que aparece a 26,5° corresponde con el del grafito. El pico es muy estrecho, por lo que se deduce que es una estructura de carbono altamente cristalizada, compatible con una estructura multicapa de grafito. Como es sabido, la estructura de varias capas de grafito por encima de un cierto número (alrededor de cinco) es muy similar a la del grafito (Andrea C. Ferrari 2007)(Wu et al. 2010). El pico a 25,8° y el que aparece a 43° indican la presencia de nanotubos de carbono (Hasanzadeh and Jafari Eskandari 2020). Los picos de menor intensidad a 22° podrían corresponder a estructuras de carbono con un menor grado de cristalización, como por ejemplo láminas de grafito corrugadas y/o con un grado mayor de desorden, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Wu et al. 2010)(Li et al. 2007)(Srinivas et al. 2010).

Además, si hacemos un estudio más detallado del difractograma (*figura 3.2*) podemos ver pequeños picos alrededor del pico más intenso del α -Fe, que pertenecen a diferentes de carburos de hierro que se forman en la síntesis de las nanopartículas en el horno de descarga de arco. La fracción de estos compuestos presente en la muestra es muy pequeña, ya que la intensidad de sus picos es muy baja. Tal y como se muestra en la *figura 3.2* la mayor parte de estos carburos es cementita (Fe₃C). Esta fase ya fue observada en estudios preliminares mediante espectroscopia Mössbauer (Rechenberg et al. 2001)(Coaquira et al. 2001).

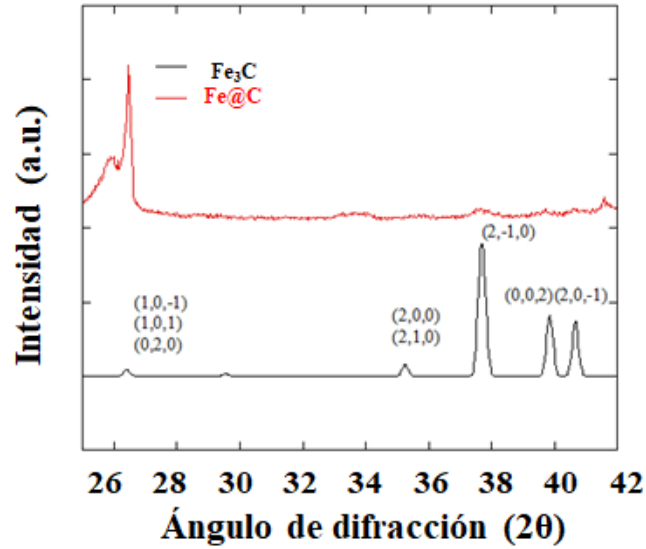


Figura 3.2. Ampliación del difractograma de rayos X de las nanopartículas de Fe@C. El espectro obtenido experimentalmente (rojo) está comparado con el patrón de cementita Fe₃C (negro ref: ICSD-Karlsruhe-99002).

La ecuación de Scherrer para difracción de rayos X relaciona el tamaño de los cristales submicrométricos en un sólido con el ancho de un pico en el patrón de difracción (Patterson 1939):

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (3.1)$$

donde τ es el tamaño medio de los dominios cristalinos, que pueden ser más pequeños o iguales al tamaño de grano y que, a su vez, puede ser más pequeño o igual al tamaño de la partícula. K es un factor adimensional, con un valor cercano a 1 (aproximadamente 0,9). λ es la longitud de onda de rayos X, β es el ancho a media altura del pico (FWHM) y θ es el ángulo de Bragg correspondiente a ese pico.

Mediante esta ecuación se calcula el tamaño de los cristalitas de hierro, a partir de los parámetros del pico que aparece a 44,5 grados. Según este cálculo, y después de analizar el espectro XRD de distintas muestras, el tamaño de las nanopartículas de hierro obtenidas tiene un valor entre 4-17 nm.

3.1.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) se puede observar claramente cómo el polvo que se obtiene en la síntesis contiene nanopartículas que son de tipo *core-shell*. Tal y como se muestra en la *figura 3.3*, y de acuerdo con los resultados obtenidos mediante difracción de rayos X, el núcleo está constituido por Fe. Este está muy bien recubierto por varias capas de un material de menor número atómico (de acuerdo con el contraste observado en la imagen), por lo que se trataría de una estructura de carbono, que podría ser carbono grafitizado o grafeno. Por ello adoptamos para estas nanopartículas la nomenclatura $Fe@C$.

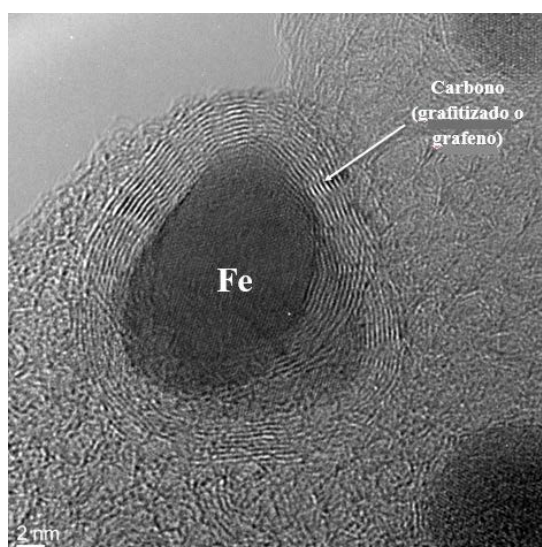


Figura 3.3. Imagen HRTEM de las nanopartículas de $Fe@C$ donde se observa un núcleo de Fe completamente recubierto por capas de una estructura de carbono grafitizado o grafeno.

Como se puede ver en la imagen de la *figura 3.3*, se observa un núcleo de hierro de alrededor de unos 15-20 nm que se encuentra encapsulado por unas 8-10 capas de grafeno. Como veremos más adelante, este recubrimiento de la partícula hace a esta completamente inerte de manera que el núcleo no se oxida, y favorece su biocompatibilidad.

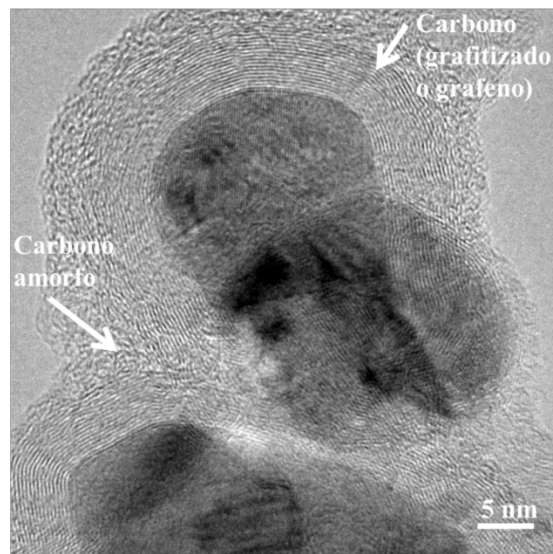


Figura 3.4. Imagen HRTEM donde se observan varias partículas de Fe@C cubiertas por una capa de carbono amorfo.

En la *figura 3.4* podemos ver otra imagen de nanopartículas de hierro encapsuladas por varias capas de grafeno y como estas, a su vez, están en una matriz de carbono amorfo. El carbono amorfo se genera también en la síntesis de las partículas, junto a otras estructuras de carbono y nanopartículas de hierro sin recubrir (Fernández-Pacheco et al. 2007). Estas últimas se eliminan mediante ataques ácidos y separación magnética, que elimina también las estructuras carbonosas que no recubren partículas magnéticas. No obstante en algunos casos se ha observado carbono amorfo recubriendo un conjunto de nanopartículas de Fe@C.

Otra de esas estructuras carbonosas que se forman junto a las nanopartículas Fe@C son los nanotubos de carbono. En la *figura 3.5* se muestra una imagen general en la que además de las nanopartículas, se ven claramente los nanotubos de carbono, junto con láminas de carbono grafitizado o grafeno y anillos (*onions*) como los descubiertos por Iijima a principios de los años 80 (Iijima 1980). Los nanotubos de carbono, como se mostrará posteriormente en el *Capítulo V: Experimentos in-vitro*, van a tener un papel fundamental en los ensayos *in-vitro* realizados.

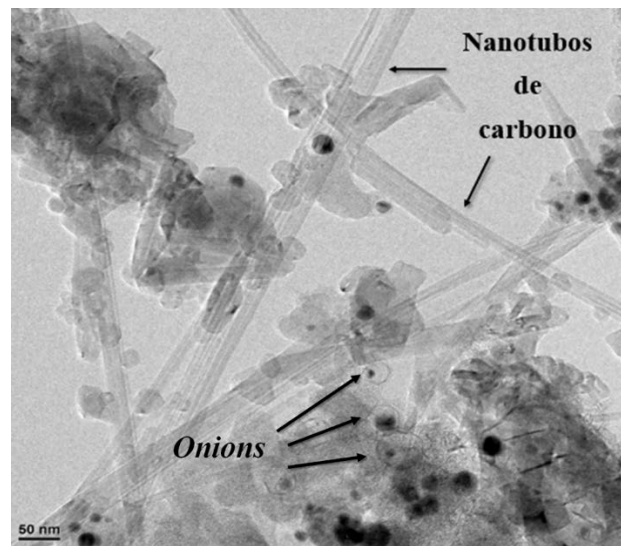


Figura 3.5. Imagen HRTEM de una muestra de nanopartículas de Fe@C donde se observan otras estructuras carbonosas como nanotubos de carbono y onions.

Analizando diferentes imágenes de TEM de diferentes regiones de una misma muestra se ha medido el diámetro de las partículas y se ha obtenido el histograma de la distribución de tamaño. Ésta se puede ajustar a una distribución logarítmica normal. Como se observa en la *figura 3.6* las partículas tienen un tamaño entre 5 y 75 nm y el tamaño medio de las partículas es aproximadamente $21 \pm 0,72$ nm.

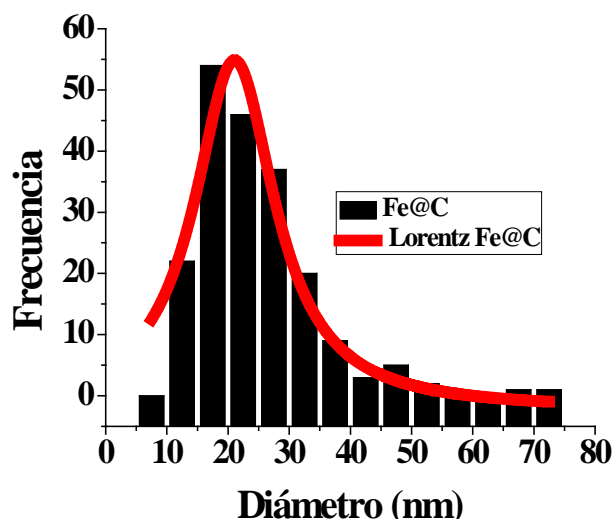


Figura 3.6. Histograma del tamaño de las partículas obtenido a partir de las imágenes de TEM. Se observa una distribución de tamaño desde 5 a 75 nm con un máximo centrado en 21 nm. En rojo se representa el ajuste a una lorentziana.

3.1.3 Espectroscopia Raman

Para estudiar en detalle la estructura del carbono presente en la muestra, ésta se analiza mediante espectroscopia Raman. Las medidas se realizaron con un láser de 532 nm, a una intensidad de 0.5 mW, realizando 25 adquisiciones de datos en intervalos de 3 segundos por medida. La resolución espacial viene dada por el diámetro del *spot* que es de 355 nm. Los experimentos se realizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza (ver más detalles en el capítulo correspondiente a la descripción de las técnicas experimentales). Este análisis se ha llevado a cabo irradiando con el láser en diferentes zonas de una misma muestra.

Como ya se ha comentado, los espectros de XRD sugieren la existencia de un carbono sin imperfecciones (que podría ser grafeno) que, según las imágenes de HRTEM, sería

el que recubre directamente el núcleo de las nanopartículas de Fe@C. El espectro Raman del grafeno tiene unos picos muy característicos, que aparecen para unos valores del desplazamiento Raman muy bien definidos (ver *figura 3.7*). Estos picos son el pico G (1580 cm⁻¹) y el pico 2D (2690 cm⁻¹).

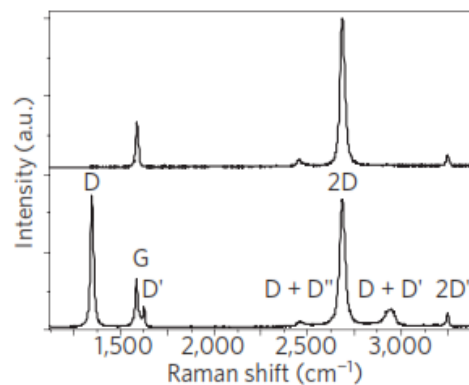


Figura 3.7. Espectro Raman de la fase prístina del grafeno (arriba) y grafeno con defectos (abajo) (Andrea C. Ferrari 2007).

La existencia de defectos en el grafeno da lugar a la aparición de picos adicionales, tal y como se muestra en la *figura 3.7*, siendo el más representativo el pico D (Andrea C. Ferrari 2007)(Andrea C. Ferrari and Basko 2013). La posición, la forma y la intensidad relativa de los picos G y 2D puede variar en función del número de capas de grafeno que haya en la muestra. Además, el dopaje del grafeno (tanto con huecos como con electrones) ocasiona cambios en la posición y la forma del pico G (reduciendo su anchura y desplazándolo hacia valores mayores de desplazamiento Raman) y también del pico 2D (dependiendo de si el dopaje es con huecos o con electrones) (Pisana et al. 2007)(Yan et al. 2007)(Andrea C. Ferrari 2007). Esto se ha observado, por ejemplo, en el estudio de grafeno depositado sobre diferentes sustratos metálicos, como se muestra en la *figura 3.8* (Serrano-Esparza et al. 2016). Por otra parte, la interacción del grafeno con un sustrato puede dar lugar además a deformaciones que también ocasionan el

desplazamiento de los picos G y 2D (Mohiuddin et al. 2009)(Huang et al. 2009)(Yu et al. 2008)(Wang et al. 2011)(Serrano-Esparza et al. 2016).

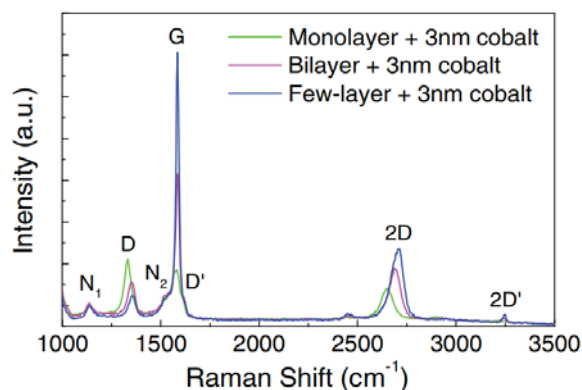


Figura 3.8. Espectro Raman de la fase prístina del grafeno para 1, 2 o más de una capa interactuando con metales, en este caso, cobalto (Serrano-Esparza et al. 2016).

En la figura 3.9 se muestra el espectro Raman de una muestra de nanopartículas Fe@C. En las figuras 3.9 (A), 3.9 (B) y 3.9 (C) se presenta el análisis de las diferentes regiones del espectro, comparando los resultados experimentales (en negro) con el espectro teórico (en rojo) y con sus diferentes contribuciones, ajustadas a una función Lorentziana (en verde). Este análisis se ha realizado en colaboración con el Dr. Jesús González, del Departamento de Ciencias de la Tierra y Física de la Materia Condensada (CITIMAC) y del Grupo de Nanomedicina del Instituto Valdecilla-(IDIVAL) de la Universidad de Cantabria, en Santander. Como se observa en la figura 3.9 el pico G es mucho más intenso que el pico 2D. Para una sola capa de grafeno la intensidad del pico 2D (i.e., $I(2D)$), es cuatro veces mayor que la intensidad del pico G (i.e., $I(G)$) (A. C. Ferrari et al. 2006). En el espectro de la figura 3.9 la relación de intensidades $I(2D)/I(G)$ es aproximadamente 0.3, lo que estaría de acuerdo con la estructura *core-shell* de las nanopartículas, es decir con capas concéntricas de grafeno rodeando el núcleo de hierro de las nanopartículas, como se observa en las imágenes de TEM mostradas en la sección anterior. Además, el espectro Raman que se obtiene se asemeja también al que se ve en

la figura 3.8, lo que confirma la influencia del núcleo de hierro de las nanopartículas que, en este caso, es el sustrato sobre el que se depositan las capas de grafeno.

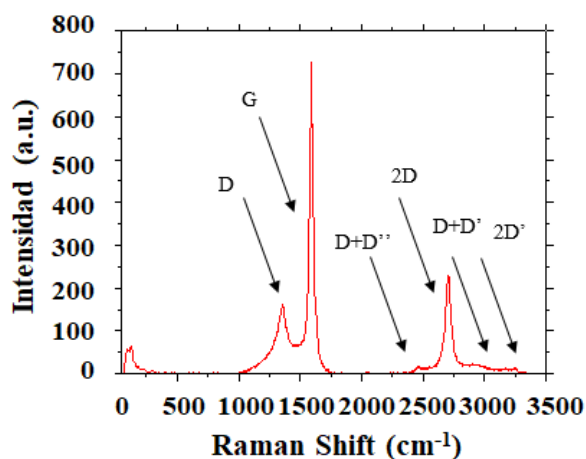


Figura 3.9. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C.

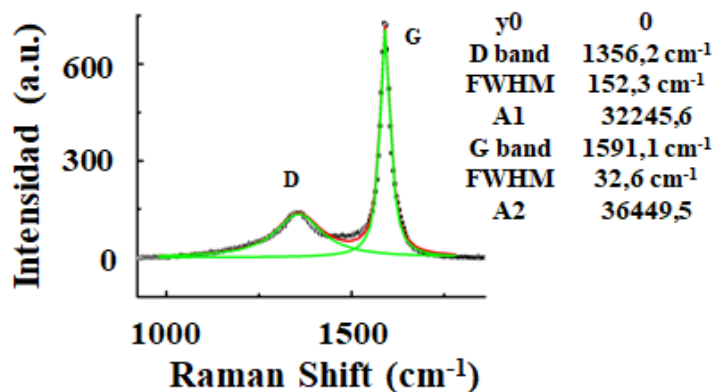


Figura 3.9.A. Espectro Raman de las nanopartículas Fe@C en la región de 1000 a 1750 cm⁻¹ (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste con una función de Lorentz. Se observa la banda G de la fase prístina del grafeno y la banda D del grafeno defectuoso.

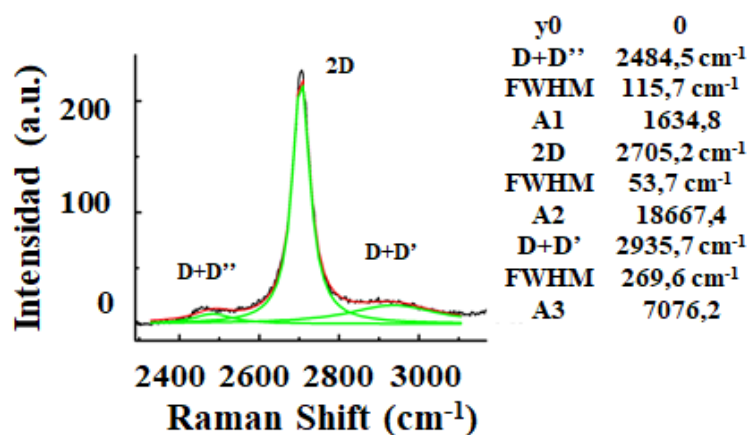


Figura 3.9.B. Espectro Raman de nanopartículas de Fe @ C, en la región de 2300 a 3100 cm⁻¹ (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste de Lorentz. Se observan las bandas de la fase prístina del grafeno (G y D + D'') y defectuoso (2D y D + D').

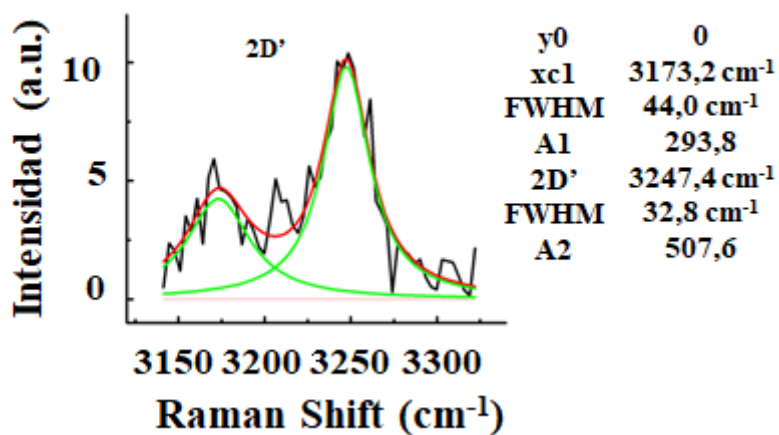


Figura 3.9.C. Espectro Raman de nanopartículas de Fe @ C en la región de 3150 a 3300 cm⁻¹ (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste de Lorentz. Se observa la banda 2D de grafeno defectuoso.

En el espectro de la *figura 3.9* y siguientes, así como en los espectros correspondientes a otras muestras sintetizadas, se observan desplazamientos de los picos G, D y 2D (entre 5 y 10 cm⁻¹) que podrían estar relacionados con dopaje o con deformaciones inducidas por el hecho de que el grafeno está en contacto con el núcleo metálico. Los defectos en el grafeno que se deducen de la aparición de los picos D, D+D', D+D'' y 2D' en el espectro Raman de la *figura 3.9* podrían deberse a estas deformaciones o bien al propio método de síntesis. Por otra parte, es bien sabido que la estructura bcc de α -Fe no tiene modos Raman activos. Solo en aquellos casos en que se interrumpe la periodicidad de la red cristalina bcc, se pueden observar en el espectro Raman los sobretonos de los fonones acústicos (2TA₁ y 2TA₂) del borde de la zona de Brillouin (Goncharov et al. 2000)(Jorge et al. 2008). La ausencia de tales señales en el espectro de la *figura 3.9* confirma la estructura bcc de los núcleos de Fe y evidencia su excelente cristalinidad.

Cuando el análisis se realiza en otra zona de la muestra el espectro Raman cambia. Como se observa en la *figura 3.10*, el espectro Raman, corresponde a un carbono con defectos, ya que además del pico G (en torno a 1600 cm⁻¹) y el 2D (en torno a 2680 cm⁻¹) se observa claramente el pico D (en torno a 1400 cm⁻¹), y además, este último y el pico G son aproximadamente similares en intensidad (Andrea C. Ferrari and Basko 2013)(Serrano-Esparza et al. 2016).

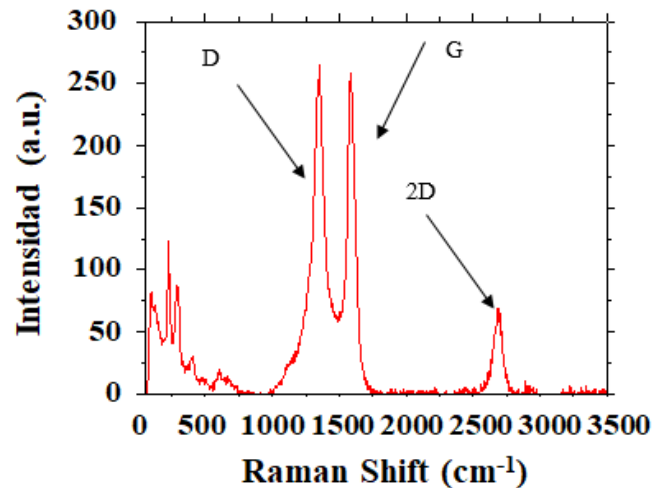


Figura 3.10. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C.

El incremento de la intensidad del pico D aumentando el ratio de intensidades $I(D)/I(G)$, es un claro signo del aumento de los defectos del carbono analizado, siendo éste, más similar a carbono amorfo (Andrea C. Ferrari 2007).

Por tanto, el análisis que se ha realizado mediante espectroscopia Raman pone de manifiesto la existencia de dos tipos de carbono en nuestras muestras: por una parte, grafeno con defectos dispuesto en varias capas sobre núcleos de hierro, y por otra parte, carbono amorfo. Por ello, de acuerdo con las imágenes de TEM, la muestra, sabemos que está compuesta mayoritariamente por nanopartículas tipo *core-shell*, pero además existe una matriz de carbono amorfo que en algunos casos rodea también a las nanopartículas *core-shell*. Este carbono amorfo residual es el que no se ha podido eliminar totalmente mediante el proceso de purificación al que se somete la muestra obtenida en el horno de arco.

3.1.4 Determinación de hierro en las nanopartículas de Fe@C por ICP-OES

La determinación de la cantidad de hierro presente en las nanopartículas de Fe@C se realizó mediante medidas de espectrometría de emisión atómica (ICP-OES) con un plasma acoplado por inducción, siguiendo los protocolos descritos en el *Capítulo II: Materiales y métodos*.

En todas las muestras analizadas, los valores de Fe obtenidos representan alrededor de un 30-40% en peso.

Los resultados obtenidos van acorde con los obtenidos mediante rayos X, espectroscopia Raman y TEM, donde se observaba claramente que la cantidad de hierro no era mayoritaria y que las nanopartículas están compuestas sobre todo por estructuras de carbono.

3.1.5 Caracterización magnética – medidas de imanación

Las medidas de imanación han sido realizadas en un magnetómetro SQUID y en un magnetómetro VSM, con el polvo obtenido de la síntesis después de someterlo a los procesos de ataque ácido y separación magnética. La *figura 3.11* corresponde a la curva de imanación a temperatura ambiente, donde las nanopartículas de Fe@C tienen una imanación de saturación próxima a 150 emu/g. Este valor de la imanación se ha calculado a partir de la cantidad de hierro obtenida en el análisis mediante ICP mencionado en el párrafo anterior y suponiendo que todo el hierro se encuentra en forma de hierro metálico.

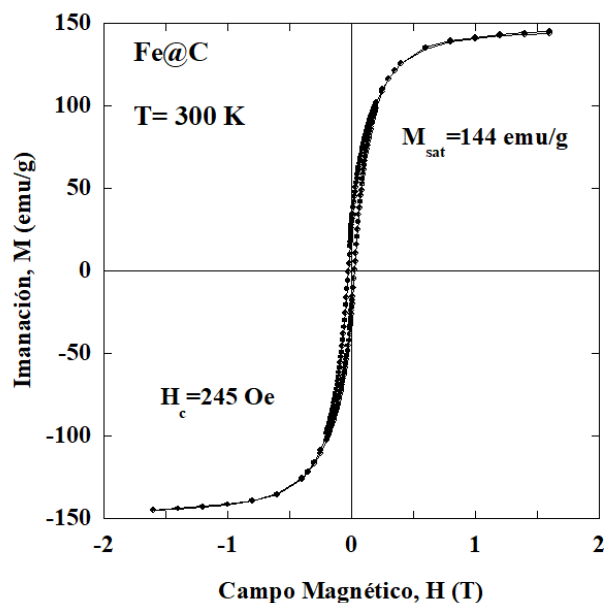


Figura 3.11. Curva de imanación a temperatura ambiente de una muestra de nanopartículas de Fe@C

La diferencia entre el valor de la imanación obtenido para nuestras nanopartículas y el valor de la imanación del hierro metálico (217 emu/g (Building 1971)) se debe a que no toda la muestra que se mide en el equipo son nanopartículas con núcleo de hierro metálico. Como se ha visto en el difractograma de rayos X (figura 3.1) las muestras resultado de la síntesis en el horno de arco contienen también nanopartículas con una pequeña fracción de carburos de hierro, junto con alguna otra pequeña impureza.

Si hacemos un estudio más detallado de la zona a bajo campo de la curva de histéresis (figura 3.12) se observa un campo coercitivo de 245 Oe, indicativo del comportamiento ferromagnético de las nanopartículas a temperatura ambiente. Esto está de acuerdo con la existencia de nanopartículas de tamaños por encima de los 6 nm (tamaño de un monodominio de Fe (Coey 2001)), tal y como muestra la distribución de tamaños de la

figura 3.6 , a la vez que sugiere la presencia de grandes agregados de nanopartículas en la muestra (aunque no se observan en las imágenes de TEM).

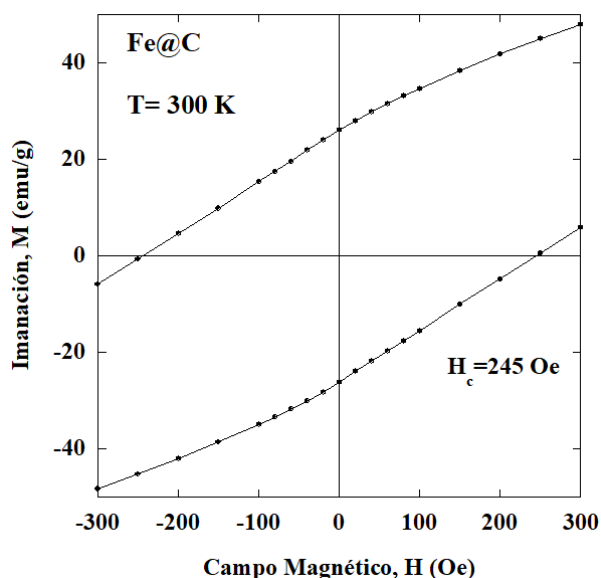


Figura 3.12. Ampliación de la región a bajo campo de la curva de histéresis de las partículas de Fe@C.

3.1.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (XPS)

La espectroscopia XPS proporciona información sobre la composición química de la superficie del material, así como del estado de oxidación de los elementos constituyentes. Las medidas se realizaron sobre unas muestras en polvo, con una fuente de rayos X (Mono Al K α 120W (8 mA/15 kV)) a una presión reducida de menos de 10⁻⁹ Torr y una zona de análisis de 700x300 μ m. Los experimentos se realizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza.

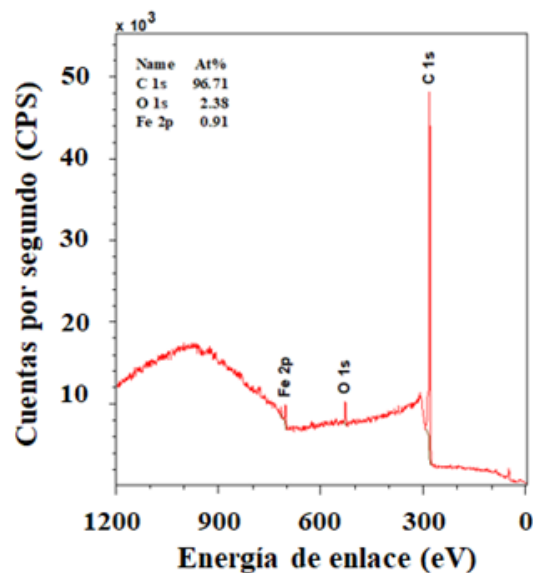


Figura 3.13. Análisis por XPS de las nanopartículas de Fe@C.

En la figura 3.13 se muestra el análisis superficial de las nanopartículas de Fe@C en todo el rango de energías estudiadas (desde 0 hasta 1200 eV). Como se puede observar, el componente mayoritario de la superficie de las nanopartículas es el carbono, que se muestra como un pico muy intenso en torno a 285 eV, correspondiente a la energía de enlace del C 1s (Johansson et al. 1973). De acuerdo con la intensidad de este pico obtenida tras el análisis del espectro, casi el 97% de la composición de la superficie es carbono, lo que concuerda con las imágenes de TEM (figuras 3.3-3.4.) donde se observan los núcleos de hierro recubiertos por varias capas de carbono. El espectro de la figura 3.13 muestra también un pico en torno a 707 eV correspondiente al Fe (0) 2p_{3/2} (Elmi, Guggenheim, and Gieré 2016)(Brion 1980). El hecho de que se observe este pico se debe a que al realizar la medida en una muestra en polvo de nanopartículas, la superficie de análisis no es uniforme y se puede estar midiendo a la vez no solo la superficie de varias nanopartículas sino también el núcleo de algunas otras.

El pico alrededor de 530 eV corresponde a la energía de enlace del oxígeno 1s (Wagner et al. 1979) y su aparición en el espectro se puede deber a la posible oxidación de alguno de los componentes (Fe o C), lo que se analizará posteriormente.

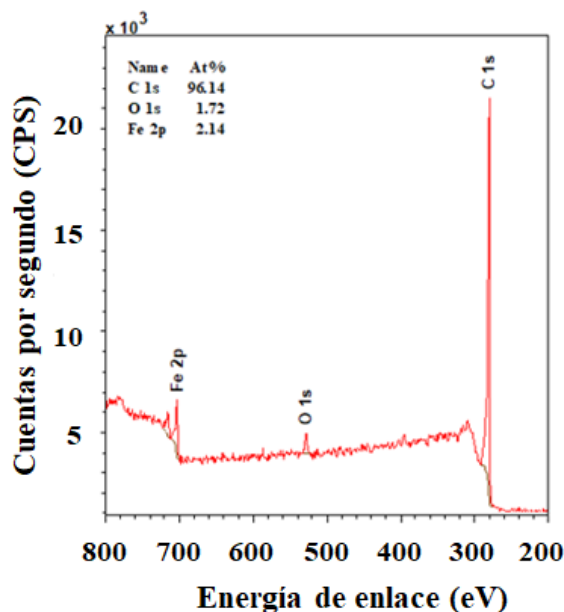


Figura 3.14. Análisis por XPS de las nanopartículas de Fe@C. Análisis realizado a 500 eV y 4500 acumulaciones.

Al irradiar la muestra con electrones, la intensidad de los picos varía tal y como se ve en la figura 3.14. En esta figura los picos se mantienen en las mismas posiciones que antes de comenzar la irradiación, pero, en comparación con los resultados presentados en la figura 3.14, el porcentaje de hierro aumenta. Esto está de acuerdo con que con la irradiación de electrones se están eliminando las capas de carbono superficial dejando el núcleo de hierro al descubierto. Esto está en buen acuerdo con lo observado en las imágenes de TEM, en las que el núcleo aparece rodeado de varias capas de grafeno (según lo observado mediante espectroscopia Raman).

Una vez realizado el análisis global la muestra, se analiza la energía de enlace de cada elemento para confirmar el estado de oxidación en que se encuentra.

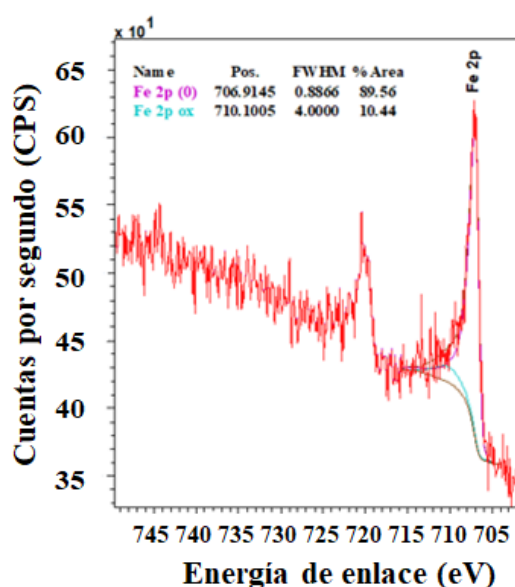


Figura 3.15. Análisis por XPS del Fe de una muestra de nanopartículas de Fe@C.

En la figura 3.15 se muestra el análisis del Fe. Como se puede ver, en el espectro hay un pico intenso en 706,9 eV, muy estrecho y asimétrico y otro a 720,4 eV. Como se muestra en la figura, el pico a 706,9 eV es el resultado de dos contribuciones. La principal es la señal que corresponde al Fe (0) 2p_{3/2}, de acuerdo con los datos presentes en la bibliografía (Elmi, Guggenheim, and Gieré 2016)(Wagner et al. 1979). También hay una pequeña contribución de óxido de hierro, lo que da origen al pico que aparece a 710.1 eV y cuya intensidad representa únicamente un 10%. Esto está en buen acuerdo con la presencia de oxígeno en la muestra, relacionada con el pico en torno a 530 eV y correspondiente a la energía de enlace del oxígeno 1s (Descostes et al. 2000)(Wagner et al. 1979). En nuestro caso, y como se ha observado en nanopartículas de Fe@SiO₂

(Fernández-Pacheco et al. 2006), debemos postular la existencia de una capa de pasivación alrededor del núcleo de Fe de unos 2 nm de espesor y de composición incierta (Fe_xO_y). Este análisis confirma que el núcleo de las nanopartículas de Fe@C es principalmente Fe⁰. El pico a 720,4 eV corresponde al Fe (0) 2p_{1/2} (Elmi, Guggenheim, and Gieré 2016).

También se ha analizado el carbono que recubre las nanopartículas de Fe@C, lo que se muestra en la *figura 3.16*.

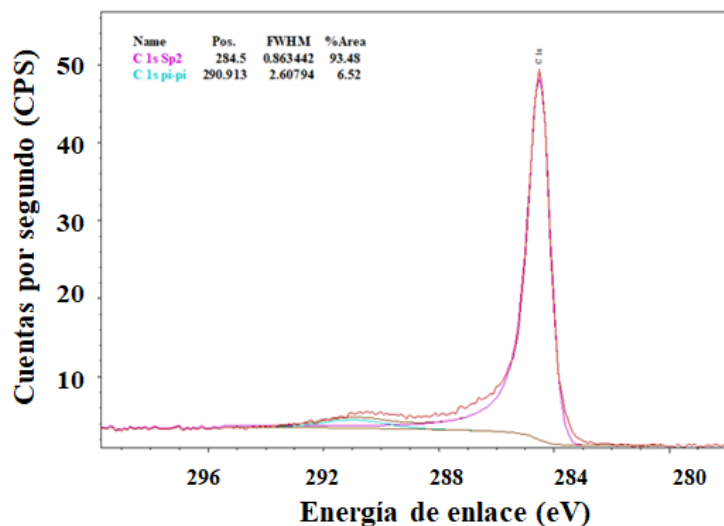


Figura 3.16. Análisis XPS del carbono que recubre las nanopartículas de Fe@C.

En el espectro se observa un pico intenso, estrecho y asimétrico en 284,5 eV que corresponde a la energía de enlace del C 1s sp₂ de un carbono tipo grafitico (Johansson et al. 1973)(Wagner et al. 1979). También está presente, en 290,9 eV, la señal correspondiente a estructura relacionada con la transición Π - Π (Mezzi and Kaciulis 2010). Esto concuerda con los resultados mostrados anteriormente en microscopía Raman donde se observaba una presencia de un carbono cristalino. Por tanto se puede

confirmar que el carbono que recubre las nanopartículas, es un carbono grafitico, donde varias capas de grafeno, recubren el núcleo magnético de hierro.

3.1.7 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Las medidas de dispersión dinámica de la luz se realizaron para obtener información sobre el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas cuando las nanopartículas se encuentran en una suspensión líquida, solvatadas por las moléculas del disolvente. En nuestro caso se ha utilizado agua, ya que para las aplicaciones en las que se van a utilizar nuestras nanopartículas necesitamos un medio biocompatible. El tamaño de las nanopartículas obtenido de las medidas de DLS puede ser diferente del tamaño obtenido analizando imágenes de TEM. En primer lugar esto es así porque la medida de TEM es una medida local en la que observamos solo una parte de la muestra, y la técnica DLS da una información global de toda la muestra. En segundo lugar, el estado de agregación de algunos materiales en suspensión es muy diferente a su comportamiento en sólido. Además, algunos agregados podrían estar ya presentes en las muestras en polvo, aunque no hubiesen sido detectados en las imágenes de TEM: al analizar una muestra en polvo mediante TEM las nanopartículas o agregados de nanopartículas que son mayores de 150 nm son opacos para el haz de electrones, ya que los electrones no pueden penetrar dentro de las partículas tan grandes.

Como vemos en la distribución de diámetros hidrodinámicos presentada en la *figura 3.17*, se observan dos poblaciones de nanopartículas en suspensión completamente diferentes. Una de ellas está formada por nanopartículas de diámetro hidrodinámico en torno a 200 nm y que representa la población más pequeña en número de partículas. La otra está formada por grandes agregados de nanopartículas, en torno a 850 nm. Estos agregados precipitan durante la medida, lo cual hace que los resultados no sean muy precisos. La presencia de nanopartículas/agregados de diámetro hidrodinámico en torno a 200 nm, está en buen acuerdo con los resultados presentados en la bibliografía (Fernández-Pacheco et al. 2007)(Fernández-Pacheco Chicón 2008).

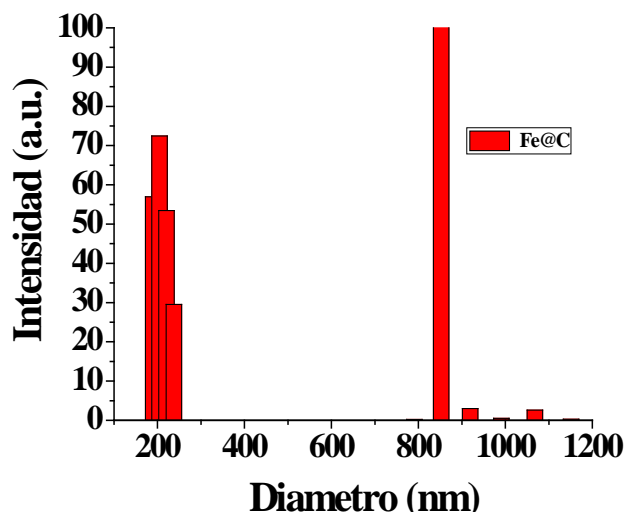


Figura 3.17. Estimación del diámetro hidrodinámico de las partículas Fe@C en suspensión acuosa, obtenida mediante DLS.

3.1.8 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)

Las medidas del coeficiente de absorción específica de potencia (o *Specific Absorption Rate*, SAR) se realizaron para estudiar si las nanopartículas Fe@C eran adecuadas para actuar como agentes de calentamiento en hipertermia magnética. En la *figura 3.18* se observa la capacidad de generar calor de una suspensión de nanopartículas de Fe@C en H₂O, medida a partir del incremento de temperatura de la suspensión durante la aplicación de un campo magnético de 300 Gauss y a una frecuencia de 578 kHz (los máximos valores alcanzados por el equipo). Aunque el incremento de la temperatura se ha medido a diferentes valores de campo y frecuencia, los valores más altos se han obtenido en estas condiciones.

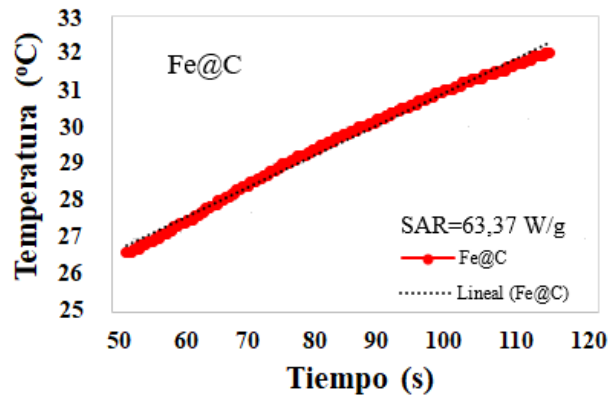


Figura 3.18. Medida del aumento de temperatura en función del tiempo, de una muestra de Fe@C a 300 Gauss y 578 kHz (puntos rojos). La línea de puntos corresponde al ajuste lineal de la zona de la curva de calentamiento considerada para el cálculo del SAR

Los valores de SAR se obtuvieron calculando la potencia de calentamiento por unidad de masa de nanopartículas (P y m_{MNP_s} respectivamente). Esta a su vez se puede calcular en función de la capacidad calorífica específica del medio líquido y de las nanopartículas magnéticas (C_{LIQ} y C_{MNP_s} respectivamente), la masa de líquido, m_{LIQ} , y del aumento de temperatura, ΔT , de la muestra cuando se mide durante un intervalo de tiempo Δt , según la expresión de SAR:

$$SAR = \frac{P}{m_{MNP_s}} = \frac{m_{LIQ}C_{LIQ} + m_{MNP_s}C_{MNP_s}}{m_{MNP_s}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (3.2)$$

Dado que en esos experimentos la concentración de nanopartículas generalmente está en el rango de 1% en peso, podemos aproximar $m_{LIQ}C_{LIQ} + m_{MNP_s}C_{MNP_s} \approx m_{LIQ}C_{LIQ}$ y la expresión se puede escribir como:

$$SAR = \frac{C_{LIQ}\delta_{LIQ}}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad (3.3)$$

donde δ_{LIQ} y Φ son la densidad del líquido y la concentración en peso de las nanopartículas en el coloide, respectivamente. Por lo tanto, podemos obtener el valor de SAR a partir de la derivada de la curva del aumento de temperatura vs. tiempo usando el criterio de la pendiente máxima (la derivada $\Delta T / \Delta t$). Como el aumento máximo de temperatura siempre ocurre dentro de los primeros segundos del experimento, se garantiza el carácter adiabático de la medida. En todos los casos, los valores obtenidos están entre unos 60 y 80 W/g.

Esto podría ser debido a que como se ha mostrado en la *figura 3.6*, la distribución de tamaño de las partículas no es uniforme. Como ya se ha comprobado en otros casos, el SAR depende, entre otros factores, del tamaño de partícula, de manera que para unas condiciones experimentales dadas, existe un tamaño crítico para el cual el SAR es máximo. Además, el que las nanopartículas no tengan un tamaño homogéneo va en detrimento del valor del SAR (Yamamoto et al. 2014)(Mehdaoui et al. 2010) (Torres et al. 2019). También, el recubrimiento que se observa en las imágenes de TEM (*figura 3.4*) con 8-12 capas de carbono junto con el carbono amorfo residual favorece la formación de agregados con un diámetro hidrodinámico elevado. Esto disminuye en gran medida la relajación de Brown de las nanopartículas en suspensión acuosa, lo que conduce a bajos valores de SAR (Torres et al. 2019)

3.2 Nanopartículas obtenidas mediante síntesis química (Fe₃O₄@C)

La preparación de estas nanopartículas se ha realizado mediante un método de síntesis química en dos pasos puesto a punto en esta tesis doctoral combinando, con pequeñas modificaciones, dos métodos ya existentes(Zhao, Cui, and Fu 2016)(De Matteis et al. 2012) según se ha explicado en el capítulo dedicado a su síntesis. En el primer paso se obtiene el núcleo de magnetita por co-precipitación y posteriormente, se lleva a cabo una síntesis hidrotermal, que tiene por objetivo recubrir de carbono los núcleos obtenidos mediante co-precipitación.

3.2.1 Difracción de rayos X

Mediante difracción de rayos X se ha analizado la composición de la muestra en polvo resultante de la síntesis.

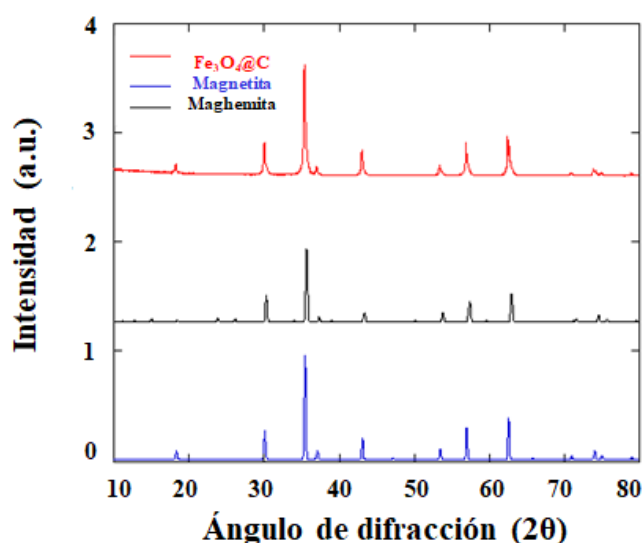


Figura 3.19. Difractograma de rayos X de una muestra de Fe₃O₄@C (en rojo) comparado con los difractogramas de magnetita (Fe₃O₄, en azul, ref: ICSD-Karlsruhe-26410) y maghemita (γ -Fe₂O₃, en negro, ref: ICSD-Karlsruhe-172906).

Si se compara el difractograma de la muestra obtenida con el espectro de XRD de la magnetita (Fe₃O₄) y el de la maghemita (γ -Fe₂O₃) como se muestra en la *figura 3.19*, se observa que el espectro de las nanopartículas es coincidente con el espectro de la magnetita, (ref: ICSD-Karlsruhe-172906) y el de la maghemita (ref: ICSD-Karlsruhe-26410). Por simplicidad se acuerda adoptar la nomenclatura Fe₃O₄@C para referirnos a estas nanopartículas.

Además el pico más característico correspondiente al carbono cristalino (a 27° (Ando, Zhao, and Shimoyana 1999)) no aparece en el espectro, lo que indica que el carbono

presente en la muestra debe encontrarse como carbono amorfo, como luego se confirmará mediante las imágenes de TEM.

Mediante ecuación de Scherrer (*ecuación 3.1*) y de igual manera que calculó para las nanopartículas de hierro, se calcula el tamaño de los cristales de óxido de hierro, a partir de los parámetros del pico que aparece a 35,4 grados en el espectro de la *figura 3.19*. Según este cálculo, y después de analizar el espectro XRD de distintas muestras, el tamaño de las nanopartículas de magnetita/maghemita obtenidas tiene un valor entre 5-20 nm.

3.2.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Para observar la morfología y el tamaño de las nanopartículas se tomaron imágenes de HRTEM.



Figura 3.20. Imagen HRTEM de las nanopartículas de $Fe_3O_4@C$ donde se observan varios núcleos de $Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$ completamente encapsulados por una capa de carbono amorfo.

Como se observa en la *figura 3.20* la muestra está formada por nanopartículas de $Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$ que se encuentran encapsuladas por una capa de carbono amorfo que cubre varios los núcleos. Este carbono, a pesar de formar únicamente una fina capa alrededor de los núcleos de magnetita, es capaz de impedir la oxidación del núcleo permitiéndole mantener sus propiedades magnéticas.

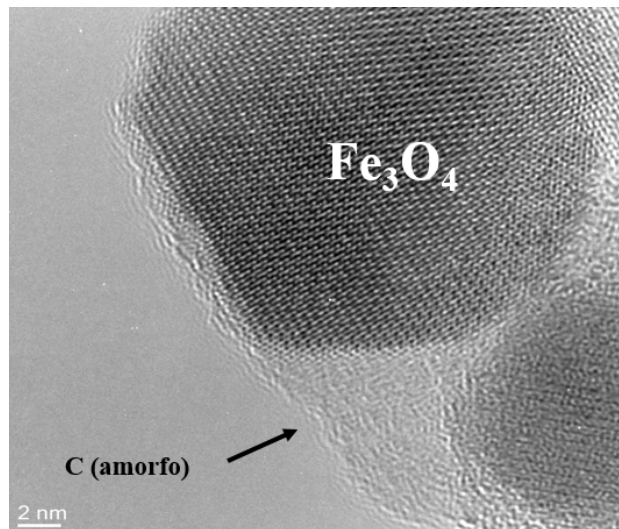


Figura 3.21. Ampliación de una imagen de HRTEM de una nanopartícula de $Fe_3O_4@C$.

Aumentando la magnificación de las imágenes de HRTEM (*figura 3.21*) se observa claramente que la muestra contiene unos núcleos de $Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$ altamente cristalinos.

De estas imágenes de TEM, tomándolas en distintas regiones de una misma muestra, se puede obtener una buena estadística para estimar el tamaño que poseen las nanopartículas. Midiendo sobre la imagen el diámetro de las partículas se ha obtenido el histograma que se presenta en la *figura 3.22*. La distribución de tamaño se ajusta a una distribución logarítmica normal. Como se observa en la figura, las partículas tienen

un tamaño entre 5 y 35 nm y el tamaño medio de las partículas es aproximadamente $14 \pm 0,26$ nm. Esto está en buen acuerdo con el tamaño derivado de los espectros de difracción de rayos X, mediante la fórmula de Scherrer.

La dispersión de tamaño de las nanopartículas de Fe₃O₄@C es menor que en el caso de las nanopartículas de Fe@C porque, en este caso, mediante una variación de los parámetros de la síntesis podemos controlar el tamaño de núcleo que queremos obtener.

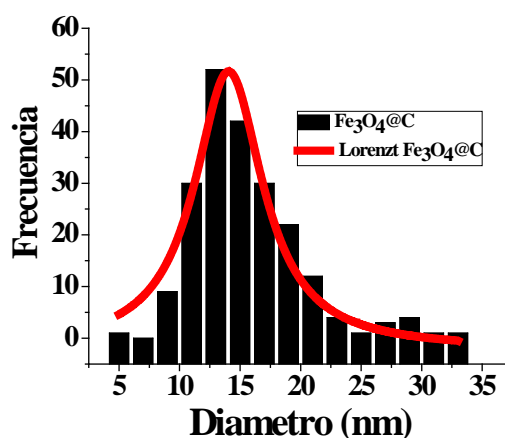


Figura 3.22. Histograma del tamaño de las partículas obtenido a partir de las imágenes de TEM. Se observa una distribución de tamaño desde 5 a 35 nm con un máximo centrado en 14 nm. La curva en rojo corresponde al ajuste de dicha distribución a una lorentziana.

3.2.3 Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman se ha utilizado para profundizar en el estudio de la matriz de carbono que rodea a los núcleos de magnetita. Al igual que en el caso de las nanopartículas de Fe@C, las medidas se realizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza, con un láser de 532 nm, a una intensidad de 0.5 mW, adquiriendo datos durante 3s. hasta 25 veces por cada medida.

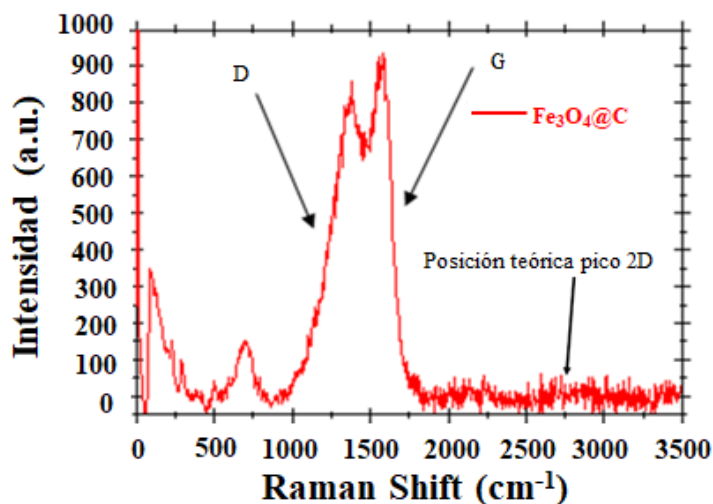


Figura 3.23. Espectro Raman de las nanopartículas de $Fe_3O_4@C$.

El análisis de los espectros se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Jesús González, del Departamento de Ciencias de la Tierra y Física de la Materia Condensada (CITIMAC) y del Grupo de Nanomedicina del Instituto Valdecilla-(IDIVAL) de la Universidad de Cantabria, en Santander.

Como se observa en la *figura 3.23* y *3.23 (B)*, los picos más intensos del espectro son el pico cerca de 1400 cm^{-1} (correspondiente al pico D de un grafeno con defectos) y el pico cercano a 1600 cm^{-1} (correspondiente al pico G del grafeno) (Andrea C. Ferrari and Basko 2013). El pico D y el pico G del espectro se encuentran solapados como se ve en la *figura 3.23*, lo que junto a la ausencia del pico 2D nos indica que el carbono que recubre las nanopartículas es amorfo, (Andrea C. Ferrari 2007) en buen acuerdo con las imágenes de TEM y el espectro de difracción de rayos X. El pico a 682 cm^{-1} corresponde a la banda A_{1g} de la magnetita, que es el más intenso de los cinco modos Raman asociados a su estructura de espinela (Shebanova and Lazor 2003)(Song et al. 2012).

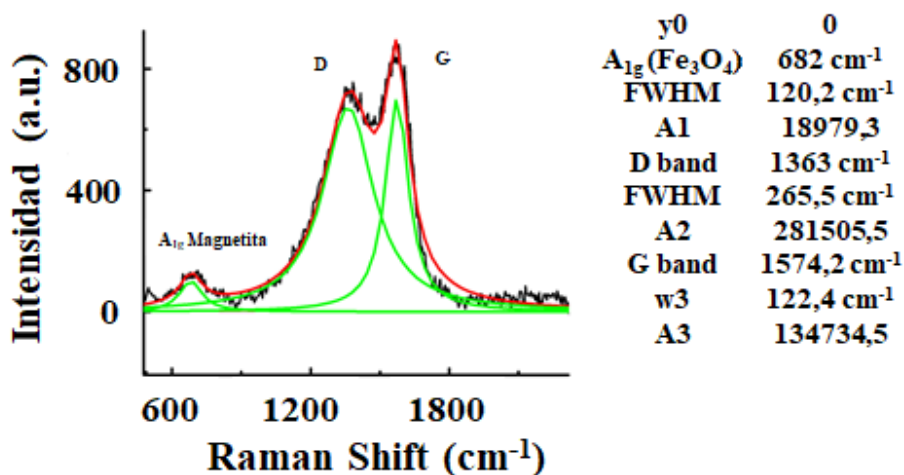


Figura. 3.23.B. Espectro Raman de nanopartículas de Fe₃O₄@C (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste de Lorentz. La banda correspondiente al modo A_{1g} de la magnetita se observa junto con las bandas D y G de carbono amorfo.

3.2.4 Espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS)

Se ha utilizado la espectroscopia de ultravioleta visible (UV-VIS) para determinar la cantidad de hierro presente en las nanopartículas de Fe₃O₄@C siguiendo diferentes protocolos presentes en la literatura y de acuerdo con lo explicado en el *Capítulo II: Materiales y métodos* (Adams 1995).

Una vez obtenida la cantidad de hierro, se ha supuesto que todo él se encuentra en forma de magnetita en el núcleo de las nanopartículas. Los valores de magnetita así obtenidos en todas las muestras sintetizadas están entre 50-60 en peso%.

Estos resultados están de acuerdo con los observados por diferentes técnicas (rayos X, Raman, TEM), donde se ponía de manifiesto claramente que las nanopartículas además

de magnetita están compuestas por más materiales, como el carbono amorfo que recubre todas las nanopartículas.

3.2.5 Caracterización magnética – medidas de imanación

Las medidas de imanación se llevaron a cabo tanto en el magnetómetro SQUID como en el magnetómetro VSM, en muestras en polvo. La curva de imanación a temperatura ambiente se presenta en la *figura 3.24*. En ella se observa que, al máximo campo aplicado (3 T), las nanopartículas de Fe₃O₄@C tienen una imanación que está cercana a la saturación y es igual a 90.22 emu/g. Este valor se ha calculado a partir de la cantidad de hierro obtenida en el análisis espectroscopia de UV-Vis (ver párrafo anterior). La imanación de nuestras nanopartículas es aproximadamente igual a la de la magnetita pura (92 emu/g (Rochelle M. Cornell 2006)) y por tanto se confirma, junto con los resultados de difracción de rayos X de la *figura 3.19* que, en efecto, el núcleo de las nanopartículas es fundamentalmente magnetita.

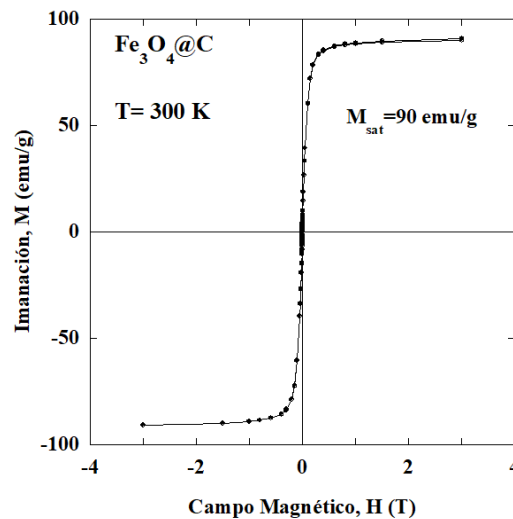


Figura 3.24. Isoterma de imanación a temperatura ambiente de una muestra de nanopartículas de Fe₃O₄@C.

Las pequeñas diferencias entre el valor de la imanación obtenido experimentalmente respecto al de la magnetita pura podrían deberse a la presencia en el núcleo de otras fases como la maghemita. Además en medidas llevadas a cabo en nuestras muestras sintetizadas por el mismo método, se han obtenido valores de magnetización de saturación ligeramente diferentes, lo que achacamos pequeñas variaciones de la temperatura de síntesis, que pueden afectar a la cristalinidad del núcleo (Liu et al. 2016).

El pequeño campo coercitivo que se observa en la ampliación de la región de bajo campo presentada en la *figura 3.25*, (≈ 1.5 Oe) corresponde al campo de compensación (*offset field*) que queda de forma residual en la bobina superconductora, después de medir en un campo tan alto como 3 T (Buchner et al. 2018). Por lo tanto, este campo coercitivo solo es aparente y no es un signo de comportamiento histérico por lo que las nanopartículas de Fe₃O₄@C a temperatura ambiente son superparamagnéticas.

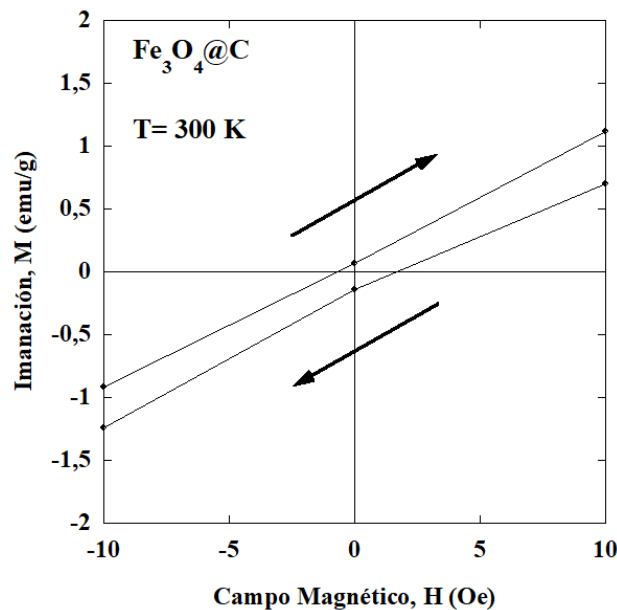


Figura 3.25. Ampliación de la región a bajo campo de la isoterma de imanación a temperatura ambiente. Las flechas indican la variación del campo magnético.

Para saber la temperatura de bloqueo de las nanopartículas se realizaron medidas de imanación en función de la temperatura después de someter la muestra a procesos de enfriamiento a campo cero y de enfriamiento con campo magnético (i.e., procesos *Zero Field Cooling/ Field Cooling*, ZFC/FC). Las medidas se realizaron antes y después de la etapa de recubrimiento con el carbono (ver descripción del proceso de síntesis en el *Capítulo II: Materiales y métodos*).

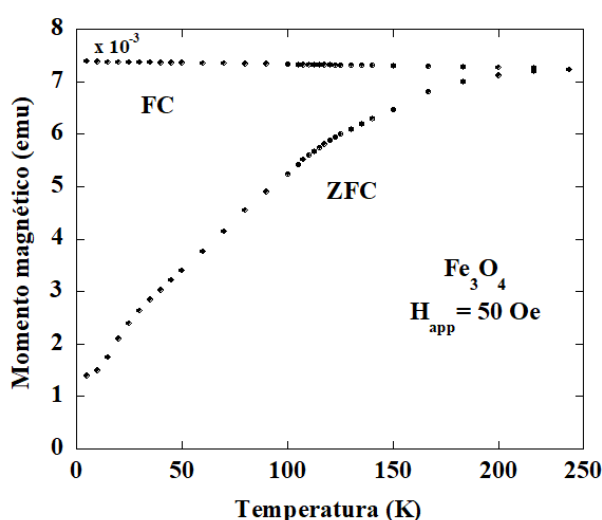


Figura 3.26. Imanación en función de la temperatura en procesos ZFC/FC, de las nanopartículas Fe₃O₄ obtenidas por co-precipitación (sin recubrir). El campo aplicado durante las medidas es de 50 Oe.

Las medidas antes de recubrir las nanopartículas se llevaron a cabo en la muestra en fase líquida resultante de la etapa de co-precipitación. Los resultados obtenidos se presentan en la *figura 3.26*. Las curvas ZFC y FC se superponen por encima de 225 K por lo que la temperatura de bloqueo de las nanopartículas de Fe₃O₄@C se encuentra alrededor de 230 K. Esto nos confirma que por encima de esta temperatura, (y por tanto, también a temperatura ambiente, en buen acuerdo con la isoterma en la *figura 3.24*), las nanopartículas son superparamagnéticas.

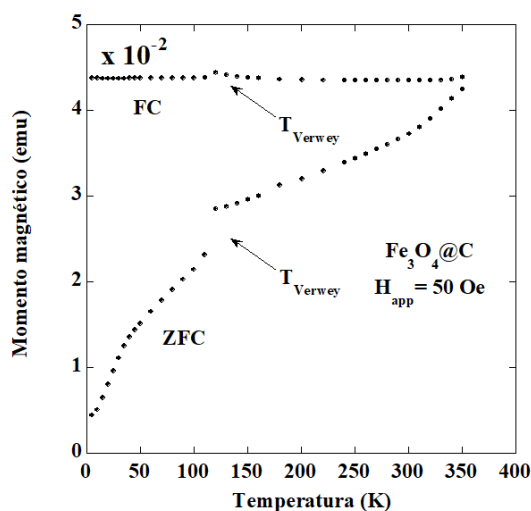


Figura 3.27. Imanación en función de la temperatura en procesos ZFC/FC de las nanopartículas Fe₃O₄@C, realizadas aplicando un campo de 50 Oe. Las flechas señalan la temperatura de la transición de Verwey (T_{Verwey}).

Tras el recubrimiento, las medidas se llevaron a cabo en la muestra en polvo resultante de la etapa de síntesis hidrotérmal. Se observa en la figura 3.27 que, alrededor de 110 K aparece una anomalía que está asociada a la transición de Verwey que aparece en la magnetita *bulk* cuando esta sufre una distorsión cristalográfica pasando de un ordenamiento cúbico a una estructura monoclinica (Iizumi 1979)(Verwey 1939). Comparando estos resultados con los de la figura 3.26, vemos que en las curvas ZFC-FC correspondientes a la magnetita sin recubrir no aparecen signos claros de la transición de Verwey, lo que indica que en la etapa de co-precipitación se obtiene una magnetita defectuosa/no estequiométrica. Para investigar el papel de la reacción de recubrimiento en la formación de nanopartículas de magnetita con propiedades similares a la *bulk*, las medidas ZFC-FC también se realizaron en los polvos obtenidos después de calentar las nanopartículas obtenidas por co-precipitación en el autoclave a 190 °C pero sin añadir los reactivos empleados en la síntesis hidrotérmal (es decir, no se añadió sacarosa ni CH₃COONH₄). Como resultado se obtuvo un polvo rojizo y no

magnético, lo que indica que este calentamiento en el autoclave condujo simplemente a la oxidación de las nanopartículas a hematita (Barrero et al. 2001) y no a su recristalización. Como demuestran nuestros resultados, la transformación que tiene lugar en la segunda etapa de nuestra síntesis (etapa de recubrimiento) no es (solo) una recristalización de los núcleos defectuosos de magnetita por difusión térmica de los átomos de hierro y oxígeno. Dado que la aparición de la transición de Verwey depende críticamente del contenido de oxígeno de la magnetita (Bhat and Kumar 2017), nuestros resultados sugieren que durante el recubrimiento de los núcleos obtenidos por coprecipitación se produce una reacción de reducción que da como resultado nanopartículas de magnetita altamente estequiométrica, con propiedades *bulk* y altamente cristalinas, como muestra la *figura 3.21*.

3.2.6 Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X. (XPS)

Al igual que las nanopartículas de Fe@C, las nanopartículas de Fe₃O₄@C se han analizado mediante espectroscopia XPS.

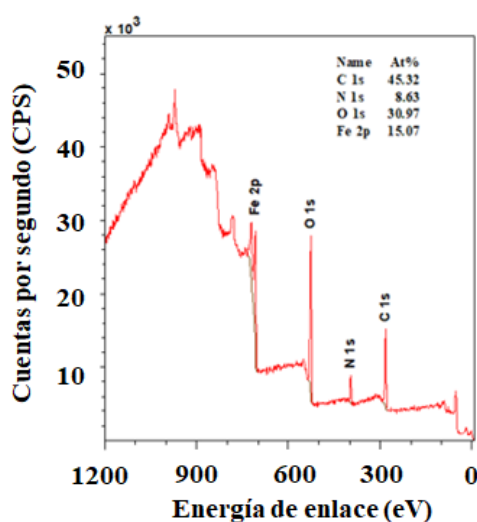


Figura 3.28. Análisis XPS de las nanopartículas de Fe₃O₄@C.

Las medidas se realizaron sobre unas muestras en polvo, con una fuente de rayos X (Mono Al K α 120W (8 mA/15 kV)) a una presión reducida de menos de 10⁻⁹ Torr y una zona de análisis de 700x300 μ m. Los experimentos se realizaron en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza.

Como se observa en el espectro de la *figura 3.28*, aparecen cuatro picos correspondientes a: la energía de enlace del carbono 1s (cerca de los 300 eV (Johansson et al. 1973)); la energía de enlace del nitrógeno 1s (en torno a 400 eV) (Wagner et al. 1979); la energía de enlace del oxígeno 1s (en torno a 530 eV) (Wagner et al. 1979) y, a la energía de enlace del hierro tipo Fe (0) 2p_{3/2} (a los 700 eV (Elmi, Guggenheim, and Gieré 2016)). La pequeña contribución del nitrógeno (8.63 %), es debida a impurezas de CH₃-COONH₄⁺ utilizado en la síntesis hidrotermal (Wagner et al. 1979).

El espectro que se muestra difiere del espectro que se obtuvo para las nanopartículas de Fe@C. Mientras que en el espectro de las nanopartículas de Fe@C se observaba un pico muy intenso y mayoritario, correspondiente al carbono, aquí los picos tienen una intensidad muy similar (excepto el asociado a las impurezas conteniendo nitrógeno). La cantidad de carbono disminuye respecto a la encontrada en el caso de las nanopartículas de Fe@C, pasando a ser solo del 45%. Sin embargo las cantidades de hierro y de oxígeno aumentan hasta un 15 y un 30% respectivamente.

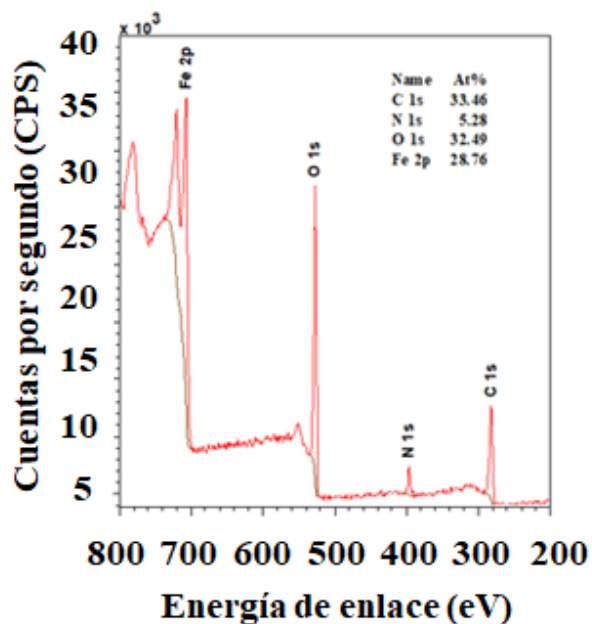


Figura 3.29. Análisis mediante espectroscopia XPS a 500 eV y 2700 acumulaciones.

Estos cambios en el espectro respecto al de las nanopartículas de Fe@C se deben a que la composición de las nanopartículas no es la misma, como se ha observado mediante difracción de rayos X y mediante espectroscopia Raman.

Al continuar irradiando la muestra con electrones, se obtiene un espectro como el de la figura 3.29, en el que, en comparación con el mostrado en la figura 3.28, disminuye la cantidad de carbono y aumenta el porcentaje de hierro y oxígeno. Esto nos indica que al irradiar con electrones se eliminan capas de la superficie de la muestra y vamos acercándonos progresivamente al núcleo de magnetita. La disminución de la contribución de carbono en el espectro XPS indica que, tal y como se ha mostrado en las imágenes de TEM (figura 3.20-21) el núcleo de las nanopartículas está recubierto de carbono.

La presencia de hierro y oxígeno en una relación casi similar está en buen acuerdo con la suposición de que el núcleo magnético sea de Fe₃O₄.

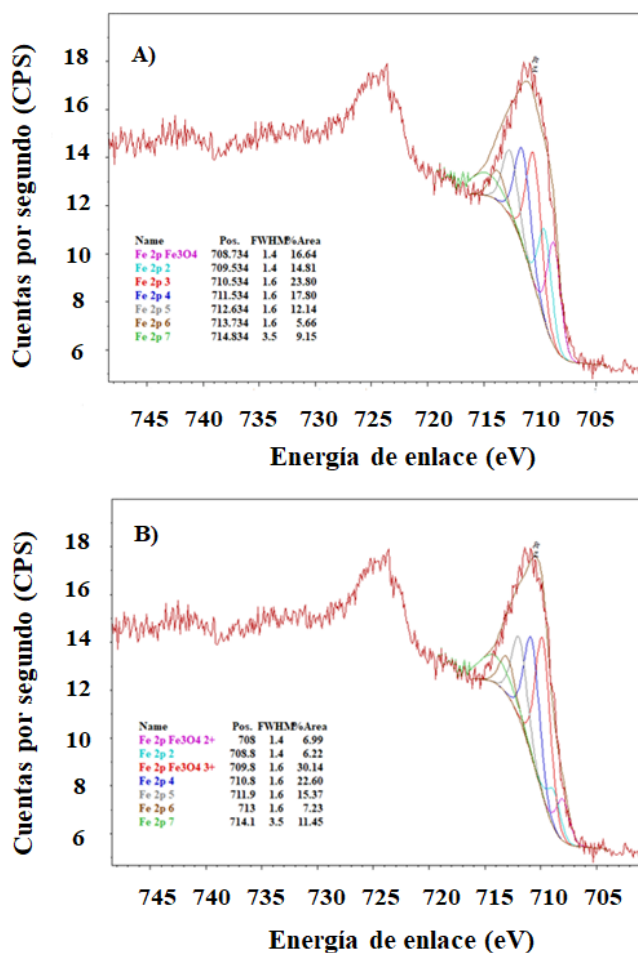


Figura 3.30. Análisis del Fe presente en las nanopartículas de Fe₃O₄@C mediante espectroscopia XPS. En la figura 3.30.A el ajuste suponiendo que el núcleo de las nanopartículas es de magnetita y en la figura 3.30.B el ajuste suponiendo que es de magnetita con una cantidad libre de Fe³⁺ y Fe²⁺.

Para confirmar la composición del núcleo de las nanopartículas se analiza el pico de hierro que aparece en torno a 710 eV. En la figura 3.30 se muestran los dos mejores

ajustes obtenidos en el análisis. Ambos presentan una desviación estándar en torno al 2%. El ajuste de la *figura 3.30.A*, con una desviación estándar igual a 2,09%) se obtiene suponiendo que el hierro se encuentra en forma de magnetita (Wagner et al. 1979). El pico en torno a 710 eV correspondería al Fe 2p_{3/2}. Además, está previamente publicado que en el caso de la magnetita, este pico no presenta picos satélites (Yamashita and Hayes 2008)(Hawn and DeKoven 1987)(Muhler, Schlögl, and Ertl 1992), al igual que sucede en el espectro de la *figura 3.30 (A)*. Este ajuste mejora ligeramente (desviación estándar 1,54%), cuando se realiza suponiendo que la muestra contiene una magnetita con una cierta cantidad libre de Fe²⁺ y Fe³⁺ (*figura 3.30.B*), en concreto, considerando un exceso de Fe³⁺ (con una desviación estándar <2%).

Los ajustes suponiendo que el núcleo de la muestra está formado por γ -Fe₂O₃ o por óxido de hierro (II) (i.e., FeO) se presentan en la *figura 3.30*. Estos ajustes también son buenos, pero su desviación estándar es mayor que la obtenida en los casos en los que se ha supuesto que el núcleo de las nanopartículas está formado por magnetita, mostrados anteriormente.

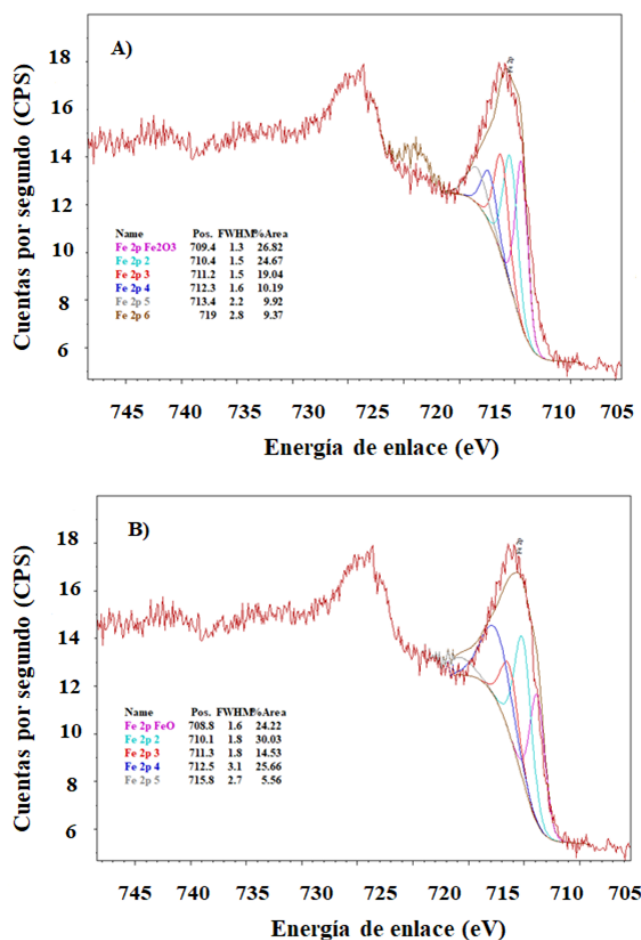


Figura 3.31. Análisis del Fe presente en las nanopartículas de Fe₃O₄@C mediante espectroscopia XPS. En la figura 3.31.A el ajuste suponiendo que el núcleo de las nanopartículas es de Fe₂O₃ y en la figura 3.31.B el ajuste suponiendo que es de FeO.

De acuerdo con la literatura, el pico de Fe 2p_{3/2} del γ -Fe₂O₃ presenta un satélite, localizado aproximadamente a una energía 8 eV mayor (Yamashita and Hayes 2008)(Hawn and DeKoven 1987)(Muhler, Schlögl, and Ertl 1992). Este pico (en marrón en el ajuste mostrado en la figura 3.31.A) no aparece en el espectro obtenido experimentalmente (en rojo). Lo mismo ocurre para el ajuste suponiendo que el núcleo de las nanopartículas está compuesto de FeO. De acuerdo con la literatura, el pico Fe

2p_{3/2} en el FeO presenta un satélite en 718 eV (Mills and Sullivan 1983) (en marrón en el ajuste mostrado en la *figura 3.31.B*) que el espectro correspondiente a nuestra muestra tampoco presenta. Por tanto las medidas de XPS confirman que el núcleo de las nanopartículas es esencialmente magnetita pero, tal como se ha ido mostrando anteriormente, con la contribución de otras fases como maghemita u óxido de hierro (II).

También se ha estudiado mediante XPS el cambio que se produce en la estructura del núcleo magnético tras realizar proceso de recubrimiento con carbono mediante síntesis hidrotérmal y que ha sido puesto de manifiesto mediante las medidas de imanación (ver sección anterior). Para ello se ha analizado una muestra de nanopartículas sin recubrir (i.e., las obtenidas mediante coprecipitación). El espectro correspondiente entorno a la energía de enlace del Fe se muestra en la *figura 3.32*. El mejor ajuste se obtiene considerando que las nanopartículas están compuestas de γ -Fe₂O₃.

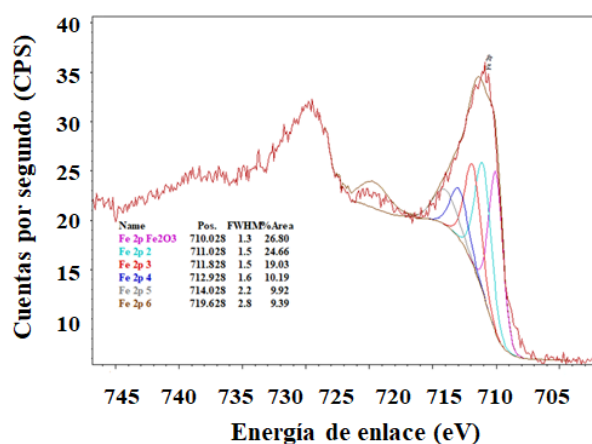


Figura 3.32. Ajuste para Fe₂O₃ del hierro de las nanopartículas de Fe₃O₄@C antes de su recubrimiento hidrotérmal.

Como se puede ver en la *figura 3.32* además del pico principal en torno a 710 eV, se observa un hombro en torno 720 eV, que en el análisis de las nanopartículas recubiertas

(figuras 3.30-3.31), no se observaba. Este hombro, es un satélite del pico Fe 2p_{3/2} típico del espectro de γ -Fe₂O₃ (Yamashita and Hayes 2008)(Hawn and DeKoven 1987)(Muhler, Schlögl, and Ertl 1992). Por tanto concluimos que las nanopartículas obtenidas en la etapa de coprecipitación son mayoritariamente de maghemita, lo que está en buen acuerdo con la ausencia de la anomalía asociada a la transición de Verwey en las medidas de imanación en función de la temperatura presentadas en la sección anterior. La aparición de dicha anomalía en la imanación obtenida en el ciclo ZFC-FC obtenidos utilizando nanopartículas recubiertas, indica que durante el proceso de recubrimiento por síntesis hidrotermal ocurre un reordenamiento de la estructura de los núcleos magnéticos pasando de un núcleo mayoritariamente de γ -Fe₂O₃, a un núcleo de magnetita cristalina.

3.2.7 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Mediante la dispersión dinámica de luz se han obtenido los valores de diámetro hidrodinámico de las partículas en suspensión, utilizand en este caso agua.

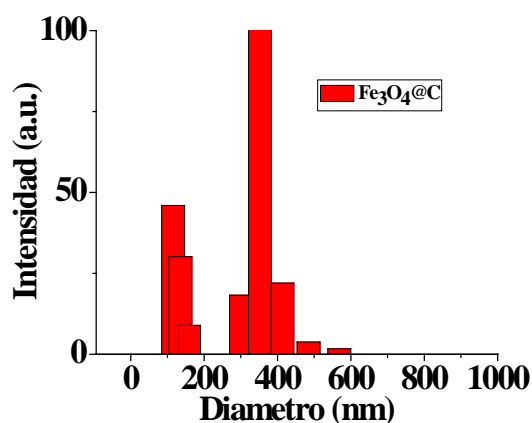


Figura 3.33. Estimación DLS del diámetro hidrodinámico de las partículas Fe₃O₄@C en suspensión acuosa.

El resultado de la medida se recoge en el histograma de la figura 3.33, que nos muestra

dos poblaciones diferenciadas, una con un diámetro hidrodinámico en torno a 150 nm y otra en torno a 375 nm, siendo esta última la que aparece en más alta proporción. Estos valores son inferiores a los obtenidos en el caso de las nanopartículas de Fe@C. Un tamaño de partícula inferior, favorece la estabilidad de las nanopartículas de Fe₃O₄@C en disolución. No obstante, tras unas horas las nanopartículas precipitan y necesitan de una funcionalización química, como la explicada en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*, para su estabilidad.

3.2.8 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)

Se ha medido el coeficiente de absorción específica de potencia de las nanopartículas de Fe₃O₄@C en disoluciones de H₂O, a diferentes valores de campo magnético y a diferentes frecuencias, obteniendo los mejores resultados a un campo magnético de 300 Gauss y a una frecuencia de 578 kHz. La variación de la temperatura de la suspensión en función del tiempo se representa en la *figura 3.34*. El coeficiente de absorción específica de potencia correspondiente a diferentes suspensiones acuosas de nanopartículas de Fe₃O₄@C se ha calculado según la *ecuación 3.3*, obteniéndose valores entre 170 y 200 W/g. En este caso el SAR es mayor que el obtenido en el caso de suspensiones acuosas de nanopartículas de Fe@C. Como ya se ha comentado, el tamaño de partícula y la anchura de la distribución de tamaño juegan un papel fundamental en el valor del SAR obtenido para una amplitud y frecuencia del campo magnético dadas. De este modo, la polidispersidad conduce a bajos valores de SAR (Torres et al. 2019). Como se ha visto en los respectivos análisis mediante TEM, la distribución de tamaños de las muestras de nanopartículas de Fe₃O₄@C (*figura 3.22*) es más estrecha que la de las muestras de nanopartículas de Fe@C (*figura 3.6*). Esto es debido a que el método utilizado para la síntesis de las nanopartículas de Fe₃O₄@C permite un mayor control del tamaño que en el caso de la síntesis en el horno de arco utilizado en la preparación de las nanopartículas de Fe@C.

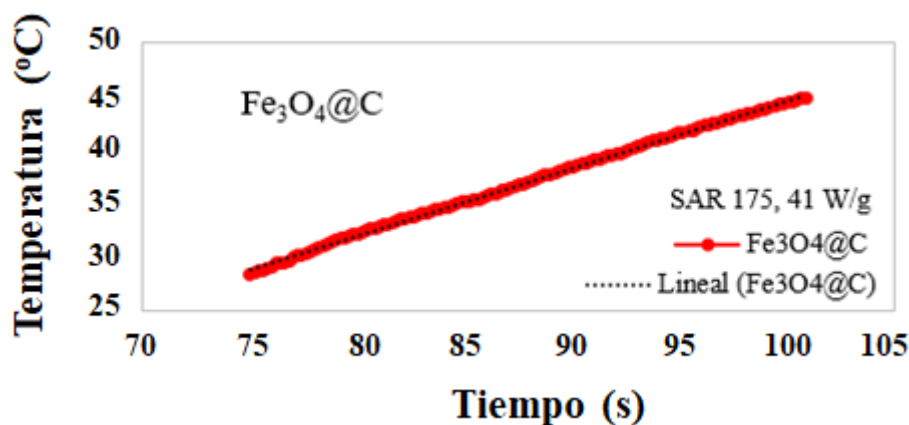


Figura 3.34. Medida del aumento de temperatura en función del tiempo, de una muestra de Fe₃O₄@C a 300 Gauss y 578 kHz (puntos rojos). La línea de puntos corresponde al ajuste lineal de la zona de la curva de calentamiento considerada para el cálculo del SAR.

La mayor homogeneidad de tamaños podría ser la causa de que los valores de SAR sean más altos para las suspensiones de nanopartículas de Fe₃O₄@C que para las de Fe@C (Yamamoto et al. 2014). Además, las diferencias entre los recubrimientos de los dos tipos de núcleos podrían también traducirse en diferencias en el proceso de relajación de Brown de las nanopartículas en suspensión, lo que también explicaría las diferencias observadas en los valores de SAR.

3.3 Conclusiones

Se han sintetizado dos tipos de nanopartículas magnéticas tipo *core-shell* con recubrimiento de carbono, mediante dos métodos de síntesis diferentes. Las nanopartículas presentan núcleos diferentes, dependiendo del método utilizado: el núcleo de las sintetizadas por el método físico (Fe@C) es Fe⁰, con una pequeña contribución de Fe₃C; y el de las sintetizadas por el método químico (Fe₃O₄@C) es de

Fe₃O₄, con una pequeña contribución de otras fases magnéticas como la γ -Fe₂O₃. La alta cristalinidad del núcleo de α -Fe ha sido confirmada por espectroscopia Raman.

Además, el recubrimiento de las nanopartículas es también distinto. Mientras que en las nanopartículas de Fe@C el núcleo magnético se encuentra encapsulado por capas de carbono cristalino, en las nanopartículas de Fe₃O₄@C es una fina capa de carbono amorfo la que rodea las nanopartículas.

Aunque los tamaños son similares, las nanopartículas de Fe₃O₄@C son más pequeñas que las de Fe@C, lo que es válido también para los agregados que se forman. El menor tamaño favorece la estabilidad de las Fe₃O₄@C frente a las de Fe@C en disoluciones acuosas.

El comportamiento magnético de los dos tipos de nanopartículas también es diferente. Las nanopartículas de Fe@C tienen un comportamiento ferromagnético a temperatura ambiente, mientras que las nanopartículas de Fe₃O₄@C tienen un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente. La existencia de la anomalía asociada a la transición de Verwey en los ciclos ZFC/FC demuestran que el núcleo de estas nanopartículas es mayoritariamente una magnetita de alta cristalinidad. La presencia de magnetita ha sido confirmada mediante espectroscopia Raman.

Finalmente, los valores del coeficiente de absorción específica de potencia (SAR) son mayores para las nanopartículas de Fe₃O₄@C que para las de Fe@C. Esto indica que el tamaño de partícula y la anchura de la distribución de tamaño de las nanopartículas de Fe₃O₄@C, así como sus propiedades magnéticas están más cerca de los valores óptimos que maximizarían el valor del SAR para los valores de amplitud y frecuencia del campo magnético utilizado en nuestros experimentos.

Referencias

Adams, Paul E. 1995. "Determining Iron Content in Foods by Spectrophotometry."

- Journal of Chemical Education* 72 (7): 649. <https://doi.org/10.1021/ed072p649>.
- Ando, Y., X. Zhao, and H Shimoyana. 1999. "Carbonaceous Products by Hydrogen Arc Discharge." *Crystal Research and Technology* 5–6: 597–603.
- Barrero, C a, a Jerez, J Restrepo, and a L Morales. 2001. "Transformación Magnetita-Hematita Inducida Térmicamente." *Revista Colombiana De Fisica* 33 (2): 230–33.
- Bhat, Shwetha G., and P. S.Anil Kumar. 2017. "Defect Mediated Exchange Bias in Oriented (111) Fe₃O₄/(100) GaAs." *Thin Solid Films* 621: 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2016.11.022>.
- Brion, D. 1980. "Etude Par Spectroscopie de Photoelectrons de La Degradation Superficielle de FeS₂, CuFeS₂, ZnS et PbS a l'air et Dans l'eau." *Applications of Surface Science* 5 (2): 133–52. [https://doi.org/10.1016/0378-5963\(80\)90148-8](https://doi.org/10.1016/0378-5963(80)90148-8).
- Buchner, M., K. Höfler, B. Henne, V. Ney, and A. Ney. 2018. "Tutorial: Basic Principles, Limits of Detection, and Pitfalls of Highly Sensitive SQUID Magnetometry for Nanomagnetism and Spintronics." *Journal of Applied Physics* 124 (16). <https://doi.org/10.1063/1.5045299>.
- Building, Hicks. 1971. "The Magnetization of Pure Iron and Nickel." *Proceedings of the Royal Society of London. A. Mathematical and Physical Sciences* 321 (1547): 477–91. <https://doi.org/10.1098/rspa.1971.0044>.
- Coaquira, J. A.H., H. R. Rechenberg, C. Marquina, M. R. Ibarra, A. M. Benito, W. Maser, E. Muñoz, and M. T. Martínez. 2001. "Hyperfine and Magnetic Characterization of Fe Particles Hosted in Carbon Nanocapsules." *Hyperfine Interactions* 134 (1): 103–8. <https://doi.org/10.1023/A:1013842720163>.
- Coey, J. M.D. 2001. "Magnetic Materials." *Journal of Alloys and Compounds* 326 (1–

2): 2–6. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(01\)01239-7](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(01)01239-7).

Descostes, M., F. Mercier, N. Thomat, C. Beaucaire, and M. Gautier-Soyer. 2000. “Use of XPS in the Determination of Chemical Environment and Oxidation State of Iron and Sulfur Samples: Constitution of a Data Basis in Binding Energies for Fe and S Reference Compounds and Applications to the Evidence of Surface Species of an Oxidized Py.” *Applied Surface Science* 165 (4): 288–302. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(00\)00443-8](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(00)00443-8).

Elmi, Chiara, Stephen Guggenheim, and Reto Gieré. 2016. “Surface Crystal Chemistry of Phyllosilicates Using X-Ray Photoelectron Spectroscopy: A Review.” *Clays and Clay Minerals* 64 (5): 537–51. <https://doi.org/10.1346/CCMN.2016.064033>.

Fernández-Pacheco Chicón, Rodrigo. 2008. “Synthesis, Characterization and Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.” Universidad de Zaragoza.

Fernández-Pacheco, Rodrigo, Manuel Arruebo, Clara Marquina, Ricardo Ibarra, Jordi Arbiol, and Jesús Santamaría. 2006. “Highly Magnetic Silica-Coated Iron Nanoparticles Prepared by the Arc-Discharge Method.” *Nanotechnology* 17 (5): 1188–92. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/17/5/004>.

Fernández-Pacheco, Rodrigo, Clara Marquina, J. Gabriel Valdivia, Martín Gutiérrez, M. Soledad Romero, Rosa Cornudella, Alicia Laborda, et al. 2007. “Magnetic Nanoparticles for Local Drug Delivery Using Magnetic Implants.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1 SPEC. ISS.): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.192>.

Ferrari, A. C., J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, et al. 2006. “Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers.” *Physical Review Letters* 97 (18): 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.97.187401>.

- Ferrari, Andrea C. 2007. "Raman Spectroscopy of Graphene and Graphite: Disorder, Electron-Phonon Coupling, Doping and Nonadiabatic Effects." *Solid State Communications* 143 (1–2): 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052>.
- Ferrari, Andrea C., and Denis M. Basko. 2013. "Raman Spectroscopy as a Versatile Tool for Studying the Properties of Graphene." *Nature Nanotechnology* 8 (4): 235–46. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.
- Goncharov, Alexander F, Ho-kwang Mao, Philippe Gillet, and Russell J Hemley. 2000. "Raman Spectroscopy of Iron to 152 Gigapascals : Implications for Earth ' s Inner Core." *Science* 288 (June): 1626–30.
- Hasanzadeh, Iraj, and Mohammad Jafari Eskandari. 2020. "Direct Growth of Multiwall Carbon Nanotube on Metal Catalyst by Chemical Vapor Deposition: In Situ Nucleation." *Surface and Coatings Technology* 381 (November 2019): 125109. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2019.125109>.
- Hawn, David D., and Benjamin M. DeKoven. 1987. "Deconvolution as a Correction for Photoelectron Inelastic Energy Losses in the Core Level XPS Spectra of Iron Oxides." *Surface and Interface Analysis* 10 (2–3): 63–74. <https://doi.org/10.1002/sia.740100203>.
- Huang, Mingyuan, Hugen Yan, Changyao Chen, Daohua Song, Tony F. Heinz, and James Hone. 2009. "Phonon Softening and Crystallographic Orientation of Strained Graphene Studied by Raman Spectroscopy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (18): 7304–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811754106>.
- Iijima, Sumio. 1980. "Direct Observation of the Tetrahedral Bonding in Graphitized Carbon Black By High Resolution Electron Microscopy." *Journal of Crystal Growth* 50: 675–83.

- Iizumi, Masashi. 1979. "Verwey Transition in Magnetite as a Potentially Incommensurate but Eventually Commensurate Phase Transition." *AIP Conference Proceedings* 53: 184–86. <https://doi.org/10.1063/1.31857>.
- Johansson, G., J. Hedman, A. Berndtsson, M. Klasson, and R. Nilsson. 1973. "Calibration of Electron Spectra." *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 2 (3): 295–317. [https://doi.org/10.1016/0368-2048\(73\)80022-2](https://doi.org/10.1016/0368-2048(73)80022-2).
- Jorge, Jose, Emmanuel Flahaut, Fernando Gonzalez-jimenez, Gema Gonzalez, Jesus Gonzalez, Edgar Belandria, Jean M Broto, and Bertrand Raquet. 2008. "Preparation and Characterization of Alpha-Fe Nanowires Located inside Double Wall Carbon Nanotubes." *Chemical Physics Letters* 457: 347–51. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2008.04.019>.
- Krätschmer, W., Lowell D. Lamb, K. Fostiropoulos, and Donald R. Huffman. 1990. "Solid C60: A New Form of Carbon." *Nature* 347 (6291): 354–58. <https://doi.org/10.1038/347354a0>.
- Li, Z. Q., C. J. Lu, Z. P. Xia, Y. Zhou, and Z. Luo. 2007. "X-Ray Diffraction Patterns of Graphite and Turbostratic Carbon." *Carbon* 45 (8): 1686–95. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2007.03.038>.
- Liu, Yun, Yana Li, Kedan Jiang, Guoxiu Tong, Tianxi Lv, and Wenhua Wu. 2016. "Controllable Synthesis of Elliptical Fe₃O₄@C and Fe₃O₄/Fe@C Nanorings for Plasmon Resonance-Enhanced Microwave Absorption." *Journal of Materials Chemistry C* 4 (30): 7316–23. <https://doi.org/10.1039/c6tc01737a>.
- Matteis, Laura De, Laura Custardoy, Rodrigo Fernández-Pacheco, César Magén, Jesús M. De La Fuente, Clara Marquina, and M. Ricardo Ibarra. 2012. "Ultrathin MgO Coating of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles by Combined Coprecipitation and Sol-Gel Synthesis." *Chemistry of Materials* 24 (3): 451–56.

<https://doi.org/10.1021/cm202306z>.

Mehdaoui, B., A. Meffre, L. M. Lacroix, J. Carrey, S. Lachaize, M. Respaud, M. Gougeon, and B. Chaudret. 2010. "Magnetic Anisotropy Determination and Magnetic Hyperthermia Properties of Small Fe Nanoparticles in the Superparamagnetic Regime." *Journal of Applied Physics* 107 (9): 25. <https://doi.org/10.1063/1.3348795>.

Mezzi, A., and S. Kaciulis. 2010. "Surface Investigation of Carbon Films: From Diamond to Graphite." *Surface and Interface Analysis* 42 (6–7): 1082–84. <https://doi.org/10.1002/sia.3348>.

Mills, P., and J. L. Sullivan. 1983. "A Study of the Core Level Electrons in Iron and Its Three Oxides by Means of X-Ray Photoelectron Spectroscopy." *Journal of Physics D: Applied Physics* 16 (5): 723–32. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/16/5/005>.

Mohiuddin, T. M.G., A. Lombardo, R. R. Nair, A. Bonetti, G. Savini, R. Jalil, N. Bonini, et al. 2009. "Uniaxial Strain in Graphene by Raman Spectroscopy: G Peak Splitting, Grüneisen Parameters, and Sample Orientation." *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* 79 (20): 1–8. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.79.205433>.

Muhler, M., R. Schlögl, and G. Ertl. 1992. "The Nature of the Iron Oxide-Based Catalyst for Dehydrogenation of Ethylbenzene to Styrene 2. Surface Chemistry of the Active Phase." *Journal of Catalysis* 138 (2): 413–44. [https://doi.org/10.1016/0021-9517\(92\)90295-S](https://doi.org/10.1016/0021-9517(92)90295-S).

Patterson, A. L. 1939. "The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination." *Physical Review* 56 (10): 978–82. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.56.978>.

Pisana, Simone, Michele Lazzeri, Cinzia Casiraghi, Kostya S. Novoselov, A. K. Geim,

- Andrea C. Ferrari, and Francesco Mauri. 2007. "Breakdown of the Adiabatic Born-Oppenheimer Approximation in Graphene." *Nature Materials* 6 (3): 198–201. <https://doi.org/10.1038/nmat1846>.
- Rechenberg, H. R., J. A.H. Coaquira, C. Marquina, B. García-Landa, M. R. Ibarra, A. M. Benito, W. Maser, E. Muñoz, and M. T. Martínez. 2001. "Mössbauer and Magnetic Characterisation of Carbon-Coated Small Iron Particles." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 226–230 (PART II): 1930–32. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(00\)00667-3](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(00)00667-3).
- Rochelle M. Cornell, Udo Schwertmann. 2006. *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses, 2nd, Completely Revised and Extended Edition*.
- Serrano-Esparza, Iné, Jiyu Fan, Jan M. Michalik, Luis Alfredo Rodríguez, Manuel Ricardo Ibarra, and José María De Teresa. 2016. "The Nature of Graphene-Metal Bonding Probed by Raman Spectroscopy: The Special Case of Cobalt." *Journal of Physics D: Applied Physics* 49 (10). <https://doi.org/10.1088/0022-3727/49/10/105301>.
- Shebanova, Olga N., and Peter Lazor. 2003. "Raman Spectroscopic Study of Magnetite (FeFe₂O₄): A New Assignment for the Vibrational Spectrum." *Journal of Solid State Chemistry* 174 (2): 424–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00294-9).
- Song, Kyeongse, Youngmin Lee, Mi Ru Jo, Ki Min Nam, and Yong Mook Kang. 2012. "Comprehensive Design of Carbon-Encapsulated Fe₃O₄ Nanocrystals and Their Lithium Storage Properties." *Nanotechnology* 23 (50). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/50/505401>.
- Srinivas, G., Yanwu Zhu, Richard Piner, Neal Skipper, Mark Ellerby, and Rod Ruoff. 2010. "Synthesis of Graphene-like Nanosheets and Their Hydrogen Adsorption

- Capacity.” *Carbon* 48 (3): 630–35. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.10.003>.
- Torres, Teobaldo E., Enio Lima, M. Pilar Calatayud, Beatriz Sanz, Alfonso Ibarra, Rodrigo Fernández-Pacheco, Alvaro Mayoral, Clara Marquina, M. Ricardo Ibarra, and Gerardo F. Goya. 2019. “The Relevance of Brownian Relaxation as Power Absorption Mechanism in Magnetic Hyperthermia.” *Scientific Reports* 9 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40341-y>.
- Verwey, E.J.W. 1939. “Electronic Conduction of Magnetite (Fe₃O₄) and Its Transition Point at Low Temperatures.” *Nature* 144: 327–28.
- Wagner, C.D., W.M. Riggs, L.E. Davis, and J.F. Moulder. 1979. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy*.
- Wang, W. X., S. H. Liang, T. Yu, D. H. Li, Y. B. Li, and X. F. Han. 2011. “The Study of Interaction between Graphene and Metals by Raman Spectroscopy.” *Journal of Applied Physics* 109 (7). <https://doi.org/10.1063/1.3536670>.
- Wu, Yingpeng, Bin Wang, Yanfeng Ma, Yi Huang, Na Li, Fan Zhang, and Yongsheng Chen. 2010. “Efficient and Large-Scale Synthesis of Few-Layered Graphene Using an Arc-Discharge Method and Conductivity Studies of the Resulting Films.” *Nano Research* 3 (9): 661–69. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0027-3>.
- Yamamoto, Y., K. Horiuchi, M. Takeuchi, N. Tanaka, R. Aihara, N. Takeuchi, and S. Fujita. 2014. “Size Dependence Study on Magnetic Heating Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Suspension.” *Journal of Applied Physics* 116 (12). <https://doi.org/10.1063/1.4896369>.
- Yamashita, Toru, and Peter Hayes. 2008. “Analysis of XPS Spectra of Fe 2+ and Fe 3+ Ions in Oxide Materials.” *Applied Surface Science* 254 (8): 2441–49. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.09.063>.

Yan, Jun, Yuanbo Zhang, Philip Kim, and Aron Pinczuk. 2007. "Electric Field Effect Tuning of Electron-Phonon Coupling in Graphene." *Physical Review Letters* 98 (16): 1–4. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.98.166802>.

Yu, Ting, Zhenhua Ni, Chaoling Du, Yumeng You, Yingying Wang, and Zexiang Shen. 2008. "Raman Mapping Investigation of Graphene on Transparent Flexible Substrate: The Strain Effect." *Journal of Physical Chemistry C* 112 (33): 12602–5. <https://doi.org/10.1021/jp806045u>.

Zhao, Huan, Hao Jie Cui, and Ming Lai Fu. 2016. "A General and Facile Method for Improving Carbon Coat on Magnetic Nanoparticles with a Thickness Control." *Journal of Colloid and Interface Science* 461: 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.09.029>.

Capítulo IV: Caracterización fisicoquímica de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas

En este capítulo se presenta la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas con diferentes compuestos orgánicos (dopamina/ácido caféico) y diferentes polímeros (Poly-L-Lisina, PEG-NH₂, NH₂-PEG-NH₂) mediante la metodología expuesta en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. El objetivo de esta funcionalización es obtener suspensiones acuosas estables de ambos tipos de nanopartículas que las hagan adecuadas para su aplicación en biomedicina. Por ello, la caracterización que se expone en el presente capítulo incluye también la medida del coeficiente de absorción específica de potencia (SAR) de las suspensiones obtenidas, con el objetivo de determinar si alguna de ellas pudiese ser el punto de partida de un nuevo tipo de agentes de calentamiento para hipertermia magnética.

Introducción

Las propiedades magnéticas de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C las convierte en potenciales candidatas para diferentes aplicaciones en biomedicina, como por ejemplo en resonancia magnética nuclear (Cardoso et al. 2018)(Pankhurst et al. 2003)(Sun, Lee, and Zhang 2008), hipertermia magnética (Cardoso et al. 2018)(Pankhurst et al. 2003)(Sun, Lee, and Zhang 2008)(Jae-hyun Lee et al. 2011)(C. S. S. R. Kumar and Mohammad 2011) o liberación de fármacos (Cardoso et al. 2018)(Sun, Lee, and Zhang 2008)(C. S. S. R. Kumar and Mohammad 2011). Muchas de estas aplicaciones requieren su administración por vía intravenosa o bien directamente en el lugar donde se desea que estas nanopartículas cumplan su función de diagnóstico o tratamiento (Alexiou et al. 2000)(Mornet et al. 2004). Para ello es necesario obtener suspensiones de nanopartículas en agua o en otros medios biocompatibles, en las que las nanopartículas sean estables preferiblemente a pH neutro y no se agreguen (Berry 2005). Sin embargo, la mayoría de las nanopartículas en suspensiones acuosas tienen tendencia a agregarse por lo que su superficie debe ser funcionalizada para evitar que esto ocurra. Esto es especialmente necesario en el caso de los nanotubos de carbono y de las nanopartículas recubiertas de material carbonoso, dado su carácter hidrófobo.

Entre los métodos utilizados para mejorar la dispersión de estos nanomateriales están por ejemplo algunos tratamientos con ácido a altas temperaturas, o la dispersión por ultrasonidos (Vaisman, Wagner, and Marom 2007)(Nishijo et al. 2006)(Taylor et al. 2010), aunque presentan el inconveniente de que pueden introducir defectos que impliquen la pérdida o modificación de las propiedades fisicoquímicas del material. Otros métodos se basan en la utilización de surfactantes funcionales (como los basados en derivados de perileno (Ernst et al. 2017)(Ernst et al. 2012), o polímeros anfifílicos, como por ejemplo el poly(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO), combinados con polímeros como el polietilenglicol (PEG) (Fernández-Pacheco Chicón 2008)(Marquina and Ibarra 2020). Otras alternativas recurren a la utilización de polímeros como el

poly(vinyl alcohol) (PVA) (Aguiló-Aguayo et al. 2014), debido a su probada no toxicidad, biocompatibilidad, solubilidad en agua y biodegradabilidad (Paradossi et al. 2003).

En nuestro caso se decidió utilizar otros compuestos orgánicos (dopamina y ácido cafeico) así como polímeros (Poly-L-Lisina, PEG) como una nueva alternativa de funcionalización de las nanopartículas magnéticas Fe@C y Fe₃O₄@C. Esta funcionalización se realiza mediante una síntesis química muy sencilla, utilizando reactivos muy comunes y baratos, en condiciones de reacción no agresivas y que además es muy fácil de reproducir (ver *Capítulo II: Materiales y métodos*). La dopamina y el ácido cafeico (ambos compuestos conteniendo un grupo catecol) se han utilizado con éxito como recubrimiento de distintos sustratos de diferentes materiales tanto orgánicos como inorgánicos (e.g., metales nobles, SiO₂, TiO₂ y otros óxidos, polímeros, cerámicas etc.), de formas variadas y complejas, sustratos con los que forma fuertes enlaces covalentes y no covalentes (H. Lee, Scherer, and Messersmith 2006)(H. Lee and Miller 2007). En particular, se han utilizado también para la funcionalización de nanopartículas magnéticas (Gao et al. 2014)(Bordet et al. 2019)(Amstad et al. 2009)(Peng et al. 2006) (De Montferrand et al. 2013)(Sangnier et al. 2019).

En el caso particular de la dopamina, la coexistencia del grupo catecol y el grupo amino parece ser crucial para su adhesión a un variado espectro de materiales (H. Lee and Miller 2007). Además, como es bien conocido, la funcionalización con compuestos con grupos amino (R-NH₂) y grupos carboxilo (R-COOH) terminales (como ocurre en la dopamina y el ácido cafeico respectivamente) permite la unión con otros compuestos con grupos carboxilo o amino mediante enlaces fuertes, de tipo peptídico (Stryer, Berg, and Tymczko 1993), como el que tiene lugar en la formación de proteínas. Por ello, la dopamina y el ácido cafeico constituyen una plataforma muy versátil para reacciones secundarias, y los recubrimientos con estos materiales son fáciles de funcionalizar. Eligiendo las moléculas apropiadas, estos materiales pueden utilizarse en multitud de aplicaciones (H. Lee and Miller 2007). Por lo que respecta a su aplicación en

biomedicina y biología, la dopamina y el ácido caféico son moléculas biocompatibles. Entre otras características, los recubrimientos de polydopamina pueden a su vez funcionalizarse para evitar interacciones biológicas inespecíficas con biomoléculas no deseadas, o por el contrario, pueden funcionalizarse para que se unan con una alta especificidad, por ejemplo, a receptores de la superficie de células tumorales (H. Lee and Miller 2007), o a determinadas proteínas (Xu et al. 2004). Experimentos *in vitro* llevados a cabo con nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido caféico y ácido fólico han demostrado su potencial como agentes de contraste para imágenes obtenidas mediante resonancia magnética y para reconocimiento selectivo de células tumorales que expresan receptores de ácido fólico (Jun Lee, Sub, and Na 2016).

En nuestro caso, mediante los protocolos expuestos en el *Capítulo II: Materiales y métodos* de esta tesis, se ha buscado unir la dopamina y el ácido cafeico a Poly-L-Lisina y a polímeros PEG (PEG-NH₂/NH₂-PEG-NH₂), de manera que se adsorban sobre la capa de carbono que recubre el núcleo magnético de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C, aportándoles estabilidad y solubilidad en agua, sin disminuir su biocompatibilidad (Wan et al. 2015)(Bordet et al. 2019). La Poly-L-Lisina contiene aminoácidos esenciales para el ser humano (Nelson, D., Cox 2008) y además, favorece la internalización celular de las nanopartículas (Babic et al. 2008)(Riggio et al. 2012). Por otra parte, el PEG es un poliéter diol lineal biocompatible (Bailey and Koleske 1976)(Davidson 1980), soluble tanto en medios acuosos como orgánicos (Davidson 1980)(Mutter, M., and Bayer 1979), no tóxico, de bajas inmunogenicidad y antigenicidad (Dreborg, S., and Akerblom 1990) y buena cinética de excreción (Yamaoka, Tabata, and Ikada 1994). Todo ello lo hace idóneo para una gran variedad de aplicaciones, en particular para la funcionalización de nanopartículas con aplicaciones en biomedicina (Harris 1992)(Monfardini and Veronese 1998)(Chen et al. 2018)(Mu et al. 2017)(Smolensky et al. 2011).

En la funcionalización desarrollada en el *Capítulo II: Materiales y métodos* se ha buscado la formación de una amida (Smith and March 2001) haciendo uso de que, en

principio, la dopamina y el ácido cafeico permiten esta unión con los grupos terminales de la Poly.L-Lisina y del PEG. A continuación se presenta la caracterización físico-química de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina, dopamina/PEG-NH₂ y ácido caféico/NH₂ PEG-NH₂. Para ello se ha seguido una metodología similar a la utilizada en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar (*Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*).

4.1 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina

4.1.1 Nanopartículas Fe@C

En la *figura 4.1 (A)* se presenta un análisis comparativo de las nanopartículas de Fe@C antes y después de la funcionalización realizado mediante difracción de rayos X. En el difractograma correspondiente a las nanopartículas funcionalizadas se puede ver cómo las señales correspondientes al hierro son mucho menos intensas que en el difractograma correspondiente a las nanopartículas sin funcionalizar. Esto se debe a que al recubrirlas, la cantidad de hierro disminuye respecto a la de polímero. No obstante se distingue claramente el pico correspondiente a la fase α -Fe a 44,5°, lo que indica que el protocolo utilizado para la funcionalización no altera el núcleo de las nanopartículas. Además, en el difractograma correspondiente a las nanopartículas funcionalizadas se confirma la presencia de la dopamina por la aparición de un hombro pronunciado entre 20-30° (Luo et al. 2015). Esta intensa señal enmascara un pico en 22° correspondiente a la Poly-L-Lisina (Spoerke and Stupp 2005) así como los debidos al Fe y su cápsula gráfica.

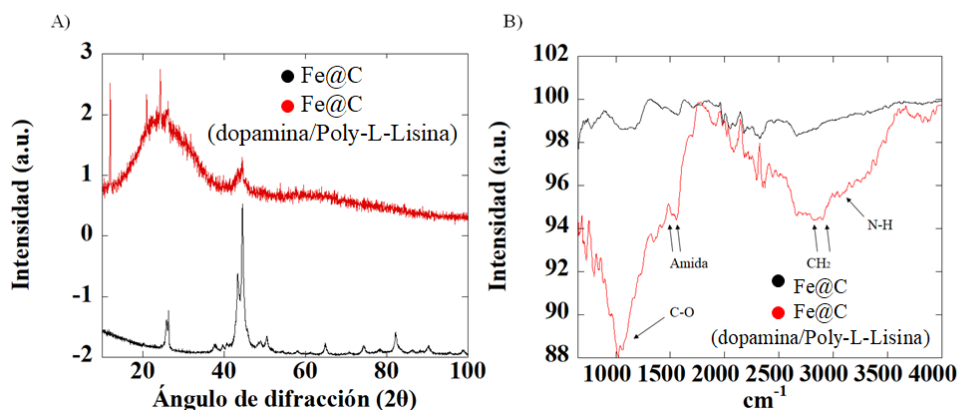


Figura 4.1. Difractograma de Rayos X (A) y espectro FTIR (B) de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina.

También mediante FTIR (figura 4.1.B), se confirma la presencia de la dopamina y Poly-L-Lisina en las nanopartículas funcionalizadas. La banda ancha alrededor de 3200 cm⁻¹ corresponde a las vibraciones de torsión de los enlaces N-H en la Poly-L-Lisina (Spoerke and Stupp 2005)(Lambert et al. 1987)(Socrates 2001) y los dos picos alrededor de 2900 y 2800 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de alargamiento simétrico y asimétrico respectivamente de los carbonos CH₂ de las cadenas de dopamina y Poly-L-Lisina (Spoerke and Stupp 2005)(Luo et al. 2015). Además aparecen dos señales a 1650 y 1530 cm⁻¹ correspondientes a las amidas de la Poly-L-Lisina (Spoerke and Stupp 2005)(Lambert et al. 1987)(Socrates 2001). Por último, el pico intenso en 1000 cm⁻¹ corresponde al enlace entre el carbono de las nanopartículas y los grupos OH de la dopamina que permite el anclaje del polímero a las nanopartículas (Kang et al. 2018).

Dado que la difracción de rayos X no pueden proporcionar información sobre la estructura gráfica se ha recurrido a la espectroscopia Raman con el fin de comprobar si el recubrimiento de capas de grafeno que rodea las nanopartículas de Fe@C se ve afectado por la funcionalización,

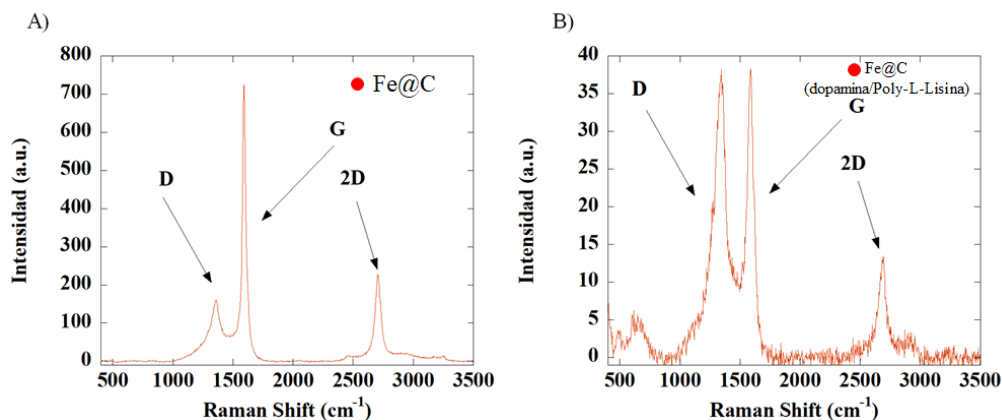


Figura 4.2. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C (A) y de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/Pol-L-Lisina (B). D, G y 2D corresponden al recubrimiento en capas de grafeno del núcleo de hierro.

En la figura 4.2 se muestra el espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (figura 4.2.A) y funcionalizadas (figura 4.2.B). El mayor cambio que se observa con la funcionalización es el aumento de la intensidad de la señal en torno a 1350 cm⁻¹ (pico D correspondiente a los defectos en la superficie del grafeno) respecto a la señal en torno a los 1600 cm⁻¹ (correspondiente al pico G del grafeno) (Ferrari and Basko 2013). Estas señales, se asemejan al espectro de la dopamina donde en estas mismas posiciones (1350 y 1580 cm⁻¹) aparecen dos picos solapados de igual intensidad, asociados a la deformación del catecol (V. Kumar et al. 2012). La Poly-L-Lisina posee sus señales más intensas a 1220 cm⁻¹ (solapada con las señales de la dopamina), 1440 cm⁻¹ y 1660 cm⁻¹ y están asignadas respectivamente a la banda de amida III, al modo de flexión (*bending*) del metileno y a la banda de amida I, respectivamente (V. Kumar et al. 2012)(Carrier and Pezolet 1978)(Kitahama, Nagahiro, and Tanaka 2017). Los picos correspondientes estarían enmascarados en las señales presentes en la zona del espectro entre aproximadamente 1200 cm⁻¹ y 1700 cm⁻¹ junto con los picos D y G que provienen de recubrimiento de capas de grafeno y la contribución de la dopamina. En el espectro de la figura 4.2 (B) se distingue claramente el pico 2D que también aparece en el

espectro de las nanopartículas sin funcionalizar y que no se observa en los espectros de la dopamina y Poly-L-Lisina publicados en la literatura. Esto sugiere que después de la funcionalización se mantiene el recubrimiento en capas gráficas del núcleo de hierro, junto con el polímero que recubre las nanopartículas, que posee un carbono menos cristalino que el de dichas capas de grafeno. Por último el pico que aparece a 620 cm^{-1} pertenece al espectro Raman de la Poly-L-Lisina (Kitahama, Nagahiro, and Tanaka 2017).

En la *imagen 4.1* se presenta una imagen obtenida mediante TEM de nanopartículas antes (A) y después de su funcionalización (B). Comparando varias imágenes de ambos tipos se observa que la funcionalización ha permitido una mejor dispersión de las nanopartículas, disminuyendo el tamaño de los agregados, y que estos son más regulares.

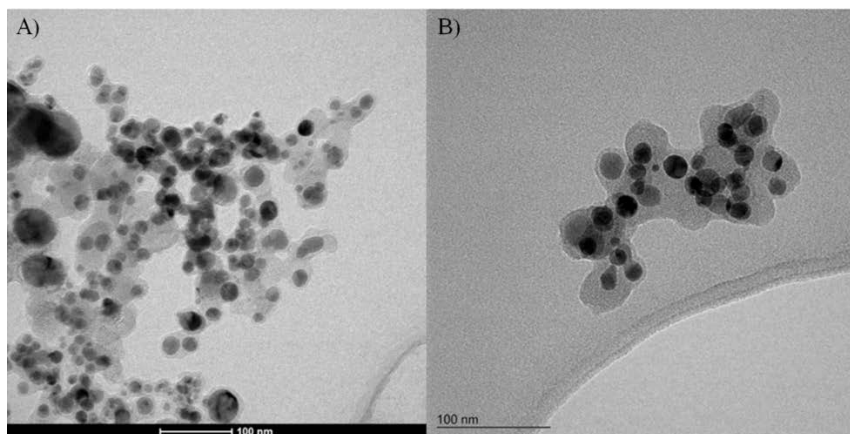


Imagen 4.1. Imagen comparativa de las nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (A) y una vez funcionalizadas (B).

Los valores que se obtienen por la técnica de DLS (*figura 4.3*), nos confirman la disminución de tamaño de los agregados presentes en la muestra cuando las nanopartículas se encuentran en suspensión acuosa. Como se ha visto en el *Capítulo III*:

Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C las nanopartículas de Fe@C en suspensión acuosa sin funcionalizar forman dos poblaciones de agregados: una con agregados de diámetro hidrodinámico en torno a los 200 nm, y otra más numerosa, formada por agregados de hasta 800 nm. Después de la funcionalización con dopamina/Poly-L-Lisina esta última población disminuye drásticamente, al igual que la población con diámetro medio 200 nm. Lo que se observa son agregados cuyo tamaño sigue una distribución ancha, con diámetro hidrodinámico medio centrado en $400 \pm 23,7$ nm.

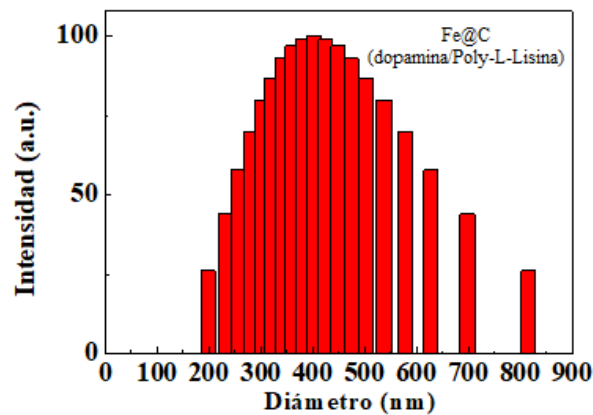


Figura 4.3. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina y Pol-L-Lisina, obtenida mediante DLS.

Un indicador de la estabilidad de las nanopartículas en suspensión es el potencial Z. Las medidas de potencial Z de las muestras funcionalizadas a pH 7, dan unos valores de alrededor de -75 mV, en buen acuerdo con lo reportado por otros autores para nanopartículas funcionalizadas con Poly-L-Lysina (Riggio et al. 2012). Esto estaría de acuerdo con la estabilidad de estas nanopartículas en suspensiones acuosas.

En la *imagen 4.2* se presenta una comparación de una suspensión de nanopartículas de Fe@C en agua, antes (A) y después (B) de su funcionalización con dopamina/Poly-L-

Lisina. Antes de la funcionalización las nanopartículas precipitan a los pocos minutos, mientras que después de la funcionalización se mantienen estables durante 24 horas.

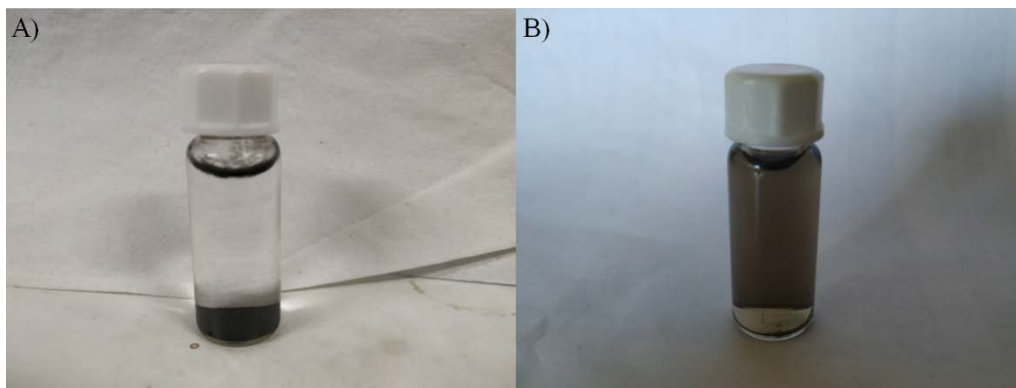


Imagen 4.2. Nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (A) y funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina en suspensión acuosa (B) después de 24 horas.

Una vez obtenida una suspensión estable y para comprobar si las nanopartículas funcionalizadas pueden utilizarse como agentes de calentamiento para hipertermia magnética, se ha medido la coeficiente de absorción de potencia (SAR). La medidas se han realizado aplicando campos magnéticos alternos de amplitud hasta 300 Gauss y frecuencia hasta 578 kHz. Tanto para las nanopartículas sin funcionalizar como para las funcionalizadas, los máximos valores de SAR se han obtenido para el máximo de amplitud y frecuencia del campo aplicado. En la *figura 4.4* se representa el incremento de temperatura en función del tiempo de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (A) y de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina (B). A partir de estos valores el valor del SAR se ha calculado según la *ecuación 3.3* (ver *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*).

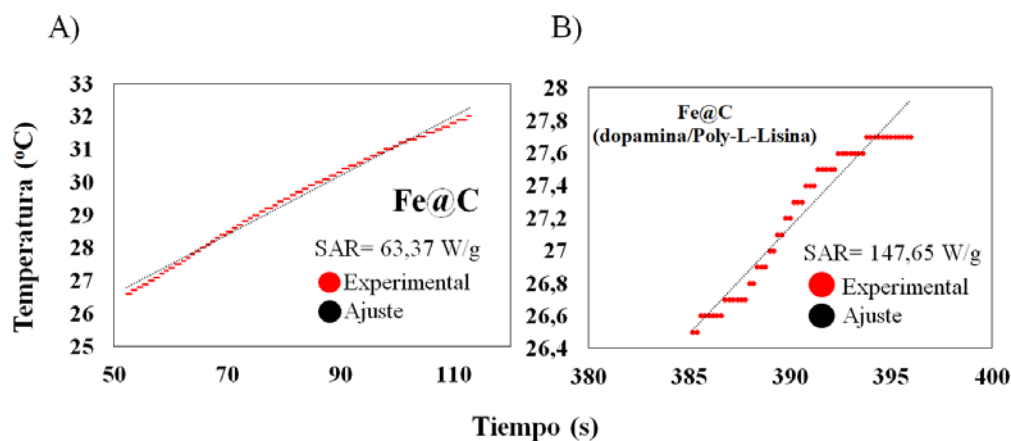


Figura 4.4. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C (A) y de Fe@C funcionalizadas con dopamina/Pol-L-Lisina (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

Si para suspensiones acuosas de las partículas de Fe@C se obtienen siempre unos valores de SAR entre 60-80 W/g, tras realizar la funcionalización, estos valores llegan hasta casi 150 W/g. Como se ha comentado en el *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*, el bajo valor de SAR obtenido en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar podría ser debido a la existencia en la suspensión de agregados de nanopartículas de elevado diámetro hidrodinámico. Esto disminuiría la relajación de Brown, uno de los mecanismos que gobiernan la absorción de potencia y que se debe a la dinámica que induce el campo electromagnético aplicado en nanopartículas en que el momento magnético sigue la dinámica de la nanopartícula, fijado por anisotropía magnetocristalina (la rotación del momento magnético daría lugar a un mecanismo diferente conocido como relajación de Neel) (Torres et al. 2019). El aumento de SAR observado cuando se utiliza una suspensión de nanopartículas funcionalizadas está en buen acuerdo con la disminución del tamaño de los agregados que se observa después de la funcionalización con dopamina/Poly-L-Lisina, y sugiere

que la relajación de Brown es el principal mecanismo de la absorción de potencia en este tipo de nanopartículas. Una futura optimización del protocolo de funcionalización para reducir todavía más el tamaño de los agregados y lograr una distribución más estrecha de sus diámetros hidrodinámicos abre una vía para la obtención de valores de SAR más elevados y para la utilización de este tipo de nanopartículas en la terapia basada en la hipertermia magnética.

4.1.2 Nanopartículas Fe₃O₄@C

Las nanopartículas de Fe₃O₄@C se han funcionalizado con dopamina y Poly-L-Lisina, buscando una mayor estabilidad de las nanopartículas en suspensión acuosa.

El polímero sintetizado se ha analizado por rayos X como se observa en la *figura 4.5*. En esta figura se puede ver un pico ancho entre 20 y 30°, con el máximo a 24° que englobaría las señales correspondientes al polímero de dopamina/Poly-L-Lisina, como ya se vio en el difractograma correspondiente a la muestra de Fe@C (*figura 4.1.A*) (Kang et al. 2018)(Luo et al. 2015)(Spoerke and Stupp 2005).

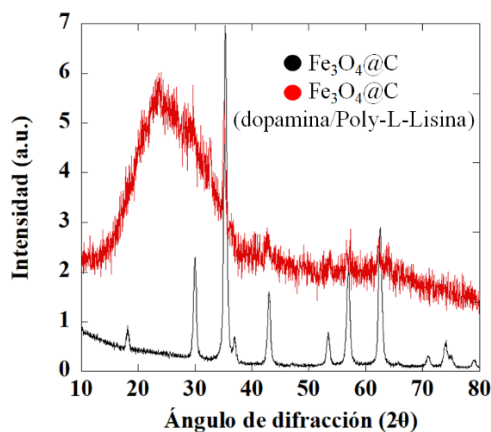


Figura 4.5. Difractograma de rayos X correspondiente a las nanopartículas de Fe₃O₄@C sin funcionalización (negro) y funcionalizadas con dopamina/Pol-L-Lisina (rojo).

Para estudiar la eficacia de la funcionalización con este polímero en disgregar los agregados presentes en la muestra de Fe₃O₄@C las nanopartículas funcionalizadas se han analizado mediante TEM. En la *imagen 4.3* se presenta una imagen correspondiente a las nanopartículas antes (*imagen 4.3.A*) y después de la funcionalización (*imagen 4.3.B*). De su comparación se puede ver claramente cómo después de la funcionalización los agregados de nanopartículas son menores y se encuentran mucho más dispersos.

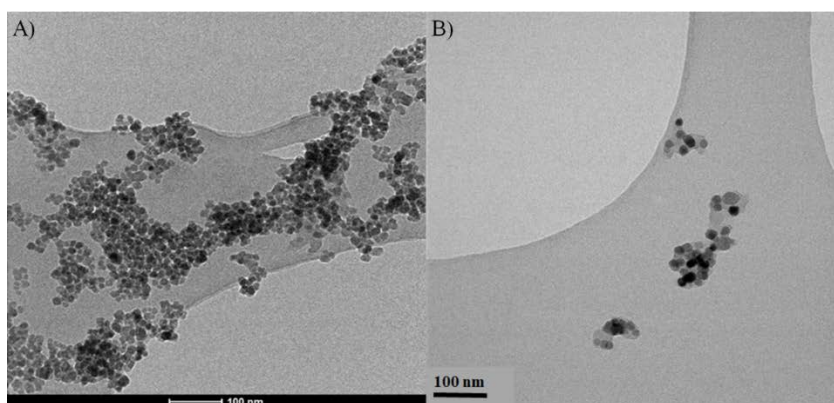


Imagen 4.3. Imagen TEM de las nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina y Poly-L-Lisina (B).

Las nanopartículas funcionalizadas en suspensión acuosa se han analizado mediante la técnica de DLS. Los resultados se presentan en el histograma de la *figura 4.6* y muestran cómo la funcionalización ha inducido un cambio en el tipo de agregados presentes en la muestra. Como se ha visto en el *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*, las nanopartículas de Fe₃O₄@C forman dos poblaciones diferenciadas de agregados: una minoritaria, con un diámetro hidrodinámico en torno a 150 nm y otra en una proporción muy elevada, formada por agregados en torno a 375 nm de diámetro hidrodinámico. Tras la funcionalización con dopamina y Poly-L-Lisina se forman agregados de nanopartículas con diámetro hidrodinámico en torno a un valor medio igual a $314 \pm 11,2$ nm. Además, se observan de nuevo agregados mayores (por encima de los 600 nm), aunque estos se encuentran

en una proporción ligeramente menor. A pesar de la presencia de estos agregados de mayor tamaño, las nanopartículas en suspensión acuosa son estables durante horas y en algunos casos durante días.

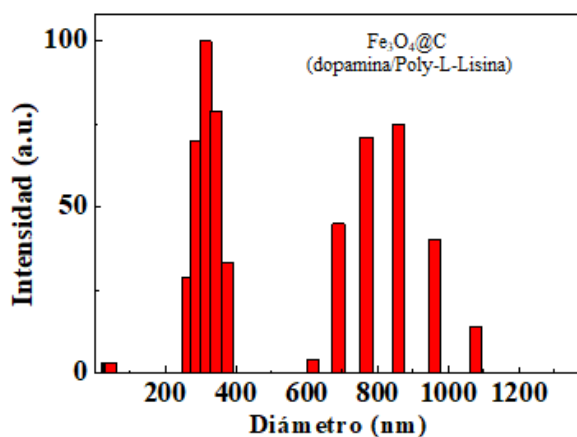


Figura 4.6. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina y Pol-L-Lisina, obtenida mediante DLS.

Para estudiar su potencial como agentes de calentamiento para hipertermia magnética, se ha medido el coeficiente de absorción de potencia (SAR). Las medidas se han realizado aplicando campos magnéticos alternos de amplitud hasta 300 Gauss y frecuencia hasta 578 kHz. Como ocurría en los casos anteriores, la mayor absorción de potencia se ha obtenido para los valores máximos de amplitud y frecuencia. En el caso de las nanopartículas funcionalizadas los valores de SAR obtenidos son menores que los correspondientes a las nanopartículas de Fe₃O₄@C sin funcionalizar. Tal y como muestra la *figura 4.7*, las nanopartículas de Fe₃O₄@C tienen un valor de SAR entre 170 y 200 W/g (dependiendo de la muestra), mientras que una vez que las nanopartículas están funcionalizadas los valores obtenidos son cercanos a los 80 W/g. El menor valor de SAR observado después de la funcionalización de las nanopartículas indica que a

pesar del tamaño inferior medio de una gran parte de los agregados presentes en la muestra sin funcionalizar, los agregados que se observan en el histograma de la *figura 4.6* de mayor tamaño, todavía tienen un peso importante en la muestra disminuyendo la relajación de Brown, uno de los mecanismos que gobiernan la absorción de potencia (Torres et al. 2019). Al igual que las nanopartículas Fe@C, la funcionalización no ha afectado a las propiedades magnéticas, por lo que no puede achacarse a esto la disminución del valores de SAR observada. En ambos casos las suspensiones calientan hasta más de los 40°C, temperatura crítica (Viglianti and Dewhirst 2013) en hipertermia magnética a la cual comienza a haber muerte por apoptosis o necrosis celular (Ramirez-Núñez et al. 2018).

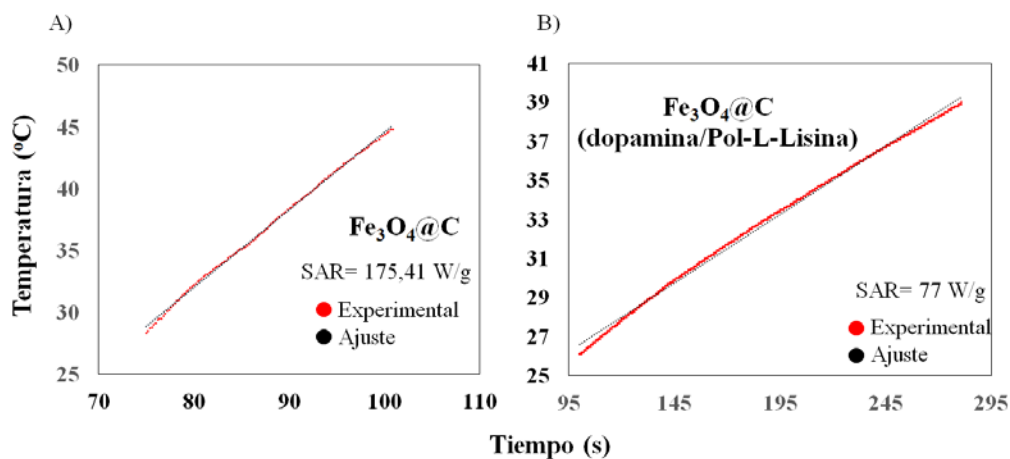


Figura 4.7. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de las una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/Pol-L-Lisina (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

4.2 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂

4.2.1 Nanopartículas Fe@C

Como en los casos anteriores, tras la funcionalización se ha analizado la presencia en las nanopartículas del polímero formado mediante dopamina/PEG-NH₂ mediante difracción de rayos X.

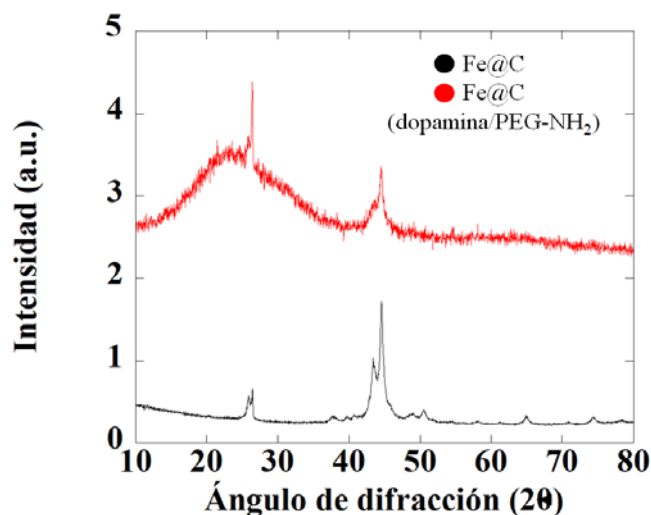


Figura 4.8. Análisis por rayos X de la muestra de nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (negro) y funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (rojo).

En el difractograma obtenido para una muestra de nanopartículas funcionalizadas mostrado en la figura 4.8 (rojo) aparece un pico ancho entre 20 y 30°, como ocurría para la funcionalización con dopamina/Poly-L-Lisina (figura 4.1 A) correspondiente al carbono de la dopamina (Luo et al. 2015) y al polímero PEG-NH₂ añadido (Wang et al. 2018), que se superpone con el del carbono de las capas de grafeno que recubren las nanopartículas. Aunque la intensidad de los picos es mucho menor, en el difractograma se observan también los correspondientes a la fase α -Fe (pico a 44,5° ref: ICSD-

Karlsruhe-631724). Esto confirma que la funcionalización no ha producido la oxidación del núcleo de las nanopartículas, protegido por las capas de grafeno.

El recubrimiento de las nanopartículas funcionalizadas se ha analizado también mediante espectroscopia Raman.

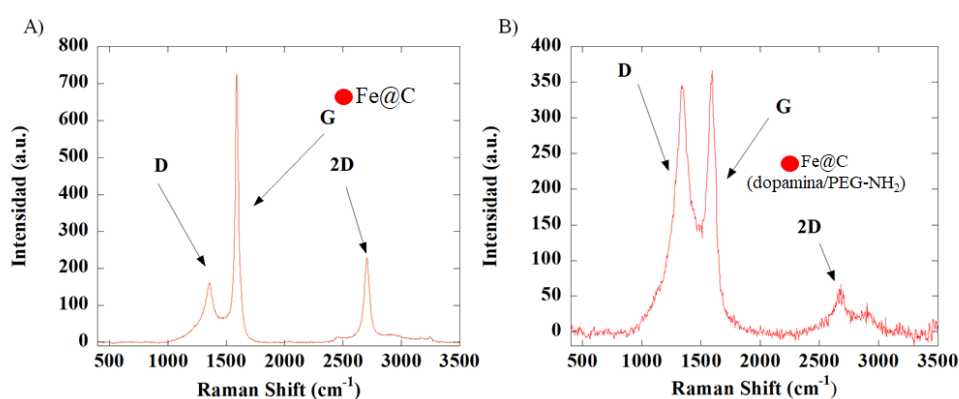


Figura 4.9. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C (A) y de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B).

En figura 4.9, se presentan los espectros Raman correspondientes a una muestra de nanopartículas de Fe@C antes (figura 4.9.A) y después de la funcionalización con dopamina/PEG-NH₂ (figura 4.9.B). El espectro de la figura 4.9 (A) corresponde a un carbono grafitico con muy pocos defectos, que es el recubrimiento del núcleo de las nanopartículas. Sin embargo, en la figura 4.9 (B), la intensidad de la señal en torno a 1350 cm⁻¹ (correspondiente al pico D que representa a los defectos presentes en el carbono) aumenta considerablemente, hasta ser comparable a la señal en torno a 1600 cm⁻¹ (correspondiente al pico G, pico que representa el carbono grafitico). El ratio de intensidades de la banda D y la banda G ($I(D)/I(G)$) permite evaluar los defectos en materiales carbonosos (Ferrari 2007). Tras la funcionalización la relación $I(D)/I(G)$ es aproximadamente 1, lo que indica un aumento en los defectos en la superficie de las nanopartículas magnéticas. Este cambio sugiere la presencia de la dopamina y del PEG-

NH₂ recubriendo las nanopartículas (Hu et al. 2018)(V. Kumar et al. 2012). Por otra parte, la presencia del pico 2D en el espectro Raman de las nanopartículas funcionalizadas indica que el recubrimiento de capas de grafeno no parece verse afectado por la funcionalización, por lo que protege el núcleo de hierro de una posible oxidación durante la reacción, en buen acuerdo con el espectro de difracción de rayos X mostrado anteriormente.

Las imágenes de TEM obtenidas después de la funcionalización de las nanopartículas de Fe@C con dopamina/PEG-NH₂ (ver *imagen 4.4.B*) muestran que la funcionalización consigue dispersar los agregados de nanopartículas presentes en la muestra de nanopartículas sin funcionalizar (*imagen 4.4.A*).

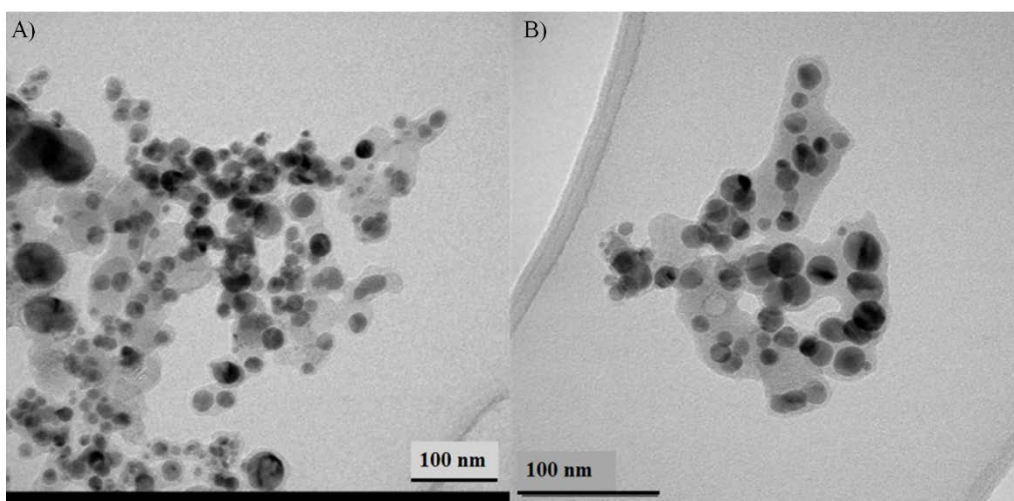


Imagen 4.4. Imagen TEM de las nanopartículas de Fe@C (A) y de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B).

La distribución de tamaño de los agregados presentes en suspensiones acuosas de nanopartículas funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ que se muestra en la *figura 4.10*, es muy similar a la obtenida en el caso de las nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina. Aunque esta funcionalización ha conseguido disgregar una gran parte de los agregados en torno a 800 nm presentes en la muestra sin funcionalizar,

los agregados en la suspensión de nanopartículas funcionalizadas siguen siendo grandes. Su distribución de tamaños es ancha y el diámetro hidrodinámico presenta un valor medio de $460 \pm 32,4$ nm.

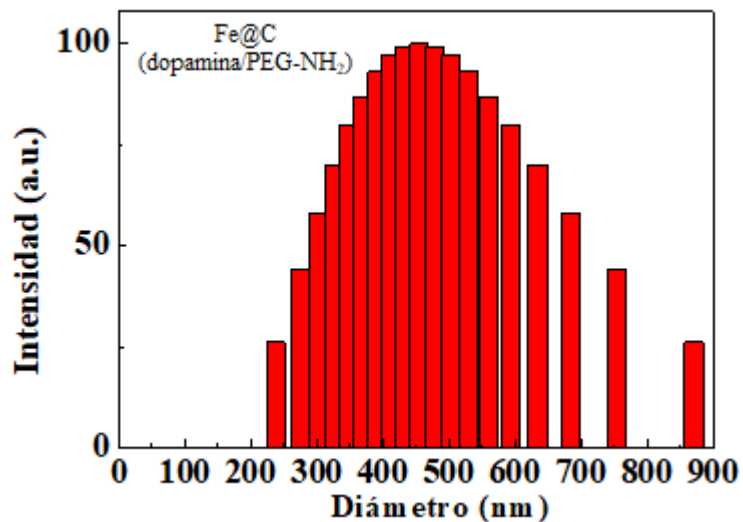


Figura 4.10. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina y PEG-NH₂ obtenida mediante DLS.

La presencia en la suspensión acuosa de agregados de este tamaño hace que los valores de SAR no mejoren con esta funcionalización respecto de los obtenidos en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar. En la figura 4.11 se presenta el aumento de temperatura en función del tiempo obtenido cuando se aplica un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y 578 kHz de frecuencia a una suspensión de nanopartículas antes (figura 4.11.A) y después de funcionalizar (figura 4.11.B).

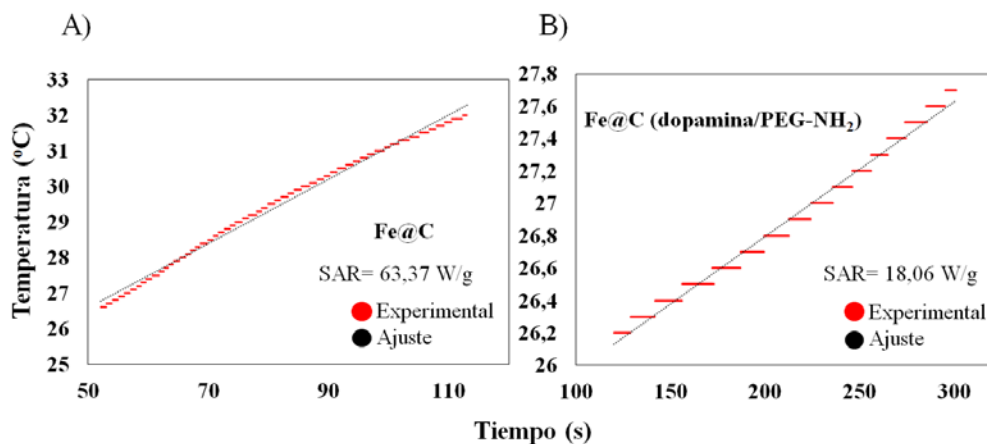


Figura 4.11. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C (A) y de Fe@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

De acuerdo con lo mostrado en la figura, las suspensiones de nanopartículas de Fe@C, tienen unos valores de SAR entre 60-80 W/g y una vez funcionalizadas, estos valores disminuyen hasta alrededor de los 20 W/g.

4.2.2 Nanopartículas Fe₃O₄@C

La funcionalización de las nanopartículas Fe₃O₄@C con dopamina/PEG-NH₂ busca de nuevo los objetivos establecidos cuando se realiza la funcionalización de las nanopartículas: mejorar la estabilidad de las nanopartículas en suspensiones acuosas, respecto a las nanopartículas Fe₃O₄@C libres y también aumentar los valores de SAR para su futura aplicación en hipertermia magnética.

Las nanopartículas funcionalizadas se analizan mediante difracción de rayos X. En la figura 4.12 se presenta el difractograma obtenido, junto con el correspondiente a las nanopartículas sin funcionalizar.

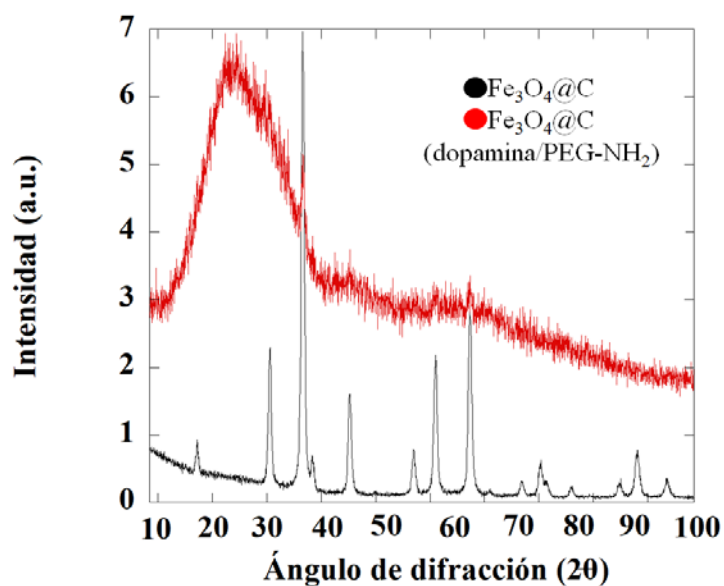


Figura 4.12. Difractograma de rayos X de nanopartículas de Fe₃O₄@C (negro) y nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (rojo).

La contribución más intensa que se observa en la figura 4.12 corresponde al carbono del polímero formado por la dopamina y el PEG-NH₂ y al recubrimiento de carbono amorfo de las nanopartículas. Esta contribución enmascara los picos a 35,5° y, a 43° grados que, junto con el que aparece a 62,5° grados (estos dos últimos de menor intensidad) corresponderían al patrón de difracción del núcleo de las nanopartículas de Fe₃O₄@C (ref: ICSD-Karlsruhe-172906) (Wang et al. 2018)(Luo et al. 2015). La presencia de estos picos en el difractograma sugiere que la composición de los núcleos magnéticos no se ve afectada por la funcionalización.

Los posibles cambios que el proceso de funcionalización pudiese inducir en el carbono que recubre las nanopartículas se analizan por microscopía Raman. Los resultados se muestran en la *figura 4.13*.

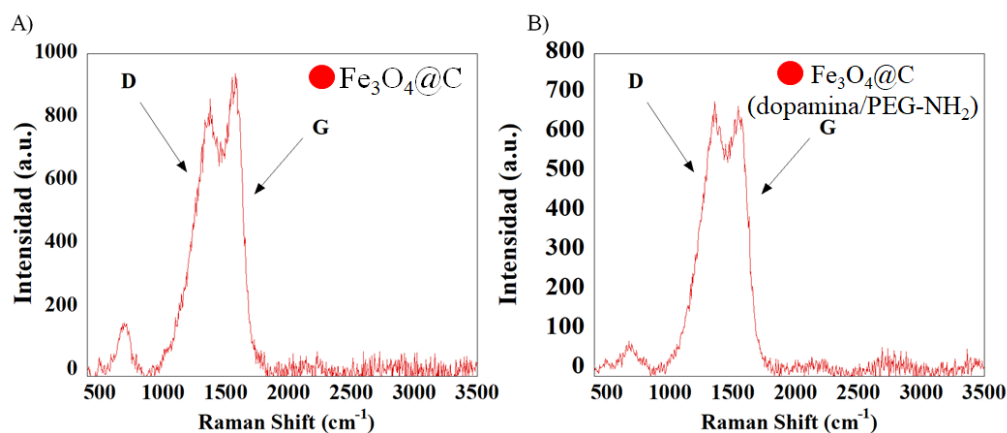


Figura 4.13. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B).

Los espectros Raman de las nanopartículas antes y después de la funcionalización son muy similares. En ambos casos se observan el pico D y del pico G, con un ligero aumento de la intensidad del pico D después de la funcionalización. Por tanto los espectros indican que el carbono que recubre las nanopartículas es un carbono con alto contenido de defectos (Ferrari and Basko 2013)(Ferrari 2007). El aumento de la intensidad del pico D que se observa en el espectro de las nanopartículas funcionalizadas se debe a la contribución del polímero de dopamina y PEG-NH₂. El pico a 682 cm⁻¹, que se observa en ambos espectros, corresponde a la banda A_{1g} de la magnetita, que es el más intenso de los cinco modos Raman asociados a su estructura de espinela (Shebanova and Lazor 2003)(Shebanova and Lazor 2003)(Song et al. 2012). La presencia de este pico confirma que la funcionalización no afecta a la composición del núcleo de las nanopartículas.

La comparación de las imágenes de microscopía de transmisión electrónica (TEM) correspondientes a las nanopartículas antes y después de su funcionalización (*imagen 4.5 A y B* respectivamente) muestra que los agregados de nanopartículas que se obtienen después de la funcionalización con dopamina/PEG-NH₂ son en su gran mayoría más pequeños que los observados en las nanopartículas sin funcionalizar (Xie et al. 2007).

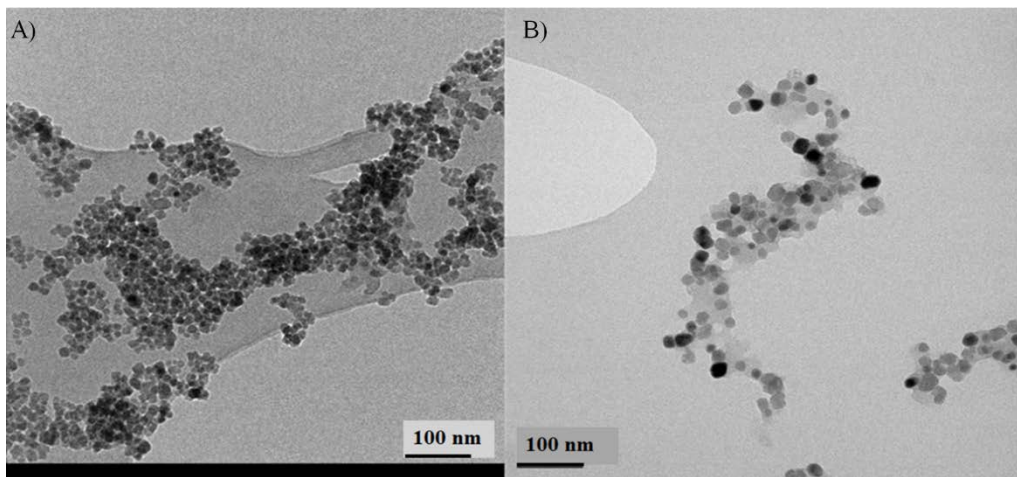


Imagen 4.5. Imágenes TEM de las nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B).

Mediante la técnica de DLS se ha estudiado el tamaño de dichos agregados en suspensiones acuosas. Los resultados obtenidos están en buen acuerdo con lo que se observa por microscopía electrónica de transmisión. El histograma de tamaño hidrodinámico se muestra en la *figura 4.14*.

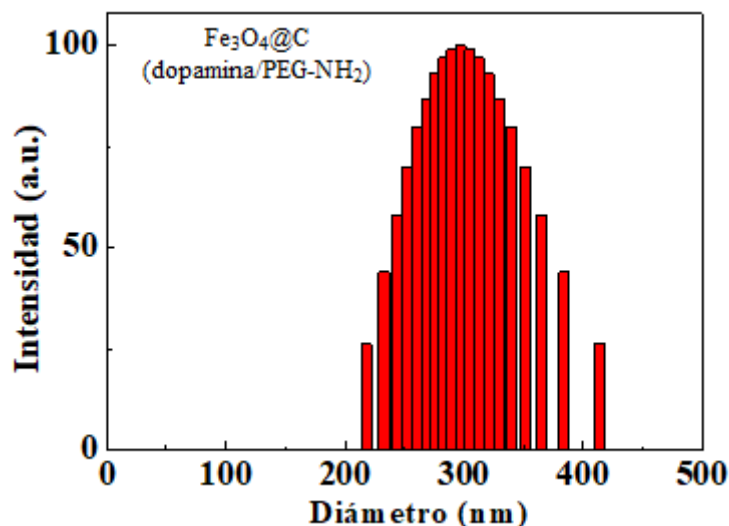


Figura 4.14. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizada con dopamina/PEG-NH₂ obtenida mediante DLS.

La distribución de tamaños muestra una única población de diámetro hidrodinámico medio centrado en torno a $300 \pm 15,5$ nm, de manera muy similar a cuando las nanopartículas se funcionalizaban con dopamina/Poly-L-Lisina. Sin embargo en el presente caso no se observan agregados por encima de los 425 nm de diámetro hidrodinámico. Estos resultados reflejan que la funcionalización ha reducido el tamaño de los agregados, permitiendo una mejor estabilización de las nanopartículas en suspensiones acuosas (Xie et al. 2007). Estas nanopartículas se mantienen sin precipitar durante varios días.

Sin embargo, esta reducción del tamaño de los agregados en suspensión no supone una mejora sustancial del valor de SAR, con respecto al obtenido en suspensiones de nanopartículas sin funcionalizar. Los resultados se muestran en la figura 4.15. Para las suspensiones de nanopartículas funcionalizadas se obtiene un SAR en torno a 121 W/g

mientras que el correspondiente a las suspensiones de nanopartículas de Fe₃O₄@C sin funcionalizar está en torno a 175W/g.

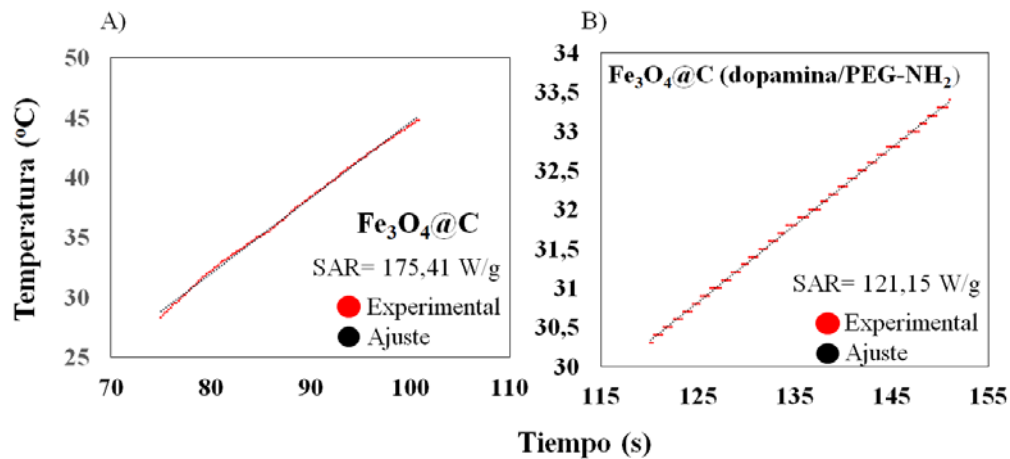


Figura 4.15. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de Fe₃O₄@C funcionalizadas con dopamina/PEG-NH₂ (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

A pesar de no aumentar sustancialmente los valores de SAR como se estaba buscando, sí que ambos tipos de suspensiones sometidas a un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y 578 kHz de frecuencia pueden llegar a alcanzar la temperatura crítica a la que se produce muerte celular (Viglianti and Dewhirst 2013). Es de esperar que una optimización de esta funcionalización dé como resultado suspensiones útiles para hipertermia magnética.

4.3 Caracterización de nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂

4.3.1 Nanopartículas Fe@C

El difractograma de rayos X de las nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ se muestra en la *figura 4.16*, junto con el correspondiente a las nanopartículas sin funcionalizar.

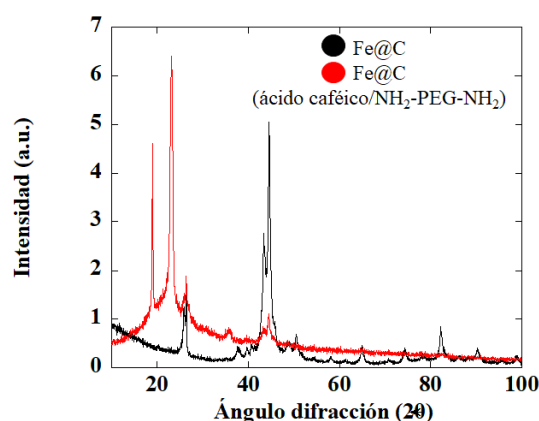


Figura 4.16. Difractograma de rayos X de las nanopartículas de Fe@C (negro) y las nanopartículas de Fe@C con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ (rojo).

Como se puede observar en la *figura 4.16*, el espectro de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ cambia respecto a los obtenidos para las nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina y dopamina/PEG-NH₂, presentando unos picos más estrechos y bien definidos a bajos ángulos de difracción. En el espectro de la figura se observa claramente un pico a unos 20° que corresponde al ácido caféico (Wei et al. 2010). Además, se distingue también el pico a 23° correspondiente al polímero NH₂-PEG-NH₂. Al igual que en el espectro de las nanopartículas Fe@C sin funcionalizar se observa el pico correspondiente al carbono bien cristalizado que recubre los núcleos magnéticos, además de los picos

correspondientes al α -Fe. Esto indica que el protocolo de funcionalización no altera la composición del núcleo de las nanopartículas, bien protegido por las capas de grafeno que lo rodean.

Mediante espectroscopia infrarroja FTIR se ha analizado la composición del recubrimiento de las nanopartículas. En la *figura 4.17* se muestran los espectros correspondientes a las nanopartículas de Fe@C (*figura 4.17 negro*) y a las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas (*figura 4.17 rojo*).

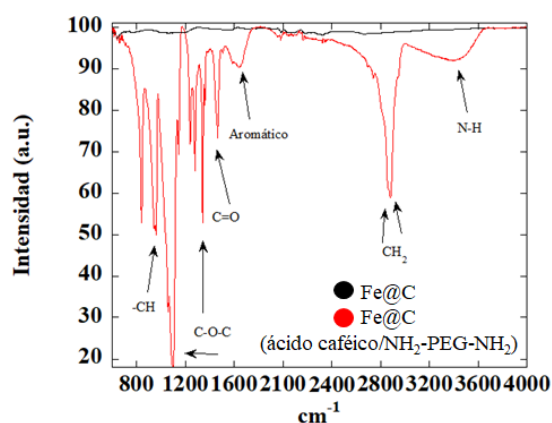


Figura 4.17. Espectro FTIR de las nanopartículas de Fe@C (negro) y nanopartículas de Fe@C con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (rojo).

El espectro correspondiente a la muestra de nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ muestra unas señales en posiciones similares a las observadas en el espectro de las nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina ya que el ácido caféico y el NH₂-PEG-NH₂, tienen grupos funcionales iguales (NH₂, C=O, CH₂, hidrocarburo aromático) y que lo único que cambia es el orden de los enlaces. Esto último hace que las señales cambien ligeramente en los espectros correspondientes a una funcionalización u otra (Kang et al. 2018).

Alrededor de 3200 cm^{-1} aparece una banda ancha correspondiente a las vibraciones de torsión de los enlaces N-H de los grupos NH_2 terminales del $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$. Esta señal se observaba también en el espectro correspondiente a la Poly-L-Lisina que se ha mostrado anteriormente que también posee grupos NH_2 terminales en su cadena alifática. Entre 2900 y 2800 cm^{-1} aparece un pico intenso con dos hombros pequeños, pertenecientes a las vibraciones de alargamiento simétrico y asimétrico de los carbonos CH_2 del polímero $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$. En torno a 1800 cm^{-1} hay un pequeño hombro correspondiente al anillo aromático del ácido caféico. Para finalizar, destaca el pico intenso a 1500 cm^{-1} correspondiente al grupo C=O del ácido caféico y los picos a 1300 (C-O-C extensión asimétrica) 1000 (extensión C-O-C) y 950 cm^{-1} ($-\text{CH}$ doblamiento fuera del plano) de absorción del polímero PEG (Akai, Alpsoy, and Baykal 2016)(Alpsoy et al. 2017).

El recubrimiento de las nanopartículas de Fe@C ha sido analizado también por espectroscopia Raman. El correspondiente espectro Raman se presenta en la *figura 4.18*, junto con el de las nanopartículas sin funcionalizar. En ambos casos se observan los picos D y G aunque con diferentes intensidades.

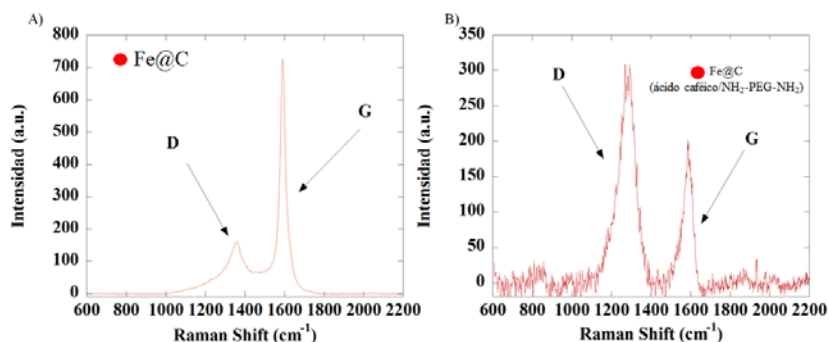


Figura 4.18. Espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C (A) y de las nanopartículas de Fe@C con ácido caféico y $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ (B).

En la *figura 4.18 (A)* correspondiente al espectro Raman de las nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar, se observa un espectro típico del grafeno con defectos, donde la señal predominante es la del pico G, en torno a 1600 cm^{-1} . En el espectro de la *figura 4.18 (B)*, correspondiente a las nanopartículas funcionalizadas, el pico D, en torno a $1300\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, es mucho mayor que el pico G, y ambos son mucho más anchos que en el espectro de las partículas de Fe@C. Ello sugiere que la contribución del ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ enmascara la de las capas de grafeno que recubren el núcleo de las nanopartículas.

En la *imagen 4.6* se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía de electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar (*imagen 4.6.A*) y de nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ (*imagen 4.6.B*).

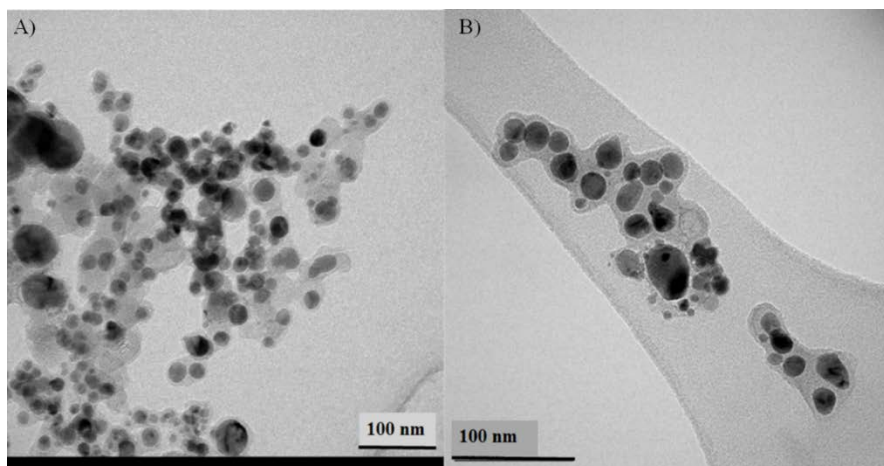


Imagen 4.6. Imágenes TEM de las nanopartículas de Fe@C antes (A) y después de la funcionalización con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ (B).

La imagen 4.6. pone de manifiesto cómo mediante la funcionalización se han podido disgregar los agregados presentes en la muestras de nanopartículas no funcionalizadas.

Los resultados obtenidos mediante DLS (figura 4.19) muestran que la distribución de diámetros hidrodinámicos de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas es ligeramente más estrecha que la obtenida mediante las funcionalizaciones con dopamina/Pol-L-Lisina y dopamina/PEG-NH₂ en suspensión acuosa. Sin embargo el diámetro medio de los agregados es mayor, y está alrededor de los 498 ± 86,3 nm (frente a los 400 nm en el caso de la funcionalización con dopamina/Pol-L-Lisina y los 460 nm obtenidos cuando las nanopartículas se funcionalizan con dopamina/PEG-NH₂).

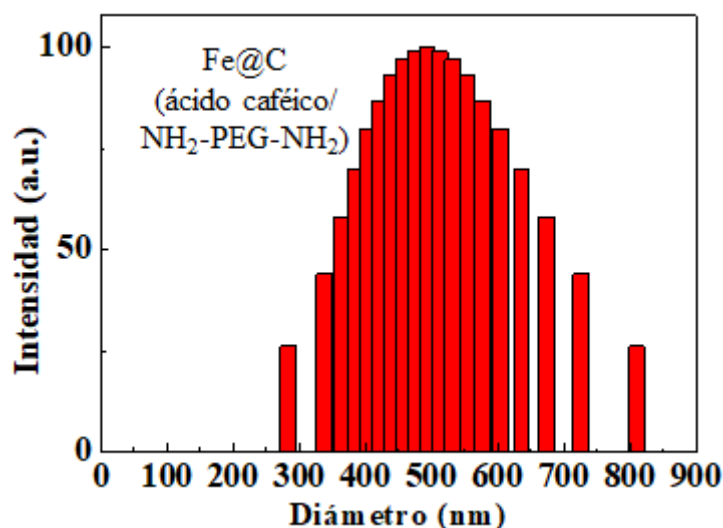


Figura 4.19. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ obtenida mediante DLS.

Los valores de SAR obtenidos para las suspensiones de nanopartículas funcionalizadas, tampoco mejoran los resultados obtenidos en el caso de las nanopartículas de Fe@C sin funcionalizar.

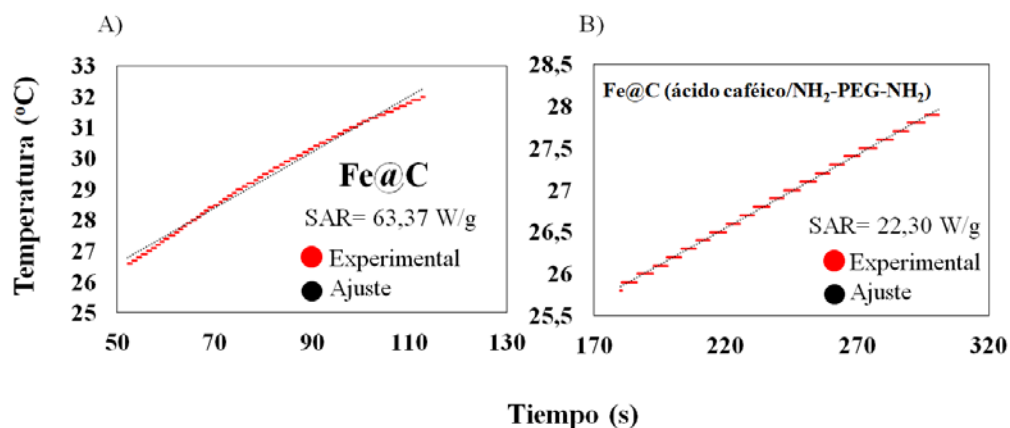


Figura 4.20. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe@C (A) y de Fe@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

En la figura 4.20 se muestran los respectivos aumentos de temperatura en función del tiempo obtenidos cuando las suspensiones de nanopartículas se someten a un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz y respectivos valores de SAR. Para la muestra de nanopartículas Fe@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (figura 4.20.B) se obtienen unos valores de SAR de 22 W/g, lejanos de los 64 W/g que muestra la muestra de Fe@C sin funcionalizar (figura 4.20.A).

4.3.2 Nanopartículas Fe₃O₄@C

La funcionalización con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ ha dado los mejores resultados para las nanopartículas de Fe₃O₄@C de todos los intentos que se han realizado.

La figura 4.21 (A) muestra el difractograma de rayos X de las nanopartículas de Fe₃O₄@C antes y después de la funcionalización con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂.

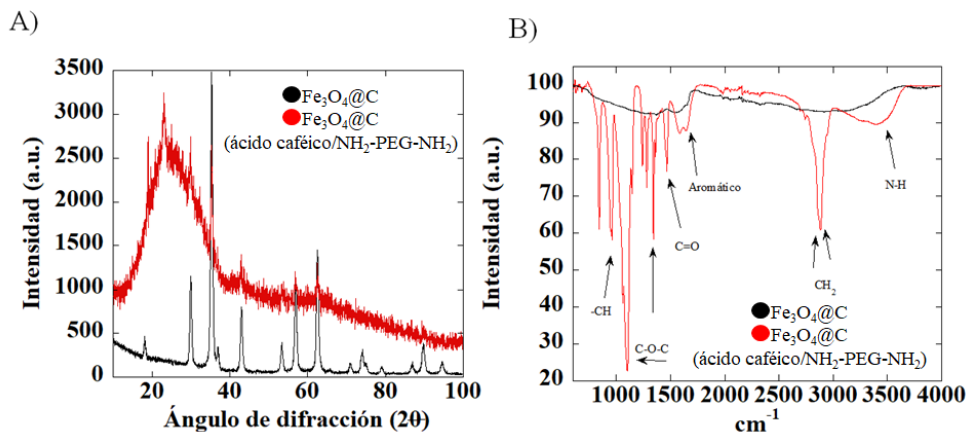


Figura 4.21. Análisis por rayos X (A) y FTIR (B) de las nanopartículas de Fe₃O₄@C y nanopartículas de Fe₃O₄@C recubiertas con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂.

El difractograma de rayos X (*figura 4.21.A, en rojo*) muestra como la funcionalización no ha afectado a las nanopartículas de Fe₃O₄@C ya que los picos más intensos correspondientes al núcleo de las nanopartículas Fe₃O₄@C (que aparecen a 35,5°, 43°, 57° a 62,5° grados (*ref: ICSD-Karlsruhe-172906*)) se observan también en el espectro de las nanopartículas funcionalizadas (línea roja). Además, como ocurría para las nanopartículas de Fe@C con esta misma funcionalización (*figura 4.16*), se observan las señales correspondientes al ácido caféico (pico a 20°) y al NH₂-PEG-NH₂ (pico a 23°) (Wei et al. 2010) solapadas con el hombro entre 20-30°, correspondiente al carbono amorfo que recubre los núcleos de las nanopartículas.

En la *figura 4.21 (B)* se muestran los espectros obtenidos mediante FTIR de las nanopartículas antes y después de la funcionalización. Los resultados correspondientes a las nanopartículas funcionalizadas son muy similares a los obtenidos en el caso de las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas de la misma manera (ver *figura 4.17*). En ambos casos el espectro es fundamentalmente debido a la contribución del ácido caféico

y al polímero NH₂-PEG-NH₂. En él se observa una banda ancha en torno a 3200 cm⁻¹, correspondiente a las vibraciones de torsión de los enlaces N-H de los grupos NH₂ terminales del NH₂-PEG-NH₂. Como en la *figura 4.17* se observa entre 2900 y 2800 cm⁻¹ un pico intenso con dos hombros pequeños, pertenecientes a las vibraciones de alargamiento simétrico y asimétrico de los carbonos CH₂ del polímero NH₂-PEG-NH₂. En torno a 1600 cm⁻¹ hay un pequeño hombro, más intenso que en la *figura 4.17*, correspondiente al anillo aromático del ácido caféico. El pico intenso que aparece a 1500 cm⁻¹ corresponde al grupo C=O del ácido caféico y los picos a 1300 (C-O-C extensión asimétrica) 1000 (extensión C-O-C) y 950 cm⁻¹ (-CH doblamiento fuera del plano) de absorción del polímero PEG. (Akal, Alpsoy, and Baykal 2016)(Alpsoy et al. 2017).(Kang et al. 2018).

La *imagen 4.7* muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas de Fe₃O₄@C antes (*imagen 4.7.A*) y después de su funcionalización con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (*imagen 4.7.B*).

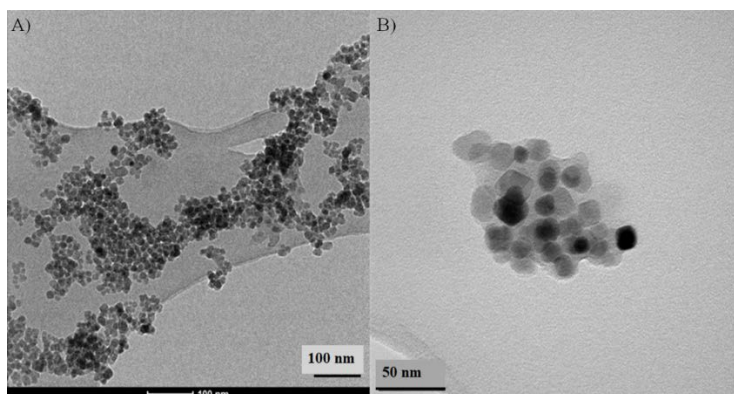


Imagen 4.7. Imágenes TEM de las nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de las nanopartículas de Fe₃O₄@C con ácido caféico y NH₂-PEG-NH₂ (B).

De la comparación de ambas imágenes se ve claramente como la funcionalización con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ ha disminuido considerablemente el tamaño de agregados de nanopartículas de Fe₃O₄@C que se observan antes de funcionalizar las

nanopartículas. Además, estos se encuentran mucho más dispersos y aislados que en la muestra de nanopartículas sin funcionalizar.

Las medidas realizadas mediante DLS (ver *figura 4.22*) muestran que la distribución de diámetros hidrodinámicos de los agregados de nanopartículas funcionalizadas en suspensión acuosa es más estrecha que cuando las nanopartículas se funcionalizan con dopamina/Poly-L-Lisina o con dopamina/PEG-NH₂. Se observa también una reducción del diámetro hidrodinámico respecto al obtenido en estos casos y en el de las nanopartículas sin funcionalizar, de manera que se obtiene un valor medio de $256 \pm 20,2$ nm. Como resultado, las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ son estables en la suspensión, y no precipitan durante varios días.

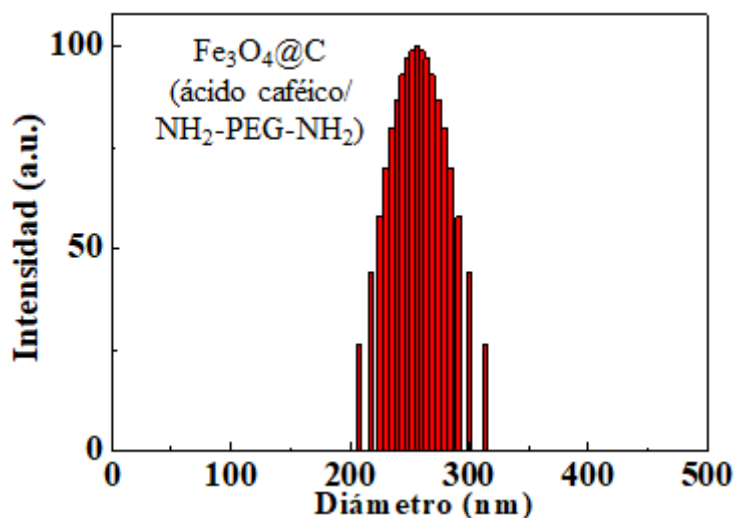


Figura 4.22. Distribución de diámetro hidrodinámico de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con ácido caféico y NH₂ PEG-NH₂ obtenida mediante DLS.

El menor diámetro hidrodinámico de los agregados de nanopartículas y la menor anchura de la distribución de tamaños hidrodinámicos se ven reflejados también en el

valor del SAR obtenido en el caso de las nanopartículas funcionalizadas. Mientras que para las nanopartículas de Fe₃O₄@C los valores de SAR se encuentran entre los 180-200 W/g (figura 4.23 A), las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ presentan unos valores de entre 230-260 W/g y en algún caso excepcional, se han llegado a muestras con más de 500 W/g (figura 4.23.B).

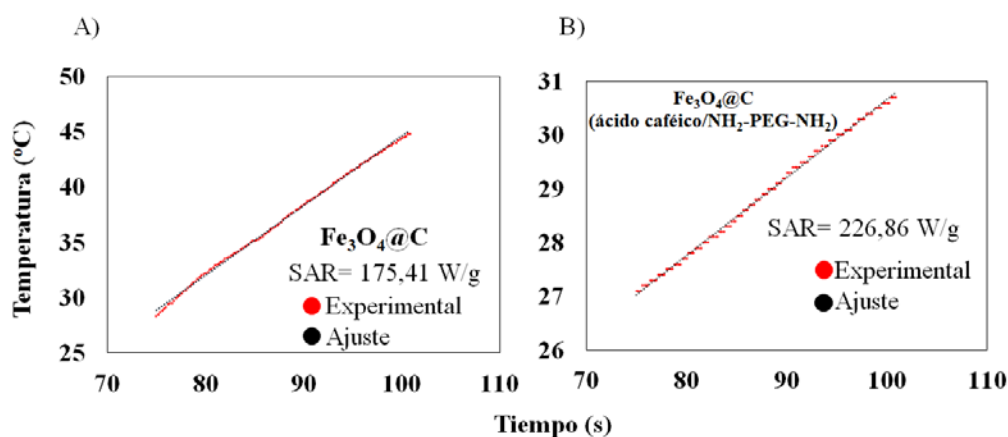


Figura 4.23. Aumento de temperatura en función del tiempo para el cálculo del SAR de una suspensión acuosa de nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y de Fe₃O₄@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (B). Las medidas se han realizado aplicando un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y a una frecuencia de 578 kHz. En rojo se representan los puntos experimentales; en negro, el ajuste lineal utilizado para el cálculo del SAR.

La tabla 4.1 recoge a modo de resumen los valores de SAR obtenidos para los distintos tipos de nanopartículas, junto con el tamaño de las nanopartículas sin funcionalizar (d_{TEM}), el diámetro hidrodinámico en suspensión acuosa obtenido mediante DLS (D_h) y el ancho de la distribución de tamaños (FWMH D_h).

	d_{TEM} (nm)	D_h (nm)	FWMH D_h (nm)	SAR (W/g)
Fe@C	21	200 (agregados>800 nm)	42,83 (50,35)	63,4
Fe@C (dopamina/Poly-L-Lisina)		400±23,7	334,08	147,6
Fe@C (dopamina/PEG-NH₂)		460±32,4	350,76	18,1
Fe@C (ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂)		498±86,3	302,18	22,3
Fe₃O₄@C	14	150 (agregados>375 nm)	12,79 (73,12)	175,4
Fe₃O₄@C (dopamina/Poly-L-Lisina)		314±11,2 (agregados>600 nm)	102 (266)	77
Fe₃O₄@C (dopamina/PEG-NH₂)		300±15,5	121,76	121,1
Fe₃O₄@C (ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂)		256±20,2	72,71	226,9

Tabla 4.1. SAR para cada tipo de nanopartículas y tamaño de las nanopartículas sin funcionalizar (d_{TEM}), diámetro hidrodinámico en suspensión acuosa obtenido mediante DLS (D_h) y ancho de la distribución de tamaños (FWMH D_h).

4.4 Conclusiones

Las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C se han funcionalizado con tres polímeros diferentes (dopamina/Poly-L-Lisina, dopamina/PEG NH₂ y ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂) con el objetivo fundamental de reducir el tamaño de los agregados hidrodinámicos que formaban las nanopartículas sin funcionalizar, aumentando así la estabilidad de las nanopartículas en suspensiones acuosas. Se ha llevado a cabo la caracterización de las nanopartículas funcionalizadas, incluyendo también la medida de la absorción de potencia cuando a estas suspensiones se aplica un campo magnético alterno. El objetivo de estas medidas ha sido comprobar cómo influía la funcionalización en el valor del SAR y si alguna de las suspensiones podría ser utilizada en experimentos de hipertermia magnética *in vitro*.

En el caso de las nanopartículas de Fe@C, las reacciones químicas en el proceso de funcionalización no ha afectado al núcleo de hierro, que se mantiene inerte gracias las capas de grafeno que lo recubren, como se ha visto por rayos X.

Todas las funcionalizaciones que se han realizado han llevado a disminuir el tamaño de los agregados que forman las nanopartículas en suspensión acuosa, respecto del tamaño de los agregados que formaban las nanopartículas sin funcionalizar cuando se resuspendan en agua. La funcionalización ha conducido a aumentar la estabilidad de estas suspensiones al menos hasta las 24 horas.

De entre todas las suspensiones acuosas, la obtenida con las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina es para la que se observa un aumento de la temperatura más rápido en presencia de un campo magnético alterno, y un valor de SAR mayor que el obtenido en las suspensiones de nanopartículas sin funcionalizar.

Dependiendo de la funcionalización se han obtenido diferentes valores de diámetro hidrodinámico y para ellos diferentes valores de SAR. Esto pone de manifiesto la importancia de la relajación de Brown como mecanismo para la absorción de potencia en nanopartículas Fe@C.

En el caso de las nanopartículas de Fe₃O₄@C, mediante los tres protocolos de funcionalización seguidos, se ha conseguido disminuir el tamaño de los agregados que forman las nanopartículas en suspensión acuosa y aumentar su estabilidad esta vez hasta más de un día.

En los tres casos estudiados, las reacciones de funcionalización no han afectado al núcleo de magnetita que, como se ha visto por rayos X, mantiene la misma estructura cristalográfica.

Tras analizar las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con los diferentes polímeros, la funcionalización con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ es la que ha dado lugar a las suspensiones acuosas más estables, en las que las nanopartículas se mantienen sin precipitar durante varios días. La distribución de los diámetros hidrodinámicos de los agregados de nanopartículas funcionalizadas en estas suspensiones es la más estrecha de todas las analizadas. El diámetro hidrodinámico medio de estos agregados es $256 \pm$

20,2. La aplicación de un campo magnético alterno de 300 Gauss de amplitud y 578 kHz de frecuencia provoca el aumento de temperatura más rápido entre todos los medidos en las tres suspensiones obtenidas. Esto da lugar a que las suspensiones de las nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ presentes los mayores valores de SAR (230-260 W/g y en algunos casos hasta 500 W/g). Desde este punto de vista, estas suspensiones serían unas buenas candidatas para realizar ensayos de hipertermia magnética *in vitro*.

Por tanto, se decide seleccionar las nanopartículas de Fe@C funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina y las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ como las mejores candidatas para pasar realizar los ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular *in-vitro* (ver *Capítulo V: Expermientos in vitro*). El estudio del comportamiento de las nanopartículas en cultivos celulares es el paso necesario para capacitarlas como buenas candidatas para futuras aplicaciones biomédicas.

Referencias

- Aguiló-Aguayo, Noemí, Lionel Maurizi, Sandra Galmarini, Marie Gabrielle Ollivier-Beuzelin, Géraldine Coullerez, Enric Bertrana, and Heinrich Hofmann. 2014. "Aqueous Stabilisation of Carbon-Encapsulated Superparamagnetic α -Iron Nanoparticles for Biomedical Applications." *Dalton Transactions* 43: 13764–75. <https://doi.org/10.1039/c4dt00085d>.
- Akal, Z. U., L. Alpsoy, and A. Baykal. 2016. "Superparamagnetic Iron Oxide Conjugated with Folic Acid and Carboxylated Quercetin for Chemotherapy Applications." *Ceramics International* 42 (7): 9065–72. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.02.166>.

Alexiou, C., W. Arnold, R.J. Klein, F.G. Parak, P. Hulin, C. Bergemann, W. Erhardt, S. Wagenpfeil, and A.S. Lübbe. 2000. "Locoregional Cancer Treatment with Magnetic Drug Targeting." *Cancer Research* 60 (23): 6641–48.

Alpsoy, L., A. Baykal, U. Kurtan, and Z. Akal. 2017. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION) Functionalized by Caffeic Acid (CFA)." *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism* 30 (9): 2699–2706. <https://doi.org/10.1007/s10948-017-4088-3>.

Amstad, Esther, Torben Gillich, Idalia Bilecka, Marcus Textor, and Erik Reimhult. 2009. "Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups." *Nano Letters* 9 (12): 4042–48.

Babic, Michal, Daniel Horák, Miroslava Trchová, Pavla Jendelová, Petr Lesný, Vít Herynek, Milan Hájek, and Eva Syková. 2008. "Poly (L-Lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling." *Bioconjugate Chemistry* 19: 740–50.

Bailey, Frederick E, and J V Koleske. 1976. *Poly(Ethylene Oxide)*. New York :

Berry, Catherine C. 2005. "Possible Exploitation of Magnetic Nanoparticle – Cell Interaction for Biomedical Applications." *Journal of Materials Chemistry* 15: 543–47. <https://doi.org/10.1039/b409715g>.

Bordet, Alexis, Ryan F. Landis, Yi Wei Lee, Gulen Y. Tonga, Juan M. Asensio, Cheng Hsuan Li, Pier Francesco Fazzini, Katerina Soulantica, Vincent M. Rotello, and Bruno Chaudret. 2019. "Water-Dispersible and Biocompatible Iron Carbide Nanoparticles with High Specific Absorption Rate." Research-article. *ACS Nano* 13 (3): 2870–78. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05671>.

Cardoso, Vanessa Fernandes, António Francesko, Clarisse Ribeiro, Manuel Bañobre-

- lópez, Pedro Martins, and Senentxu Lanceros-mendez. 2018. "Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications." *Advanced Healthcare Materials* 1700845: 1–35. <https://doi.org/10.1002/adhm.201700845>.
- Carrier, Danielle, and Michel Pezolet. 1978. "Raman Spectroscopic Study of the Interaction of Poly-L-Lisine with Dipalmitoylphosphatidylglycerol Bilayers." *Biophysical Journal* 46: 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84047-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84047-3).
- Chen, Yuhua, Feng Zhang, Qian Wang, Huiming Lin, Ruihan Tong, Na An, and Fengyu Qu. 2018. "The Synthesis of LA-Fe₃O₄@PDA-PEG-DOX for Photothermal Therapy-Chemotherapy." *Dalton Transactions* 47 (7): 2435–43. <https://doi.org/10.1039/c7dt04080f>.
- Davidson, Robert L. 1980. *Handbook Of Water-Soluble Gums And Resins*. Edited by R. L. Davidson. McGraw-Hil.
- Dreborg, S., and Akerblom, E. B. 1990. "Immunotherapy with Monomethoxypolyethylene Glycol Modified Allergenes." *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 6: 315–65.
- Ernst, Friederike, Zhenghong Gao, Rau Arenal, Timm Heek, Antonio Setaro, Rodrigo Fernandez-pacheco, Rainer Haag, Laurent Cognet, and Stephanie Reich. 2017. "Noncovalent Stable Functionalization Makes Carbon Nanotubes Hydrophilic and Biocompatible." *Journal of Physical Chemistry C* 121: 18887–91. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b03062>.
- Ernst, Friederike, Timm Heek, Antonio Setaro, Rainer Haag, and Stephanie Reich. 2012. "Energy Transfer in Nanotube-Perylene Complexes." *Advanced Functional Materials* 22: 3921–26. <https://doi.org/10.1002/adfm.201200784>.
- Fernández-Pacheco Chicón, Rodrigo. 2008. "Synthesis, Characterization and

Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.”
Universidad de Zaragoza.

Ferrari, Andrea C. 2007. “Raman Spectroscopy of Graphene and Graphite: Disorder, Electron-Phonon Coupling, Doping and Nonadiabatic Effects.” *Solid State Communications* 143 (1–2): 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.ssc.2007.03.052>.

Ferrari, Andrea C., and Denis M. Basko. 2013. “Raman Spectroscopy as a Versatile Tool for Studying the Properties of Graphene.” *Nature Nanotechnology* 8 (4): 235–46. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.

Gao, Fan, Hua Qu, Yangyang Duan, Jing Wang, Xiao Song, Tianjiao Ji, Lixin Cao, Guangjun Nie, and Shuqing Sun. 2014. “Dopamine Coating as a General and Facile Route to Biofunctionalization of Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles for Magnetic Separation of Proteins.” *RSC Advances* 4 (13): 6657–63. <https://doi.org/10.1039/c3ra46938g>.

Harris, J. M. 1992. *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*. Plenum Pre.

Hu, Yiwen, Yongxin Wang, Zhixiang Zeng, Haichao Zhao, Xuwu Ge, Kai Wang, Liping Wang, and Qunji Xue. 2018. “PEGlated Graphene as Nanoadditive for Enhancing the Tribological Properties of Water-Based Lubricants.” *Carbon* 137: 41–48.

Kang, Haijiao, Zhong Wang, Shujun Zhao, Qingchun Wang, and Shifeng Zhang. 2018. “Reinforced Soy Protein Isolate–Based Bionanocomposites with Halloysite Nanotubes via Mussel-Inspired Dopamine and Polylysine Codeposition.” *Journal of Applied Polymer Science* 135 (18): 1–10. <https://doi.org/10.1002/app.46197>.

Kitahama, Yasutaka, Takuji Nagahiro, and Yoshito Tanaka. 2017. “Analysis of Blinking from Multicoloured SERS- Active Ag Colloidal Nanoaggregates with

- Poly- L-Lysine via Truncated Power Law.” *Journal of Raman Spectroscopy* 48: 570–77. <https://doi.org/10.1002/jrs.5079>.
- Kumar, Challa S S R, and Faruq Mohammad. 2011. “Magnetic Nanomaterials for Hyperthermia-Based Therapy and Controlled Drug Delivery.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (9): 789–808. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>.
- Kumar, V., L. Meng-Fang, E. Jin Tan, and P. See Lee. 2012. “Green Aqueous Modification of Fluoropolymers for Energy Storage.” *Journal of Materials Chemistry Dynamic* 22. <https://doi.org/10.1039/C2JM15665B>.
- Lambert, J., H. Shurvell, D. Lightner, and R. Cooks. 1987. *Group Frequencies: Infrared and Raman*. In: *Introduction to Organic Spectroscopy*. Edited by Macmillan Pub.
- Lee, Haeshin, and William M Miller. 2007. “Mussel-Inspired Surface Chemistry for Multifunctional Coatings.” *Science* 318 (5849): 426–30. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>.
- Lee, Haeshin, Norbert F Scherer, and Phillip B Messersmith. 2006. “Single-Molecule Mechanics of Mussel Adhesion.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 (17).
- Lee, Jae-hyun, Jung-tak Jang, Jin-sil Choi, Seung Ho Moon, Seung-hyun Noh, Ji-wook Kim, Jin-gyu Kim, Il-sun Kim, Kook In Park, and Jinwoo Cheon. 2011. “Exchange-Coupled Magnetic Nanoparticles for Efficient Heat Induction.” *Nature Nanotechnology* 6 (July). <https://doi.org/10.1038/nnano.2011.95>.
- Lee, Jun, Kyoung Sub, and Kun Na. 2016. “Caffeic Acid-Coated Multifunctional Magnetic Nanoparticles for the Treatment and Bimodal Imaging of Tumours.” *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 160: 210–16. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.058>.

Luo, Hongyong, Changwei Gu, Weihua Zheng, Fei Dai, Xinling Wang, and Zhen Zheng. 2015. "Facile Synthesis of Novel Size-Controlled Antibacterial Hybrid Spheres Using Silver Nanoparticles Loaded with Poly-Dopamine Spheres." *RSC Advances* 5 (January): 13470–77. <https://doi.org/10.1039/C4RA16469E>.

Marquina, Clara, and M. Ricardo Ibarra. 2020. "Carbon Encapsulated Functional Magnetic Nanoparticles for Life Sciences. In Pure and Functionalized Carbon Based Nanomaterials." In *Pure and Functionalized Carbon Based Nanomaterials Analytical, Biomedical, Civil and Environmental Engineering Applications*, 1st ed. CRC Press.

Monfardini, Cristina, and Francesco M Veronese. 1998. "Stabilization of Substances in Circulation." *Bioconjugate Chemistry* 1802 (97): 418–50.

Montferrand, Caroline De, Ling Hu, Irena Milosevic, Vincent Russier, Dominique Bonnin, Laurence Motte, Arnaud Brioude, and Yoann Lalatonne. 2013. "Iron Oxide Nanoparticles with Sizes, Shapes and Compositions Resulting in Different Magnetization Signatures as Potential Labels for Multiparametric Detection." *Acta Biomaterialia* 9 (4): 6150–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.025>.

Mornet, Stéphane, Sébastien Vasseur, Fabien Grasset, and Etienne Duguet. 2004. "Magnetic Nanoparticle Design for Medical Diagnosis and Therapy." *Journal of Materials Chemistry* 14 (14): 2161–75. <https://doi.org/10.1039/b402025a>.

Mu, Xupeng, Fuqiang Zhang, Chenfei Kong, Hongmei Zhang, Wenjing Zhang, Rui Ge, Yi Liu, and Jinlan Jiang. 2017. "EGFR-Targeted Delivery of DOX-Loaded Fe₃O₄@ Polydopamine Multifunctional Nanocomposites for MRI and Antitumor Chemo-Photothermal Therapy." *International Journal of Nanomedicine* 12: 2899–2911. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131418>.

Mutter, M., and Bayer, E. 1979. *The Peptides*. Edited by E. Gross and J. Meienhofer.

Academic P.

Nelson, D., Cox, M. Boyle. 2008. *Lehninger-Principles of Biochemistry*. 5th ed.

Nishijo, Junichi, Chie Okabe, Osamu Oishi, and Nobuyuki Nishi. 2006. "Synthesis , Structures and Magnetic Properties of Carbon-Encapsulated Nanoparticles via Thermal Decomposition of Metal Acetylide." *Carbon* 44: 2943–49. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2006.05.037>.

Pankhurst, Q. A., J. Connolly, S.K. Jones, and J. Dobson. 2003. "Applications of Magnetic Nanoparticles in Biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 36.

Paradossi, Gaio, Francesca Cavalieri, Ester Chiessi, Chiara Spagnoli, and Mary K Cowman. 2003. "Poly (Vinyl Alcohol) as Versatile Biomaterial for Potential Biomedical Applications." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 14: 687–91.

Peng, Sheng, Chao Wang, Jin Xie, and Shouheng Sun. 2006. "Synthesis and Stabilization of Monodisperse Fe Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 128: 10676–77. <https://doi.org/10.1021/ja063969h>.

Ramirez-Núñez, A. L., L. F. Jimenez-Garcia, G. F. Goya, B. Sanz, and J. Santoyo-Salazar. 2018. "In Vitro Magnetic Hyperthermia Using Polyphenol-Coated Fe₃O₄γFe₂O₃ Nanoparticles from Cinnamomun Verum and Vanilla Planifolia: The Concert of Green Synthesis and Therapeutic Possibilities." *Nanotechnology* 29 (7). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/aaa2c1>.

Riggio, Cristina, Maria Pilar Calatayud, Clare Hoskins, Josephine Pinkernelle, Beatriz Sanz, Teobaldo Enrique Torres, Manuel Ricardo Ibarra, et al. 2012. "Poly-l-Lysine-Coated Magnetic Nanoparticles as Intracellular Actuators for Neural Guidance." *International Journal of Nanomedicine* 7: 3155–66.

<https://doi.org/10.2147/ijn.s28460>.

Sangnier, A.P., A.B. Van de Walle, A. Curcio, R. Le Borgne, L. Motte, Y. Lalatonne, and C. Wilhelm. 2019. "Impact of Magnetic Nanoparticle Surface Coating on Their Long-Term Intracellular Biodegradation in Stem Cells." *Nanoscale* 11: 16488–98. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.

Shebanova, Olga N., and Peter Lazor. 2003. "Raman Spectroscopic Study of Magnetite (FeFe₂O₄): A New Assignment for the Vibrational Spectrum." *Journal of Solid State Chemistry* 174 (2): 424–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00294-9](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00294-9).

Smith, Michael B., and Jerry March. 2001. *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms, and Structure*.

Smolensky, Eric D., Hee Yun E. Park, Thelma S. Berquó, and Valérie C. Pierre. 2011. "Surface Functionalization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for MRI Applications - Effect of Anchoring Group and Ligand Exchange Protocol." *Contrast Media and Molecular Imaging* 6 (4): 189–99. <https://doi.org/10.1002/cmml.417>.

Socrates, G. 2001. *Infrared and Raman Characteristic Group Frequencies*. Edited by Wiley. 3rd Editio.

Song, Kyeongse, Youngmin Lee, Mi Ru Jo, Ki Min Nam, and Yong Mook Kang. 2012. "Comprehensive Design of Carbon-Encapsulated Fe₃O₄ Nanocrystals and Their Lithium Storage Properties." *Nanotechnology* 23 (50). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/50/505401>.

Spoerke, Erik D, and Samuel I Stupp. 2005. "Synthesis of a Poly (L -Lysine) -Calcium Phosphate Hybrid on Titanium Surfaces for Enhanced Bioactivity." *Biomaterials* 26: 5120–29. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.039>.

- Stryer, Lubert, Jeremy M. Berg, and John L. Tymoczko. 1993. *Bioquímica*.
- Sun, Conroy, Jerry S H Lee, and Miqin Zhang. 2008. "Magnetic Nanoparticles in MR Imaging and Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 1252–65. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.018>.
- Taylor, Arthur, Yulia Krupskaya, Sara Costa, Steffen Oswald, Kai Kramer, Susanne Füssel, Rüdiger Klingeler, Bernd Büchner, Ewa Borowiak-Palen, and Manfred P. Wirth. 2010. "Functionalization of Carbon Encapsulated Iron Nanoparticles." *Journal of Nanoparticle Research* 12 (2): 513–19. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9773-0>.
- Torres, Teobaldo E., Enio Lima, M. Pilar Calatayud, Beatriz Sanz, Alfonso Ibarra, Rodrigo Fernández-Pacheco, Alvaro Mayoral, Clara Marquina, M. Ricardo Ibarra, and Gerardo F. Goya. 2019. "The Relevance of Brownian Relaxation as Power Absorption Mechanism in Magnetic Hyperthermia." *Scientific Reports* 9 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40341-y>.
- Vaisman, Linda, H Daniel Wagner, and Gad Marom. 2007. "The Role of Surfactants in Dispersion of Carbon Nanotubes." *Advances in Colloid and Interface Science* 130 (2006): 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.11.007>.
- Viglianti, Benjamin L, and Mark W Dewhirst. 2013. "Thresholds for Thermal Damage to Normal Tissues : An Update." *International Journal of Hyperthermia* 27 (4): 320–43. <https://doi.org/10.3109/02656736.2010.534527.Thresholds>.
- Wan, Qing, Jianwen Tian, Meiyong Liu, Guangjian Zeng, Zhen Li, Ke Wang, Qingsong Zhang, Fengjie Deng, Xiaoyong Zhang, and Yen Wei. 2015. "Mussel Inspired Preparation of Highly Dispersible and Biocompatible Carbon Nanotubes." *RSC Advances* 5: 25329–36. <https://doi.org/10.1039/c4ra13408g>.
- Wang, Yu, Youyun Wang, Wanxia Wang, Hongda Zhu, and Mingxing Liu. 2018.

- “Synthesis and Characterization of Carboxyl-Terminated Polyethylene Glycol Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles.” *Journal Wuhan University of Technology, Materials Science Edition* 33 (6): 1540–45.
<https://doi.org/10.1007/s11595-018-2003-9>.
- Wei, Y., Y. Gao, K. Zhang, and Y. Ito. 2010. “Isolation of Caffeic Acid From Eupatorium Adenophorum Spreng By High-Speed Counter Current Chromatography And Synthesis of Caffeic Acid Intercalated Layered Double Hydroxide.” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 33: 837–45.
- Xie, Jin, Chenjie Xu, Nathan Kohler, Yanglong Hou, and Shouheng Sun. 2007. “Controlled PEGylation of Monodisperse Fe₃O₄ Nanoparticles for Reduced Non-Specific Uptake by Macrophage Cells.” *Advanced Materials* 19 (20): 3163–66.
<https://doi.org/10.1002/adma.200701975>.
- Xu, Chenjie, Keming Xu, Hongwei Gu, Rongkun Zheng, Hui Liu, Xixiang Zhang, Zhihong Guo, and Bing Xu. 2004. “Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles.” *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 126 (32): 9938–39.
- Yamaoka, Tetsuji, Yasuhito Tabata, and Yoshito Ikada. 1994. “Distribution and Tissue Uptake of Poly(Ethylene Glycol) with Different Molecular Weights after Intravenous Administration to Mice.” *Journal of Pharmaceutical Sciences* 83 (4): 1–6.

Capítulo V: Experimentos *in vitro*

En este capítulo, se muestran los experimentos *in-vitro* realizados con diferentes líneas celulares para estudiar la internalización de las nanopartículas magnéticas cuya síntesis y caracterización se ha presentado en los capítulos anteriores, así como su viabilidad celular. También se ha investigado la posible degradación que pueden sufrir estas nanopartículas en el interior celular. El objetivo es determinar si existen diferencias en cuanto a la viabilidad celular, internalización y degradación según el tipo de nanopartículas, y en particular, de su recubrimiento. Los ensayos han sido realizados con nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C, antes y después de su funcionalización con diferentes polímeros orgánicos, según los protocolos descritos en los capítulos anteriores. Además, se ha realizado un estudio comparativo de la capacidad de ambos tipos de nanopartículas para adsorber y liberar un agente quimioterapéutico, como prueba de concepto previa para la utilización de estas nanopartículas como portadores de fármacos.

Introducción

Como ya se ha comentado en la introducción a esta tesis, las nanopartículas magnéticas, en concreto las nanopartículas de óxidos de hierro, tienen desde hace décadas un gran interés por su potencial aplicación en Biomedicina, Biotecnología, Biología y otras áreas de las Ciencias de la Vida (Arruebo et al. 2007). En particular, experimentos previos llevados a cabo en nuestro grupo con nanopartículas tipo *core-shell* de hierro recubiertas de carbono sintetizadas por el método de método Krätschmer-Huffman (i.e., las nanopartículas Fe@C) han mostrado resultados prometedores cuando han sido utilizadas *in vivo*, tanto en modelos animales (Escribano et al. 2012)(Fernández-Pacheco et al. 2007) como en experimentos realizados con plantas (González-Melendi et al. 2008)(Corredor et al. 2009)(Cifuentes et al. 2010)(Marquina and Ibarra 2020). Estos prometedores resultados en cuanto a la biocompatibilidad de las nanopartículas Fe@C se han adscrito al recubrimiento en capas de grafeno que recubre el núcleo de hierro. Por esta razón uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido estudiar la interacción de estas nanopartículas y de las nanopartículas de magnetita recubiertas de carbono amorfo (Fe₃O₄@C) con diferentes tipos de células, para estudiar la influencia del tipo de recubrimiento en su captación e internalización por las células, y en la viabilidad celular. Este estudio se ha llevado a cabo mediante diferentes ensayos *in vitro* en distintas líneas celulares:

Líneas celulares humanas

- Línea celular de carcinoma epidermoide (A431)
- Células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas (A549)
- Células epiteliales de cáncer cérvico-uterino (HeLa)

Líneas de macrófagos murinos

- Línea celular BV2 (línea celular microglial murina)

-Líneas celular J774 (macrófagos reticulares de ratón BALB/c).

Además de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C, la viabilidad celular se ha estudiado también cuando las células se cultivan con las nanopartículas funcionalizadas Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina y Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂.

Para determinar la toxicidad de las nanopartículas en cultivos celulares hemos utilizado dos métodos diferentes basados en la colorimetría. Uno de ellos es el método MTT o test de Mosmann (Mosmann 1983), basado en estudiar la actividad mitocondrial. El otro es el método del Azul de Tripán (Trypan blue) (Strober 2015), que informa directamente de la muerte celular, ya que este compuesto que es capaz de traspasar la membrana celular cuando la célula ha muerto (ver *Capítulo II: Materiales y métodos* para la descripción de estas técnicas experimentales).

Como se ha comentado anteriormente, además de la toxicidad, también es clave observar si las nanopartículas son capaces de penetrar en el interior de las células y observar su comportamiento en el interior celular. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) ya ha sido utilizada en muchas ocasiones para confirmar la presencia de agregados de nanopartículas, su internalización y su comportamiento en el interior celular (Calatayud et al. 2014)(Marcos-Campos et al. 2011)(Iturrioz-Rodríguez. et al. 2017), y también la posible degradación de nanomateriales de carbonosos, como por ejemplo los nanotubos de capa múltiple (MWCNT) (González-Lavado et al. 2018)(Rodríguez-Fernandez et al. 2012), dentro del citoplasma. En nuestro caso el objetivo del estudio utilizando la microscopía TEM que presentamos en este capítulo ha sido no solo visualizar las nanopartículas en el interior celular sino también investigar si el recubrimiento carbonoso de las nanopartículas se degrada con el tiempo. El análisis de las imágenes de TEM obtenidas ha mostrado que se necesita de un estudio más pormenorizado y de otras técnicas experimentales para confirmar los resultados.

Una técnica adecuada para ello es la espectroscopia Raman, ya que existen precedentes del estudio de la degradación de MWCNT en el interior celular a partir del análisis de los espectros Raman obtenidos utilizando muestras de cultivos celulares con nanotubos. Además, el espectro Raman proporciona también información acerca de los constituyentes del citoplasma (en particular acerca de las proteínas celulares) (García-Hevia et al. 2015)(González-Lavado et al. 2018).

Los estudios de citotoxicidad y viabilidad celular son necesarios como paso previo para la utilización de las nanopartículas en biomedicina. En nuestro caso estamos interesados en el uso de nuestras nanopartículas como transportadores de fármacos guiados mediante gradientes de campo magnético para la liberación de la droga en el órgano diana. (Arruebo et al. 2007)(Zamora-mora et al. 2017). Experimentos preliminares llevados a cabo con nanopartículas Fe@C confirmaron su alta capacidad para la absorción y liberación de doxorubicina, un fármaco utilizado en quimioterapia (Fernández-Pacheco et al. 2007)(Fernández-Pacheco Chicón 2008). Estos experimentos mostraron que el fármaco se adsorbía en el recubrimiento de las nanopartículas en unas pocas horas, y se liberaba completamente después de aproximadamente 3 días. En esta tesis doctoral este estudio se ha llevado a cabo también en las nanopartículas Fe₃O₄@C, para comprobar si estas nanopartículas son adecuadas como portadores de fármacos, y también para comprobar si existen diferencias en los procesos de adsorción/liberación dependiendo del tipo de recubrimiento de las nanopartículas. En este caso se ha utilizado el ácido ferúlico como fármaco modelo, debido a su baja toxicidad (Tada, Tayama, and Aoki 1999).

5.1 Ensayos de viabilidad celular

5.1.1 Ensayos de viabilidad celular con las líneas celulares A431 (células de carcinoma epidermoide) y A549 (células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas)

Los ensayos con las líneas celulares A431 y A549 se realizaron en el laboratorio del Departamento de Ingeniería Química y Biológica y División de Medio Ambiente y

Sostenibilidad de la *Hong Kong University of Science and Technology (HKUST)* en el marco de la colaboración con el grupo del Profesor King-Lu Yeung. La línea celular A549, pertenece a células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas de ATCC ((ATCC® CCL-185™), Organismo: Homo sapiens, humano, Tipo de célula: epitelial, Tejido: pulmón, Enfermedad: Carcinoma) y la línea celular A431, son células de carcinoma epidermoide de ATCC ((ATCC® CRL-1555™), Organismo: Homo Sapiens, humano, Tejido; piel/epidermis, Enfermedad: carcinoma epidermoide).

Los cultivos celulares de ambas líneas (A431 y A549), se trataron con las nanopartículas en concentraciones entre 10-100 µg/mL durante 4, 16 y 24 horas, y la viabilidad celular se determinó mediante el ensayo colorimétrico MTT, basado en la utilización de la sal de bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio donde las células vivas tienen la capacidad de reducir este compuesto en un producto azul de formazán, mediante el cual el ensayo de viabilidad celular evalúa la función mitocondrial (Mosmann 1983).

Los resultados se muestran en la *figura 5.1*, donde el porcentaje de inhibición de la viabilidad celular (ver sección 4.2 en el *Capítulo II: Materiales y métodos ecuación 2.10*) se representa en función de la concentración de nanopartículas.

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times \frac{[(C - B) - (M - B)]}{(C - B)} \quad (2.10)$$

La *figura 5.1 (A-C)* muestra los resultados correspondientes a las células A549 y la *figuras 5.1 (D-F)* muestran los resultados correspondientes a las células A431. Los resultados han demostrado que al aumentar la dosis de nanopartículas, la viabilidad de los dos tipos de líneas celulares disminuye, dependiendo también del tipo de partícula. Como tendencia general, la toxicidad de las nanopartículas de Fe₃O₄ sin recubrir (utilizada como control para estudiar el efecto del recubrimiento de cada tipo de nanopartícula) es la más alta. Entre las nanopartículas recubiertas de carbono, la toxicidad de las nanopartículas de Fe₃O₄@C es en todos los casos mayor que la de las nanopartículas de Fe@C. Para ambas líneas celulares, la inhibición más baja se observa

4 horas después de añadir las nanopartículas al cultivo. Según la *figura 5.1 (A-C)* para las células A549 y a la concentración 50 (Fe_3O_4), 80 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$) y 100 ($\text{Fe}@\text{C}$) $\mu\text{g}/\text{mL}$, la inhibición es similar. Según la *figura 5.1 (D-F)*, para las células A431 y a la concentración de 10 (Fe_3O_4), 60 ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$) y 80 ($\text{Fe}@\text{C}$) $\mu\text{g}/\text{mL}$, la inhibición está a casi el mismo nivel.

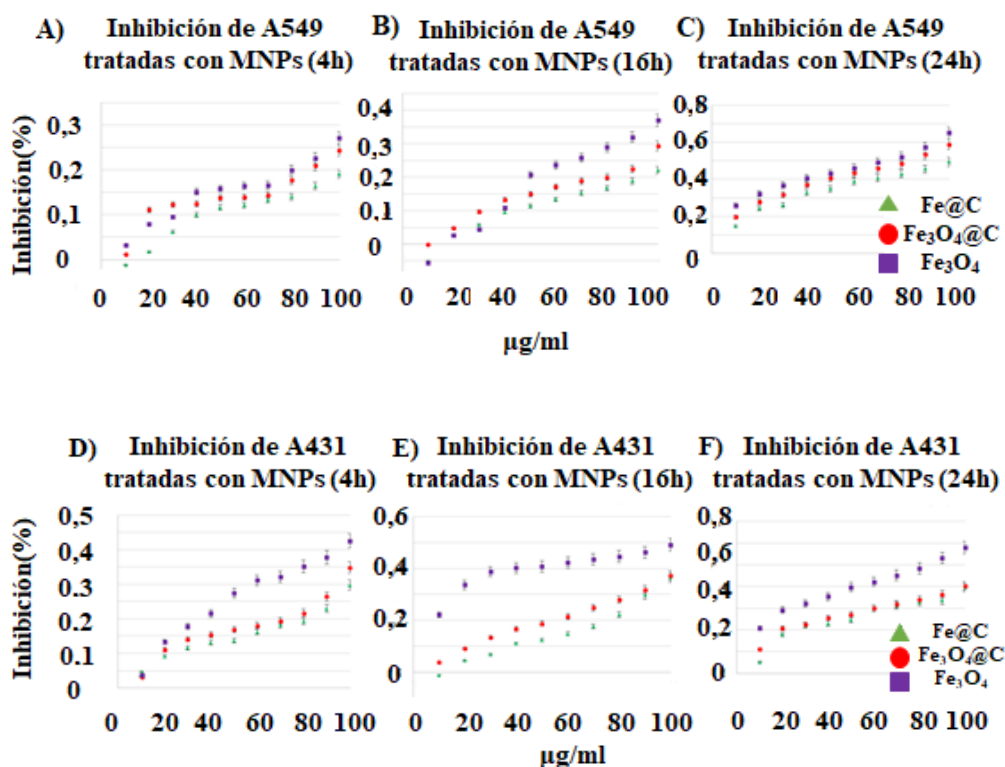


Figura 5.1. Inhibición de la viabilidad de células A549 (figuras 5.1 (A-C)) y células A431 (figuras 5.1 (D-F)) tratadas con nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$ (triángulos verdes), $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ (círculos rojos) y Fe_3O_4 (cuadrados morados), en función de la concentración de nanopartículas para diferentes tiempos de tratamiento, según lo determinado a partir de ensayos MTT.

Estos resultados indican que las nanopartículas magnéticas no recubiertas (Fe_3O_4) inducen inhibiciones más altas que las recubiertas de carbono ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ y $\text{Fe}@\text{C}$) en

condiciones similares, lo que puede deberse a la biocompatibilidad conferida por el recubrimiento de carbono al núcleo magnético. Además, entre los dos tipos de nanopartículas recubiertas de carbono, el recubrimiento cristalizado en capas de grafeno que observamos en las muestras de Fe@C conduce a una mayor viabilidad celular. Aunque no se ha podido estudiar el mecanismo real mediante el cual las nanopartículas inducen toxicidad, puede estar relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La producción de ROS cuando las nanopartículas están en contacto con las células puede conducir a cambios de concentración de plasma intracelular, activación de factores de transcripción y citosinas y además puede incluir daño al ADN, interferir con las vías de señalización celular e inducir cambios en la transcripción génica (Saravanakumar, Kim, and Kim 2017)(Ou and Kwok 2004)(Wang and Ou-Yang 2005). Si este es el caso, nuestros resultados sugieren que, aunque las nanopartículas de magnetita siempre se han considerado biocompatibles (Lubbe et al. 1996)(Lübbe et al. 1996)(Goodwin et al. 1999) el núcleo de Fe₃O₄ sigue desempeñando un papel en la generación de ROS. Al recubrir el núcleo con una capa de carbono reduce la producción de especies oxidativas. De hecho, la menor toxicidad observada en el caso de las nanopartículas de Fe@C sugiere que debido a su alta cristalinidad, las capas de grafeno constituyen un recubrimiento más efectivo que el recubrimiento poroso amorfo presente en las nanopartículas Fe₃O₄@C, en relación a la generación de ROS.

5.1.2 Ensayos de viabilidad celular con la línea celular BV2 (macrófagos murinos)

Además de los experimentos realizados con las líneas celulares A431 y A549, se ha estudiado también la viabilidad de la línea celular BV2 (línea celular microglial murina). Estos ensayos han sido llevados a cabo en el laboratorio de cultivos celulares del Instituto de Nanociencia de Aragón (Universidad de Zaragoza). Los ensayos se han realizado cultivando las células con las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C, así como con estas nanopartículas funcionalizadas con diferentes polímeros (Riggio et al.

2012)(Calatayud et al. 2013)(Calatayud et al. 2014), según los protocolos que se han descrito anteriormente en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. Estos ensayos nos permitirán comparar con los ensayos realizados con las líneas celulares A431 y A549 y con las líneas HeLa y J774 que mostraremos más adelante. Los ensayos realizados con las nanopartículas funcionalizadas, nos permitirán comprobar si la funcionalización con los polímeros utilizados mejora la viabilidad celular. En este capítulo presentamos los ensayos con las nanopartículas Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina y Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂, puesto que son estas las que presentan mejores propiedades (en particular, radio hidrodinámico, estabilidad en disolución acuosa y valor de SAR) comparadas con las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C sin funcionalizar, tal y como se ha mostrado en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*.

Para estos ensayos celulares, las células BV2 se cultivan en medio celular DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) modificado con un 5% de suero fetal bovino, 1% de antibiótico y 1% de gentamicina. Las células, se colocan en una estufa a 37 °C en una atmósfera húmeda que contiene un 5% de CO₂.

Tras haber introducido las células 24 horas en la estufa, se añaden las nanopartículas magnéticas en diferentes concentraciones (0/0,1/1/10/100 µg/mL) y se dejan incubar durante 72 horas. La viabilidad se estudia mediante el método conocido como *Trypan Blue* que, como se describió en el *Capítulo II: Materiales y Métodos*, tiñe de azul aquellas células que tienen dañada su membrana celular como consecuencia de la muerte celular por necrosis (muerte celular violenta en la que la pérdida de viabilidad se asocia con la lisis celular y liberación al exterior del contenido citoplasmático y orgánulos dañando el tejido en el que se encuentra (Lizarbe Iracheta 2007)). La viabilidad celular se obtiene contando el número de células vivas y muertas mediante su visualización en el microscopio óptico (Nikon, Modelo Eclipse TE2000-S). Los resultados se presentan en las *figuras 5.2 y 5.3*.

5.1.2.1 Ensayos de viabilidad celular con las nanopartículas de Fe@C y Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina

En la *figura 5.2* se presentan los resultados obtenidos mediante el método del *Trypan Blue*. Hasta concentraciones de nanopartículas igual a 100 $\mu\text{g/mL}$, pasadas 72h. de incubación se obtienen unos índices de supervivencia mayores al 90%, lo que demuestra que ni las nanopartículas de Fe@C ni las funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina inducen toxicidad en esta línea celular. De hecho, en ambos casos se obtienen buenos valores de IC_{50} (concentración del compuesto necesaria para reducir *in vitro* el crecimiento poblacional de los organismos a la mitad): 911 $\mu\text{g/mL}$ para las nanopartículas de Fe@C y 938 $\mu\text{g/mL}$ para las de Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina.

Durante el conteo de células en el microscopio óptico, se observa una buena internalización de las nanopartículas en el citoplasma celular (Goya et al. 2008), aunque en algunas ocasiones se han detectado nanopartículas en el exterior, rodeando la membrana celular. También, a partir de concentraciones mayores de 10 $\mu\text{g/mL}$ se comienzan a observar agregados de nanopartículas en el medio de cultivo. La aparición de estos agregados de nanopartículas, es común, ya que se encuentran en un medio celular salino. Las nanopartículas tienden a agregarse debido a su interacción con la sal del medio, lo que induce a la formación de una “corona” que recubre rápidamente la superficie de las nanopartículas (Calero 2015). Por eso a pesar de los valores elevados de IC_{50} , no es recomendable utilizar en la práctica concentraciones tan altas de nanopartículas.

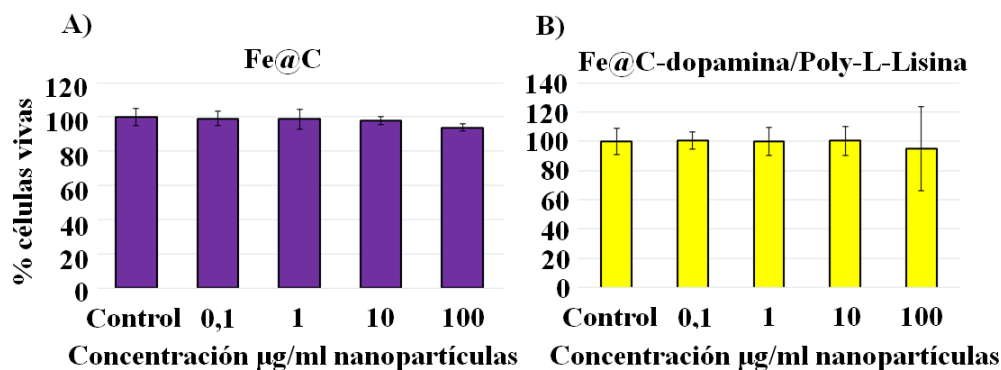


Figura 5.2. Viabilidad celular de la línea celular BV2 cultivada con nanopartículas de Fe@C (A) y Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina (B), estudiada mediante el método del Azul de Trypan. Las células estuvieron cultivadas con las nanopartículas 72 h.

Los resultados obtenidos muestran que la viabilidad de las células BV2 cuando se exponen a las nanopartículas Fe@C es mayor que la observada con las líneas celulares A431 y A549.

5.1.2.2 Ensayos de viabilidad celular de las nanopartículas de Fe₃O₄@C y Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂

Se realizaron estudios de viabilidad celular mediante el método del Azul de Trypan utilizando nanopartículas de Fe₃O₄@C, así como aquellas funcionalizadas de Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂.

Los resultados se presentan en la figura 5.3. Como en el caso de las nanopartículas de Fe@C, hasta concentraciones de 100 µg/mL y hasta pasadas 72h. de incubación se obtienen unos índices de supervivencia que superan con creces el 90%. De hecho con las nanopartículas de Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ la viabilidad celular llega hasta el 97% tras 72h. de incubación con una concentración de nanopartículas de 100 µg/mL. De aquí se derivan unos valores de IC₅₀ mayores que 750 µg/mL en el caso de las nanopartículas de Fe₃O₄@C y que 2500 µg/mL en el caso de las Fe₃O₄@C-ácido

caféico/NH₂-PEG-NH₂. En ambos casos, estos valores son mayores que los obtenidos para las nanopartículas de Fe@C y de Fe@C-dopamina/Poly-L-Lisina. Esto demuestra que en las condiciones experimentales estudiadas, ninguna de las nanopartículas induce toxicidad.

Durante la observación en el microscopio óptico se ve como en algunas ocasiones las nanopartículas se encuentran rodeando la membrana celular mientras que en otros casos las nanopartículas, se internalizan en gran cantidad. A este respecto no se observan diferencias entre las nanopartículas de Fe₃O₄@C y las de Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂. Al igual que en el caso de las nanopartículas de Fe@C, a concentraciones alrededor de los 10 µg/mL se empiezan a observar agregados en el medio de cultivo. Esto sucede tanto en el caso de las nanopartículas sin funcionalizar como en el de las funcionalizadas, a pesar de que estas presentaban una mejor dispersión y mayor estabilidad en medio acuoso, como se ha mostrado en el *Capítulo III* correspondiente a su caracterización fisicoquímica. Ello pone de manifiesto la importancia de caracterizar las nanopartículas en el medio de cultivo.

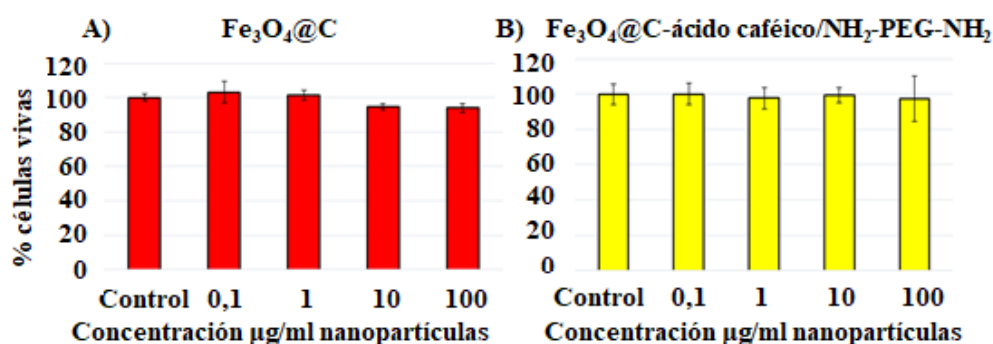


Figura 5.3. Viabilidad celular estudiada mediante el método de Azul de Trypan, de la línea celular BV2 cultivada con las nanopartículas de Fe₃O₄@C (A) y Fe₃O₄@C-ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ (B). Las células estuvieron cultivadas con las nanopartículas 72 h.

5.1.3 Ensayos de viabilidad de las líneas celulares HeLa (células epiteliales de cáncer cérvico-uterino) y J774 (macrófagos reticulares de ratón BALB/c)

Los ensayos de citotoxicidad de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C con las líneas celulares HeLa y J774, se realizaron en el laboratorio de la Profesora Mónica López Fanarraga del *Dpto. Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander)* en el marco de colaboración con este grupo.

Las células HeLa son células epiteliales de cáncer cérvico-uterino y son la línea celular más clásica y además la que con más frecuencia se utiliza (Rahbari et al. 2009). Las células HeLa, se han convertido, en el modelo celular más utilizado en laboratorios de investigación en cáncer (Masters 2002) lo que ha motivado este estudio.

La línea celular J774 corresponde a macrófagos reticulares de ratón BALB/c. Esta línea también es muy utilizada en ensayos celulares porque las líneas celulares de macrófagos se pueden mantener fácilmente y se pueden modificar genéticamente. Son también cada vez más reconocidas como modelos preferidos para estudios cuantitativos biofísicos de motilidad de células eucariotas e inmunomecanismo (Lam et al. 2009).

Estos dos modelos celulares se escogieron porque son representativos de células humanas y murinas, además son dos tipos celulares diferentes (células epiteliales y células fagocíticas) y se sabe que muestran diferentes sensibilidades y respuestas a los nanomateriales.

Una metodología útil para determinar la toxicidad de las nanopartículas y su interferencia con los procesos más básicos de la biología celular es el basado en estudiar los cambios en el ciclo celular (proceso de proliferación celular cíclico) cuando los cultivos están expuestos a las nanopartículas durante diferentes periodos de tiempo. La técnica, que se describe en el *Capítulo II: Materiales y métodos*, se basa en estudiar el ciclo y la muerte celular por apoptosis (es decir, la muerte celular programada en organismos multicelulares (Green 2011), mientras que los ensayos realizados con la

línea celular BV2 explicados anteriormente se basan en la medida de la muerte celular por necrosis (i.e. la muerte celular que tiene lugar por la muerte prematura de las células por autólisis (Proskuryakov, Konoplyannikov, and Gabai 2003)).

En las células que se dividen constantemente, como las procedentes de las líneas celulares empleadas en nuestros ensayos, el proceso de proliferación celular continuado (denominado ciclo celular) se divide en 4 fases conocidas como sub-G₀, G₀-G₁, S y G₂ (ver diagrama en la *figura 5.4* (Gómez i Arbonés 1993)). La fase sub-G₀, corresponde a fragmentos de células apoptóticas o necróticas. La fase G₁ (G₀ en las células que se diferencian y no se dividen) es la primera fase del ciclo celular. Es el periodo entre el final de la mitosis (M, citocinesis) y el inicio del siguiente ciclo de división que comienza con la síntesis del ADN y demás orgánulos celulares (Alberts et al. 2008). La mayoría de las células de un organismo pluricelular adulto no se dividen constantemente sino que abandonan el ciclo celular en la fase G₁, entrando en el denominado periodo G₀ (Blomen and Boonstra 2007)(Matson and Cook 2017). Al detener el ciclo celular, la célula se va a diferenciar, o a quedar quiescente (inactiva) como ocurre por ejemplo con las neuronas, o, como en el caso de células que se dividen regularmente, va a sufrir muerte por apoptosis o senescencia (ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada). La fase S es, en realidad el comienzo del proceso de proliferación y comprende la replicación (copia hasta el duplicado completo) del ADN y centriolos. Al final de la fase S, cada cromosoma se ha duplicado y queda formado por dos cromátidas idénticas (Alberts et al. 2008). Por último la fase G₂ es la tercera fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas, de ARN y demás orgánulos celulares, aumentando la biomasa celular (Alberts et al. 2008). Esta fase culmina en el proceso de la mitosis, mecanismo por el cual las células que ya han duplicado su genoma se dividen en dos células hijas idénticas. En el momento de la separación física de las dos células hijas, estas pasarán a la fase G₁ de nuevo, comenzando el ciclo celular.

El ciclo celular se puede estudiar mediante la técnica de citometría de flujo, representando la cantidad de ADN por cada corpúsculo que pasa por el detector (célula

o fragmento de ésta) y el número de eventos contados por el citómetro. De esta manera se obtienen los perfiles de ciclo celular, que son representaciones como las mostradas en la *figura 5.4. A y C*. Estos perfiles son histogramas que muestran el número de células que se encuentran en cada una de las fases del ciclo celular.

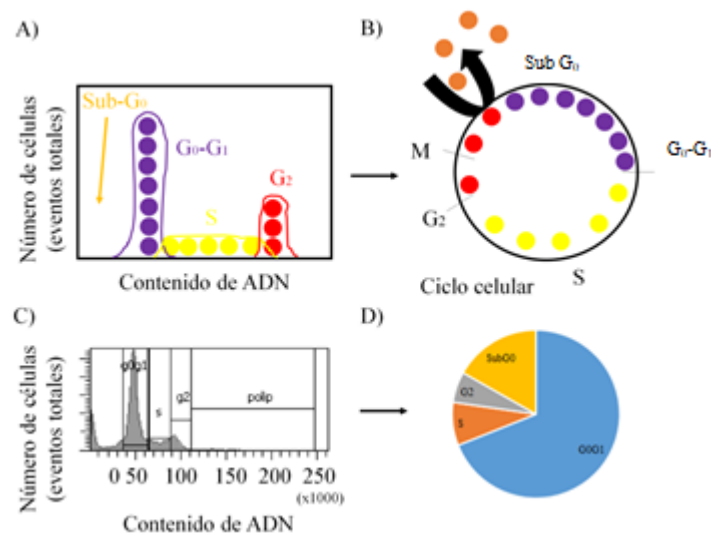


Figura 5.4. A): Perfil del ciclo celular obtenido mediante citometría de flujo (ver texto) B): Diagrama del ciclo celular: los círculos representan el número de células en las fases sub-G₀ (naranja), G₁ (morado), S (amarillo), G₂ y M (rojo) del ciclo. C) Perfil del ciclo celular obtenido experimentalmente mediante citometría de flujo de un control de células HeLa después de 24h. D) Diagrama de ciclo celular derivado del ciclo celular en C).

En esta representación, la fase G₁/G₀ se identifica como el primer pico (generalmente el más agudo y alto pues comprende el mayor número de células). La fase S se identifica como una zona de valle, y la fase G₂ como un segundo pico, no tan agudo como el G₁, que comprende también todas las células en los diferentes estadios de la mitosis. Esta técnica es muy útil para identificar procesos de muerte celular que típicamente aparecen

en el eje de las X a la izquierda del pico correspondiente a G_0 - G_1 (fase sub- G_0), lo que se corresponde con pequeños acúmulos de ADN intracelulares (en vez de núcleos completos) indicativos de muerte celular por apoptosis (Umansky, Korol', and Nelipovich 1981)(Nicoletti et al. 1991)(Gong, Traganos, and Darzynkiewicz 1994)(Wlodkowic et al. 2011)(Rodriguez-Fernandez et al. 2012)(Garcia-Hevia et al. 2015)(Gil 2005)(Gómez i Arbonés 1993). Los histogramas de ciclo celular se pueden representar también en forma de diagramas como los representados en la *figura 5.4 B y C*.

5.1.3.1 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C en macrófagos reticulares murinos BALB/c (línea celular J774)

En los ensayos que se presentan a continuación, los macrófagos murinos J774, se han cultivado durante 96 h. con una concentración de nanopartículas de 50 $\mu\text{g/mL}$, utilizando como control un cultivo de células al que no se añaden nanopartículas. El ciclo celular se ha analizado cada 24 h.

Los gráficos de la *figura 5.5* corresponden a los resultados de los experimentos realizados con nanopartículas Fe@C. En ellos se muestra el número de eventos contados con el citómetro frente a la concentración de ADN correspondiente (en escala logarítmica), medido tras 24 y 96 h. de exposición a las nanopartículas. Los gráficos A y C corresponden a los controles (i.e., macrófagos sin nanopartículas) y los gráficos B y D corresponden a los macrófagos cultivados con nanopartículas. El número de células en sub- G_0 es indicativo de muerte celular. En estas figuras las flechas indican el ADN fragmentado, correspondiente a procesos de apoptosis. El análisis del ciclo celular también se puede representar en gráficos como los mostrados en la *figura 5.6*. Aquí se muestra el estado del ciclo celular de todas y cada una de las células del cultivo en el momento del análisis. En los gráficos de la *figura 5.5* no se observa ningún pico en la zona correspondiente a la fase sub- G_0 y la cantidad de células que sufren apoptosis se estima en torno al 2% y 5% respectivamente (ver *figura 5.6*). Los gráficos correspondientes a las células control y a las células incubadas con nanopartículas de

Fe@C durante 24 h indican que las nanopartículas inducen un putativo efecto de bloqueo en la fase "G₁-S" durante las primeras 24 h, lo que resulta en un aumento en la muerte celular a las 96 h, al menos en estas condiciones experimentales, como se deduce de las proporciones de células en la fase sub-G₀ del ciclo en el gráfico D. Una parada parcial del ciclo celular en la fase G₁-S podría ser debida a los efectos mecánicos ejercidos por las partículas a nivel intracelular. El cambio observado en la fase "S" del ciclo celular sugiere un bloqueo parcial de la síntesis de ADN similar al observado en nanotubos de carbono de capa múltiple (MWCNT) (Garcia-Hevia et al. 2015).

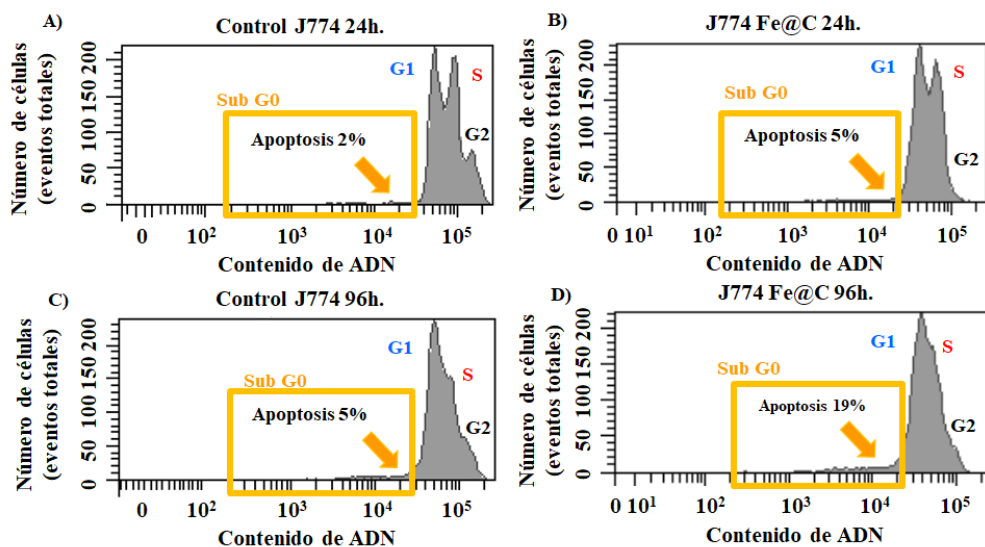


Figura 5.5. Perfiles de ciclo celular (número de células frente a cantidad de ADN por célula) obtenidos mediante citometría de flujo, en cultivos de macrófagos murinos con nanopartículas de Fe@C durante 24 h (B) y 96 h (D). Los perfiles A y C corresponden a los respectivos controles (células sin nanopartículas). Las flechas indican ADN fragmentado como resultado de procesos de apoptosis.

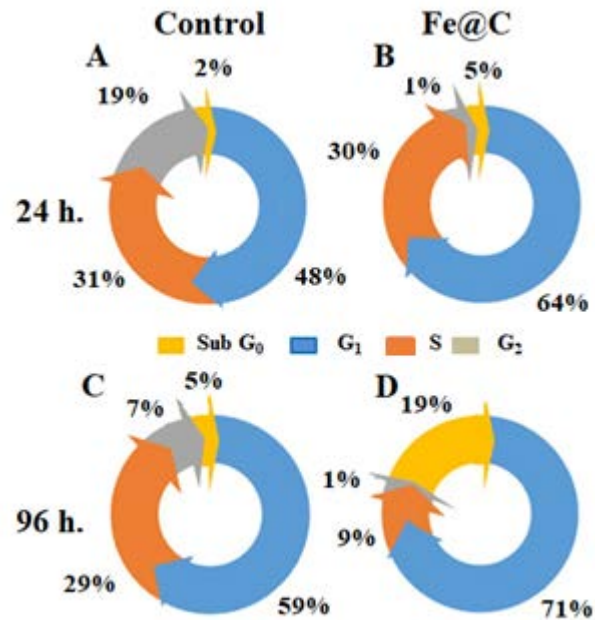


Figura 5.6. Proporción de macrófagos en una determinada fase del ciclo celular, después de ser cultivadas 24 h. (B) y 96 h. (D) con las nanopartículas de Fe@C. Los gráficos A y C corresponden las células del cultivo control, (i.e., sin nanopartículas); los gráficos B y D corresponden a los macrófagos cultivados con nanopartículas.

La figura 5.7 corresponde a los resultados de los experimentos realizados con nanopartículas Fe₃O₄@C. Los gráficos A y C corresponden a los controles y los gráficos B y D corresponden a los macrófagos cultivados con nanopartículas durante 24 h. y 96 h. respectivamente. Estos resultados se representan también en la figura 5.8. En este caso, no se producen cambios significativos después de 24 h. de exposición a estas nanopartículas. Sin embargo, al igual que ocurre con las nanopartículas Fe@C se observa una reducción patente en la fase S (naranja) del ciclo celular acompañada de un aumento en las células apoptóticas (amarillo) tras la exposición de los macrófagos a las partículas durante 96 h. (figura 5.8 D). Esto sugiere que las nanopartículas interfieren

con el proceso de proliferación celular (proceso de síntesis de ADN) a las dosis indicadas.

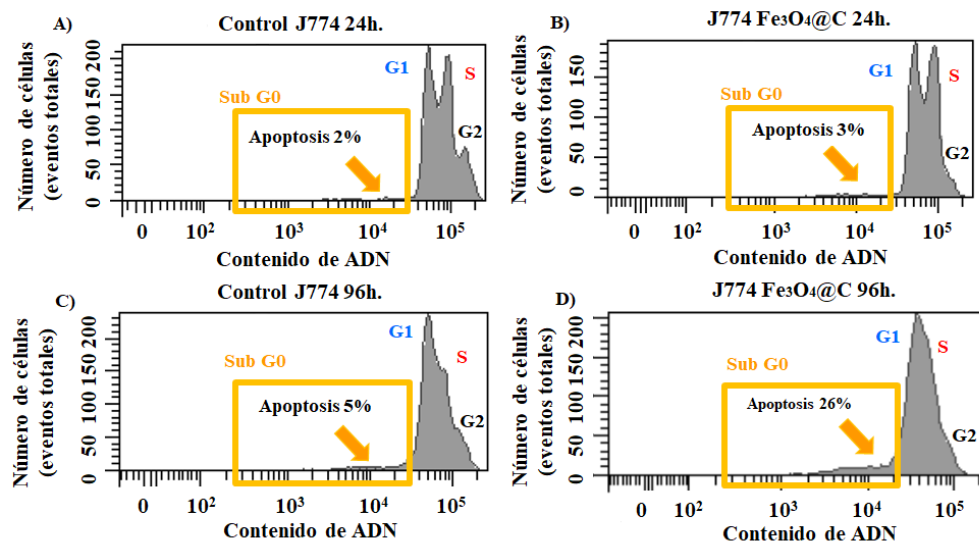


Figura 5.7. Perfiles de ciclo celular (número de células frente a cantidad de ADN por célula) obtenidos mediante citometría de flujo en cultivos de células J774 con nanopartículas de Fe₃O₄@C a las 24 h. (B) y a las 96 h. (D). Los perfiles A y C corresponden a los respectivos controles (células sin nanopartículas). Las flechas indican ADN fragmentado como resultado de procesos de apoptosis.

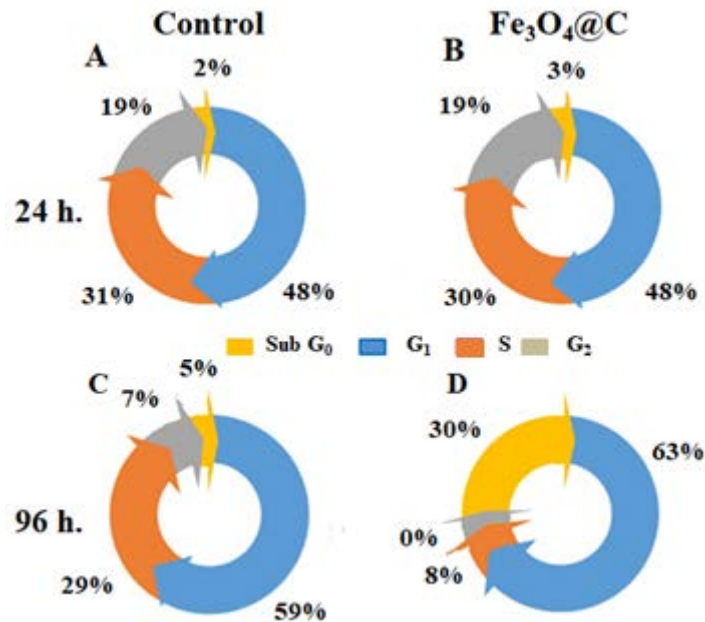


Figura 5.8. Proporción de macrófagos en una determinada fase del ciclo celular, después de ser cultivadas 24 h. (B) y 96 h. (D) con las nanopartículas de Fe₃O₄@C. Los gráficos A y C corresponden las células del cultivo control, (i.e., sin nanopartículas); los gráficos B y D corresponden a los macrófagos cultivados con nanopartículas.

5.1.3.2 Estudio de la toxicidad de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C en células HeLa

Los experimentos llevados a cabo con células HeLa se han realizado en las mismas condiciones experimentales que en los experimentos realizados con los macrófagos murinos.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos cuando las células se cultivan con las nanopartículas Fe@C se resumen en la *figura 5.9* (en representación logarítmica) y en la *figura 5.10*.

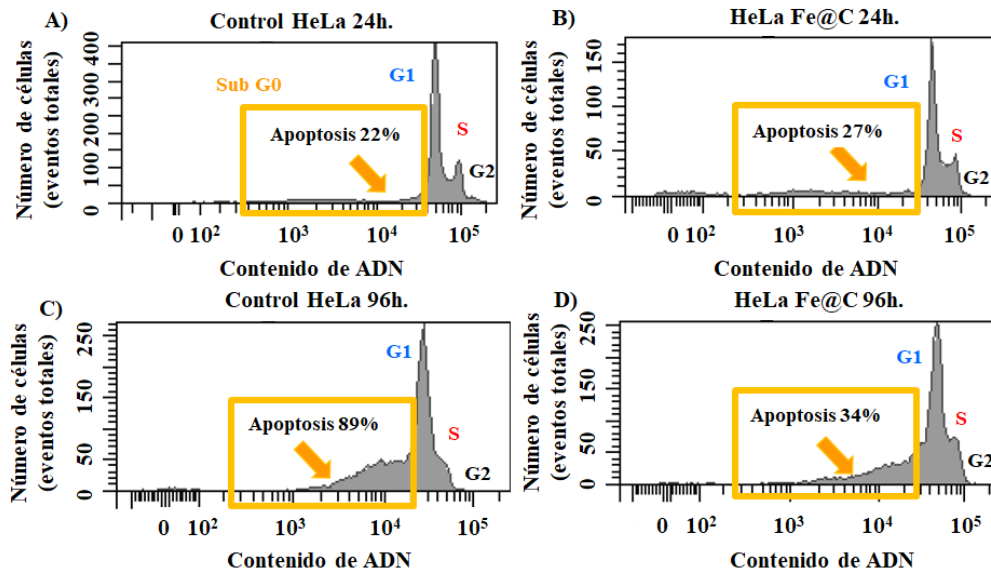


Figura 5.9. Perfiles de ciclo celular (número de células frente a cantidad de ADN por célula) obtenidos mediante citometría de flujo, en cultivos de células HeLa con nanopartículas de Fe@C durante 24 h (B) y 96 h (D). Los perfiles A y C corresponden a los respectivos controles (células sin nanopartículas). Las flechas indican ADN fragmentado como resultado de procesos de apoptosis.

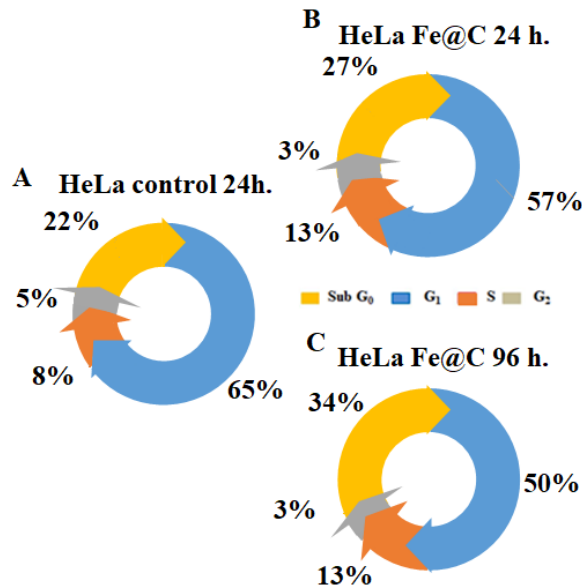


Figura 5.10. Proporción de células HeLa en una determinada fase del ciclo celular, después de ser cultivadas 24 h. (B) y 96 h. (C) con las nanopartículas de Fe@C. El gráfico A corresponden las células del cultivo control, (i.e., sin nanopartículas); los gráficos B y C corresponden a las células cultivados con nanopartículas.

En este caso, 24 horas después de añadir las nanopartículas Fe@C al cultivo, la mayor diferencia en el ciclo celular se traduce en un aumento de la fase S y una ligera disminución de la fase G₂. Los porcentajes de células en estas dos fases apenas sufren variación a las 96 h. de exposición a las nanopartículas. Transcurrido este tiempo, aunque se aprecia un descenso en el número de células en fase G₁, la variación más acusada está en el número de células en fase sub-G₀. De acuerdo con esto, hasta las 24 h. las nanopartículas inducen un efecto poco significativo en el ciclo celular. Tanto en el cultivo control como en los cultivos con nanopartículas la mayoría de las células se encuentran en las fases G₁ y S, al menos hasta 96 h. después de añadir las nanopartículas de Fe@C al medio de cultivo. El bloqueo parcial de las células en la fase G₁-S del ciclo

celular podría resultar de los efectos mecánicos de las partículas a nivel intracelular. Por otro lado, las células en la fase sub-G₀ corresponden a células muertas, probablemente debido a la superpoblación de células en el cultivo: si las células siguen dividiéndose y multiplicándose aun en presencia de nanopartículas, finalmente mueren por sobrepoblación en el cultivo.

Las *figura 5.11* (en representación logarítmica) y *figura 5.12* resumen los resultados de viabilidad celular obtenidos cuando las células HeLa se cultivan con las nanopartículas Fe₃O₄@C.

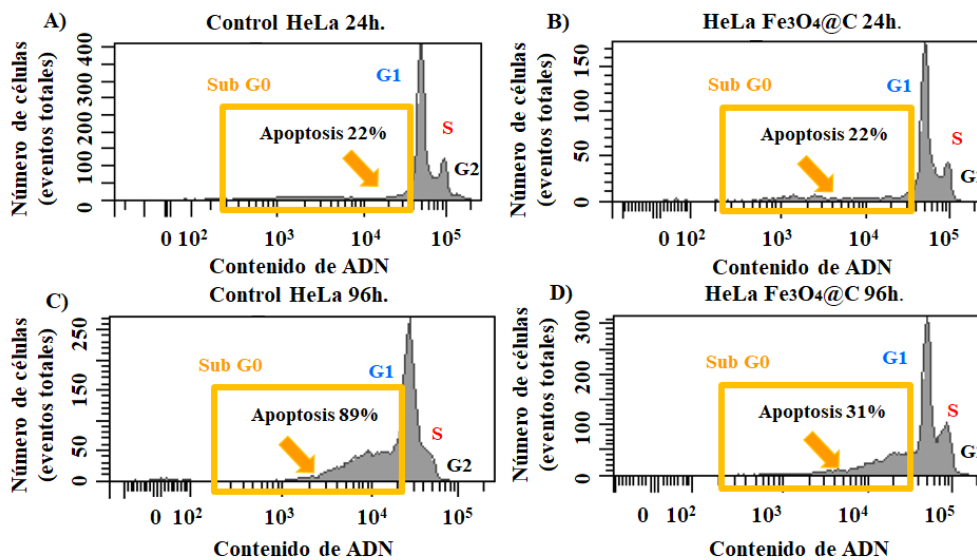


Figura 5.11. Perfiles de ciclo celular (número de células frente a cantidad de ADN por célula) obtenidos mediante citometría de flujo en cultivos de células HeLa con nanopartículas de Fe₃O₄@C a las 24 h. (B) y a las 96 h. (D). Los perfiles A y C corresponden a los respectivos controles (células sin nanopartículas). Las flechas indican ADN fragmentado como resultado de procesos de apoptosis.

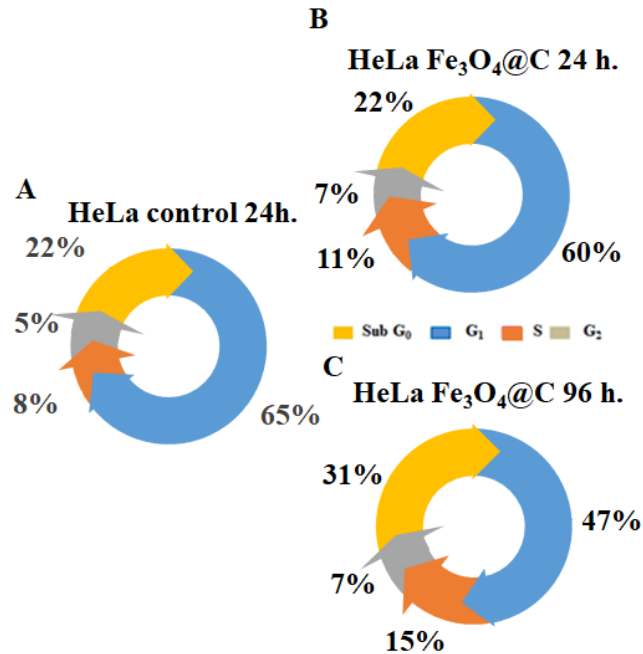


Figura 5.12. Proporción de células HeLa en una determinada fase del ciclo celular, después de ser cultivadas 24 h. (B) y 96 h. (C) con las nanopartículas de Fe₃O₄@C. El gráfico A corresponde al ciclo celular del cultivo control, (i.e., sin nanopartículas).

La proporción de células cada fase del ciclo celular, en el cultivo control y en cultivo con nanopartículas son bastante similares, con un ligero aumento de células en las fases S y G₂; esto parece indicar que las nanopartículas de Fe₃O₄@C no inducen ningún efecto adverso en las células al menos hasta transcurridas 24 h de exposición. Transcurridas 96 h. la variación más acusada corresponde a un aumento de células en la fase sub-G₀. Al igual que sucedía en el caso de los cultivos celulares con las nanopartículas de Fe@C, la muerte celular que se observa después de 96 h. es probablemente debida a una superpoblación de células en el cultivo y no a la toxicidad de las nanopartículas.

5.2 Internalización de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C por macrófagos murinos J774

5.2.1 Estudio de la internalización celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se ha estudiado si las nanopartículas entran en los macrófagos mediante endocitosis/fagocitosis y si una vez encapsuladas en membranas celulares son capaces de penetrar al citosol, y en caso afirmativo, su distribución en este. Se ha estudiado también si las propiedades fisicoquímicas del citoplasma afectan a las nanopartículas y en particular al recubrimiento. En este estudio los macrófagos se han incubado con las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C en una concentración de 50 mg/ml durante 7 días. El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) se ha llevado a cabo en muestras de estos cultivos después de 24 h y siete días de exposición a las nanopartículas. Los detalles del experimento se describen en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. Este estudio, incluida la preparación de las muestras, se realizaron en el laboratorio de la Prof. Mónica López Fanarraga del *Dpto. Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cantabria (Santander)*.

Mediante inspección visual, no se apreciaron diferencias entre las células de los cultivos control y los tratados con nanopartículas de Fe@C, lo que sugiere que las nanopartículas no inducían daño a nivel celular. En la *imagen 5.1* se muestra una imagen de microscopía de transmisión de una sección ultrafina del borde de un macrófago en el proceso de captura de un agregado de nanopartículas de Fe@C, tras 24 horas de incubación. En ella se distingue claramente un filopodio desarrollado por la célula.

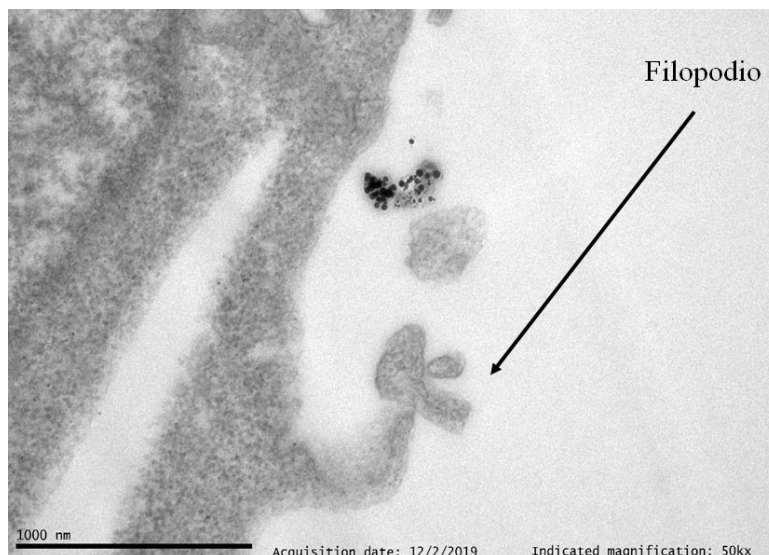


Imagen 5.1. Momento de encapsulación de un agregado de nanopartículas Fe@C mediante un filopodio de una célula J774, tras 24 horas de cultivo.

La imagen 5.2 muestra una célula J774 tras 24 h. de incubación con nanopartículas de Fe@C. Como se puede apreciar, el citoplasma contiene zonas muy definidas de color negro, que se corresponden con agregados de nanopartículas. Estos aparecen rodeados de una membrana, lo que indica que se encuentran en el interior de un endo-lisosoma, ya que es a éstos a donde llega el material en las vesículas que provienen de la membrana plasmática y que se han formado como consecuencia del proceso de endocitosis/fagocitosis mediante el cual la célula atrapa las nanopartículas (Cabrera and Ungermann 2010). Las nanopartículas en esta imagen son muy similares a las que se ven en las imágenes de TEM del *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C* correspondientes a las muestras después del proceso de purificación y separación magnética. Además, el contraste en negro de los agregados y su morfología sugiere que las nanopartículas mantendrían su recubrimiento de carbono, lo que indicaría que, una vez en el interior del citoplasma, las nanopartículas mantendrían sus propiedades fisicoquímicas, en particular las propiedades del núcleo, que estaría protegido de la oxidación por el recubrimiento de capas de grafeno.

Comparando estas imágenes con las correspondientes a células que han estado expuestas a las nanopartículas de Fe@C durante 7 días (ver *imagen 5.3*) no se aprecian diferencias significativas ni en las nanopartículas ni en la morfología de los propios macrófagos.

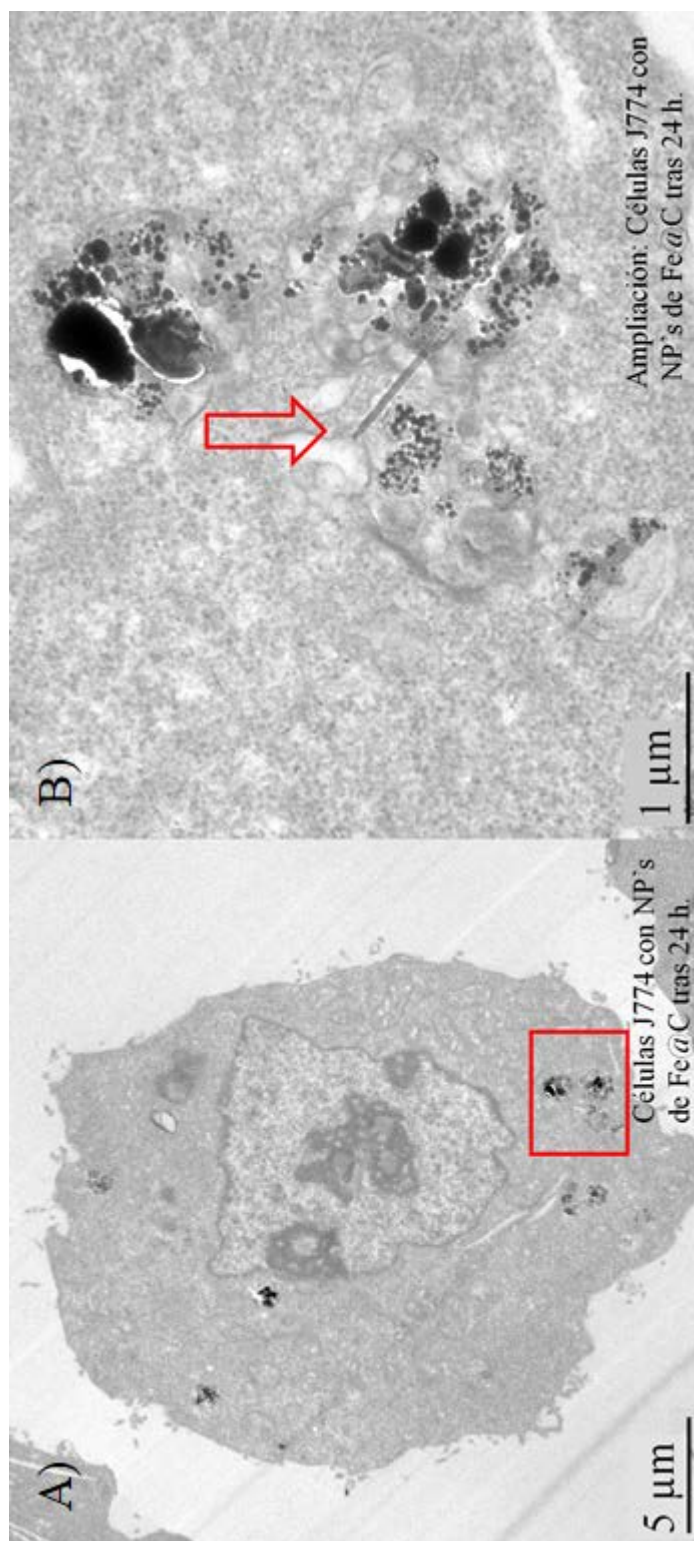


Imagen 5.2. Imágenes TEM de las nanopartículas de Fe@C internalizadas en las células J774 tras 24h. de incubación. En la imagen 5.2 (A) se muestra una célula con nanopartículas en el interior. En la imagen 5.2 (B) se muestra una ampliación de la zona señalada en rojo en la imagen anterior; se observan las nanopartículas en el interior de un endosoma, así como una estructura (señalada por una flecha) que pueden ser uno o varios nanotubos similares a los del estudio de López-Fanarraga et al. (Iturrioz-Rodríguez et al. 2017).

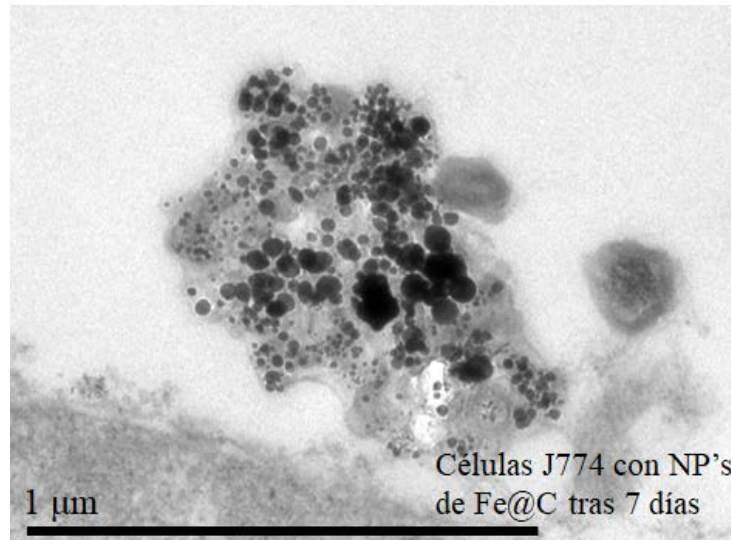


Imagen 5.3. Imagen TEM de las nanopartículas de Fe@C internalizadas en las células J774 tras 7 días de incubación. Se observan las nanopartículas en el interior de un endosoma sin diferencias significativas en las nanopartículas.

Como ya se ha mencionado en el capítulo correspondiente a la síntesis y caracterización de nanopartículas, las muestras de Fe@C que se han utilizado en estos experimentos, aparte de contener las nanopartículas también contienen otro tipo de especies carbonosas, incluso después de la purificación y separación magnética. Una de estas especies son los nanotubos de carbono. En la ampliación de la *imagen 5.2* a la derecha, señalado por una flecha se puede apreciar uno o varios nanotubos de carbono atravesando el endosoma y lisándolo. Esto favorece la salida de las nanopartículas libres a la célula como han observado López Fanarraga et al. (Iturrioz-Rodríguez. et al. 2017). En la *imagen 5.4* vemos nanopartículas de Fe@C libres de membranas en el citoplasma de otro macrófago. A la vista de las imágenes de TEM, una vez que las nanopartículas están fuera de los endosomas y libres en el citoplasma, su recubrimiento de capas de grafeno parece mantenerse y no parece estar degradado. Para confirmarlo muestras de estos cultivos celulares se analizaron mediante espectroscopía Raman y los resultados se presentan en la próxima sección.

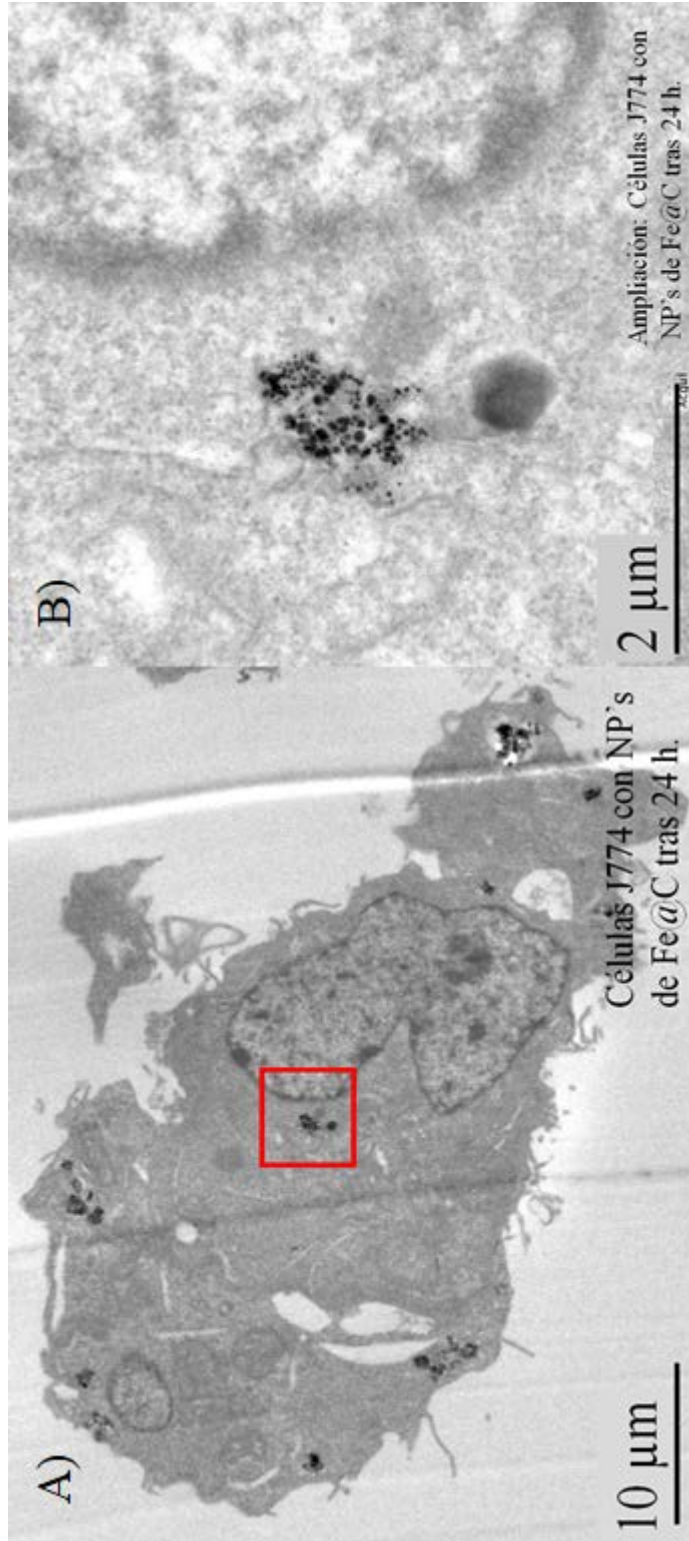


Imagen 5.4. Imagen TEM de las nanopartículas de Fe@C internalizadas en las células J774 tras 24h. de incubación. En la imagen 5.4 (A) se muestra una célula con nanopartículas en el interior y en la imagen 5.4 (B) se muestra una ampliación de la imagen anterior donde se observan las nanopartículas libres que han conseguido escapar del endosoma y se encuentran cerca núcleo celular (en la zona derecha de la imagen, rodeado por la membrana nuclear, diferenciándolo del citoplasma).

Estos mismos ensayos se han realizado con las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, en idénticas condiciones experimentales. Como se observa en la *imagen 5.5* tomada 24 h. después de la exposición de las células a las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, estas no parecen haber sufrido alteración en comparación con las imágenes de microscopía TEM obtenidas tras su síntesis (mostradas en el *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*). En la *imagen 5.5 (B)* se ve claramente como el agregado de nanopartículas está rodeado de una membrana, lo que apunta a que las nanopartículas se encuentran en el interior de un endosoma/fagosoma. Además, en las nanopartículas de la imagen se observa una zona más oscura, que correspondería al núcleo de las nanopartículas rodeada de una zona de menor contraste, que correspondería al carbono amorfo que recubre las nanopartículas. Esto indica que, al igual que sucedía en el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$, el medio celular no parece alterar significativamente el recubrimiento de las nanopartículas, lo que se estudiará posteriormente por espectroscopía Raman.

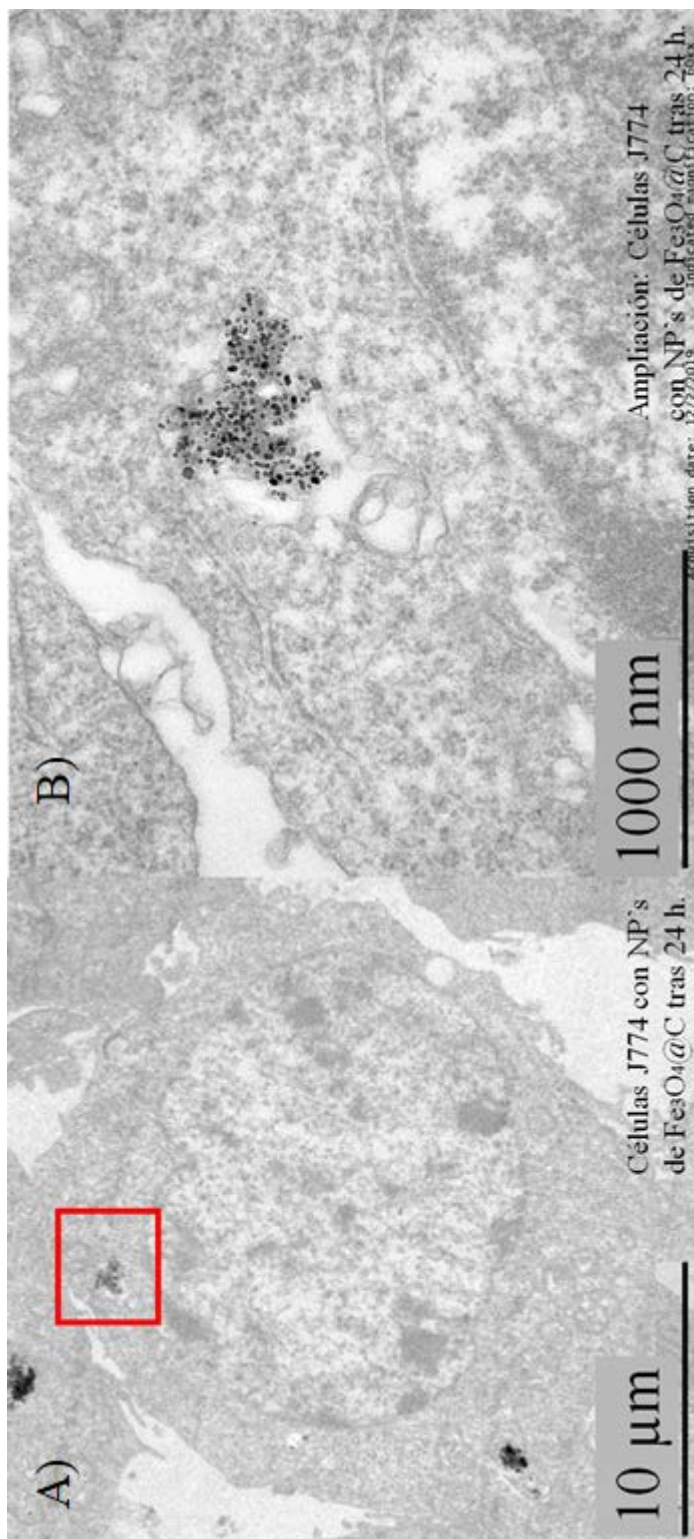


Imagen 5.5. Imagen TEM de las nanopartículas de $Fe_3O_4@C$ internalizadas en las células J774 tras 24h. de incubación. En la imagen 5.5 (A), se muestra una imagen de una célula con nanopartículas en su interior donde se observan los núcleos diferenciados del citoplasma; en la imagen 5.4 (B), una ampliación de la zona señalada en rojo en la imagen anterior, donde se observan las nanopartículas en el interior de un endosoma y cercano al núcleo de la célula, diferenciado por la membrana nuclear.

Tras 7 días de internalización se lleva a cabo un nuevo estudio de las células J774 mediante TEM, para comprobar si las nanopartículas de Fe₃O₄@C en el interior de las células sufren algún tipo de degradación. Comparando con las imágenes de TEM mostradas en la *imagen 5.5*, en la *imagen 5.6* obtenida tras 7 días de incubación, se observan nanopartículas bien definidas que coexisten con nanopartículas rodeadas de una zona difusa. Este cambio morfológico podría ser indicativo de la biodegradación del recubrimiento ya que estos macrófagos tienen un potencial de degradación extraordinario y pueden descomponer enzimáticamente casi todo tipo de biomoléculas capturadas por las rutas de entrada endocítica o fagocítica. Sus lisosomas, además de mostrar un pH de 4.5, contienen una gran variedad de enzimas (ácido-hidrolasas y peroxidasas) que pueden digerir gradualmente los nanomateriales de carbono, incluidos los nanotubos de carbono (González-Lavado et al. 2018).

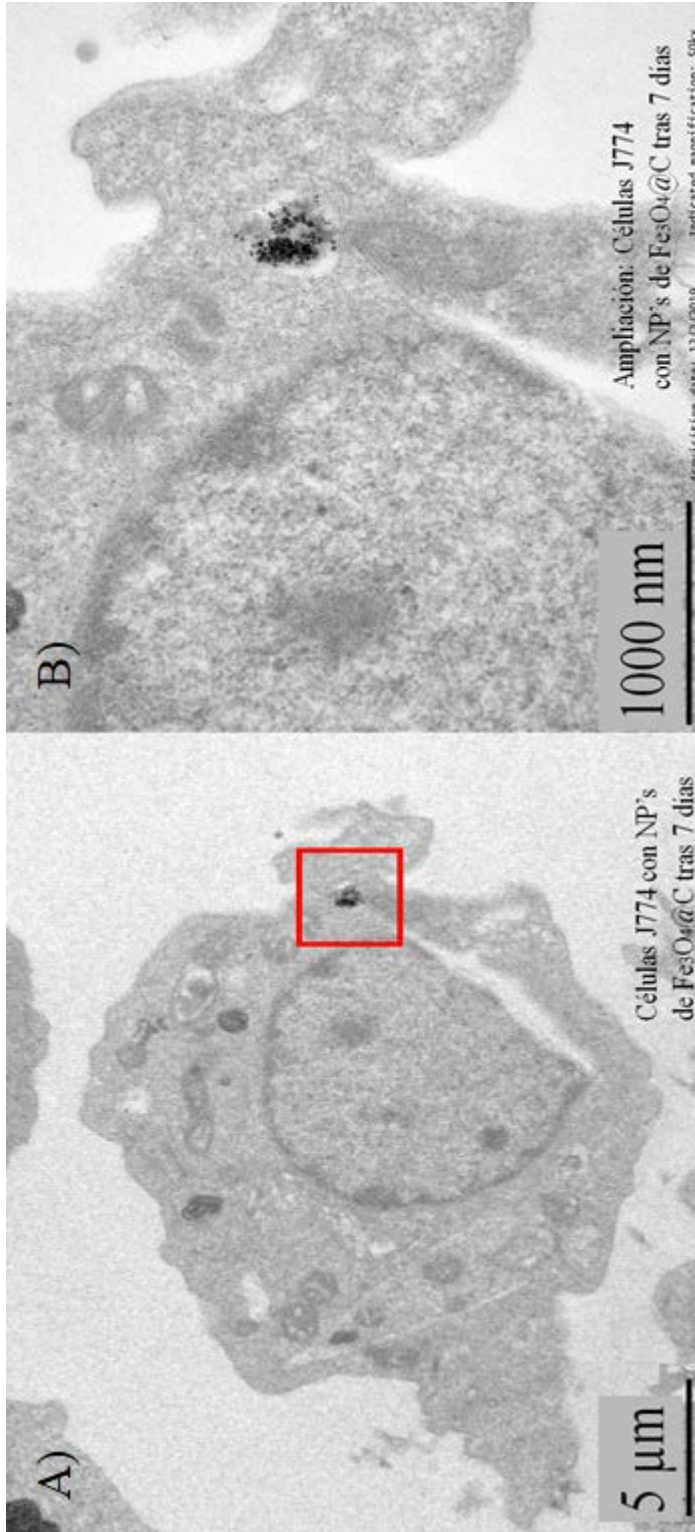


Imagen 5.6. Imagen TEM de las nanopartículas de $Fe_3O_4@C$ internalizadas en las células J774 tras 7 días de incubación. En la imagen 5.6 (A), se muestran varias células con nanopartículas en su interior; en la imagen 5.6 (B), una ampliación de la zona señalada en rojo en la imagen anterior.

Por tanto, del análisis mediante TEM llevado a cabo en los dos tipos de muestras sintetizadas durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se concluye que las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C entran en las células, y una vez dentro se mantienen estables en lo que respecta a su morfología y, aparentemente, a su recubrimiento, al menos hasta 7 días. En ambos casos, la mayoría de las nanopartículas se encuentran en el interior de endosomas/lisosomas. Además, en los cultivos utilizando nanopartículas de Fe@C, las imágenes de TEM han mostrado cómo alguno de los nanotubos de carbono presentes en las muestras favorecen el escape al citosol de las nanopartículas, quedando estas libres en este medio.

5.2.2 Estudio de la degradación del recubrimiento de las nanopartículas Fe@C y Fe₃O₄@C por macrófagos mediante espectroscopía Raman

Para obtener más información acerca del estado de las nanopartículas en el interior de las células se han llevado a cabo medidas de espectroscopía Raman en co-cultivos de macrófagos J774 con nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C. El objetivo de estos experimentos es analizar si el recubrimiento de las nanopartículas se ve afectado por el hecho de que estén en el interior de las células.

Para estos experimentos las células se incubaron con una concentración de 50 µg/mL de nanopartículas, durante 72 h. Transcurrido este tiempo, la mayoría de las células contienen nanopartículas. Las medidas por espectroscopía Raman, se realizaron con un láser de 514 nm, a una intensidad de 3 mW, acumulando por medida, la señal de 3 espectros obtenidos durante 30 segundos cada uno. Estas medidas se realizaron en el marco de la colaboración con el Profesor Jesús González del *Departamento de Ciencias de la tierra y Física de la Materia Condensada de la Universidad de Cantabria*.

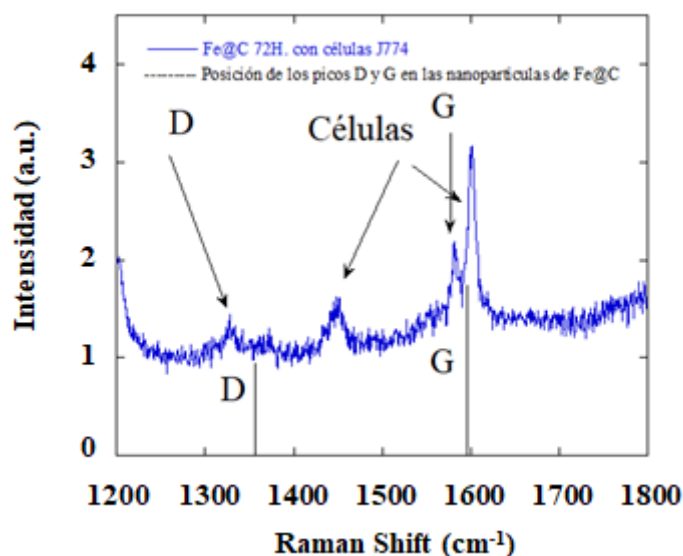


Figura 5.13. Espectro Raman de un cultivo de células J774 con nanopartículas de Fe@C tras 72 h. de incubación (azul). En negro, posición de los picos D y G del espectro de las nanopartículas Fe@C.

En la figura 5.13 se presenta el espectro Raman correspondiente a un cultivo de nanopartículas Fe@C con células J774, durante 72 h, en el que se ha representado mediante líneas verticales la posición de los picos D y G del espectro Raman de las nanopartículas antes de su internalización en las células. Según los resultados mostrados en el capítulo acerca de su caracterización (ver *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*), el espectro de las nanopartículas de Fe@C muestra una banda en torno a 1300 cm⁻¹, correspondiente a la banda D del espectro de un grafeno con defectos y otra a 1587 cm⁻¹ correspondiente a la banda G del espectro del grafeno. Estas características se observan también en el espectro Raman de la muestra de cultivo celular. En este además, aparecen dos bandas en torno a 1400 cm⁻¹ y 1600 cm⁻¹ que provienen de la señal de las células, concretamente de proteínas celulares (García-Hevia et al. 2015)(Villegas et al. 2014). La contribución de estas

proteínas es claramente visible en la zona de baja frecuencia del espectro, como se muestra en la figura 5.14.

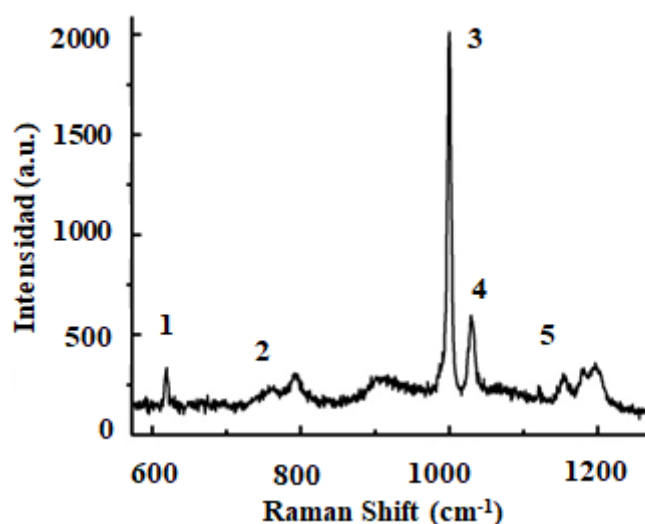


Figura 5.14: Espectro Raman de baja frecuencia de una muestra de macrófagos expuestos a nanopartículas de Fe@C durante 72 h: 1. Modo de torsión (*twisting mode*) C-C de fenilalanina (proteínas); 2. Modo de estiramiento simétrico (*symmetric breathing mode*) del triptófano (proteína); 3. Estiramiento (*stretching*) del anillo aromático C-C en fenilalanina; Modo de flexión (*bending*); 4. C-H en fenilalanina, estiramiento (*stretching*) C-N en proteínas; 5 Estiramiento (*stretching*) C-C y C-N de proteínas y/o lípidos.

En las figuras 5.15, 5.16 y 5.17 se presenta el análisis de las distintas zonas del espectro Raman, comparando los resultados experimentales (en negro) con el espectro teórico (en rojo) y con sus diferentes contribuciones, ajustadas a una función Lorentziana (en verde).

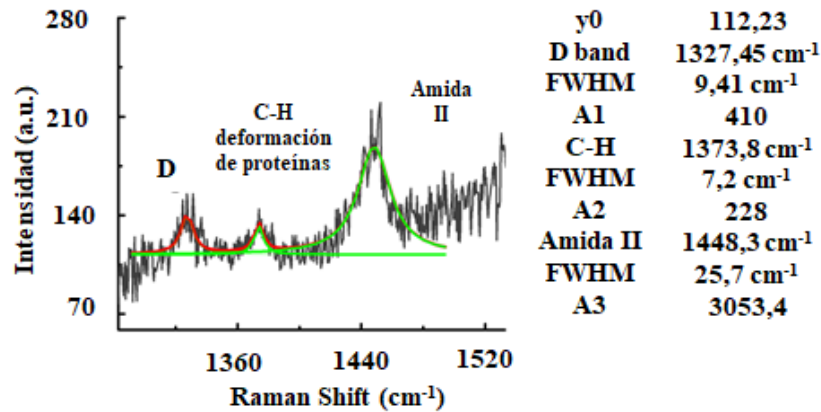


Figura 5.15. Espectro Raman en la región de 1280 a 1520 cm⁻¹ de una muestra de macrófagos expuestos a nanopartículas de Fe@C durante 72 h. (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste de Lorentz. Se observan las bandas correspondientes a la deformación C-H de las proteínas y de la Amida II, junto con la banda D de grafeno.

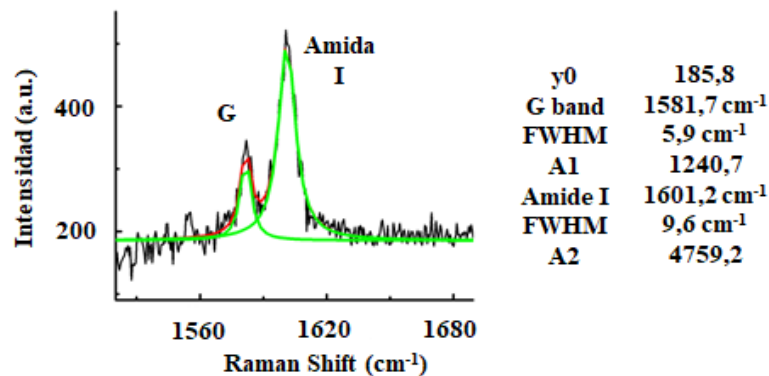


Figura 5.16. Espectro Raman en la región de 1530 a 1680 cm⁻¹ de una muestra de macrófagos expuestos a nanopartículas de Fe@C durante 72 h (línea negra); la línea roja corresponde al espectro teórico y las líneas verdes al ajuste de Lorentz. La banda correspondiente a la Amida I se observa junto con la banda G de grafeno.

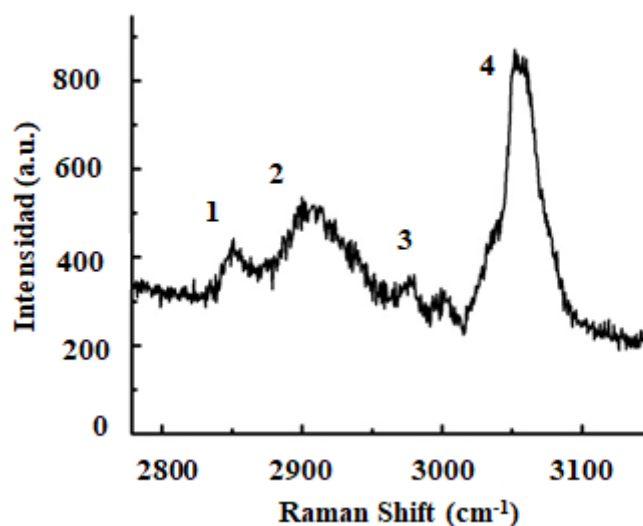


Figura 5.17. Espectro Raman en la región de alta frecuencia de una muestra de macrófagos expuestos a nanopartículas de Fe@C durante 72 h. 1. modo de estiramiento simétrico (*symmetric stretching mode*) de CH₂ (lípidos); 2. Modo de estiramiento simétrico de CH₂ y CH₃ (lípidos); 3. Modo de estiramiento simétrico de CH₃ (lípidos); 4. Modo de estiramiento simétrico CH₂-CH₃ (lípidos).

Si se comparan la posición de las bandas D y G de los espectros correspondientes a la muestra de las nanopartículas y a la muestra de cultivo celular con nanopartículas, los picos de la señal que proviene del carbono en este último espectro se desplazan unos 25 cm⁻¹ hacia la izquierda (es decir, hacia el infrarrojo). Esto indica que después de tres días en el interior de las células se ha producido un cambio en la estructura del carbono que recubre las nanopartículas. Este desplazamiento hacia el infrarrojo también se ha observado en nanotubos de carbono, después de haber sido sometidos a un proceso de oxidación (González-Lavado et al. 2018). Según este estudio, el desplazamiento indica una transferencia de carga resultante de los procesos de oxidación y degradación, que modifican la carga en la superficie de los nanotubos (González-Lavado et al.

2018)(Gupta et al. 2004)(Rao et al. 1997). En nuestro caso, este cambio puede deberse también a transferencia de carga y, en consecuencia, a la posible degradación del recubrimiento de las nanopartículas que es inducida por el medio ácido del lisosoma. En las imágenes de TEM mostradas anteriormente, no tenemos suficiente resolución para observar estos defectos que, sin embargo, gracias a la microscopía Raman, sí que podemos confirmar.

Del mismo modo, se han llevado a cabo las medidas de espectroscopía Raman en cocultivos de macrófagos J774 con nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. Este estudio se ha llevado a cabo en las mismas condiciones experimentales.

En la *figura 5.18* se muestra una comparativa del espectro Raman correspondiente a una muestra de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, junto con el obtenido de un cultivo de estas nanopartículas con células J774, durante 72 h. En el espectro de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ se observan dos bandas anchas que se superponen, cuyos máximos aparecen en torno a 1400 cm^{-1} , correspondiente a la banda D de un grafeno con defectos, y en torno a 1600 cm^{-1} , correspondiente a la banda G del grafeno (Ferrari and Basko 2013). Estas características se observan también en el espectro Raman de la muestra de cultivo celular con nanopartículas. El pico D y el pico G del espectro se encuentran solapados ya que el carbono que recubre las nanopartículas es un carbono amorfo, en buen acuerdo con los resultados mostrados anteriormente en el *Capítulo III: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C*. Las contribuciones de proteínas celulares a 1400 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} (Villegas et al. 2014)(Garcia-Hevia et al. 2015) están convolucionadas dentro de los picos anchos observados del recubrimiento.

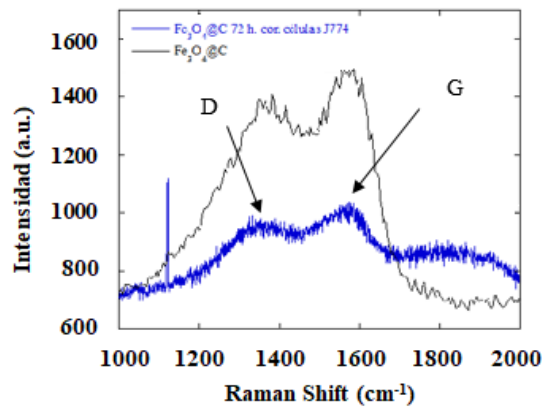


Figura 5.18. Espectros Raman de las nanopartículas de $Fe_3O_4@C$ obtenido después de su síntesis y purificación (negro) y de los cultivos de células J774 con dichas nanopartículas, tras 72 h. de incubación (azul).

En la figura 5.19 se presenta un análisis de las distintas contribuciones al espectro Raman.

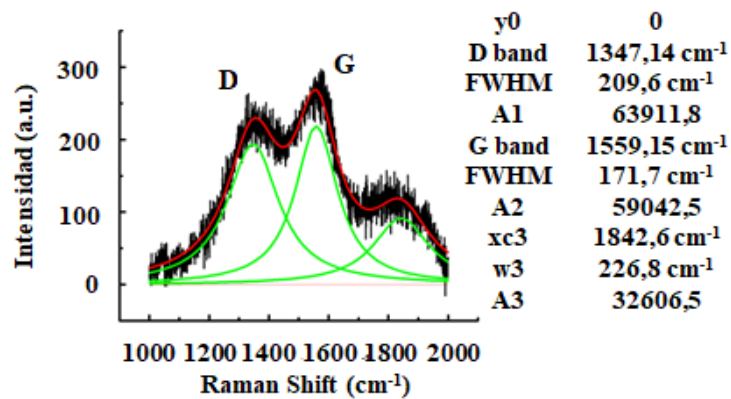


Figura 5.19. Espectro Raman de una muestra de macrófagos expuestos a nanopartículas de $Fe_3O_4@C$ durante 72 h. El espectro es el característico del carbono amorfo.

Las bandas correspondientes al espectro Raman del cultivo de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ con células J774 comparadas con las bandas del espectro Raman de una muestra de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ se desplazan en torno unos 20 cm^{-1} hacia el infrarrojo. Como en el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$, este desplazamiento puede deberse también a la transferencia de carga y, en consecuencia, a la posible degradación del recubrimiento de nanopartículas. Teniendo en cuenta las conclusiones de experimentos *in vitro* similares realizados por González-Lavado et al. en macrófagos expuestos a nanotubos de carbono multicapa (González-Lavado et al. 2018), la oxidación/degradación del recubrimiento de carbono de nuestras nanopartículas mejoraría el procesamiento intracelular de las nanopartículas, mejorando su biodegradación. Sin embargo, la degradación del recubrimiento parece que no ocasiona su desaparición completa, ni en este caso ni en el caso de las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$, ya que esto dejaría los núcleos de nanopartículas sin protección. Es bien sabido que el hierro metálico es una fuente de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden provocar efectos letales para las células a través del daño oxidativo de las biomoléculas (Wu et al. 2014), y, la magnetita (así como la maghemita) cataliza la descomposición de H_2O_2 para producir el radical hidroxilo, a través de la actividad similar a la peroxidasa en las condiciones ácidas dentro de los lisosomas (Chen et al. 2012). El estudio *in vivo* mediante MRI de la biodistribución de nanopartículas en conejos de Nueva Zelanda realizado con nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$ antes mencionado, confirmó la supervivencia de los animales al menos 18 meses después de la inyección intravenosa de nanopartículas (Marquina and Ibarra 2020). Estos resultados confirmaron la biocompatibilidad de las nanopartículas durante su eliminación progresiva (presumiblemente, a través de la orina y las heces) a lo largo del tiempo que duró el experimento, lo que a su vez confirma que el recubrimiento de capas de grafeno protege los núcleos de Fe durante meses, a pesar de la aparición de los defectos ahora evidenciados mediante espectroscopia Raman. Además, el escape lisosómico de nanopartículas al citosol evitaría en cierta medida las reacciones químicas que conducen a su degradación. En el caso de las nanopartículas

de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, serían necesarios experimentos Raman a más largo plazo para investigar la degradación completa de la matriz de carbono amorfo.

5.3 Experimentos de adsorción y desorción de fármacos

Este trabajo se ha realizado en el marco de la colaboración con el grupo del Profesor King-Lu Yeung de la *Hong Kong University of Science and Technology (HKUST)* y se llevaron a cabo en el Instituto de Nanociencia de Aragón (INA) de la Universidad de Zaragoza).

Para estos experimentos las nanopartículas se han incubado con ácido ferúlico siguiendo el procedimiento explicado en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. La concentración de ácido ferúlico utilizada está por debajo de los niveles de toxicidad reportados para este medicamento. Para los experimentos de adsorción se incubaron 10 mg/ml de nanopartículas en etanol con una disolución de ácido ferúlico con una concentración de 2 mg/ml en el caso de las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$, y de 1 mg/ml en el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. La concentración de fármaco adsorbido por las nanopartículas se calcula a partir de la intensidad de los picos característicos del ácido ferúlico en el espectro UV-Vis del sobrenadante que resulta después de separar las nanopartículas de la disolución con el ácido ferúlico, transcurridos 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos de incubación (ver *Capítulo II: Materiales y métodos*). Los resultados correspondientes a las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ se muestran en la *figura 5.20 A y C*, respectivamente. En ellas, los círculos representan la concentración de ácido ferúlico en el sobrenadante (en el eje de la derecha) a partir de la cual se calcula la concentración adsorbida en la superficie de las nanopartículas (representada por triángulos, correspondiente al eje de la izquierda). En ambos tipos de nanopartículas, la adsorción ocurre rápidamente hasta que están saturadas con ácido ferúlico. En el caso de las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$ se adsorben más de 1,8 mg de ácido ferúlico en

aproximadamente 20 minutos. En el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ estas están casi saturadas con ácido ferúlico después de 2 minutos, adsorbiendo en total 0,721 mg.

En los experimentos de desorción se resuspende 1 mg de las nanopartículas ya cargadas con ácido ferúlico en 1 ml de PBS, y se calienta a 36 °C con agitación suave durante de 1, 5, 10, 20 y 30 días. Una vez transcurrido cada intervalo de tiempo las nanopartículas se separan magnéticamente y, al igual que en los experimentos de adsorción, la cantidad de ferúlico adsorbida en las nanopartículas se calcula a partir del espectro UV-Vis del sobrenadante. El proceso de desorción el proceso sigue tendencias muy diferentes según el tipo de partícula (ver *figuras 5.20.B. y 5.20.D*). Según la *figura 5.20 (B)*, casi todo el ácido ferúlico adsorbido en las nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$ se desorbe en aproximadamente 20 días con una liberación constante. Sin embargo, en el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$, en el primer día se liberan aproximadamente 0,6 mg de fármaco (es decir, más del 80% del adsorbido y el resto se libera lentamente a lo largo de casi un mes. Las nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$ muestran una tasa de liberación cercana al 100%, mientras que en el caso de las de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ es alrededor de 81%. El hecho de que no se libere todo el fármaco adsorbido puede deberse a la naturaleza porosa del recubrimiento de carbono amorfo de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. Desde el punto de vista de la eficacia de la liberación del fármaco, en el caso de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ se lleva a cabo en un periodo corto, demasiado rápido si lo que se busca es una liberación lenta para producir un efecto del fármaco a largo plazo.

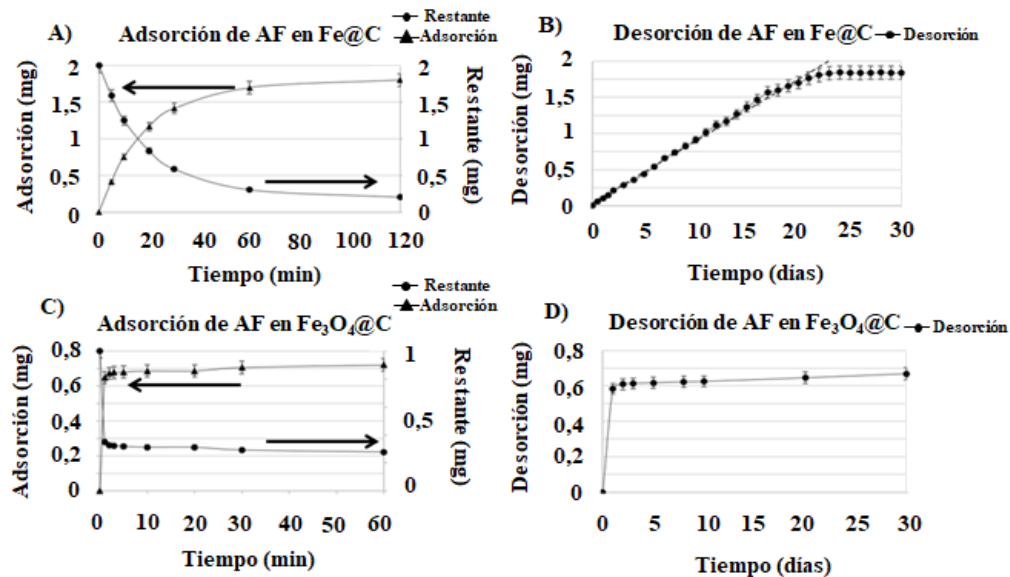


Figura 5.20. Perfiles de adsorción y desorción de ácido ferúlico (AF) en las nanopartículas Fe@C (A y B) y Fe₃O₄@C (C y D). En A y C los triángulos representan la concentración de ácido ferúlico en la superficie de las nanopartículas calculada a partir de la concentración de ácido ferúlico medida en el sobrenadante (círculos).

5.4 Conclusiones

Los resultados obtenidos al analizar la viabilidad celular de las líneas celulares A431 y A549 por el método MTT con las nanopartículas de Fe@C, Fe₃O₄@C y Fe₃O₄ confirman la importancia de la capa de carbono que recubre las nanopartículas, ya que esta podría reducir la generación de especies reactivas de oxígeno. Esta reducción sería mayor en las nanopartículas de Fe@C que en las de Fe₃O₄@C, debido a la alta cristalinidad de las capas de grafeno que recubren el núcleo de hierro metálico (más tóxico que la magnetita/maghemita) de una manera más efectiva que el carbono amorfo. No obstante, el carbono amorfo juega también un importante papel en la disminución de la toxicidad.

El análisis de la viabilidad de células BV2 mediante el método de Azul de Tripan nos permite concluir que, en ciertas condiciones experimentales, las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C así como las respectivas nanopartículas funcionalizadas con dopamina-Poly-L-Lisina, dopamina-PEG y ácido caféico-PEG-NH₂, no inducen toxicidad apreciable en las líneas celulares BV2, al menos hasta las 72 h. Para ello la concentración de nanopartículas añadida al medio de cultivo no debe superar 100 µg/mL. Nuestros experimentos han demostrado que no es necesaria una posterior funcionalización de ninguno de los dos tipos de recubrimiento de carbono. Entre las nanopartículas funcionalizadas y sin funcionalizar no se observan diferencias significativas en la viabilidad celular; no obstante, la funcionalización con los polímeros estudiados disminuye el tamaño de los agregados y mejora la estabilidad de las nanopartículas en suspensiones acuosas independientemente de la naturaleza de la envoltura de carbono.

Las imágenes TEM de las líneas celulares de macrófagos murinos expuestos a las nanopartículas muestran que estas células internalizan una buena cantidad de ambos nanomateriales, sin apreciarse diferencias relacionadas con el recubrimiento. En ambos casos las nanopartículas se localizan en el interior de los endolisomas-fagosomas, aunque en caso de las nanopartículas Fe@C, algunos nanotubos producidos durante su síntesis ocasionan su escape hacia el citosol.

Las imágenes TEM de los macrófagos no muestran signos de daño incluso después de 7 días de exposición a las nanopartículas, a pesar de un posible bloqueo de la fase S del ciclo celular observado después de 96 h. de exposición a los nanomateriales.

Los espectros Raman obtenidos en cultivos celulares expuestos durante 72 h. a las nanopartículas revelaron la aparición de defectos en el recubrimiento de ambos tipos de nanopartículas, lo que podría favorecer su degradación por los macrófagos y, en consecuencia, su biocompatibilidad. Sin embargo, la degradación del recubrimiento parece que no ocasiona su desaparición completa, ya que dejaría desnudos los núcleos

de nanopartículas, ocasionando la producción de radicales libres que darían lugar a una toxicidad elevada. Para estudiar la completa degradación tanto del recubrimiento de capas de grafeno como de carbono amorfo habría que realizar experimentos durante mucho más tiempo.

Los experimentos de adsorción y desorción de ácido ferúlico han demostrado que tanto el recubrimiento de capas de grafeno como el de carbono amorfo son adecuados para la adsorción del fármaco en la superficie de las nanopartículas y para su posterior liberación. Por lo tanto, ambos tipos de partículas son adecuados como portadores de fármacos para la administración de fármacos dirigida magnéticamente. Sin embargo, los diferentes perfiles de adsorción/desorción observados, consecuencia del diferente recubrimiento, hacen que las nanopartículas de Fe@C sean más adecuadas en la práctica, dado su perfil de liberación lineal, lo que supone un comportamiento excepcional y único para esta posible aplicación.

Referencias

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. *Biología Molecular de La Célula*. 5ª.
- Arruebo, Manuel, Rodrigo Fernández-Pacheco, M Ricardo Ibarra, and Jesús Santamaría. 2007. "Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery." *Nanotoday* 2 (3): 22–32.
<https://pdfs.semanticscholar.org/1844/8eb43dc235f82cb591983bc8df5ed799984c.pdf>.
- Blomen, V.A., and J. Boonstra. 2007. "Cell Fate Determination during G1 Phase Progression." *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 3084–3104.
- Cabrera, Margarita, and Christian Ungermann. 2010. "Guiding Endosomal

- Maturation.” *Cell* 141 (3): 404–6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.013>.
- Calatayud, M. Pilar, Cristina Riggio, Vittoria Raffa, Beatriz Sanz, Teobaldo E. Torres, M. Ricardo Ibarra, Clare Hoskins, et al. 2013. “Neuronal Cells Loaded with PEI-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles for Magnetically Guided Nerve Regeneration.” *Journal of Materials Chemistry B* 1 (29): 3607–16. <https://doi.org/10.1039/c3tb20336k>.
- Calatayud, M. Pilar, Beatriz Sanz, Vittoria Raffa, Cristina Riggio, M. Ricardo Ibarra, and Gerardo F. Goya. 2014. “The Effect of Surface Charge of Functionalized Fe₃O₄ Nanoparticles on Protein Adsorption and Cell Uptake.” *Biomaterials* 35 (24): 6389–99. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.04.009>.
- Calero, Macarena Calero. 2015. *Caracterización de Nanopartículas Magnéticas En Cultivos Celulares Para Sus Aplicaciones Biomédicas Cellular Studies of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Chen, Zhongwen, Jun-jie Yin, Yu-ting Zhou, Yu Zhang, Lina Song, Mengjie Song, Sunling Hu, Ning Gu, and Chen E T Al. 2012. “Dual Enzyme-like Activities of Iron Oxide Nanoparticles and Their Implication for Diminishing Cytotoxicity.” *ACS Nano* 6 (5): 4001–12. <https://doi.org/10.1021/nn300291r>.
- Cifuentes, Zuny, Laura Custardoy, Jesús M. de la Fuente, Clara Marquina, M. Ricardo Ibarra, Diego Rubiales, and Alejandro Pérez-de-Luque. 2010. “Absorption and Translocation to the Aerial Part of Magnetic Carbon-Coated Nanoparticles through the Root of Different Crop Plants.” *Journal of Nanobiotechnology* 8: 1–8. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-8-26>.
- Corredor, Eduardo, Pilar S. Testillano, María José Coronado, Pablo González-Melendi, Rodrigo Fernández-Pacheco, Clara Marquina, M. Ricardo Ibarra, et al. 2009.

- “Nanoparticle Penetration and Transport in Living Pumpkin Plants: In Situ Subcellular Identification.” *BMC Plant Biology* 9: 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-45>.
- Escribano, Elvira, Rodrigo Fernández-Pacheco, J. Gabriel Valdivia, M. Ricardo Ibarra, Clara Marquina, and Josep Queralt. 2012. “Effect of Magnet Implant on Iron Biodistribution of Fe@C Nanoparticles in the Mouse.” *Archives of Pharmacal Research* 35 (1): 93–100. <https://doi.org/10.1007/s12272-012-0109-8>.
- Fernández-Pacheco Chicón, Rodrigo. 2008. “Synthesis, Characterization and Functionalization of Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.” Universidad de Zaragoza.
- Fernández-Pacheco, Rodrigo, Clara Marquina, J. Gabriel Valdivia, Martín Gutiérrez, M. Soledad Romero, Rosa Cornudella, Alicia Laborda, et al. 2007. “Magnetic Nanoparticles for Local Drug Delivery Using Magnetic Implants.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311 (1 SPEC. ISS.): 318–22. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2006.11.192>.
- Ferrari, Andrea C., and Denis M. Basko. 2013. “Raman Spectroscopy as a Versatile Tool for Studying the Properties of Graphene.” *Nature Nanotechnology* 8 (4): 235–46. <https://doi.org/10.1038/nnano.2013.46>.
- García-Hevia, Lorena, Rafael Valiente, José L. Fernández-Luna, Emmanuel Flahaut, Lidia Rodríguez-Fernández, Juan C. Villegas, Jesús González, and Mónica L. Fanarraga. 2015. “Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes.” *Advanced Healthcare Materials* 4 (11): 1640–44. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500252>.
- García-Hevia, Lorena, Rafael Valiente, Jesús González, José Fernández-Luna, Juan Villegas, and Mónica Fanarraga. 2015. “Anti-Cancer Cytotoxic Effects of

- Multiwalled Carbon Nanotubes.” *Current Pharmaceutical Design* 21 (15): 1920–29. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150302144101>.
- Gil, Roberto Alonso. 2005. *Regulación de La Muerte Celular Inducida Por Activación En Linfocitos T. Papel de La Diacilglicerol Quinasa Alfa*. Universidad Autónoma de Madrid.
- Gómez i Arbonés, Xavier. 1993. *Estudio Del Contenido En ADN y Cinética Celular de Síndromes Infoproliferativos. Estudio Por Citometría de Flujo e Inmunohistoquímica*. Universitat de Lleida. <http://www.tdx.cat/handle/10803/8255>.
- Gong, Jianping P., Frank Traganos, and Zbigniew Darzynkiewicz. 1994. “A Selective Procedure for DNA Extraction from Apoptotic Cells Applicable for Gel Electrophoresis and Flow Cytometry.” *Analytical Biochemistry* 218 (2): 314–19. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1184>.
- González-Lavado, E., N. Iturrioz-Rodríguez, E. Padín-González, J. González, L. García-Hevia, J. Heuts, C. Pesquera, et al. 2018. “Biodegradable Multi-Walled Carbon Nanotubes Trigger Anti-Tumoral Effects.” *Nanoscale* 10 (23): 11013–20. <https://doi.org/10.1039/c8nr03036g>.
- González-Melendi, P., R. Fernández-Pacheco, M. J. Coronado, E. Corredor, P. S. Testillano, M. C. Risueño, C. Marquina, M. R. Ibarra, D. Rubiales, and A. Pérez-De-Luque. 2008. “Nanoparticles as Smart Treatment-Delivery Systems in Plants: Assessment of Different Techniques of Microscopy for Their Visualization in Plant Tissues.” *Annals of Botany* 101 (1): 187–95. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm283>.
- Goodwin, Scott, Caryn Peterson, Carl Hoh, and Craig Bittner. 1999. “Targeting and Retention of Magnetic Targeted Carriers (MTCs) Enhancing Intra-Arterial

- Chemotherapy.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 194 (1): 132–39. [https://doi.org/10.1016/S0304-8853\(98\)00584-8](https://doi.org/10.1016/S0304-8853(98)00584-8).
- Goya, G. F., I. Marcos-Campos, R. Fernández-Pacheco, B. Sáez, J. Godino, L. Asín, J. Lambea, et al. 2008. “Dendritic Cell Uptake of Iron-Based Magnetic Nanoparticles.” *Cell Biology International* 32 (8): 1001–5. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.04.001>.
- Green, D. 2011. *Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms*. Cold Spring.
- Gupta, S., M. Hughes, A. H. Windle, and J. Robertson. 2004. “Charge Transfer in Carbon Nanotube Actuators Investigated Using in Situ Raman Spectroscopy.” *Journal of Applied Physics* 95 (4): 2038–48. <https://doi.org/10.1063/1.1641518>.
- Iturrioz-Rodríguez., Nerea, Elena González-Domínguez, Eloisa González-Lavado, Laura Marín-Caba, Belén Vaz, Moisés Pérez-Lorenzo, Miguel A. Correa-Duarte, and Monica L. Fanarraga. 2017. “A Biomimetic Escape Strategy for Cytoplasm Invasion by Synthetic Particles.” *Angewandte Chemie - International Edition* 56 (44): 13736–40. <https://doi.org/10.1002/anie.201707769>.
- Lam, Jonathan, Marc Herant, Micah Dembo, and Volkmar Heinrich. 2009. “Baseline Mechanical Characterization of J774 Macrophages.” *Biophysical Journal* 96 (1): 248–54. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.139154>.
- Lizarbe Iracheta, María. 2007. “El Suicidio y La Muerte Celular.” *Revista de La Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales* 101 (2): 419–54.
- Lubbe, A.S., C. Bergemann, H. Riess, F. Schriever, P. Reichardt, K. Possinger, M. Matthias, et al. 1996. “Clinical Experiences with Magnetic Drag Targeting: A Phase I Study with 4'-Epidoxorubicin in 14 Patients with Advanced Solid Tumors.” *Cancer Research* 56: 4686–93.

- Lübbe, Andreas Stephan, Christian Bergemann, Winfried Huhnt, Thomas Fricke, Hanno Riess, Jeffery Walter Brock, and Dieter Huhn. 1996. "Preclinical Experiences with Magnetic Drug Targeting: Tolerance and Efficacy." *Cancer Research* 56 (20): 4694–4701.
- Marcos-Campos, I., L. Asín, T. E. Torres, C. Marquina, A. Tres, M. R. Ibarra, and G. F. Goya. 2011. "Cell Death Induced by the Application of Alternating Magnetic Fields to Nanoparticle-Loaded Dendritic Cells." *Nanotechnology* 22 (20). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/20/205101>.
- Marquina, Clara, and M. Ricardo Ibarra. 2020. "Carbon Encapsulated Functional Magnetic Nanoparticles for Life Sciences. In Pure and Functionalized Carbon Based Nanomaterials." In *Pure and Functionalized Carbon Based Nanomaterials Analytical, Biomedical, Civil and Environmental Engineering Applications*, 1st ed. CRC Press.
- Masters, J.R. 2002. "HeLa Cells 50 Years on: The Good, the Bad and the Ugly." *Nature Reviews Cancer* 2 (4): 311–15. <https://doi.org/10.1038/nrc774>.
- Matson, J.P., and J.G. Cook. 2017. "Cell Cycle Proliferation Decisions: The Impact of Single Cell Analyses." *The FEBS Journal* 284: 362–75.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65 (1–2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi. 1991. "A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry." *Journal of Immunological Methods* 139 (2): 271–79. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90198-O](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-O).
- Ou, Shiyi, and Kin Chor Kwok. 2004. "Ferulic Acid: Pharmaceutical Functions,

- Preparation and Applications in Foods.” *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84 (11): 1261–69. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>.
- Proskuryakov, Sergey Ya, Anatoli G. Konoplyannikov, and Vladimir L. Gabai. 2003. “Necrosis: A Specific Form of Programmed Cell Death?” *Experimental Cell Research* 283 (1): 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(02\)00027-7](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(02)00027-7).
- Rahbari, Raheleh, Tom Sheahan, Vasileios Modes, Pam Collier, and Catriona Macfarlane. 2009. “A Novel L1 Retrotransposon Marker for HeLa Cell Line Identification.” *Biotechniques* 46 (4): 277–84. <https://doi.org/doi/10.2144/000113089>.
- Rao, A. M., P. C. Eklund, Shunji Bandow, A. Thess, and R. E. Smalley. 1997. “Evidence for Charge Transfer in Doped Carbon Nanotube Bundles from Raman Scattering.” *Nature* 388 (6639): 257–59. <https://doi.org/10.1038/40827>.
- Riggio, Cristina, Maria Pilar Calatayud, Clare Hoskins, Josephine Pinkernelle, Beatriz Sanz, Teobaldo Enrique Torres, Manuel Ricardo Ibarra, et al. 2012. “Poly-L-Lysine-Coated Magnetic Nanoparticles as Intracellular Actuators for Neural Guidance.” *International Journal of Nanomedicine* 7: 3155–66. <https://doi.org/10.2147/ijn.s28460>.
- Rodriguez-Fernandez, Lidia, Rafael Valiente, Jesús Gonzalez, Juan C. Villegas, and Mónica L. Fanarraga. 2012. “Multiwalled Carbon Nanotubes Display Microtubule Biomimetic Properties in Vivo, Enhancing Microtubule Assembly and Stabilization.” *ACS Nano* 6 (8): 6614–25. <https://doi.org/10.1021/nn302222m>.
- Saravanakumar, Gurusamy, Jihoon Kim, and Won Jong Kim. 2017. “Reactive-Oxygen-Species-Responsive Drug Delivery Systems: Promises and Challenges.” *Advanced Science* 4 (1). <https://doi.org/10.1002/advs.201600124>.
- Umansky, S. R., B. A. Korol’, and P. A. Nelipovich. 1981. “In Vivo DNA Degradation

- in Thymocytes of γ -Irradiated or Hydrocortisone-Treated Rats.” *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis* 655 (1): 9–17. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(81\)90060-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(81)90060-5).
- Villegas, Juan C., Laura Álvarez-Montes, Lidia Rodríguez-Fernández, Jesús González, Rafael Valiente, and Mónica L. Fanarraga. 2014. “Multiwalled Carbon Nanotubes Hinder Microglia Function Interfering with Cell Migration and Phagocytosis.” *Advanced Healthcare Materials* 3 (3): 424–32. <https://doi.org/10.1002/adhm.201300178>.
- Wang, Bao Hua, and Jing Ping Ou-Yang. 2005. “Pharmacological Actions of Sodium Ferulate in Cardiovascular System.” *Cardiovascular Drug Reviews* 23 (2): 161–72. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2005.tb00163.x>.
- Wlodkovic, Donald, William Telford, Joanna Skommer, and Zbigniew Darzynkiewicz. 2011. *Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. Methods in Cell Biology*. Vol. 103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385493-3.00004-8>.
- Wu, Haohao, Jun-jie Yin, Wayne G Wamer, Mingyong Zeng, and Y Martin Lo. 2014. “Reactive Oxygen Species-Related Activities of Nano-Iron Metal and Nano-Iron Oxides.” *Journal of Food and Drug Analysis* 22 (1): 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.007>.
- Zamora-mora, Vanessa, Mar Fernández-gutiérrez, Álvaro González-gómez, Beatriz Sanz, Julio San, Gerardo F Goya, Rebeca Hernández, and Carmen Mijangos. 2017. “Chitosan Nanoparticles for Combined Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia : From Preparation to in Vitro Studies.” *Carbohydrate Polymers* 157: 361–70. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.084>.

Capítulo VI: Propiedades físico-químicas de nanopartículas de carburo de hierro $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$ y su funcionalización

En este capítulo se presenta la caracterización de las propiedades físicoquímicas de nanopartículas de carburo de hierro $\text{Fe}_{2.2}\text{C}$, y de estas nanopartículas funcionalizadas con diferentes polímeros orgánicos, basados en la combinación de polietilenglicol (PEG) con un grupo catecol (tanto la síntesis de las nanopartículas como los diferentes métodos de funcionalización se han descrito en el *Capítulo II: Materiales y métodos*). En todos los casos se ha prestado especial atención a la medida de la potencia absorbida por suspensiones acuosas de las nanopartículas funcionalizadas, en presencia de un campo magnético alterno, por su posible aplicación en tratamientos de hipertermia magnética.

Además, se presenta la síntesis y caracterización de un nuevo polímero orgánico, con el objetivo futuro de realizar una funcionalización alternativa que mejore los resultados obtenidos con las funcionalizaciones anteriores.

Introducción

Las nanopartículas de carburo de hierro tienen aplicación como catalizadores metálicos de reacciones que tienen lugar a altas temperaturas. Además, estas nanopartículas son ferromagnéticas a temperatura ambiente, presentan campos coercitivos moderados y una buena estabilidad coloidal (Yu et al. 2016)(Xu et al. 2014)(C. Yang et al. 2012)(Me et al. 2012)(Hong et al. 2015)(Wu et al. 2015)(Z. Yang et al. 2017).

En particular, la síntesis de las nanopartículas del carburo de hierro Fe_{2.2}C es muy reciente y como se ha comentado en el *Capítulo II: Materiales y métodos*, se realiza a partir de nanopartículas de Fe (0) (Chaudret et al. 2004)(Amiens et al. 2005)(Lacroix et al. 2009)(Meffre et al. 2011). Las nanopartículas de Fe(0), además de un elevado valor de imanación de saturación, tienen altos valores de SAR. Al realizar una carburación con una mezcla *syngas* de CO y H₂ se obtiene la fase Fe_{2.2}C, que presenta un SAR mucho más elevado (Alexis Bordet et al. 2016)(Me et al. 2012)(A. Bordet et al. 2016a). Por ello, estas nanopartículas son muy buenas candidatas no sólo para catálisis aplicando campos magnéticos alternos, sino para utilizarlas en terapia mediante hipertermia magnética. Sin embargo las nanopartículas de Fe_{2.2}C no son estables en condiciones atmosféricas ni tampoco son estables en disoluciones acuosas lo que hace que deban ser funcionalizadas con polímeros para hacerlas además biocompatibles. Estas son las principales razones de que no haya apenas precedentes de su utilización en biomedicina (Alexis Bordet et al. 2019).

En nuestro caso se ha decidido utilizar una estrategia de funcionalización similar a la seguida para las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C y que se expone en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*, basada en la utilización de compuestos orgánicos, formando polímeros con estructura catecol-PEG. La elección de esta estructura para la funcionalización de las nanopartículas de Fe_{2.2}C se debe a diferentes factores. En principio, dada la buena coordinación que los grupos catecoles han mostrado con nanopartículas de hierro (Gao

et al. 2014)(Alexis Bordet et al. 2019)(Amstad et al. 2009)(Peng et al. 2006)(De Montferrand et al. 2013)(Sangnier et al. 2019), es de esperar que los grupos catecol de los polímeros que utilizaremos se unan también fácilmente a la superficie de las nanopartículas Fe_{2.2}C. Además, como ya se comentó al tratar la funcionalización las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C, los compuestos utilizados para estas síntesis, son baratos, comerciales y comúnmente utilizados.

La presencia de múltiples cadenas de polímeros PEG sobre la superficie de la nanopartícula formará una corona de hidratación que aportará una mejor solubilidad en agua, mayor estabilidad y una mayor biocompatibilidad (Cauda, Argyo, and Bein 2010)(Bailey and Koleske 1976)(Robert L Davidson 1980)(Mutter, M., and Bayer 1979).

En nuestro caso, de entre todos los polímeros mostrados en el *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C funcionalizadas*, las nanopartículas del carburo de hierro se han funcionalizado en primer lugar con el polímero ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂, ya que las nanopartículas de Fe₃O₄@C funcionalizadas con este polímero presentaban una buena estabilidad en agua y unos valores de SAR prometedores para su posterior utilización en hipertermia magnética. A continuación se ha llevado a cabo la funcionalización con un polímero catecol-PEG sintetizado en el laboratorio del Profesor Fernando Novio del grupo de investigación *Nanostructured Functional Materials (Nanosfun)* del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Por último, el objetivo ha sido sintetizar un nuevo polímero orgánico basado también en la combinación catecol-PEG e inspirado en el sintetizado por Bordet y colaboradores (Alexis Bordet et al. 2019), aunque en nuestro caso con diferente cantidad de cadenas PEG y diferentes grupos funcionales. En este caso el polímero cuenta con una cadena alquílica de unos 8-10 carbonos entre el grupo catecol y el PEG (i.e., catecol-(CH₂)_n-PEG), que es de esperar que aporte mayor estabilidad en disoluciones acuosas a las

nanopartículas funcionalizadas, evitando que se produzca la agregación de las nanopartículas (Nerambourg et al. 2008) (ver *Capítulo IV: Caracterización físico-química de nanopartículas de $Fe@C$ y $Fe_3O_4@C$ funcionalizadas*). Además, el polímero que pretendemos sintetizar puede unirse a diferentes grupos terminales. Esta versatilidad va a permitir que las nanopartículas funcionalizadas sean utilizadas para unas aplicaciones u otras, en función de la elección de este grupo terminal.

Esta síntesis ha sido ardua y compleja ya que no existen apenas precedentes de la síntesis de este tipo de polímeros. Después de numerosos ensayos a base de prueba y error, la síntesis del polímero ha quedado interrumpida en una de las últimas etapas, debido a la crisis sanitaria de la COVID-19, por lo que no se ha podido continuar con la funcionalización de las nanopartículas.

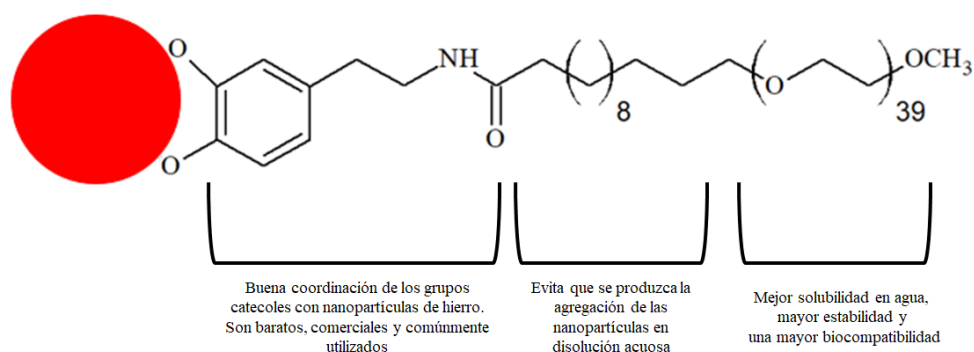


Figura 6.1. Esquema de la estructura del polímero catecol- $(CH_2)_8$ -PEG para las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$.

La complejidad que supone la síntesis del polímero y el trabajo de funcionalización ha hecho necesaria la colaboración de varios grupos de investigación. La síntesis de las nanopartículas de Fe (0) y las de $Fe_{2.2}C$ y las primeras pruebas de funcionalización se realizaron durante una estancia en el laboratorio del grupo del Profesor Bruno Chaudret, del Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO), del CNRS-INSA-Université Paul Sabatier de Toulouse (Francia). Además se ha trabajado junto con los

grupos del Profesor Fernando Novio y del Profesor Daniel Ruíz-Molina del grupo de investigación *Nanostructured Functional Materials (Nanosfun)* del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y del Profesor Félix Busqué del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona (ambos especializados en química orgánica), durante una estancia en sus laboratorios. Otros grupos con los que se ha colaborado son el grupo de la Profesora Teresa Sierra, del Laboratorio de Cristales Líquidos del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza), y con el grupo del Profesor Babil Menjón, del Instituto de Síntesis Química y Catálisis Homogénea-ISQCH (CSIC-Universidad de Zaragoza) y del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

6.1 Caracterización de nanopartículas de carburo de hierro Fe_{2.2}C

La síntesis de las nanopartículas del carburo de hierro Fe_{2.2}C se realizó en dos etapas independientes (ver *Capítulo II: Materiales y métodos*), siguiendo la metodología descrita en la literatura (Lacroix et al. 2009)(A. Bordet et al. 2016b). En una primera reacción se obtienen las nanopartículas de Fe (0). Las propiedades de estas nanopartículas (en concreto su estructura cristalográfica, tamaño y propiedades magnéticas) son muy sensibles a las condiciones de síntesis, ya que una mínima variación en las cantidades de los reactivos o la presencia de oxígeno en el ambiente conducen a la total oxidación de las nanopartículas. Tras esta primera reacción se realiza el proceso de carburación de las nanopartículas de Fe (0) hasta obtener las nanopartículas de carburo de hierro, también muy inestables y sensibles a la presencia de oxígeno. Por ello, las distintas etapas de síntesis se llevan a cabo en caja seca. La precisión en la síntesis es fundamental para obtener la composición deseada, y el alto valor del coeficiente de absorción de potencia (SAR) que caracteriza a estas nanopartículas (Alexis Bordet et al. 2016)(Asensio et al. 2019).

6.1.1 Caracterización de nanopartículas de Fe (0)

6.1.1.1 Difracción de rayos X

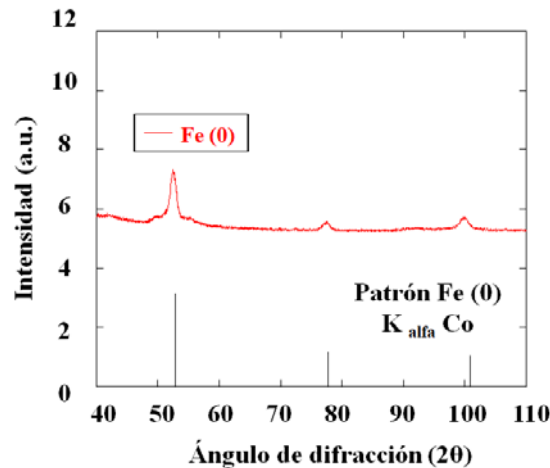


Figura 6.2. Patrón de difracción de las nanopartículas de Fe (0) comparado con un patrón de Fe (0) (ref. Patrón 00-006-0696 X'Pert HighScore) (la radiación utilizada es la K_α del Co).

La composición de las nanopartículas se ha analizado mediante difracción de rayos X. Para ello, dentro de la caja seca, el polvo con las nanopartículas se coloca en un portamuestras que se sella antes de llevarlo al difractómetro. En este caso, la longitud de onda utilizada en el difractómetro de rayos X es la correspondiente a la línea K_α del Co. En la *figura 6.2* se presenta el patrón de difracción del Fe (0) comparado con el patrón de difracción de las nanopartículas sintetizadas (A. Bordet et al. 2016b). Como se puede observar, los picos más intensos y característicos del Fe (0) coinciden con los del patrón de difracción obtenido experimentalmente, confirmando la presencia de Fe (0) en las partículas.

6.1.1.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La caracterización morfológica de las nanopartículas de Fe (0) se ha realizado mediante microscopía TEM.

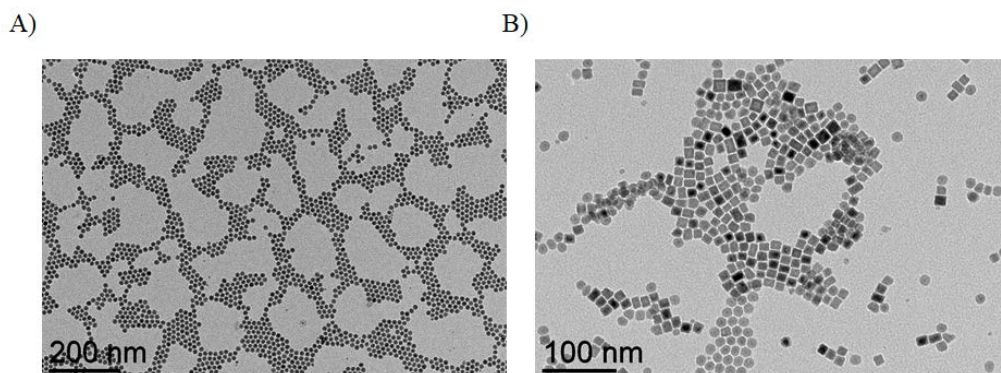


Imagen 6.1 Imagen TEM de las nanopartículas de Fe (0) de un tamaño aproximado de 12,5 nm.

Como se puede observar en la *imagen 6.1 (A)*, las nanopartículas de Fe (0) tienen un tamaño muy homogéneo, alrededor de los 12,5 nm en buen acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente siguiendo el mismo procedimiento de síntesis (Asensio et al. 2019). Este diámetro junto con la homogeneidad de la distribución de tamaño, es una de las claves para la obtención de los altos valores de SAR que se han obtenido para este compuesto (Asensio et al. 2019). Como se observa en la *imagen 6.1 (B)*, las nanopartículas se dispersan fácilmente en la rejilla de TEM, sin formar apenas agregados.

6.1.1.3 Caracterización magnética

La caracterización magnética de las nanopartículas de Fe (0) se llevó a cabo en un magnetómetro VSM. La medida de imanación se llevó a cabo en una muestra de polvo (sellando el portamuestras en la caja seca), a temperatura ambiente, aplicando un campo magnético máximo de 3 Tesla.

Como se observa en la *figura 6.3*, la imanación satura prácticamente a 1 Tesla, siendo la magnetización de saturación igual a 163,83 emu/g. La discrepancia entre este valor y el obtenido en nanopartículas de Fe (0) sintetizadas con anterioridad (Lacroix et al. 2009) está probablemente en que el contenido de hierro de las nanopartículas sintetizadas en nuestro caso es menor. El campo coercitivo es igual a 220 Oe, lo que confirma el carácter ferromagnético de las nanopartículas (ver inset en la *figura 6.3*).

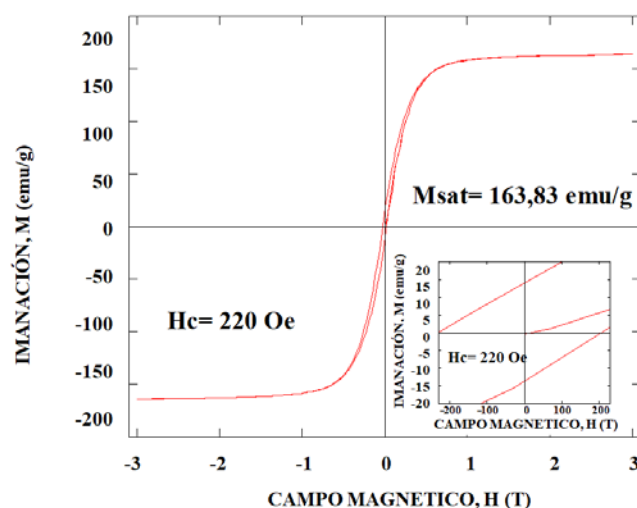


Figura 6.3. Ciclo de histéresis de las nanopartículas de Fe (0). En el inset se representa la región de bajo campo, observándose el campo coercitivo.

6.1.1.4 Medida del coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)

El estudio de la absorción de potencia se ha llevado a cabo resuspendiendo las nanopartículas de Fe (0) en mesitileno, dado que el hierro metálico se oxidaría al contacto con el agua.

Las medidas para la obtención del SAR se llevaron a cabo durante la estancia realizada en el Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO), del CNRS-INSA-

Université Paul Sabatier de Toulouse (Francia). El equipo utilizado trabaja a una frecuencia constante de 100 kHz y permite variar la amplitud del campo magnético alterno desde 0 mT hasta 50 mT.

En la *figura 6.4* se representa la variación del SAR en función de la amplitud del campo magnético. El SAR es prácticamente nulo hasta aproximadamente 40 mT, campo a partir del cual aumenta muy rápidamente hasta cerca de los 800 W/g cuando se aplica el campo máximo. Este valor está en buen acuerdo con lo observado en las nanopartículas sintetizadas previamente (Meffre et al. 2011) y en consonancia con el tamaño, morfología y propiedades magnéticas comentadas en los apartados anteriores. Por ello las nanopartículas de Fe (0) sintetizadas pueden ser consideradas como buenos precursores para la preparación de nanopartículas del carburo Fe_{2.2}C buscado.

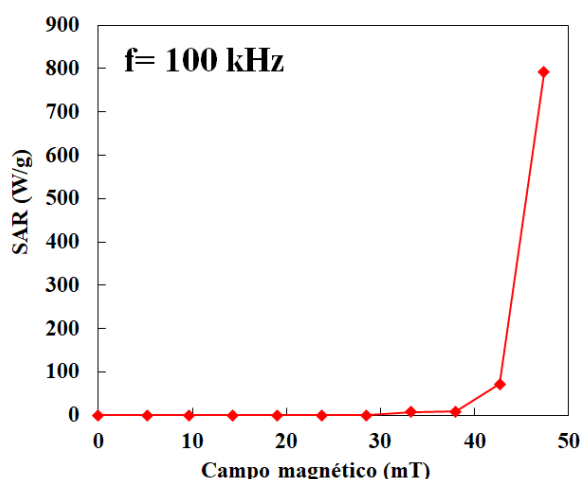


Figura 6.4. SAR de la muestra de Fe (0) cuando la medida se realiza a y diferentes campos magnéticos entre 0 mT y 50 mT manteniendo fija una frecuencia de 100 kHz.

6.1.2 Caracterización de nanopartículas de $Fe_{2.2}C$

6.1.2.1 Difracción de rayos X

El proceso de carburación de las nanopartículas de Fe (0) para la obtención de nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ se encuentra descrito en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. En la *figura 6.5* se presenta el patrón de difracción de rayos X obtenido utilizando la radiación K_{α} del Co, correspondiente a las nanopartículas resultado de la carburación. Al igual que en el caso de las nanopartículas de Fe(0), la muestra en polvo se prepara y sella en el interior de la caja seca antes de llevarla al difractómetro. En el difractograma, los cuadrados señalan los picos característicos de los patrones de Fe (0) y de $Fe_{2.2}C$.

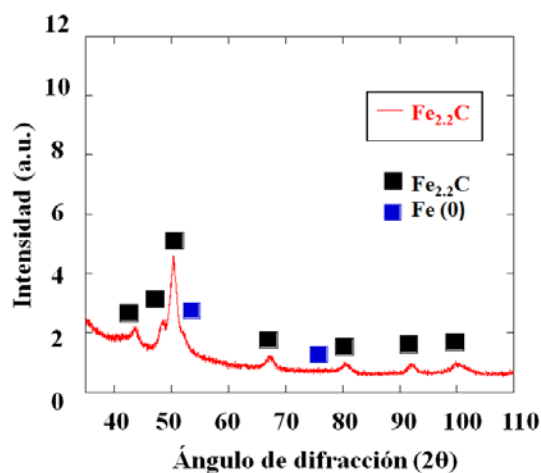


Figura 6.5. Patrón de difracción de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ (línea roja). Los cuadrados señalan los picos de difracción característicos en los patrones de difracción de Fe (0) (ref. Bordet et al. 2016) y de $Fe_{2.2}C$ (ref. Bordet et al. 2016) (la radiación utilizada es la K_{α} del Co).

Como puede verse, existe una buena coincidencia con el patrón del carburo de hierro, con una pequeña contribución de Fe (0), lo que indica que se ha obtenido la fase deseada, aunque una pequeña parte de Fe (0) no ha reaccionado.

6.1.2.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

La morfología de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ se ha estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

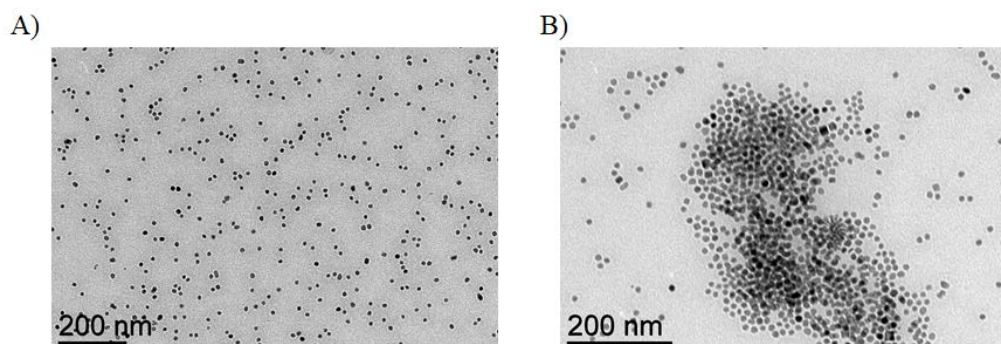


Imagen 6.2. Imagen TEM de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ de un tamaño aproximado de 15 nm.

De acuerdo con la *imagen 6.2 (A)* las nanopartículas tienen un tamaño en torno a 15 nm. La mayoría de las nanopartículas se encuentran muy bien dispersadas gracias a la adición de la hexadecilamina y el ácido palmítico durante la síntesis (Asensio et al. 2019). No obstante, en algunas ocasiones se observan agregados como los mostrados en la *imagen 6.2 (B)*. Estos agregados aparecen debido a que durante la síntesis algunos ligandos no se unen bien a los núcleos magnéticos. Sin embargo, la fracción de agregados en la muestra parece ser muy pequeña, dado el elevado valor del SAR que, como se verá más adelante, se ha obtenido para estas nanopartículas.

6.1.2.3 Caracterización magnética

La caracterización magnética de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ se llevó a cabo en un magnetómetro VSM. La medida de imanación se llevó a cabo con la muestra en polvo (sellando el portamuestras en el interior de la caja seca), a temperatura ambiente, aplicando un campo magnético máximo de 3 Tesla.

Según la isoterma mostrada en la *figura 6.6* las imanación alcanzan prácticamente la saturación para un campo magnético aplicado igual a 3 Tesla, y presenta un valor igual a 143,94 emu/g. La discrepancia entre este valor y el obtenido en nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ sintetizadas con anterioridad (Asensio et al. 2019) está probablemente en que el contenido de $Fe_{2.2}C$ de las nanopartículas sintetizadas en nuestro caso es menor. La imanación presenta histéresis, siendo el valor del campo coercitivo igual a 400 Oe (ver inset *figura 6.6*). Este comportamiento ferromagnético es semejante a los obtenidos en nanopartículas sintetizadas por el mismo método (Asensio et al. 2019).

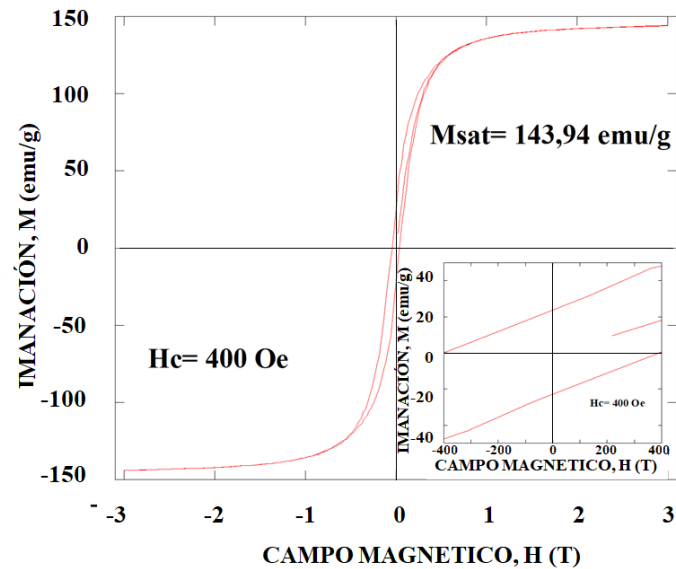


Figura 6.6. Ciclo de histéresis de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$. En el inset se representa la región de bajo campo, observándose el campo coercitivo.

6.1.2.4 Coeficiente de absorción específica de potencia (SAR)

Al igual que en el caso de las nanopartículas de Fe (0) la medida del SAR se ha llevado a cabo en nanopartículas redispersadas en una disolución de mesitileno, para evitar su oxidación en contacto con el aire y el agua.

Las medidas para la obtención del SAR se llevaron en el equipo del Laboratoire de Physique et Chimie des Nano-objets (LPCNO), del CNRS-INSA-Université Paul Sabatier de Toulouse, que trabaja a una frecuencia constante de 100 kHz y permite variar la amplitud del campo magnético alterno desde 0 mT hasta 50 mT.

En la *figura 6.7* se muestra la dependencia del SAR de la amplitud del campo magnético aplicado. Hasta 25 mT el SAR es nulo, aumentando rápidamente hasta alcanzar un máximo cercano a los 1400 W/g, al aplicar el campo magnético máximo. Este valor es un 20% menor que los 2000 W/g obtenidos en el caso de nanopartículas de Fe₂C sintetizadas por el mismo método (Asensio et al. 2019). Esta discrepancia podría ser debida a la existencia de agregados de nanopartículas en la suspensión. Como se ha mencionado anteriormente su cantidad parece ser pequeña, de acuerdo con las imágenes de TEM tomadas en distintas regiones de la rejilla portamuestras de TEM, aunque las imágenes de TEM pueden no ser representativas de toda la muestra. Por otra parte, el menor valor del SAR podría ser debido a que las nanopartículas presentasen un menor contenido en hierro que las sintetizadas anteriormente (Asensio et al. 2019). En cualquier caso, el valor de SAR obtenido está entre los más elevados conseguidos con nanopartículas magnéticas (Bonvin et al. 2017)(Alexis Bordet et al. 2016) por lo que son candidatas para utilizarlas como agentes de calentamiento en tratamientos mediante hipertermia magnética.

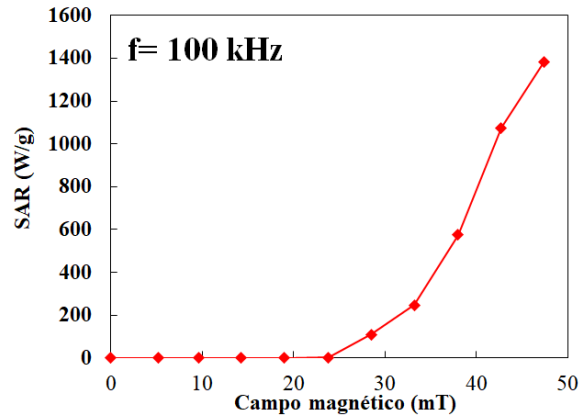


Figura 6.7. SAR de la muestra de $Fe_{2.2}C$ cuando la medida se realiza a y diferentes campos magnéticos entre 0 mT y 50 mT manteniendo fija una frecuencia de 100 kHz

6.1.2.5 Análisis termogravimétrico (TGA)

Para analizar el origen de la discrepancia entre los valores de las propiedades magnéticas de las nanopartículas sintetizadas (fundamentalmente del valor del SAR) y los que se observaron anteriormente, se ha determinado la cantidad de hierro mediante análisis termogravimétrico.

De acuerdo con los resultados presentados en la *figura 6.8* la cantidad de hierro presente en nuestras nanopartículas es de un 88% de la masa total de la muestra.

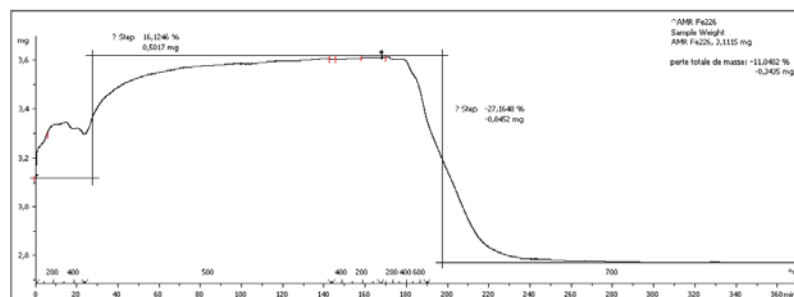


Figura 6.8. Análisis termogravimétrico de una muestra de nanopartículas de $Fe_{2.2}C$.

En cualquier caso, las nanopartículas sintetizadas presentan un tamaño similar al publicado en la literatura, así como un alto valor de la imanación y un SAR elevado. Por ello el siguiente paso es su funcionalización para obtener suspensiones acuosas biocompatibles y estables, con el fin de utilizarlas en aplicaciones biomédicas.

6.2 Caracterización de nanopartículas $Fe_{2.2}C$ funcionalizadas con polímeros orgánicos

Presentamos en esta sección la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas funcionalizadas con ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2 y con un polímero basado en la combinación catecol-PEG. Los métodos de funcionalización se han descrito en el *Capítulo II: Materiales y Métodos*.

6.2.1 Caracterización de nanopartículas $Fe_{2.2}C$ funcionalizadas con ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2

La funcionalización utilizando el polímero ácido cafeico/ NH_2 -PEG- NH_2 se realizó en el laboratorio del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza del Profesor Babil Menjón. La caracterización de las nanopartículas funcionalizadas se llevó a cabo en los laboratorios del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza) y del Instituto de Nanociencia de Aragón-INA (Universidad de Zaragoza).

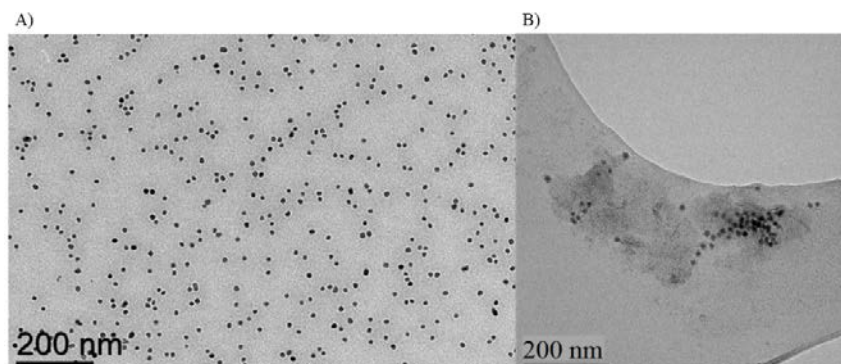


Imagen 6.3. Imagen de TEM de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ sin funcionalizar (A) y funcionalizadas (B).

Tal y como muestra la imagen 6.3 la funcionalización ha dado como resultado la formación de una matriz polimérica recubriendo las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$. Sin embargo, si en la muestra de $Fe_{2.2}C$ los núcleos magnéticos se encuentran bien dispersos, tal y como se ve en la imagen 6.3 (A) cuando se realiza la funcionalización, estos núcleos se aglomeran formando, en algunas ocasiones, aglomerados micrométricos (imagen 6.3 B).



Imagen 6.4. Imagen de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ funcionalizadas con ácido caféico/ NH_2 -PEG- NH_2 . A la izquierda, se observa la muestra inmediatamente después de la funcionalización de las nanopartículas. A la derecha se observa la muestra a los pocos minutos, en la que las nanopartículas han precipitado.

Nada más acabar la reacción de funcionalización, las nanopartículas están bien dispersas en disolución acuosa (*imagen 6.4 izq.*) pero pasados pocos minutos, las partículas comienzan a agregarse y a formar grandes aglomerados micrométricos que precipitan, tal y como se observa en la *imagen 6.4. drcha.* Probablemente, estos agregados se forman porque, aunque al inicio la reacción de funcionalización haya ido bien, conforme pasa el tiempo la dopamina autopolimeriza al estar en contacto con el oxígeno atmosférico y del agua. La presencia de estos grandes agregados parece la razón fundamental de la disminución del valor del SAR, que en las muestras funcionalizadas pasa a ser 30 W/g, mucho menor que en las nanopartículas sin funcionalizar (las medidas fueron realizadas aplicando un campo alterno de 300 Gauss de amplitud y 578 kHz de frecuencia). Evitar la agregación es lo que, se pretende resolver con las modificaciones del polímero que se presentan en las secciones siguientes.

El análisis mediante rayos X confirma sin embargo que después de la funcionalización y en suspensión acuosa las nanopartículas no se han oxidado totalmente y siguen conservando la fase Fe_{2.2}C, aunque la intensidad de los picos característicos del carburo en el difractograma de la *figura 6.9* es muy débil. Esto podría ser debido a que la contribución del polímero al patrón de difracción sea mucho mayor que la contribución de las nanopartículas. Además, las nanopartículas siguen conservando su carácter magnético, siendo atraídas cuando se coloca un imán próximo al vial que contiene la suspensión, lo que confirma la presencia de la fase magnética en una proporción razonable.

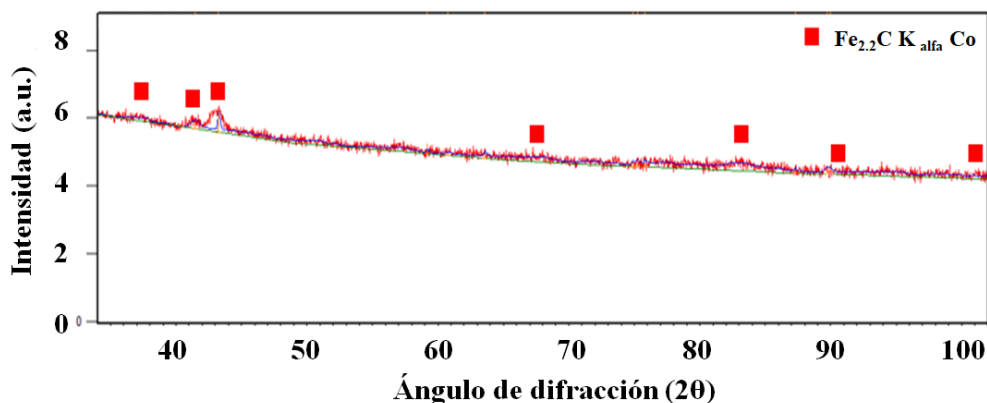


Figura 6.9. Análisis por difracción de rayos X de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ funcionalizadas con ácido caféico y NH_2 -PEG- NH_2 . La radiación utilizada es la $K\alpha$ del Co.

6.2.2 Caracterización de nanopartículas $Fe_{2.2}C$ funcionalizadas con Catecol-PEG

La funcionalización de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ con un polímero orgánico con estructura catecol-PEG se describe en el *Capítulo II: Materiales y métodos*. Se realizó en el laboratorio del Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza del Profesor Babil Menjón. El polímero, cuya estructura se muestra en la *figura 6.10*, se sintetizó en colaboración con el laboratorio del Profesor Fernando Novio del grupo de investigación *Nanostructured Functional Materials (Nanosfun)* del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) de la Universitat Autònoma de Barcelona. En este caso, el polímero consta de una cadena de 40 polímeros PEG unida a un grupo catecol y a un grupo OCH_3 terminal.

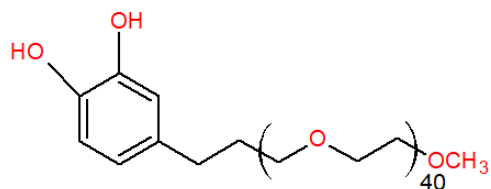


Figura 6.10. Estructura del polímero catecol-PEG con el que se ha realizado la funcionalización de las nanopartículas de $Fe_{2.2}C$.

Las nanopartículas funcionalizadas y en suspensión acuosa siguen siendo magnéticas, aunque precipitan a los pocos minutos. Aunque algunas imágenes de TEM muestran partículas bien dispersas y aisladas (ver imagen 6.5. A), la muestra contiene también grandes agregados como el que se muestra en la imagen 6.5 (B), cuyo tamaño es de varias micras. La presencia de agregados en la suspensión de gran diámetro hidrodinámico (alrededor de 5 micras) ha sido confirmada por los resultados obtenidos utilizando la técnica DLS.

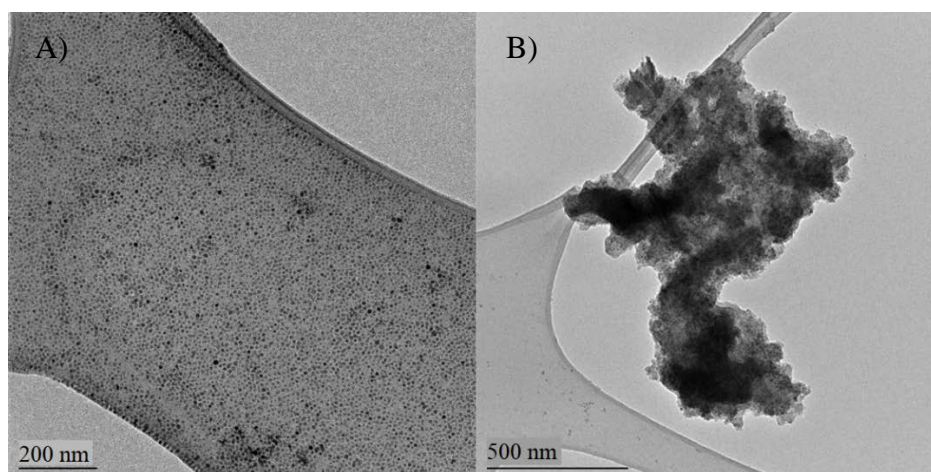


Imagen 6.5. Nanopartículas de $Fe_{2.2}C$ recubiertas con el polímero cat-PEG. En la imagen 6.5 (A), se muestra una gran extensión de nanopartículas bastante bien dispersas en la disolución. En la imagen 6.5 (B) se muestra los grandes agregados presentes en la muestra funcionalizada con cat-PEG.

La presencia de estos agregados es con toda probabilidad la razón por la cual estas nanopartículas no calientan en experimentos de absorción de potencia y por tanto su valor de SAR es nulo.

6.3 Síntesis del polímero Catecol-(CH₂)₈-PEG para la funcionalización de nanopartículas magnéticas Fe₂C

Por último, el objetivo ha sido sintetizar un nuevo polímero orgánico similar al basado en la combinación catecol/PEG pero con una cadena alquílica de unos 8-10 carbonos entre el grupo catecol y el PEG. Es de esperar que una cadena de esta longitud aporte mayor estabilidad en disoluciones acuosas a las nanopartículas funcionalizadas y prevenga la formación de agregados. Además las múltiples cadenas de PEG aportarán una mejor solubilidad en agua, mayor estabilidad y una mayor biocompatibilidad.

El polímero a sintetizar tiene una estructura como la que se muestra en la *figura 6.11*. Esta síntesis, se ha realizado durante una estancia en los laboratorios del Profesor Fernando Novio y del Profesor Daniel Ruíz-Molina del grupo de investigación *Nanostructured Functional Materials (Nanosfun)* del Instituto Catalán de Nanociencia y Nanotecnología (ICN2) y del Profesor Félix Busqué del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universitat Autònoma de Barcelona, y también gracias a la colaboración con el Laboratorio de Cristales Líquidos del de la Profesora Teresa Sierra, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y del Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón-ICMA (CSIC-Universidad de Zaragoza).

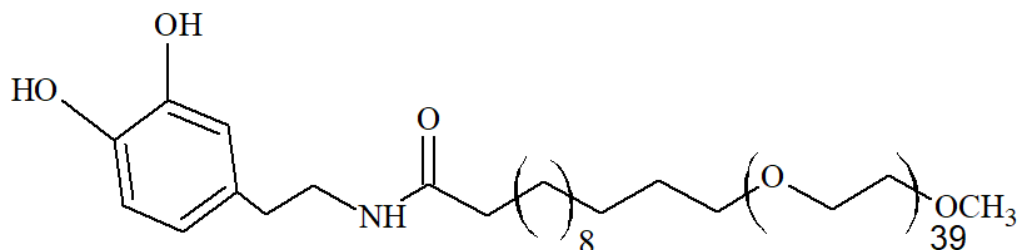


Figura 6.11. Polímero catecol- $(CH_2)_8$ -PEG.

En la síntesis de este polímero se distinguen dos etapas que se describen a continuación: la oxidación del PEG-OCH₃ y la síntesis del ligando Catecol- $(CH_2)_8$.

6.3.1 Oxidación PEG-OCH₃

La oxidación del PEG-OCH₃ se lleva a cabo para unirlo posteriormente al ligando catecol- $(CH_2)_8$.

A una disolución de 501 mg de PEG-OCH₃ (0,25 mmol) en 5 ml de CH₂Cl₂ anhidro en atmósfera inerte de argón, se añaden 187 mg (0,425 mmol) de DMPI (peróxido de Dess-Martin). El DMPI se utiliza para la oxidación de alcoholes primarios a aldehídos y alcoholes secundarios a cetonas (Dess and Martin 1983). El esquema de la reacción se presenta en la *figura 6.12*. La reacción se deja durante 4 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añade una disolución preparada de NaHCO₃/Na₂S₂O₃·5H₂O (5 ml) para parar la reacción y se realizan extracciones con CH₂Cl₂. La fase orgánica se seca con Na₂SO₃ y se evapora a presión reducida obteniéndose un aceite que se recrystaliza con éter frío, obteniéndose 332 mg de un sólido blanco con un rendimiento del 66%.

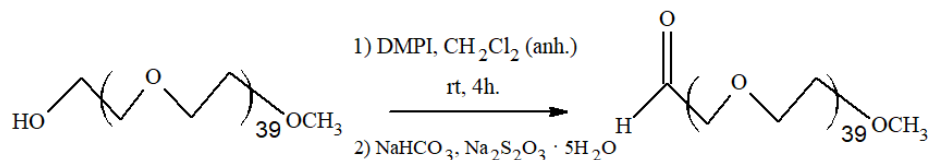


Figura 6.12. Oxidación de Dess-Martin del PEG- OCH_3 .

En la figura 6.13 se muestra el espectro 1H RMN del producto de esta reacción, que se corresponde con el PEG- OCH_3 oxidado.

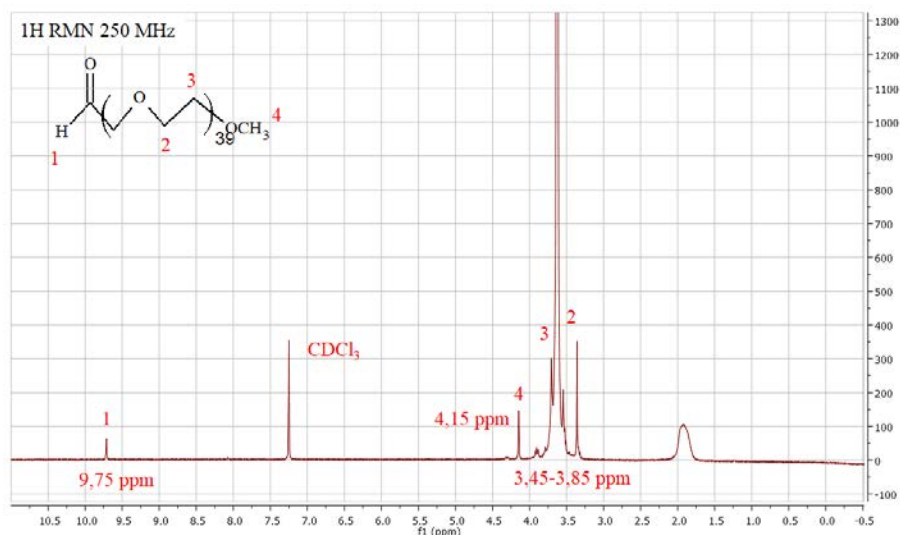


Figura 6.13. Espectro 1H RMN del PEG- OCH_3 oxidado.

6.3.2 Síntesis del ligando Catecol- $(CH_2)_8$

Esta síntesis tiene lugar en cinco etapas, siguiendo el protocolo presente en la literatura (Yan et al. 2013).

En el primer paso, a una disolución del ácido 10-bromodecanoico (500 mg, 1,99 mmol, 1 eq.) y la N-hidroxisuccinimida (229 mg, 1,99 mmol, 1 eq.) en diclorometano a 0 °C se le añade, gota a gota, una disolución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida (492 mg, 2,38

mmol, 1,2 eq.). Tras 15 minutos se añaden 48 mg (0,4 mmol, 0,2 eq.) de 4-dimetilaminopiridina en sólido y se deja durante 1 hora a 0 °C. Transcurrido este tiempo, se deja la reacción 24 horas a temperatura ambiente. Todos estos pasos, se realizan en atmósfera inerte de N_2 . El esquema de la reacción se presenta en la *figura 6.14*.

Una vez terminada la reacción, se lava el crudo con diclorometano y se realizan 3 extracciones con diclorometano/agua. La fase orgánica, se seca, se evapora a presión reducida y el sólido obtenido se purifica mediante cromatografía de columna utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 3:1 obteniéndose un sólido amarillo con un 42% de rendimiento.

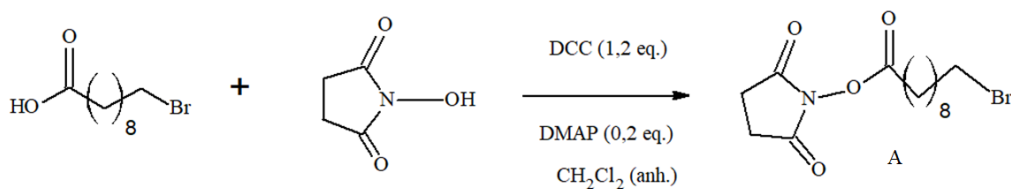


Figura 6.14. Primer paso de la síntesis del ligando catecol-(CH₂)₈.

En la *figura 6.15* se muestra el espectro ¹H RMN del producto de esta reacción, que se corresponde con el del compuesto A esperado, lo que indica que la primera etapa de esta síntesis se ha realizado con éxito.

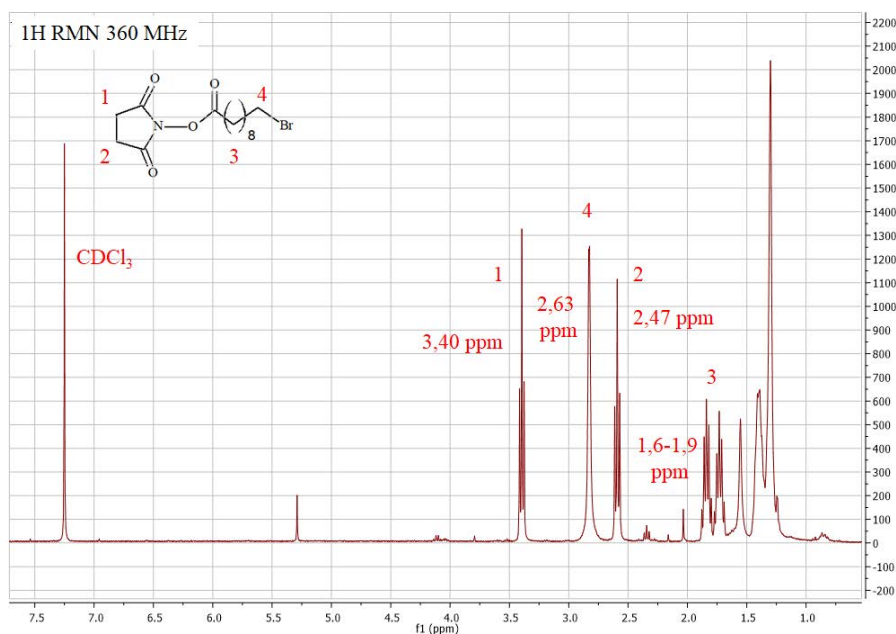


Figura 6.15. Espectro 1H RMN del primer paso de la síntesis del ligando catecol- $(CH_2)_8$ en un equipo RMN operando a 360 MHz.

Finalizado este primer paso, se continúa con la síntesis del ligando a partir del compuesto A obtenido (Yan et al. 2013). Para ello, a una disolución de 3,4-dibenciloxifenetilamina (310 mg, 0,83 mmol, 1 eq.) en dimetilformamida (DMF) (anh.) que se encuentra en atmósfera inerte de N_2 se añaden 214 mg (1,66 mmol, 2 eq.) de N,N-Diisopropiletilamina (DIPEA) y 292 mg (0,83 mmol, 1 eq.) del compuesto A sintetizado previamente, y se deja reaccionar durante 52 horas. El esquema de la reacción se presenta en la figura 6.16. Transcurrido este tiempo, se evapora la DMF a presión reducida y el sólido obtenido se disuelve en acetato de etilo, y se realizan lavados con HCl 1M, brine y agua. La fase orgánica, se seca con $MgSO_4$ y se evapora obteniendo un sólido que se purifica por columna cromatográfica, utilizando como eluyente acetato de etilo/hexano (3:1). Se obtienen así 200 mg del compuesto B que es un sólido amarillo, con un rendimiento del 34%.

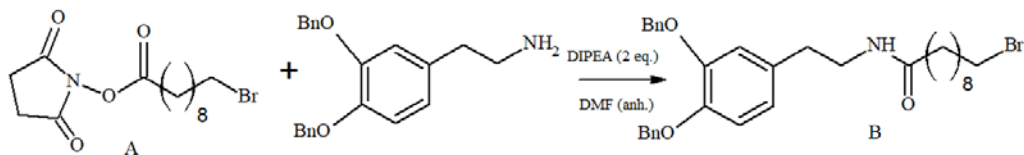


Figura 6.16. Segundo paso de la síntesis del ligando catecol- $(CH_2)_8$.

La figura 6.17 muestra el espectro 1H RMN del producto de esta reacción, que se corresponde con el del compuesto B esperado en esta segunda etapa de la síntesis del ligando Catecol- $(CH_2)_8$.

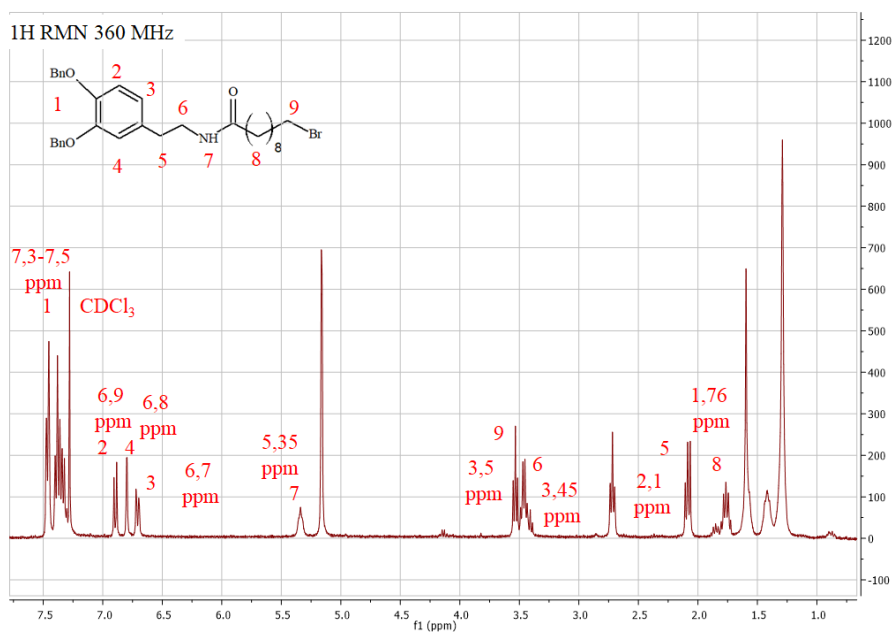


Figura 6.17. Espectro 1H RMN del segundo paso de la síntesis del ligando catecol- $(CH_2)_8$ en un equipo de 360 MHz.

Posteriormente, se sustituye el Br terminal del compuesto B por un I, lo que favorecerá el último paso de la reacción, es decir, la unión entre el ligando catecol- $(CH_2)_8$ con el

PEG-OCH₃ previamente oxidado. Para ello y siguiendo los pasos descritos en la literatura (Groendyke, Modak, and Cook 2019), en un matraz se pone una disolución de 60 mg de NaI (0,4 mmol, 2,2 eq.) en acetona (3 ml) en atmósfera inerte de Ar y se deja durante 10 minutos en agitación hasta que está todo en disolución. Transcurridos 10 minutos, se añade una disolución de 100 mg del compuesto B (ver *figura 6.16*) (0,18 mmol, 1 eq.) en acetona (7 ml). La disolución, se deja 1 noche a reflujo. El esquema de la reacción se presenta en la *figura 6.18*. Transcurrido este tiempo, se observa que la reacción ha avanzado porque se forma un precipitado blanco, que se filtra y se lava con acetona. El disolvente, se evapora a presión reducida y el sólido obtenido, se disuelve en dietil éter, realizándose extracciones con Na₂S₂O₃ (saturado), H₂O y brine. La fase orgánica se seca con MgSO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida y obteniéndose, 64 mg del compuesto C que es un sólido oleoso con un rendimiento del 60%.

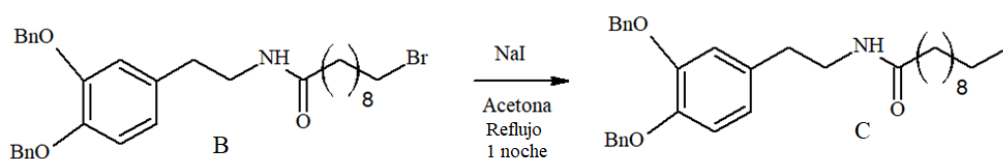


Figura 6.18. Tercer paso de la síntesis del ligando catecol-(CH₂)₈.

En la *figura 6.19* se muestra el espectro ¹H RMN del producto de esta reacción, que se corresponde con el del compuesto C esperado.

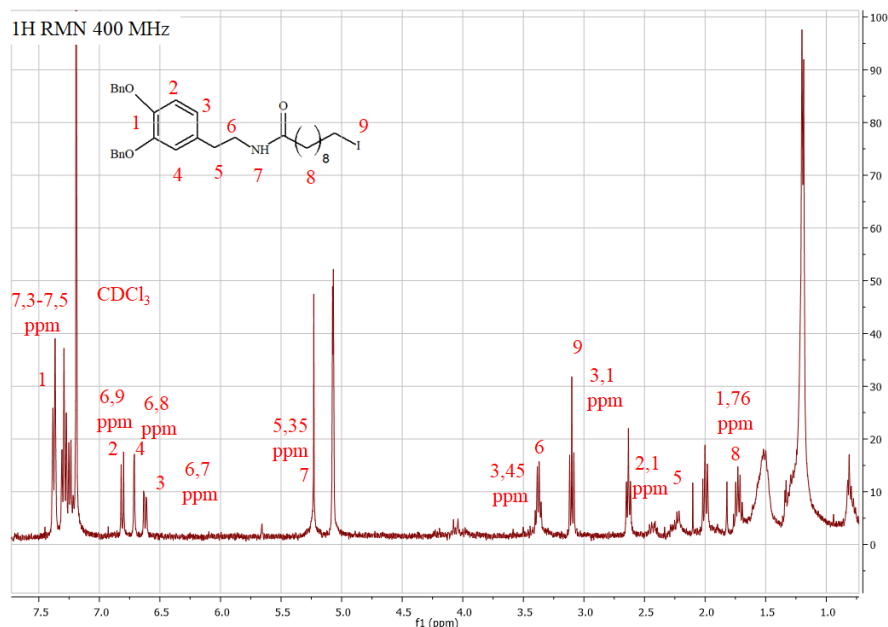


Figura 6.19. Espectro $1H$ RMN del tercer paso de la síntesis del ligando catecol- $(CH_2)_8$ en un equipo de 400 MHz.

Finalmente se llega al último paso de la reacción, el enlace entre el ligando catecol- $(CH_2)_8$ y el PEG- OCH_3 previamente oxidado. Esta reacción se realiza en dos etapas: una primera en la que se forma una sal de iluro en el ligando, seguida de una reacción de Wittig, para formar un enlace C-C entre el ligando y el PEG.

En primer lugar, en la formación de la sal de iluro (ver figura 6.20), a una disolución de 40 mg (0,07 mmol, 1 eq.) del compuesto C en tolueno (3 ml), se añaden 60 mg (0,21 mmol, 3 eq.) de PPh_3 y se deja la reacción durante 48 horas a reflujo. Transcurridas las 48 horas, el matraz de la reacción se pone en un baño de agua y hielo, formándose en el fondo del matraz un aceite marrón que precipita. Este aceite marrón, se lava con tolueno frío, y posteriormente se disuelve en diclorometano. Se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose 28 mg del compuesto D, que es un sólido oleoso marrón con un rendimiento del 58%.

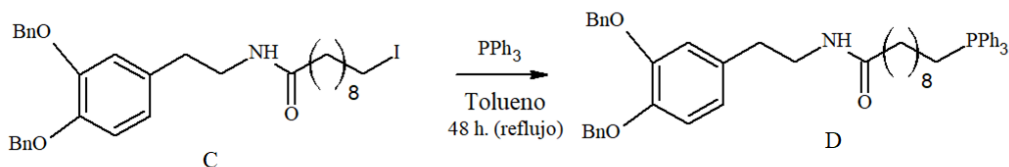


Figura 6.20. Síntesis del iluro de fósforo.

La figura 6.21 muestra el espectro 1H RMN del producto de esta reacción, que se corresponde con el del compuesto D esperado.

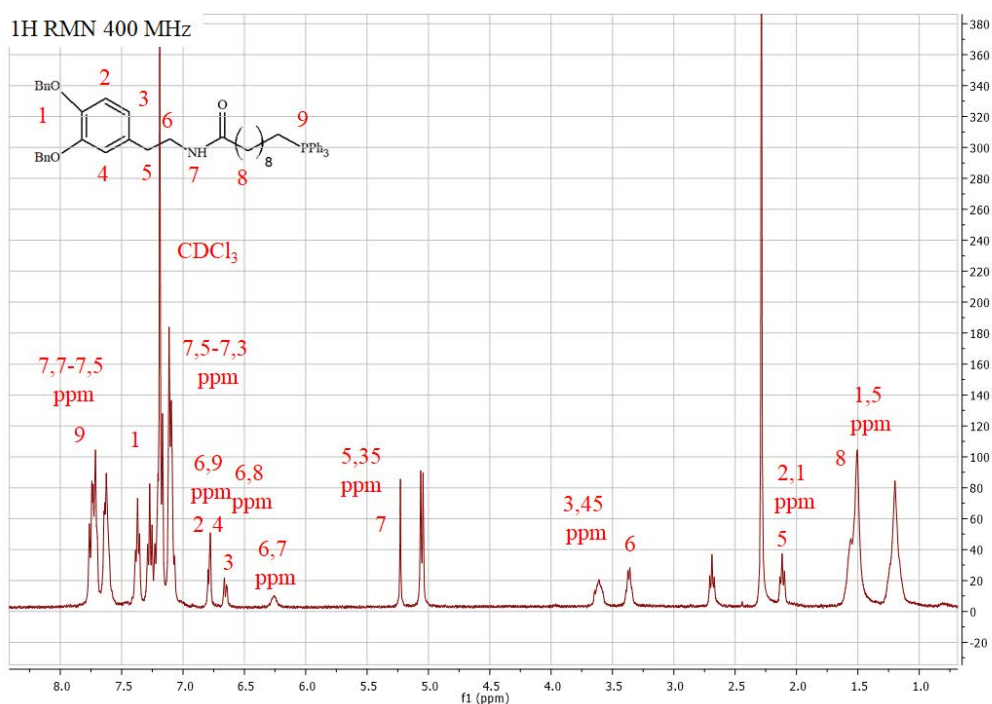


Figura 6.21. Espectro 1H RMN del iluro de fósforo formado en un equipo de 400 MHz.

Por último se realiza la unión entre el ligando catecol- $(CH_2)_8$ y el PEG- OCH_3 mediante la reacción de Wittig (Wittig 1956), siguiendo el protocolo descrito en la literatura (Pronin et al. 2015).

Para ello (ver figura 6.22), a una disolución de 28 mg del compuesto D (0,039 mmol, 1 eq.) en 2 ml de THF anhidro y bajo atmósfera inerte de Ar se añaden 3 mg de n-BuLi (0,039 mmol, 1 eq.) a -78 °C y se deja actuar durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lleva la reacción a 0 °C y se añade una disolución del PEG-OCH₃ (80 mg, 0,039 mmol, 1 eq.) en 2 ml de THF anhidro y bajo atmósfera inerte de Ar. La disolución se deja 1 noche a reacciona temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, la reacción se para, el disolvente se evapora a presión reducida y el sólido obtenido, se purifica mediante una columna cromatográfica usando como eluyente CH₂Cl₂/MeOH (95/5).

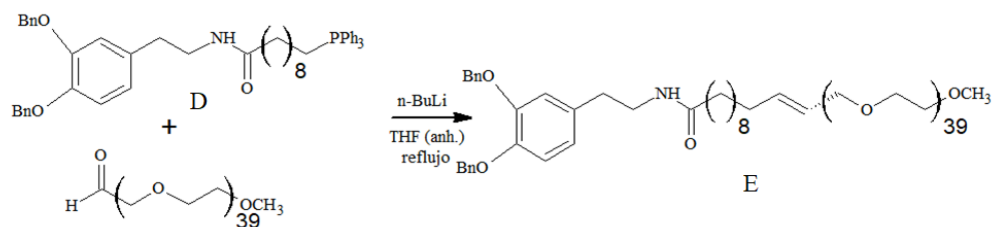


Figura 6.22. Reacción de Wittig.

Como resultado de esta purificación se han obtenido dos fracciones. En la figura 6.23 se muestra el espectro RMN de una de ellas. Este espectro presenta unas señales similares a las del PEG-OCH₃. En la figura 6.24 se muestra el espectro RMN de la otra fracción extraída de la columna cromatográfica, que coincide con el espectro RMA del producto D de partida. Estos resultados indican que la reacción de Wittig no ha tenido lugar. Las posibles causas podrían ser una mala elección de reactivos pudiendo haber elegido otros, o a la posible presencia de agua en la reacción.

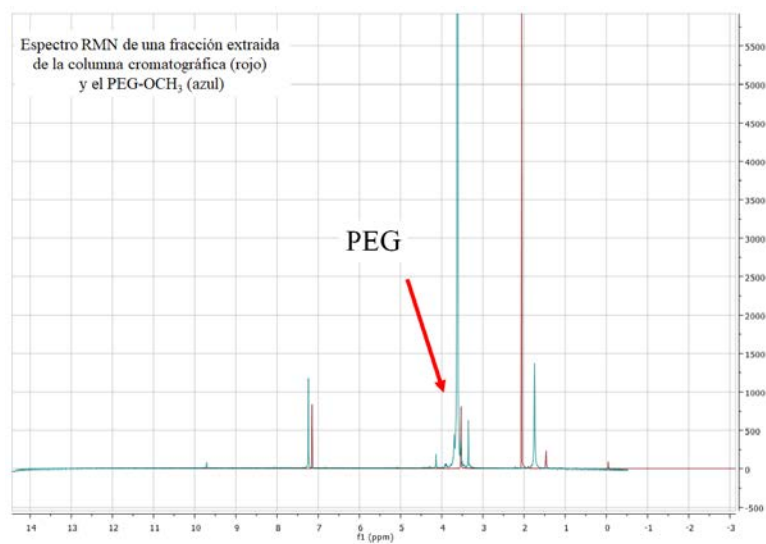


Figura 6.23. Espectro $1H$ RMN de una fracción de la columna cromatográfica comparada con el espectro $1H$ -RMN del PEG-OCH₃ en un equipo de 400 MHz.

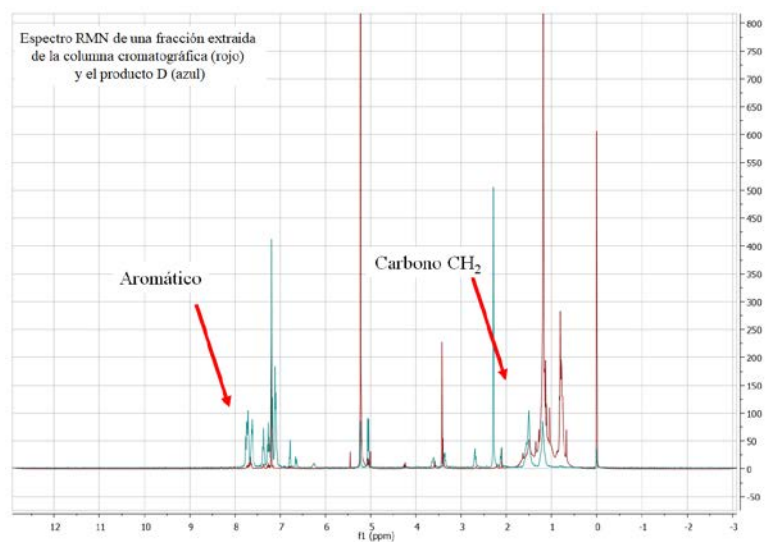


Figura 6.24. Espectro $1H$ RMN de una fracción de la columna cromatográfica comparada con el espectro $1H$ -RMN del producto D en un equipo RMN operando a 400 MHz.

Debido al cierre de los laboratorios en marzo de 2020 y a la parada de la actividad asociada a la COVID-19, el trabajo de síntesis se interrumpió durante más de 2 meses, afectando los plazos previstos para la síntesis del polímero. Aunque la actividad se retomó lo más pronto posible, los pocos intentos que pudieron realizarse no tuvieron éxito, lo que impidió la continuación de la síntesis del polímero, la posterior funcionalización y la medida del SAR de las nanopartículas de Fe_{2,2}C en suspensión acuosa que nos habíamos marcado como objetivo.

6.4 Conclusiones

Se han sintetizado nanopartículas de Fe (0) y de Fe_{2,2}C de tamaño homogéneo, bien dispersas y estables en una disolución de metileno. Sus valores de imanación y del coeficiente de absorción de potencia (SAR) son comparables a los de la literatura.

Tanto la funcionalización con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ como la funcionalización con el polímero catecol-PEG han conseguido evitar la oxidación de las nanopartículas de Fe_{2,2}C en suspensión acuosa, pero no así la formación de aglomerados. Estos probablemente son la causa de que no se hayan obtenido los elevados valores de SAR esperados. La ausencia de oxidación de las nanopartículas parece indicar que en ambos casos, terminada la reacción de funcionalización, el polímero se encuentra recubriendo individualmente cada una de las partículas (o al menos formando agregados de unos pocos nanómetros). Sin embargo, transcurrido unos minutos el oxígeno atmosférico y el del agua hacen que se produzca una autopolimerización de los grupos catecoles dando lugar a grandes agregados. También, la cantidad de polímero añadida (5 equivalentes en peso) puede que sea excesiva y favorezca esta autopolimerización. Por tanto, para futuras pruebas, sería recomendable utilizar una cantidad inferior de polímero.

Respecto a la nueva ruta de funcionalización con un polímero de estructura catecol-(CH₂)_n-PEG que evitara la formación de estos agregados, se han llevado a cabo con éxito cuatro de las cinco etapas de las que consta su síntesis. Los problemas que se han expuesto anteriormente y con los que se ha tenido que ir trabajando, han impedido la

finalización de la síntesis del polímero y por consiguiente el resto del trabajo con las nanopartículas de Fe₂C. Sin embargo dejan la puerta abierta a la continuación de la investigación en este campo.

Referencias

- Amiens, Catherine, Peter Fejes, Philippe Renaud, Marc Respaud, Pierre Lecante, Etienne Snoeck, and Bruno Chaudret. 2005. "Multimillimetre-Large Superlattices of Air-Stable Iron-Cobalt Nanoparticles." *Nature Materials* 4: 750–53. <https://doi.org/10.1038/nmat1480>.
- Amstad, Esther, Torben Gillich, Idalia Bilecka, Marcus Textor, and Erik Reimhult. 2009. "Ultrastable Iron Oxide Nanoparticle Colloidal Suspensions Using Dispersants with Catechol-Derived Anchor Groups." *Nano Letters* 9 (12): 4042–48.
- Asensio, Juan M., Julien Marbaix, Nicolas Mille, Lise Marie Lacroix, Katerina Soulantica, Pier Francesco Fazzini, Julian Carrey, and Bruno Chaudret. 2019. "To Heat or Not to Heat: A Study of the Performances of Iron Carbide Nanoparticles in Magnetic Heating." *Nanoscale* 11 (12): 5402–11. <https://doi.org/10.1039/c8nr10235j>.
- Bailey, Frederick E, and J V Koleske. 1976. *Poly(Ethylene Oxide)*. New York :
- Bonvin, Debora, Duncan T L Alexander, Angel Mill, Rafael Piñol, Beatriz Sanz, Gerardo F Goya Id, Abelardo Mart, et al. 2017. "Tuning Properties of Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Synthesis without Ligands to Improve MRI Relaxivity and SAR." *Nanomaterials* 7 (8). <https://doi.org/10.3390/nano7080225>.
- Bordet, A., L.M. Lacroix, K. Soulantica, and B. Chaudret. 2016a. "A New Approach to

- the Mechanism of Fischer-Tropsch Syntheses Arising from Gas Phase NMR and Mass Spectrometry.” *ChemCatChem* 8 (9): 1727–31. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600245>.
- Bordet, A., L.M. Lacroix, K. Soulantica, and B. Chaudret. 2016b. “A New Approach to the Mechanism of Fischer-Tropsch Syntheses Arising from Gas Phase NMR and Mass Spectrometry.” *ChemCatChem* 8 (9): 1727–31. <https://doi.org/10.1002/cctc.201600245>.
- Bordet, Alexis, Lise-marie Lacroix, Pier-francesco Fazzini, Julian Carrey, Katerina Soulantica, and Bruno Chaudret. 2016. “Magnetically Induced Continuous CO₂ Hydrogenation Using Composite Iron Carbide Nanoparticles of Exceptionally High Heating Power.” *Angewandte Chemie - International Edition* 33: 1–6. <https://doi.org/10.1002/anie.201609477>.
- Bordet, Alexis, Ryan F. Landis, Yi Wei Lee, Gulen Y. Tonga, Juan M. Asensio, Cheng Hsuan Li, Pier Francesco Fazzini, Katerina Soulantica, Vincent M. Rotello, and Bruno Chaudret. 2019. “Water-Dispersible and Biocompatible Iron Carbide Nanoparticles with High Specific Absorption Rate.” Research-article. *ACS Nano* 13 (3): 2870–78. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b05671>.
- Cauda, Valentina, Christian Argyo, and Thomas Bein. 2010. “Impact of Different PEGylation Patterns on the Long-Term Bio-Stability of Colloidal Mesoporous Silica Nanoparticles.” *Journal of Materials Chemistry* 20: 8693–99. <https://doi.org/10.1039/c0jm01390k>.
- Chaudret, Bruno, Catherine Amiens, Philippe Renaud, and Peter Fejes. 2004. “Superlattices of Iron Nanocubes Synthesized from Fe[N(SiMe₃)₂]₂.” *Science* 303: 821–24.
- Davidson, Robert L. 1980. *Handbook Of Water-Soluble Gums And Resins*. Edited by R.

L. Davidson. McGraw-Hil.

Dess, D.B, and J.C. Martin. 1983. "Readily Accessible 12-I-5 Oxidant for the Conversion of Primary and Secondary Alcohols to Aldehydes and Ketones." *Journal of Organic Chemistry*, no. 7: 4155–56. <https://doi.org/10.1021/jo00170a070>.

Gao, Fan, Hua Qu, Yangyang Duan, Jing Wang, Xiao Song, Tianjiao Ji, Lixin Cao, Guangjun Nie, and Shuqing Sun. 2014. "Dopamine Coating as a General and Facile Route to Biofunctionalization of Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles for Magnetic Separation of Proteins." *RSC Advances* 4 (13): 6657–63. <https://doi.org/10.1039/c3ra46938g>.

Groendyke, Brian J., Atanu Modak, and Silas P. Cook. 2019. "Fenton-Inspired C-H Functionalization: Peroxide-Directed C-H Thioetherification." *Journal of Organic Chemistry* 84 (20): 13073–91. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01979>.

Hong, Seok Yong, Dong Hyun Chun, Jung-il Yang, Heon Jung, Ho-tae Lee, Sungjun Hong, Sanha Jang, Jung Tae Lim, Chul Sung Kim, and Ji Chan Park. 2015. "A New Synthesis of Carbon Encapsulated Fe₅C₂ Nanoparticles for High-Temperature Fischer–Tropsch Synthesis." *Nanoscale* 7: 16616–20. <https://doi.org/10.1039/c5nr04546k>.

Lacroix, Lise Marie, Sébastien Lachaize, Andrea Falqui, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2009. "Iron Nanoparticle Growth in Organic Superstructures." *Journal of the American Chemical Society* 131 (2): 549–57. <https://doi.org/10.1021/ja805719c>.

Me, Anca, Boubker Mehdaoui, Vinciane Kelsen, Pier Francesco Fazzini, Julian Carrey, Sebastien Lachaize, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2012. "A Simple Chemical Route toward Monodisperse Iron Carbide Nanoparticles Displaying

Tunable Magnetic and Unprecedented Hyperthermia Properties.” *Nano Letters* 12: 4722–28. <https://doi.org/10.1021/nl302160d>.

Meffre, Anca, Sébastien Lachaize, Christophe Gatel, Marc Respaud, and Bruno Chaudret. 2011. “Use of Long Chain Amine as a Reducing Agent for the Synthesis of High Quality Monodisperse Iron(0) Nanoparticles.” *Journal of Materials Chemistry* 21 (35): 13464–69. <https://doi.org/10.1039/c1jm12127h>.

Montferrand, Caroline De, Ling Hu, Irena Milosevic, Vincent Russier, Dominique Bonnin, Laurence Motte, Arnaud Brioude, and Yoann Lalatonne. 2013. “Iron Oxide Nanoparticles with Sizes, Shapes and Compositions Resulting in Different Magnetization Signatures as Potential Labels for Multiparametric Detection.” *Acta Biomaterialia* 9 (4): 6150–57. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.025>.

Mutter, M., and Bayer, E. 1979. *The Peptides*. Edited by E. Gross and J. Meienhofer. Academic P.

Nerambourg, N, R Praho, M H V Werts, and D Thomas. 2008. “Hydrophilic Monolayer-Protected Gold Nanoparticles and Their Functionalisation with Fluorescent Chromophores.” *International Journal of Nanotechnology* 5: 722–40. <https://doi.org/10.1504/IJNT.2008.018693>.

Peng, Sheng, Chao Wang, Jin Xie, and Shouheng Sun. 2006. “Synthesis and Stabilization of Monodisperse Fe Nanoparticles.” *Journal of the American Chemical Society* 128: 10676–77. <https://doi.org/10.1021/ja063969h>.

Pronin, Sergey V, M Greg Tabor, Daniel J Jansen, and Ryan A Shenvi. 2015. “A Stereoselective Hydroamination Transform To Access Polysubstituted Indolizidines.” *Journal of the American Chemical Society* 134 (4): 2012–15.

Sangnier, A.P., A.B. Van de Walle, A. Curcio, R. Le Borgne, L. Motte, Y. Lalatonne, and C. Wilhelm. 2019. “Impact of Magnetic Nanoparticle Surface Coating on

- Their Long-Term Intracellular Biodegradation in Stem Cells.” *Nanoscale* 11: 16488–98. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- Wittig, G. 1956. “Ursprung Und Entwicklung in Der Chemie Der Phosphin-Alkylene.” *Angewandte Chemie* 68 (16): 505–8.
- Wu, Zhen-yu, Xing-xing Xu, Bi-cheng Hu, Hai-wei Liang, Yue Lin, and Li-feng Chen. 2015. “Iron Carbide Nanoparticles Encapsulated in Mesoporous Fe-N-Doped Carbon Nanofibers for Efficient Electrocatalysis.” *Angewandte Chemie - International Edition* 54: 8179–83. <https://doi.org/10.1002/anie.201502173>.
- Xu, Ke, Bo Sun, Jun Lin, Wen Wen, Yan Pei, Shirun Yan, Minghua Qiao, Xiaoxin Zhang, and Baoning Zong. 2014. “E-Iron Carbide as a Low-Temperature Fischer–Tropsch Synthesis Catalyst.” *Nature Communications* 5: 5783. <https://doi.org/10.1038/ncomms6783>.
- Yan, Bo, Jeong Youngdo, Luiza A. Mercante, Gülen Yesilbag Tonga, Chaekyu Kim, Zheng-Jiang Zhu, Richard W. Vachet, and Vincent M. Rotello. 2013. “Characterization of Surface Ligands on Functionalized Magnetic Nanoparticles Using Laser Desorption/ Ionization Mass Spectrometry (LDI-MS).” *Nanoscale* 5: 5063–66. <https://doi.org/10.1039/c3nr01384g>.
- Yang, Ce, Huabo Zhao, Yanglong Hou, and Ding Ma. 2012. “Fe₅C₂ Nanoparticles : A Facile Bromide-Induced Synthesis and as an Active Phase for Fischer – Tropsch Synthesis.” *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY* 134: 15814–21. <https://doi.org/10.1021/ja305048p>.
- Yang, Ziyu, Tianshan Zhao, Xiaoxiao Huang, Xin Chu, Tianyu Tang, and Yanmin Ju. 2017. “Modulating the Phases of Iron Carbide Nanoparticles : From a Perspective of Interfering with the Carbon Penetration of Fe@Fe₃O₄ by Selectively Adsorbed Halide Ions.” *Chemical Science* 8: 473–81. <https://doi.org/10.1039/c6sc01819j>.

Yu, Jing, Fan Chen, Weiliang Gao, Yanmin Ju, Xin Chu, and Shenglei Che. 2016. "Iron Carbide Nanoparticles: An Innovative Nanoplatform for Biomedical Applications." *Nanoscale Horizons*. <https://doi.org/10.1039/C6NH00173D>.

Capítulo VII: Conclusiones generales y perspectivas de trabajo futuro

Durante toda esta tesis se han ido exponiendo las conclusiones de cada apartado en los respectivos capítulos. Aquí exponemos las conclusiones generales del trabajo realizado:

- Se han sintetizado dos tipos de nanopartículas magnéticas tipo *core-shell* con recubrimiento de carbono, mediante dos métodos de síntesis diferentes. Las nanopartículas presentan núcleos diferentes (en un caso, Fe^0 con una pequeña contribución de Fe_3C ; en el otro, Fe_3O_4 con una pequeña contribución de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Además, el recubrimiento es también distinto. Las nanopartículas de Fe , se encuentran encapsuladas por capas de grafeno y las de Fe_3O_4 , recubiertas por una fina capa de carbono amorfo.
- El método elegido para la síntesis de las nanopartículas *core-shell* determina no solo la composición, el tamaño y comportamiento magnético del núcleo magnético, sino también el tipo de recubrimiento.
- Las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ son más pequeñas que las de $\text{Fe}@\text{C}$, lo que favorece la estabilidad en disoluciones acuosas.
- El comportamiento magnético es diferente para los dos tipos de nanopartículas, siendo ferromagnético para las nanopartículas de $\text{Fe}@\text{C}$ y superparamagnético, incluso a temperatura ambiente para las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$.
- Los valores del coeficiente de absorción específica de potencia (SAR) de las suspensiones acuosas obtenidas con las respectivas nanopartículas son mayores para las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. Esto indica que el tamaño de partícula y la anchura de la distribución de tamaño, así como sus propiedades magnéticas están más cerca de los valores óptimos que maximizan el valor del SAR para la amplitud y frecuencia del campo magnético alterno utilizados en los experimentos.
- La funcionalización de las nanopartículas $\text{Fe}@\text{C}$ con dopamina/Poly-L-Lisina y de las nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ con ácido caféico/ $\text{NH}_2\text{-PEG-NH}_2$ disminuye el tamaño de los agregados en disolución acuosa, mejora la estabilidad de las suspensiones y aumenta ligeramente el valor del SAR.

- Los experimentos *in vitro* llevados a cabo con macrófagos murinos no han mostrado signos de daño celular incluso después de 7 días de exposición a las nanopartículas.
- Los ensayos *in-vitro* confirman la importancia de la capa de carbono que recubre las nanopartículas (y en especial del recubrimiento en capas de grafeno), en la biocompatibilidad de las nanopartículas. Los espectros Raman obtenidos en cultivos celulares expuestos durante 72 h a las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C han revelado la aparición de defectos en el recubrimiento, lo que favorecería su degradación y por tanto la biocompatibilidad de las nanopartículas. Este proceso parece ser lento ya que las imágenes de TEM han mostrado que los núcleos magnéticos permanecieron protegidos incluso después de 7 días en el interior de los lisosomas de los macrófagos, reduciéndose así la generación de especies reactivas de oxígeno causada por el hierro metálico y la magnetita.
- Las nanopartículas de Fe@C y de Fe₃O₄@C así como las respectivas nanopartículas funcionalizadas con dopamina/Poly-L-Lisina, dopamina/PEG y ácido caféico-PEG-NH₂, no inducen toxicidad apreciable en células de la líneas microglial murina BV2, al menos hasta las 72 h. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en cultivos de células humanas de pulmón y piel, así como en células humanas de cáncer cérvico-uterino HeLa.
- Los experimentos de adsorción y desorción de ácido ferúlico han demostrado que tanto el recubrimiento de capas de grafeno como el de carbono amorfo son adecuados para la adsorción del fármaco en la superficie de las nanopartículas y para su posterior liberación, aunque el primero puede adsorber el doble de fármaco, que además es liberado de manera lineal con el tiempo. Por ello las nanopartículas Fe@C son mucho más adecuadas como portadores de fármacos, ya que una dosificación constante es esencial para garantizar la eficacia y la seguridad necesarias para muchas aplicaciones terapéuticas.

- Se han sintetizado nanopartículas de Fe (0) y de Fe_{2.2}C de tamaño homogéneo, bien dispersas y estables en una disolución de mesitileno. Sus valores del coeficiente de absorción específica (SAR) son mucho más altos comparados con los de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C y son comparables a los de la literatura.
- Tanto la funcionalización con ácido caféico/NH₂-PEG-NH₂ como la funcionalización con el polímero catecol-PEG han conseguido evitar la oxidación de las nanopartículas de Fe_{2.2}C en suspensión acuosa, pero no así la formación de aglomerados.
- La síntesis de un polímero de estructura catecol-(CH₂)_n-PEG que evite la formación de estos agregados, se ha llevado a cabo con éxito en cuatro de las cinco etapas de las que consta el proceso. Los problemas que se han expuesto anteriormente han impedido la finalización de la síntesis del polímero.

Los resultados obtenidos con los diferentes tipos de nanopartículas abren un campo prometedor para futuras investigaciones.

- Optimización de los métodos de síntesis de las nanopartículas, tanto por método físico como por método químico para mejorar las propiedades físico-químicas presentadas.
- Mejora de los métodos de funcionalización de las nanopartículas de Fe@C y Fe₃O₄@C, para disminuir el tamaño de los agregados en suspensión acuosa y mejorar la estabilidad de estas suspensiones.
- Estudio de los fenómenos de absorción de potencia y de relajatividad en las suspensiones de nanopartículas *core-shell* optimizadas.
- Finalización del proceso de síntesis del prometedor polímero catecol-(CH₂)_n-PEG (que se vio truncada por la crisis del COVID-19) para la funcionalización de las nanopartículas de Fe_{2.2}C y para la obtención de suspensiones biocompatibles de estas nanopartículas.

-
- Estudio de la absorción de potencia y de la relajatividad de estas suspensiones.
 - Estudio *in vitro* de la internalización celular y de la citotoxicidad de las nanopartículas de Fe₂C funcionalizadas.
 - Realización de ensayos *in vivo* con las nanopartículas magnéticas core-shell y de carburo de hierro. En este último caso es particularmente interesante la realización de experimentos de hipertermia magnética, dependiendo de los resultados *in vitro*.