

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FÍSICA DE MATERIALES**



**TESIS DOCTORAL**

**Nanopartículas magneto-plasmódicas para aplicaciones biomédicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Jesús García Ovejero**

DIRECTORES

**Antonio Hernando Grande**  
**Pilar Herrasti González**  
**Miguel Ángel García García-Tuñón**

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS

Departamento de Física de Materiales

Instituto de Magnetismo Aplicado Salvador Velayos



Memoria para optar al grado de Doctor en Física titulada:

## **Nanopartículas magneto-plasmónicas para aplicaciones biomédicas**

Presentada por:

D. Jesús García Ovejero

Dirigida por:

Prof. Antonio Hernando Grande

Prof. Pilar Herrasti de Diego

Dr. Miguel Ángel García García-Tuñón

Madrid, 2017



*A mi familia*



*“Above all do not attempt to use science (I mean the real sciences) as a defence against Christianity. They will positively encourage him to think about realities he can’t touch and see. There have been sad cases among modern physicists.”*

– C.S. Lewis, **Screwtape Letters**



# AGRADECIMIENTOS

---

Me resulta inevitable comenzar los agradecimientos de esta tesis recordando a la persona responsable de que este trabajo de tesis comenzase y de que fuera yo el que lo llevase a cabo, la Prof. Patricia Crespo. Ella fue quien confió en mí en primer lugar y quien durante los primeros años ejerció como tutora y directora de tesis. Su disposición a la discusión científica, sus consejos y la magnífica libertad que me brindó a la hora de diseñar el proyecto de investigación, me ha permitido vivir estos primeros años en el mundo de la investigación como un verdadero proyecto de realización personal. Confío en que esta tesis sirva como un tributo a su memoria y que su alma esté descansando en paz.

En segundo lugar agradezco a mis actuales directores de tesis, la Prof. Pilar Herrasti, el Dr. Miguel Ángel García y el Prof. Antonio Hernando. Gracias a vosotros he descubierto la ciencia como un campo fascinante de conocimiento y enriquecimiento personal. Sois y seréis para mí referentes del trabajo bien hecho, del rigor científico y de la pasión por comprender el origen de los fenómenos naturales. Os agradezco todo lo que me habéis aportado a nivel científico y a nivel humano. Salgo de esta etapa con un bagaje de conocimiento inestimable y una deuda impagable con todos vosotros.

También quiero recordar a todos los investigadores y trabajadores de los centros en los que he llevado a cabo este trabajo de tesis. Empezando por el IMA, quiero agradecer a Pilar, José, Patricia, Marta, Jorge, Ana, Victor, Miguel Ángel, Pepe, Alicia, Conchi y sobretodo a Victor Velasco que fue con quien empecé esta aventura y con quien he compartido tantas horas de penas y alegrías analizando experimentos y a Irene por sus medidas de magnetometría en la Universidad de Toulouse y su imperturbable alegría. No me cabe duda que sin vuestra ayuda y acompañamiento esta tesis no habría sido posible, y si lo hubiera sido, no la habría disfrutado del mismo modo. En segundo lugar, al grupo de Matelec, a Nieves, Jorge, Sandra, Eva, a todos los mejicanos que han pasado por el laboratorio y especialmente María con quien compartí expedición a China, entre otras grandes experiencias. Aunque haya estado menos tiempo por allí me he sentido uno más. Poder discutir con vosotros sobre *lo científico* y *lo humano* ha sido una delicia y espero que los encuentros del café se sigan repitiendo tan pronto como se pueda. En tercer lugar, también quiero destacar al grupo de biología celular de la Prof.

Magdalena Cañete y la Prof. Ángeles Villanueva, donde he estado investigando estos últimos meses. A ellas y a sus estudiantes Ana, Andrea y Ángela, les agradezco su paciencia y apoyo, me habéis hecho muy fácil esta pequeña incursión en el terreno de la biología.

One of the most exciting and rewarding experiences of this thesis project were the internships carried out in other institutions. They have enhanced significantly the scientific content of this manuscript and has meant to me joyful steps of this long way. In all of them, I have growth as a person and as a researcher. Because of that, I want to thank to Prof. Isabel Pastoria and Prof. Jorge Pérez-Juste who hosted me in the Universidad de Vigo; to Prof. Matthew O'Donnell and Prof. Xiaohu Gao who hosted me in the University of Washington; to Prof. Gaojian Chen, who hosted me in the University of Soochow; and to Prof. Roy Goodacre who hosted me in the Institute of Biotechnology of Manchester. I want to include in this acknowledgment to all the people of their teams (please, forgive me for missing your names). I hope to give you back somehow all your contribution to this thesis and the time you dedicated to me, inside and outside the lab.

No me olvido tampoco de la gente que estaba en el punto de partida de esta tesis. Estoy convencido de que mi experiencia en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid con la Prof. Puerto Morales y el Prof. Manuel Vázquez, y en IMDEA Nanociencia con el Prof. Julio Camarero y el Dr. Francisco Terán, fueron argumentos de enorme peso para conseguir la beca que ha financiado esta tesis. Por este motivo quiero agradecerles el impulso inicial y la oportunidad que me dieron de trabajar con su equipos de trabajo. Me gustaría destacar especialmente a Gorka y a Marzia por la paciencia que tuvieron para introducir en el mundo de la química a un joven físico que aparecía de vez en cuando por el laboratorio; a David, por sus discusiones sobre interacciones y procesos magnéticos; y a mis *hermanas mayores* Cristina y Ester por haber conseguido hacer un equipo de trabajo que *lo flipas* y generar el mejor ambiente de trabajo que uno pueda disfrutar en un laboratorio.

Considero importante agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad la financiación de la beca de formación de personal investigador que me ha permitido llevar a cabo esta tesis. La tranquilidad y responsabilidad de saberse beneficiario de una beca pública han sido un enorme acicate para el aprovechamiento de esta etapa

investigadora. También quiero agradecerle la concesión de las becas de financiación de estancias breves de investigación. Al Banco Santander le agradezco el proyecto de cooperación con Asia que me permitió realizar la estancia en la Universidad de Soochow mencionada anteriormente.

Fuera del ámbito científico he recibido también apoyos fundamentales para esta tesis. El primero de ellos han sido mis padres y mis hermanos. Tal vez no he sabido corresponderlo durante estos años, pero llegar a casa a las tantas y encontrar la luz encendida, aunque solo fuera para un beso de buenas noches; o recibir un mensaje de ánimo en los momentos de agotamiento; o poder relajarme en el Espinar sintiendo que uno vuelve a casa, son las cosas que me han permitido mantener el ánimo y seguir luchando. Presumo orgullosamente del apellido que acompaña mi nombre y espero que sintáis esta tesis como propia, al igual que yo siento como propios todos vuestros éxitos.

El mayor de los agradecimientos que quiero expresar es para mi mujer Elena. Si ha habido algún experimento realmente exitoso en este tiempo de tesis, fue el de pedirte que fueras mi esposa. Has sido lo que necesitaba cuando lo necesitaba. Me has sabido apoyar y poner límites. Has controlado mi ego y has conseguido que pudiera llegar hasta el final sin perder la cabeza. Has sido la mejor consejera y te has quedado a mi lado cuando no había nada que decir. Reducir a un párrafo todo lo que me has ayudado me parece insultante pero espero poder devolverte todo el apoyo que me has dado y hacer la mitad de feliz de lo que tú me haces.

El último de los agradecimientos es el que da sentido a todos los anteriores. Agradezco al Dios todo lo que ha construido en mi durante estos años. Porque hubiese bastado con la vida eterna, o con el perdón de los pecados, o con el don de la fe, pero por pura gracia he cosechado donde no sembré y disfruto de una vida que no se corresponde con mis méritos. Sirva esta tesis para la mayor gloria de Dios.



En los últimos años el estudio y aplicación de las nanopartículas magneto-plasmónicas ha despertado un enorme interés en la comunidad científica. El uso de este tipo de materiales en aplicaciones biomédicas abre la puerta a un gran número de nuevas técnicas de diagnóstico y tratamiento. Sin embargo existe una carencia de materiales biocompatibles que presenten propiedades magneto-plasmónicas adecuadas.

En la presente tesis se abordará en primer lugar la síntesis y caracterización de estructuras magneto-plasmónicas híbridas basadas en nanocilindros de Au, nanopartículas magnéticas de diferentes ferritas y sílice.

La síntesis de estas nanoestructuras se realizó desarrollando un nuevo método de hibridación que aprovecha el entrecruzamiento que tiene lugar entre las moléculas de polietilenglicol y el ácido cítrico cuando se incluyen en los procesos de crecimiento de sílice como mecanismo de autoensamblado. Para ello la superficie de los nanocilindros de Au y de las nanopartículas de ferritas fueron recubiertas con polietilenglicol y ácido cítrico respectivamente y sometidas a un proceso de silanización conjunta. La estructura obtenida al final del proceso consiste en una geometría núcleo-satélite con los nanocilindros de Au en el centro y las nanopartículas de ferrita alrededor embebidas en una matriz de sílice.

La síntesis individual de los componentes magnético y plasmónico, permitió ajustar individualmente sus propiedades antes de ser hibridados en una estructura común. Sin embargo, aunque este tipo de nanoestructuras evitan la intercara entre las fases, aparece un cierto grado de interacción que obliga a considerar los posibles cambios en las propiedades magneto-plasmónicas del material resultante.

El uso de este tipo de nanopartículas en aplicaciones que supongan su inyección intravenosa exige que su tamaño hidrodinámico este limitados y que su superficie interactúe débilmente con las proteínas presentes en el medio biológico de manera que no se produzcan obstrucciones de los capilares y que se evite que el sistema inmune las reconozca para su eliminación. Por este motivo, las nanopartículas magneto-plasmónicas híbridas fueron recubiertas con un glicopolímero no comercial que inhibe la adhesión de las proteínas del medio a su superficie, les confiere una alta estabilidad

coloidal y favorece la interacción de estas con receptores de glucosa como los sobreexpresados en ciertas líneas tumorales como las células HeLa.

Para comprobar la efectividad de estos recubrimientos se analizó la cantidad de material inorgánico internalizado por esta línea celular tras 24 horas de incubación y se estudió el descenso de la viabilidad celular en las 24 horas posteriores.

Una vez obtenidas nanoestructuras híbridas coloidalmente estables, con un tamaño hidrodinámico controlado, capaces de penetrar en células del tipo HeLa y con una baja citotoxicidad, se estudió su posible aplicabilidad en sistemas de detección y tratamiento de células tumorales a partir de modelos *in vitro* de células HeLa.

Para la detección de células tumorales se utilizó un sistema de imagen médica conocido como imagen fotoacústica en el que se emplea la respuesta plasmónica de estos agentes permite obtener una señal detectable en el entorno biológico.

El carácter magneto-plasmonicos de estas nanoestructuras permitió aumentar la resolución de la técnica mediante un sistema de gradientes magnéticos alternos conocido como imagen fotoacústica magneto-motriz, lo que permitió la detección de regiones localizadas de nanopartículas en un patrón de gelatina. Además, se exploró la posibilidad de aumentar el límite de detección fotoacústica de células tumorales circulantes (no localizadas) en un sistema mimético de flujo, acumulando las células tumorales marcadas con este tipo de nanopartículas mediante gradientes magnéticos de diferentes intensidades y geometrías.

Las terapias anticancerígenas basadas en este tipo de nanopartículas se centraron en dos posibles mecanismos de actuación, la hipertermia celular y el daño mecánico. En la primera aproximación se utilizó el calor generado por estas nanopartículas cuando son sometidas a un campo electromagnético para inducir una muerte celular por estrés térmico en poblaciones *in vitro* de células HeLa. En la segunda, se hizo uso de la respuesta motriz de estas frente a un campo magnético rotatorio para generar un daño mecánico a distancia en el seno de las células.

## SUMMARY

---

In the recent years, magneto-plasmonic nanoparticles have attracted increasing attention from the scientific community due to their promising properties and high applicability. Thanks to the development of new synthesis routes, it has been possible to use this kind of nanostructures in different biomedical applications such as dual imaging, combined treatments or biodetection. However, there is still a lack of biocompatible materials with suitable magneto-plasmonic features to translate all these advances to clinical studies.

In this thesis, I propose a new synthesis to produce hybrid magneto-plasmonic nanoparticles based on Au nanorods, ferrite nanospheres and silica. The synthesis developed takes advantage of the cross-linking process between polyethylenglycol and citric acid during sol-gel reactions of silylation, to drive the self-assembly between Au nanorods and ferrite nanospheres. Following such method, it was possible to obtain hybrid nanostructures composed by a Au nanorod in the core and ferrite nanospheres in satellite positions imbedded in a silica matrix.

The individual synthesis of the components before hybridization enabled the fine tuning of their magnetic and plasmonic properties. Besides in this geometry there are not common interfaces between Au and ferrite, avoiding a direct interaction between them. However, due to the close proximity of the phases, it was important to study the effect of the short-distance interaction in the magneto-plasmonic properties.

Furthermore, the use of magneto-plasmonic nanoparticles in biological organisms requires a careful control of their hydrodynamic size and surface properties. Otherwise, the injection of this kind of nanoparticles in a patient can produce problems such as capillary obstruction or thrombus. Because of that, it is important to functionalize them with biocompatible molecules that preserve the colloidal stability avoiding a quick clearance from the blood stream. The hybrid magneto-plasmonic nanoparticles were coated with a non-commercial glycopolymer that avoids the adhesion of the proteins of the media to the surface and promotes the internalization in certain cancer cell line. The internalization and cytotoxicity of these nanostructures were evaluated with *in vitro* studies using HeLa cells as a model.

Once obtained biocompatible and stable magneto-plasmonic nanoparticles with interesting magneto-plasmonic features, I tested their possible use in biomedical applications such as detection and treatment of tumor cells.

On one hand, using the plasmonic component of these nanostructures as photoacoustic contrast agents, it was possible to combine the photoacoustic detection of cancer cells with a contrast enhancing technique known as magneto-motive photoacoustic imaging to detect localized inclusions in a gelatin phantom that mimics a localized tumor.

On the other hand, the magneto-plasmonic features were used in the detection of circulating tumor cells in a mimetic flowing system by concentrating them with a magnetic field gradient of different intensities and geometries.

Finally, the magneto-plasmonic nanoparticles were applied to the *in vitro* treatment of tumor cells using magneto-plasmonic approach that combine the heat produced by infrared laser irradiation with the mechanical damage produced with a rotating magnetic field.

<b>Capítulo 1: Introducción .....</b>	<b>5</b>
1.1 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA .....	7
1.1.1 Breve revisión histórica .....	7
1.1.2 Fenómenos en la nanoescala .....	8
1.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	10
1.2.1 Superparamagnetismo .....	10
1.2.2 Mecanismos de relajación de coloides magnéticos .....	13
1.2.3 Interacciones dipolares magnéticas .....	15
1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS .....	18
1.3.1 Plasmones de superficie localizados .....	18
1.3.2 Nanopartículas de Au anisométricas .....	20
1.4 NANOPARTÍCULAS MAGNETO-PLASMÓNICAS HÍBRIDAS .....	21
1.5 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNETO- PLASMÓNICAS .....	24
1.5.1 Materiales biocompatibles .....	24
1.5.2 Técnicas de imagen magneto-plasmónicas .....	27
1.5.3 Terapias magneto-plasmónicas .....	28
1.5.4 Técnicas de teragnosis magneto-plasmónicas .....	29
1.6 REFERENCIAS .....	30
<b>Capítulo 2: Técnicas Experimentales .....</b>	<b>39</b>
2.1 RUTAS DE SÍNTESIS QUÍMICA .....	40
2.1.1 Crecimiento coloidal de NP de Au mediado por semillas .....	41
2.1.2 Síntesis electroquímica de NP basadas en óxidos Fe .....	43
2.1.3 Método de Stöber para el recubrimiento de NP con óxido de Si .....	45
2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES .....	47
2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM) .....	47
2.2.2 Patrones de difracción de rayos X (XRD) .....	50

2.2.3 Espectrometría visible-infrarojo (Vis-IR) .....	51
2.2.4 Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) .....	51
2.2.5 Espectrometría infraroja por transformadas de Fourier (FT-IR) .....	52
2.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	52
2.2.7 Dispersión dinámica de Luz (DLS) .....	53
2.2.8 Magnetometría SQUID.....	55
5.2.9 Magnetometría de alta frecuencia.....	56
5.2.10 Calorimetría local inducida por radiación .....	57
2.3 TÉCNICAS DE IMAGEN Y DETECCIÓN BIOMÉDICAS .....	58
2.3.1 Imagen de ultrasonidos (US) .....	58
2.3.2 Imagen fotoacústica (PA) .....	58
2.4 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR .....	60
2.4.1 Cultivo de células tumorales tipo HeLa .....	60
2.4.2 Visualización celular mediante microscopía óptica .....	61
2.4.3 Ensayo de proliferación y viabilidad celular por tinción con azul de tripán .	62
2.4.4 Ensayo de viabilidad celular por MTT .....	64
2.5 REFERENCIAS .....	65
<b>Capítulo 3: Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magneto-Plasmónicas Híbridas.....</b>	<b>67</b>
3.1 INTRODUCCIÓN.....	69
3.1.1 Síntesis de NPMPH .....	69
3.1.2 Relevancia de la sílice en las NPMPH .....	72
3.1.3 Hibridación de moléculas orgánicas en recubrimientos de sílice por sol-gel	75
3.1.4 Objetivos del capítulo.....	76
3.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	77
3.2.1 Síntesis de AuNR por crecimiento mediado por semillas .....	77
3.2.2 Síntesis electroquímica de NPM basadas en óxidos de Fe.....	78
3.2.3 Síntesis de NPMPH .....	78
3.2.4 Teoría de Mie-Gans para el cálculo de los espectros de extinción.....	80
3.2.5 Simulación de la respuesta óptica por el método de elementos finitos .....	83

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	85
3.3.1 Caracterización estructural de los componentes plasmónicos y magnéticos	85
3.3.2 Funcionalización de los componentes plasmónicos y magnéticos.....	92
3.3.3 Influencia de los parámetros de síntesis de las NPMPH .....	98
3.3.4 Caracterización estructural de las NPMPH .....	105
3.3.5 Estudio de la respuesta plasmónica de los AuNR y las NPMPH.....	108
3.3.6 Estudio de la respuesta magnética de las NPM y las NPMPH.....	115
3.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO .....	128
3.5 REFERENCIAS .....	129
<b>Capítulo 4: Detección Fotoacústica de Células Tumorales .....</b>	<b>141</b>
4.1 INTRODUCCIÓN.....	143
4.1.1 Uso de nanopartículas como agentes de contraste de imagen fotoacústica para detección de cáncer.....	143
4.1.2 Imagen fotoacústica magneto-motriz .....	146
4.1.3 Detección de células tumorales circulantes mediante imagen PA .....	147
4.1.4 Objetivos del capítulo.....	149
4.2 MATERIAL Y MÉTODOS .....	150
4.2.1 Preparación de sistemas miméticos de regiones tumorales localizadas .....	150
4.2.2 Rastreo de puntos referenciales .....	150
4.2.3 Sistema mimético de detección de CTC en sistema de flujo.....	151
4.2.4 Simulaciones por el método de elementos finitos del campo inducido.....	153
4.2.5 Marcado no específico de células tumorales HeLa con NPMPH.....	153
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	154
4.3.1 Imagen Fotoacústica magneto-motriz .....	154
4.3.2 Captura y detección de células tumorales circulantes .....	165
4.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO .....	173
4.5 REFERENCIAS .....	174
<b>Capítulo 5: Tratamiento magneto-plasmónico de células tumorales.</b>	<b>179</b>
5.1 INTRODUCCIÓN.....	180
5.1.1 Procesos de disipación de calor en nanopartículas magnéticas.....	181

5.1.2	Procesos de disipación de calor en nanopartículas plasmónicas .....	187
5.1.3	Calentamiento local con nanopartículas como tratamiento contra el cáncer.....	188
5.1.4	Suministro dirigido de fármacos: Vectorización de nanoagentes y efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR).....	191
5.1.5	Biofuncionalización de nanopartículas con glicopolímeros.....	193
5.1.6	Objetivos del capítulo.....	194
5.2	MATERIAL Y MÉTODOS .....	195
5.2.1	Recubrimiento de nanopartículas híbridas con PMAG .....	195
5.2.2	Internalización y toxicidad de nanopartículas en células HeLa .....	197
5.2.3	Tratamientos con nanopartículas magneto-plasmónicas .....	199
5.3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	201
5.3.1	Estudios de disipación de calor en nanopartículas .....	201
5.3.2	Biofuncionalización con glicopolímeros.....	211
5.3.3	Internalización y toxicidad en células HeLa.....	216
5.3.4	Tratamiento magneto-plasmónico <i>in vitro</i> de células HeLa.....	222
5.4	CONCLUSIONES.....	230
5.5	REFERENCIAS .....	231
<b>CHAPTER 6:</b>	<b>Final conclusions and future work .....</b>	<b>241</b>
6.1	FINAL CONCLUSIONS .....	243
6.2	FUTURE WORK .....	245
<b>Apéndice A:</b>	<b>Teoría de Mie-Gans .....</b>	<b>246</b>
	Permitividad en nanopartículas metálicas .....	246
	Teoría de Mie-Gans para nanopartículas metálicas esféricas.....	248
	Referencias .....	250
<b>Apéndice B:</b>	<b>Método de Elementos Finitos .....</b>	<b>251</b>
	Referencias .....	254
<b>Apéndice C:</b>	<b>Rastreo de puntos referenciales .....</b>	<b>255</b>
	Referencias .....	258
<b>Índice de acrónimos.....</b>	<b>.....</b>	<b>259</b>

# Capítulo I

## **Introducción**



## 1.1 NANOCIENCIA Y NANOTECNOLOGÍA

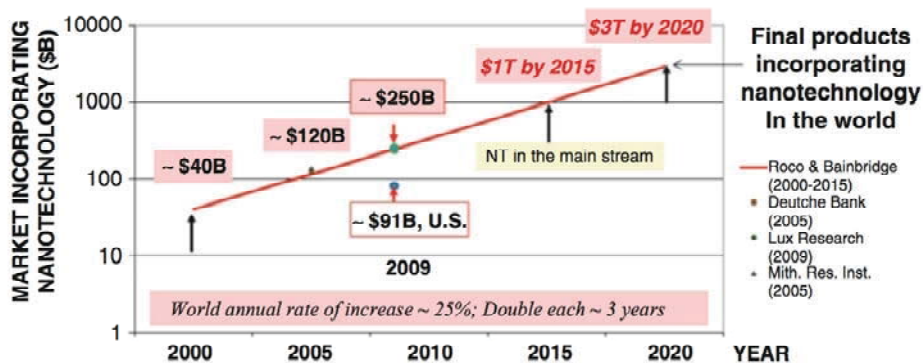
### 1.1.1 Breve revisión histórica

El visionario discurso del Profesor Richard Feynman en 1959 titulado “Plenty of space at the bottom” es considerado por muchos como el germen de una de las ramas de la ciencia de materiales con mayor actividad en la actualidad, la nanotecnología<sup>1</sup>. En este discurso se postulaba que la manipulación de átomos individuales permitiría, entre otras cosas, escribir los 24 volúmenes de la Enciclopedia Británica en la cabeza de un alfiler. La realidad es que los hitos alcanzados hoy en día por la nanociencia y la nanotecnología han superado con creces las mejores predicciones del Prof. Feynman.

En este discurso, el principal requisito impuesto a la consecución de tales progresos era el desarrollo de nuevas técnicas de fabricación y microscopía que permitieran la manipulación y caracterización de los materiales a escala nanométrica. Fue en la década de 1980 cuando tuvo lugar el gran salto nanotecnológico<sup>2</sup> gracias al desarrollo de técnicas de nanofabricación como la deposición catódica<sup>3</sup>, la nanolitografía<sup>4</sup>, o la química coloidal<sup>5</sup>, y de técnicas de imagen como el microscopio electrónico<sup>6</sup>, el microscopio de fuerza atómica<sup>7</sup> o el microscopio de efecto túnel<sup>8</sup>.

El respaldo institucional que encontraron estos avances científicos al comienzo del siglo XXI<sup>9</sup> permitió explotar la aplicabilidad de los revolucionarios fenómenos observados en la nanoescala y hacer prosperar el incipiente campo de la nanotecnología. Las aportaciones de la nanotecnología al mundo actual están fuera de toda duda. Por exponer algunos ejemplos, se podría destacar la optimización de paneles solares<sup>10</sup>; la miniaturización de componentes electrónicos<sup>11</sup>; o el desarrollo de tratamientos médicos mediados por nanopartículas<sup>12</sup>.

La historia de la nanotecnología se sigue escribiendo hoy en día. La [Figura 1.1](#) muestra la evolución predicha por Roco, Mirkin y Hersam<sup>9</sup> sobre el crecimiento de la inversión pública y privada en el campo de la nanotecnología prevista para los próximos años. La creación de centros nanotecnológicos especializados, así como los recientes avances en la tecnología del grafeno postulan esta disciplina como un claro motor de progreso en el siglo XXI.



**Figura 1.1** Inversión de los últimos años y previsiones a futuro del gasto público-privado en nanotecnología (tomado de Roco, Mirkin y Hersam<sup>9</sup>).

### 1.1.2 Fenómenos en la nanoescala

Comúnmente, se conocen como nanomateriales<sup>13</sup> o materiales nanoestructurados<sup>14</sup> aquellos que presentan tamaños o estructuras con dimensiones entre 1 y 100 nm en al menos en una de sus direcciones. A dicha escala, los materiales experimentan una serie de cambios en sus propiedades fisicoquímicas denominados “fenómenos de nanoescala”. Algunos de los más relevantes son: los efectos de superficie o de intercara, los efectos de confinamientos y los fenómenos de origen cuántico.

#### 1.1.2.a Efectos de superficie o de intercara

Generalmente, las teorías de la materia condensada explican el comportamiento de los materiales asumiendo que están compuestos por una red periódica e infinita de átomos que produce a su vez un potencial cristalino periódico e infinito. Estas teorías pueden resultar incompletas a la hora de describir el comportamiento real de la materia, puesto que incluso los materiales monocristalinos de la más alta pureza son finitos y por tanto presentan superficies.

Los efectos que estas superficies tienen sobre las propiedades de los materiales son considerados entonces como defectos bidimensionales del potencial cristalino. En la macroescala, estos defectos suponen ligeras correcciones al potencial que pueden ser despreciables en la mayoría de los casos. No es así en la nanoescala. Al reducir el tamaño de los materiales, el número de átomos en la superficie crece exponencialmente. Si realizamos un sencillo cálculo observamos que para una partícula cúbica de 2 nm de lado formada por una red cúbica simple con parámetro de red de 2 Å, la proporción de átomos en la superficie es del 50% aproximadamente.

Esto nos da una idea de la relevancia que tiene la contribución de los átomos de superficie en el comportamiento global del material. Para estos átomos, el potencial cristalino no presenta las mismas simetrías que para los átomos internos, lo que supone una completa alteración de sus propiedades fisicoquímicas. Además, la mayor relación superficie-volumen hace que procesos asociados a la superficie de los materiales, como la catálisis o la interacción con biomoléculas, se vean potenciados en esta escala.

Se puede realizar un razonamiento análogo cuando se estudian materiales con fases nanoestructuradas conocidos como nanocomposites o nanoestructuras híbridas. En estos materiales, los átomos cercanos a la interfase encuentran su potencial cristalino modificado por la presencia de átomos de distinta naturaleza en su entorno. La modificación del potencial puede dar lugar a propiedades que no aparecían en las fases por separado, generando sinergias o interferencias entre ellos.

#### **1.1.2.b Efectos de confinamiento**

Además de los efectos superficiales, el pequeño volumen de estos materiales supone la aparición de los efectos de confinamiento en los electrones libres del material. A consecuencia de la cercanía entre los límites del material, parámetros como el recorrido libre medio de los electrones o la hibridación de las bandas de energía se ven fuertemente modificados. Estos cambios en el comportamiento de los electrones hacen que ciertos materiales adquieran propiedades únicas de la nanoescala tales como la luminiscencia o las oscilaciones plasmónicas localizadas.

#### **1.1.2.c Fenómenos cuánticos**

Es un hecho bien conocido que cuando estudiamos la materia en escalas nanométricas, algunos conceptos de la física clásica dejan de tener vigencia y han de ser explicados mediante principios cuánticos. Un claro ejemplo de ello es el efecto túnel, el cual permite a los electrones del material atravesar barreras de potencial sin que estos posean energía suficiente para superarla. Este fenómeno ha permitido explicar ciertos comportamientos en la nanoescala y es el fundamento de una de las técnicas de microscopía más utilizadas en la física de superficies, la microscopía de efecto túnel<sup>8</sup>.

Además de los fenómenos descritos, en las nanopartículas (NP) magnéticas y metálicas aparecen propiedades específicas que analizaremos en los siguientes apartados.

## 1.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Los efectos de confinamiento, la proximidad a la distancia de correlación magnética y los efectos de superficie, hacen surgir comportamientos magnéticos asociados a esta escala. Uno de los que más comunes es el comportamiento superparamagnético.

### 1.2.1 Superparamagnetismo

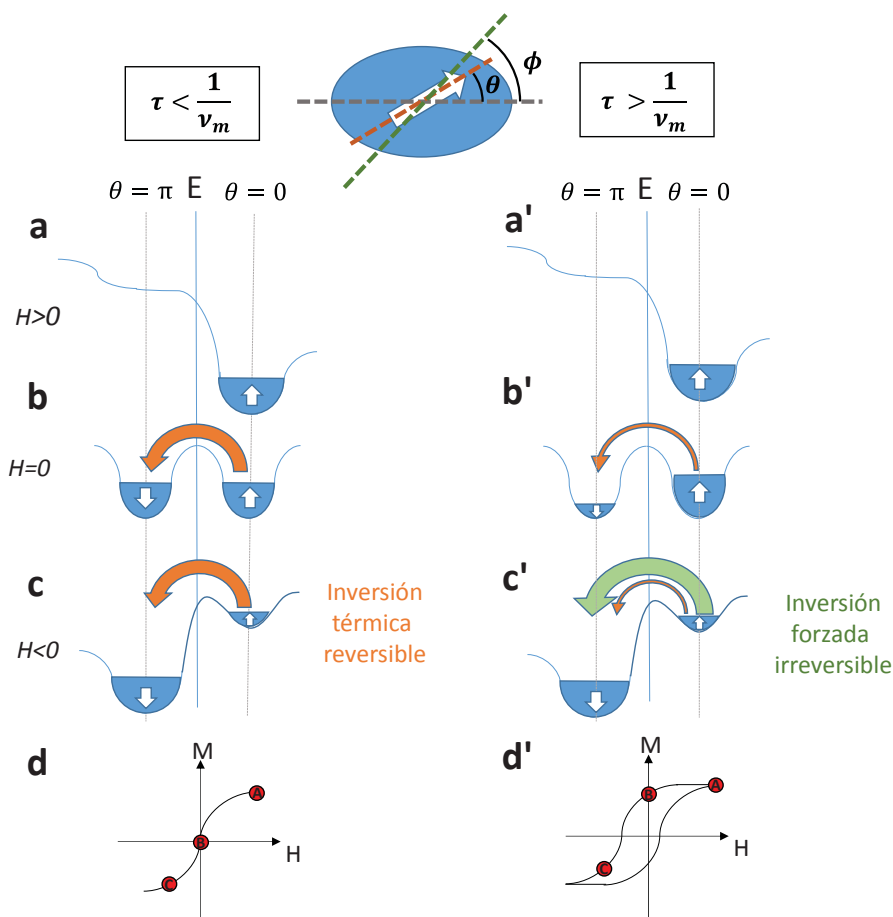
El superparamagnetismo es comúnmente descrito como un fenómeno de fluctuación térmica de la magnetización en materiales ferro(ferri)magnéticos que aparece cuando sus dimensiones son reducidas a la nanoescala<sup>15</sup>. Sin embargo, los procesos de relajación térmica que están detrás del comportamiento superparamagnético tienen lugar en materiales magnéticos de cualquier escala. Si fuéramos capaces de medir la respuesta ferromagnética de materiales masivos en una escala de tiempo secular observaríamos efectos similares a los que presentan las nanopartículas magnéticas (NPM).

Por este motivo, para poder definir con rigor el concepto de superparamagnetismo, deben tenerse en cuenta tres variables en el sistema, la energía de anisotropía ( $E_A$ ), la temperatura ( $T$ ) y la frecuencia de medida ( $\nu_m$ ).

Como primera aproximación, supongamos una NPM monodominio de imanación de saturación ( $M_S$ ) con una constante de anisotropía uniaxial ( $K_A$ ), en la que todos los espines rotan de forma coherente (modelo de macroespín) cuando se les aplica un campo magnético opuesto ( $\mu_0 H$ ). La [Ecuación 1.1](#) muestra el balance de energías por unidad de volumen ( $E_V$ ) de la NPM, en función del ángulo que forma la magnetización ( $\theta$ ) y el campo aplicado ( $\phi$ ) con su eje de fácil imanación (ver [Figura 1.1](#)).

$$E_V(\theta, \phi) = K_A \sin^2(\theta) + \mu_0 H M_S \quad \text{Ecuación 1.1}$$

En la [Figura 1.1](#) se representa de manera esquemática la evolución de este balance de energías en función del ángulo  $\theta$ , para un conjunto de NPM monodominio cuando que se varía la intensidad de campo aplicado paralelo en el eje de fácil imanación ( $\phi=0$ ). En la columna de la izquierda se muestra la evolución de un sistema superparamagnético (no disipativo) en el que el tiempo de inversión del campo es lento y por tanto el tiempo de relajación ( $\tau$ ) es menor que el tiempo de medida ( $1/\nu_m$ ). En cambio, la columna de la derecha muestra la evolución de un sistema cuyo tiempo de relajación es mayor que el tiempo de medida, en el que aparece un comportamiento ferromagnético (disipativo).



**Figura 1.2** Esquema del comportamiento superparamagnético (izquierda) y ferromagnético (derecha) de una NPM frente a un campo aplicado  $H$ . El campo es aplicado en paralelo al eje de fácil imanación ( $\phi=0$ ) y la imanación es medida por el ángulo  $\theta$ . En las figuras  $a$ ,  $a'$ ,  $b$ ,  $b'$ ,  $c$  y  $c'$  se representa la energía potencial en función de  $\theta$ . En las figuras  $d$  y  $d'$  se representan los ciclos de histéresis  $M$ - $H$ . La flecha naranja indica los procesos de relajación térmica y la verde procesos de inversión magnética.

Podemos analizar la evolución del sistema superparamagnético partiendo de una situación de saturación del sistema superparamagnético ([Figura 1.2a](#)) en la que todos los momentos están alineados con el campo y se va reduciendo el campo a 0. Dado que  $\tau < 1/\nu_m$ , los momentos magnéticos (NPM) tienen tiempo para invertirse y el sistema alcanza el equilibrio dejando la misma ocupación en las dos direcciones de fácil imanación y generando por tanto una imanación total nula. Esto se traduce en un ciclo de histéresis sin remanencia ([Figura 1.2d](#)) y con una coercitividad nula. Al aplicar un campo magnético en sentido opuesto los momentos magnéticos se alinean progresivamente con el campo sin que esto suponga una disipación de energía en el sistema.

Sin embargo, en el caso en el que  $\tau > 1/\nu_m$  encontramos que al hacer desaparecer el campo (**Figura 1.2b'**) no todos los momentos han tenido tiempo de relajarse y por tanto el ciclo presenta una magnetización remanente a campo 0 (**Figura 1.2d'**). Para invertir la magnetización, resulta necesario aplicar un campo opuesto que fuerce la inversión de los momentos, lo que genera una disipación de energía en el sistema. Observamos que el resultado de este proceso es un ciclo de histéresis con una coercitividad no nula (**Figura 1.2d'**), cuya área estará relacionada con la cantidad de energía disipada. La cantidad de energía disipada en este proceso puede calcularse a partir del área encerrada bajo la curva, tal y como expresa la **Ecuación 1.2**.

$$W_{dis} = E_{dis}v_{med} = v_{med} \int \mu_0 H M dV = A v_{med} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

De acuerdo con lo descrito, concluimos que para poder definir correctamente un sistema superparamagnético deberá tenerse en cuenta no solo las propiedades intrínsecas del sistema sino la frecuencia de medición del observador. De esta manera, un sistema superparamagnético es aquél que, para un determinado volumen de NPM (V) y una temperatura fija, presenta un tiempo de relajación magnética igual o inferior a la inversa de la frecuencia de medida.

$$\tau \leq \frac{1}{\nu_m} \quad \text{Ecuación 1.3}$$

De manera análoga, para un V fijo de NPM con un volumen fijo y asumiendo una frecuencia de medida característica, podríamos definir una temperatura límite a partir de la cual la excitación térmica es capaz de superar la barrera de anisotropía sin necesidad de un campo aplicado, mostrando así un comportamiento superparamagnético. A esta temperatura se la denomina comúnmente, temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) y viene determinada por la **Ecuación 1.4**.

$$T_B = \frac{K_A V}{K_B \ln\left(\frac{1}{\nu_m \tau_0}\right)} \quad \text{Ecuación 1.4}$$

Donde  $\tau_0$  es un parámetro que recoge las características intrínsecas del material (relación giromagnética de los espines, atenuación,  $M_S$  y  $K_A$ ) junto con ciertas condiciones experimentales (T y H) y generalmente se aproxima a  $\tau_0 = 10^{-9}$  s<sup>16,17</sup>.

Bajo cualquiera de las dos definiciones, resulta evidente que el carácter superparamagnético de un sistema de NPM, se encuentra íntimamente ligado con los procesos de relajación del momento magnético. Por ello, abordaremos en detalle los mecanismos que poseen los sistemas de NPM para llevar a cabo esta relajación térmica de la energía magnética acumulada.

### 1.2.2 Mecanismos de relajación de coloides magnéticos

En 1949, Louis Néel desarrolló un modelo de relajación térmica basándose en la ocupación de dos estados energéticos separados por una barrea energética<sup>18</sup>. Desde entonces, este modelo viene siendo utilizado para el cálculo del tiempo de relajación de sistemas de NPM superparamagnéticas con anisotropía uniaxial, asumiendo que los dos estados de fácil imanación de la NPM ( $\theta=0^\circ$  y  $\theta=180^\circ$ ) se encuentran separados por una barrera energética igual a la energía de anisotropía del sistema ( $K_A V$ ). La [Ecuación 1.5](#), muestra cómo en este modelo, el tiempo de relajación térmica entre los dos estados ( $\tau_N$ ), se relaciona de manera exponencial con la relación entre la barrera de anisotropía y la energía térmica del sistema ( $K_B T$ ).

$$\tau = \tau_0 \exp(K_A V / K_B T) \quad \text{Ecuación 1.5}$$

Este proceso de relajación en el que el momento magnético se invierte respecto a los ejes cristalinos de la NPM es conocido como relajación Néel. Sin embargo, cuando se trabaja con sistemas coloidales de NPM, la libertad de movimiento de las fases abre la posibilidad de llevar a cabo un proceso de inversión de la imanación basados en la rotación mecánica de las NPM conocido como relajación Browniana.

En este mecanismo, el momento magnético se alinea con el campo sin modificar su posición relativa a los ejes de la red cristalina. El tiempo en el que tiene lugar este proceso de inversión por rotación Browniana ( $\tau_B$ ) depende de la viscosidad del medio ( $\eta$ ), el tamaño hidrodinámico de la NPM ( $D_H$ ) y la temperatura a la que se encuentre ( $T$ ), como se refleja en la [Ecuación 1.6](#).

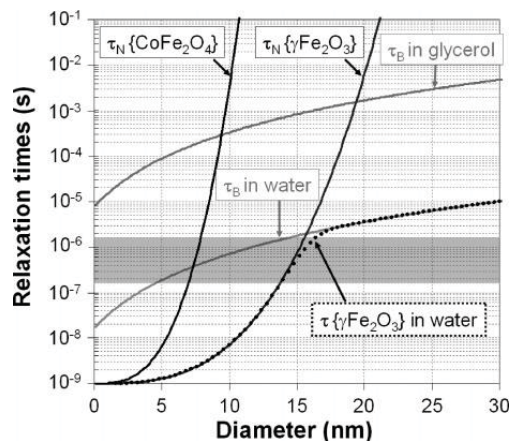
$$\tau_B = \frac{\pi \eta D_H^3}{2 K_B T} \quad \text{Ecuación 1.6}$$

Esta expresión puede ser corregida para tener en cuenta el torque que ejerce el campo aplicado sobre el momento de la partícula añadiéndole un factor dependiente del campo aplicado<sup>19</sup>.

En los sistemas coloidales de NPM aparece una competencia entre los dos mecanismos descritos. Como en otros procesos de relajación competitivos, el mecanismo por el que la NPM relajará la energía acumulada será aquel que ocurra en un tiempo más corto. Por tanto, si ambos procesos son considerados independientes, el tiempo de relajación del sistema se puede calcular como la suma inversa de los tiempos de cada mecanismo según la [Ecuación 1.7](#).

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad \text{Ecuación 1.7}$$

El grado en el que cada uno de los procesos mencionados se desarrolle dependerá de diferentes parámetros. Suponiendo en primera aproximación que el volumen magnético de un coloide de NPM es igual su volumen hidrodinámico (i.e., despreciando el efecto del surfactante y la doble capa aniónica<sup>20</sup>), se puede definir un diámetro límite, denominado tamaño Shliomis, en el que el sistema transita de un tipo de relajación a la otra. La [Figura 1.3](#) muestra la dependencia de los dos tiempos de relajación con el tamaño y el tiempo de relajación efectivo de acuerdo con la [Ecuación 1.7](#). Se puede observar que para una NPM de magnetita ( $K_A=13 \text{ kJ/m}^3$ ) dispersas en agua ( $\eta=1 \text{ mPa s}$ ), el tamaño de Shliomis es de unos 16 nm. Si la viscosidad del medio aumenta (glicerol,  $\eta= 1,2 \text{ Pa s}$ ), este tamaño aumenta hasta los 19 nm. En cambio, si se consideran NPM con mayor anisotropía magnetocristalina ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $K_A=290 \text{ kJ/m}^3$ ), este tamaño puede disminuir hasta los 9 nm.



**Figura 1.3** Representación gráfica del tiempo de relajación Néel ( $\tau_N$ ) para NPM de maghemita ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) y ferrita de Co ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ); y del tiempo de relajación Brown ( $\tau_B$ ) en agua y glicerol, en función del tamaño de las NPM. La línea punteada señala el tiempo de relajación efectivo de NPM de maghemita dispersas en agua (tomada de Fortin y col.<sup>21</sup>).

Esto demuestra que los procesos de relajación magnética no dependen únicamente de las propiedades de las NPM (tamaño, anisotropía, etc.), sino de otros parámetros como la movilidad de estas en el medio de dispersión. El estudio de estos mecanismos de relajación resulta especialmente importante en aquellas aplicaciones biomédicas en las que las NPM se internalizan en tejidos biológicos ya que diferentes estudios han demostrado que la viscosidad de estos medios puede inhibir la rotación Browniana de las NPM modificando drásticamente su respuesta magnética<sup>22</sup>. }

Además, debe tenerse en cuenta que para determinados tamaños y geometrías de NPM existe un grado de dependencia entre estos dos procesos de relajación que complica el análisis de la respuesta dinámica de la magnetización<sup>19,23,24</sup>. Por lo general, a campos moderados, las NPM tienden a alinear sus ejes de fácil imanación con la dirección del campo aplicado además suelen llevar a cabo una relajación tipo Néel<sup>23</sup>.

### 1.2.3 Interacciones dipolares magnéticas

Aunque lo expuesto anteriormente pretende explicar el comportamiento individual de las NPM, en un sistema coloidal, estas partículas no están aisladas sino que interactúan fuertemente entre sí, especialmente cuando la concentración es elevada.

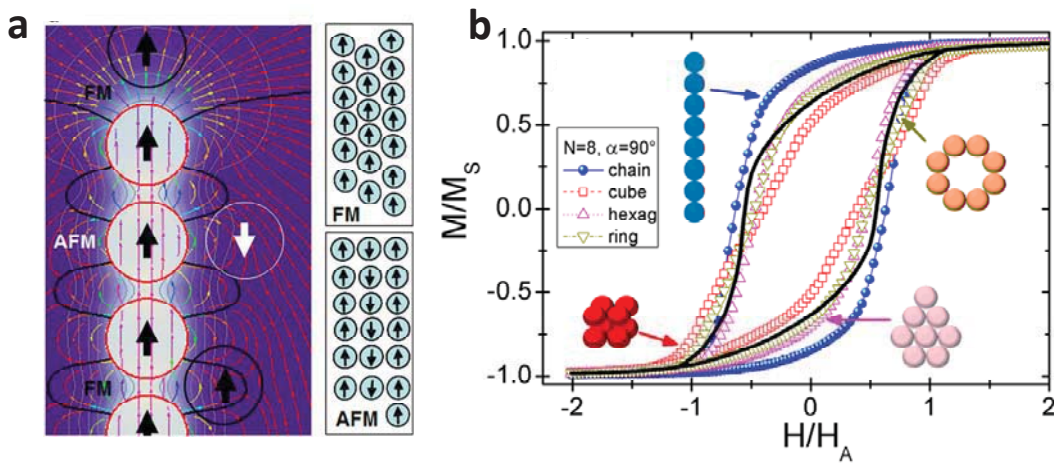
La principal interacción magnética que se produce entre las NPM recubiertas por un surfactante es la interacción entre el momento magnético de una NPM y el campo dipolar generado por los momentos que la rodean. En la [Ecuación 1.8](#) se puede observar cómo esta interacción depende del cubo de la distancia entre partículas (d), del momento magnético que lo genera ( $\mu$ ) y del ángulo entre los dipolos ( $\varphi$ ).

$$\vec{B} = \frac{\mu_0\mu}{4\pi d^3} (2 \cos(\varphi) \hat{u}_r + \text{sen}(\varphi)\hat{u}_\varphi) \quad \text{Ecuación 1.8}$$

Esta dependencia supone que si dos partículas están lo suficientemente cerca, el campo de interacción entre ellas puede llegar a ser superior al campo aplicado, mientras que

sus efectos se atenuarán rápidamente cuando la distancia entre NPM aumente. Además, la dependencia del campo dipolar con  $\theta$  hace que la naturaleza de esta interacción sea fuertemente anisótropa, lo que hace que se puedan generar efectos antagónicos según las posiciones relativas de las NPM.

En la [Figura 1.4a](#) se muestra cómo una configuración punta-cola (nose-tail) de los momentos magnéticos de las NPM genera una interacción cooperativa sobre la imanación (posición negra), mientras que para los momentos que se sitúan en paralelo (posición blanca), la disposición energéticamente más favorable es la antiparalela.



**Figura 1.4** (a) Campo dipolar de un ensamblado de NPM en disposición punta-cola (FM, negro) y antiparalela (AFM, blanca), tomada de Varón y col.<sup>25</sup>. Ciclos de histéresis obtenidos por simulaciones micromagnéticas para diferentes tipos de ensamblados de NPM, tomada de Serantes y col.<sup>26</sup>.

La anisotropía de las interacciones dipolares complica el análisis de sus efectos sobre las propiedades magnéticas de las NPM superparamagnéticas. Los primeros modelos de campo efectivo utilizados para explicar los efectos de las interacciones dipolares en el comportamiento magnético de las NPM fueron desarrollados por Dormann, Bessais y Fiorani (modelos DBF)<sup>27</sup>. En ellos, la interacción dipolar entre NPM era promediada por un campo efectivo que depende de la distancia entre ellas. Este campo efectivo suponía un aumento de las barreras de anisotropía y por ende un aumento en el tiempo de relajación de las NPM. Sin embargo, la aproximación desarrollada por Mørup y Tronc, usando también teorías de campo medio predecía el efecto opuesto<sup>28</sup>. Aunque los resultados experimentales parecen dar la razón a la teoría de DBF, el modelo de Mørup y col. sigue teniendo validez en el caso de NPM poco interactuantes<sup>29</sup>.

Contradicciones similares han sido observadas en simulaciones numéricas del tipo Montecarlo. Mientras que El-Hilo y Bsoul<sup>30</sup> predicen una bajada de la coercitividad como consecuencia de las interacciones dipolo-dipolo, Lu y col.<sup>31</sup> muestran que esta coercitividad puede tanto aumentar como disminuir. Lo que demuestra que las teorías de campo efectivo no resultan una aproximación correcta para la explicación de fenómenos con un carácter tan anisótropo como las interacciones dipolares<sup>32</sup>.

Las simulaciones llevadas a cabo por Serantes y col. Permitieron arrojar luz sobre este asunto<sup>26</sup>. Al comparar los ciclos de histéresis obtenidos para distintos tipos de ensamblados de NPM, los autores observaron que en una disposición lineal de NPM, las interacciones dipolares aumentan la dureza magnética del sistema y por tanto su coercitividad y su remanencia en los ciclos de histéresis. En cambio, si las NPM se encuentran dispuestas en un agregado más compacto (estructura cúbica, hexagonal o anillo) la coercitividad y la remanencia del ciclo resultan inferiores a las de las NPM individuales ([Figura 1.4b](#)). Por este motivo, los efectos de las interacciones dipolares en el comportamiento magnético de las NPM están íntimamente relacionados con su disposición microestructural en los ensamblados que se forman en los coloides.

### 1.3 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Un fenómeno de nanoescala propio de los materiales metálicos, es la generación de los plasmones de superficie localizados. Aunque las propiedades ópticas de las NP metálicas –concretamente de las NP de Au– vienen siendo utilizadas desde el siglo IV a.C. y durante toda la Edad Media para dar coloración a los vidrios fines decorativos<sup>33</sup>, el estudio sistemático de sus propiedades no comenzó hasta finales del siglo XIX<sup>34</sup>. Uno de los padres del electromagnetismo, Michael Faraday, descubrió que la respuesta óptica del Au se veía totalmente modificada cuando este se preparaba como una suspensión coloidal de pequeñas partículas<sup>35</sup>. Este peculiar comportamiento abrió la puerta al estudio de los plasmones de superficie.

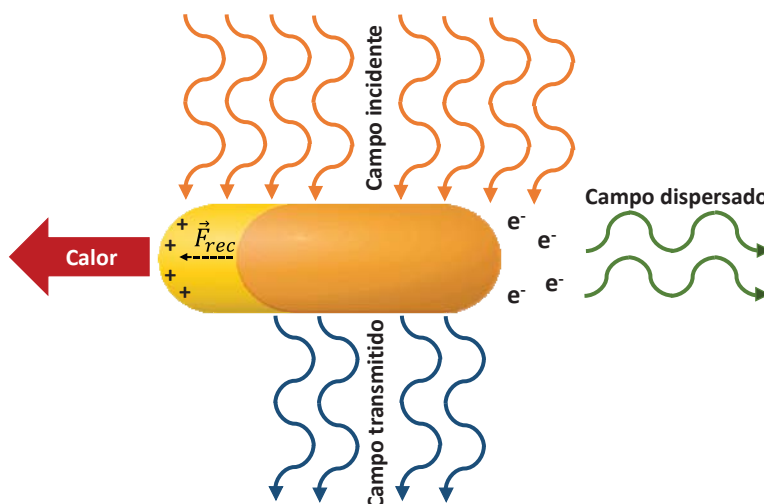
El concepto de plasmón de superficie surgió a principios del siglo XX<sup>36–38</sup>. En aquel entonces, era explicado como unas pequeñas anomalías en los procesos de dispersión de luz de ciertos materiales metálicos. Fue más tarde, con el desarrollo de la teoría cuántica, cuando estas anomalías se relacionaron con la respuesta colectiva de los electrones de conducción frente a una excitación electromagnética<sup>39–41</sup>.

El desarrollo teórico de este concepto y el avance experimental de las técnicas de nanofabricación durante el siglo XX<sup>42</sup> han permitido que en la actualidad, la disciplina conocida como “plasmónica” haya conseguido saltar del laboratorio a la aplicación tecnológica, lo que confiere a las NP metálicas una gran importancia en el campo de la nanotecnología.

#### 1.3.1 Plasmones de superficie localizados

Desde una perspectiva clásica, el plasmón de superficie puede ser explicado como la oscilación colectiva de la nube de electrones libres en las cercanías de una superficie metálica. En términos generales, cuando se aplica un campo eléctrico a un material metálico, los electrones libres de este se desplazan en oposición a la dirección del campo. En los materiales masivos, los electrones acelerados por este campo se desplazan hasta ser dispersados por interacciones con la red cristalina (generalmente con los fonones). La distancia que recorren antes de ser dispersados se conoce como recorrido libre medio y es de unas decenas de nanómetros en materiales metálicos como el Au.

Cuando las dimensiones del material se reducen hasta escalas comparables al recorrido libre medio de sus electrones, son los límites de las NP los que limitan el movimiento de los electrones. Como se muestra en la [Figura 1.5](#), el desplazamiento de los electrones hacia una de las caras de la NP induce una acumulación de carga positiva en la cara opuesta. Se genera entonces, como consecuencia de esta polarización, un campo eléctrico recuperador que fuerza a los electrones a volver al material. Encontramos que la suma del campo excitación y la de recuperación produce una oscilación armónica de los electrones entorno a la superficie del material. Esta oscilación colectiva de los electrones, es conocida como resonancia plasmónica localizada en la superficie o plasmón de superficie localizado.



**Figura 1.5** Esquema de la excitación de un plasmón de superficie en una NP metálica.

Los plasmones de superficie dan a los materiales metálicos en la nanoescala propiedades ópticas únicas. El campo de radiación que generan los electrones al ser acelerados, interfiere con el campo de la luz incidente haciendo que la sección eficaz de las NP supere su sección eficaz geométrica en varios órdenes de magnitud. Esto supone una extraordinaria capacidad de absorción y esparcimiento de la luz incidente. Además, como se muestra en la figura, parte de la energía absorbida es disipada al medio en forma de calor. Las propiedades ópticas de las NP metálicas con respuesta plasmónica o NP plasmónicas hace de ellas excelentes candidatos para aplicaciones como las placas solares<sup>1043</sup>, sistemas ópticos no lineales<sup>44</sup> o biosensores<sup>45,46</sup>.

### 1.3.2 Nanopartículas de Au anisométricas

Las NP de Au destacan frente a otro tipo de materiales metálicos por sus buenas propiedades conductoras, su baja reactividad química y su baja toxicidad. Además, gracias a la intensiva investigación de la química coloidal del Au, la rutas de síntesis son capaces de desarrollar hoy en día una plétora de nanoestructuras que van mucho más allá de las NP de Au esféricas<sup>12,47,48</sup>.

Una de las geometrías no esféricas con mayor desarrollo y aplicabilidad son los nanocilindros de Au (AuNR)<sup>49,50</sup>. Este tipo de NP ofrecen claras ventajas en cuanto a la eficiencia en procesos de absorción y de dispersión de la luz<sup>51</sup>. Aunque existen métodos alternativos como la electrodeposición<sup>52,53</sup> o la reacción por transporte químico<sup>54</sup>, la síntesis medida por semillas desarrollada paralelamente por ElSayed y col.<sup>55</sup> y Murphy y col.<sup>56</sup> es la que mayor popularidad ha alcanzado gracias a su sencillez y versatilidad.

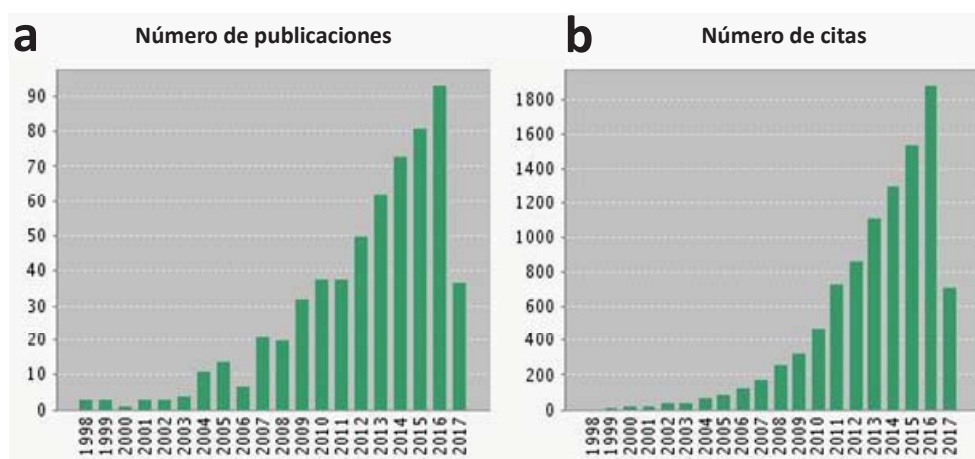
La mayor limitación que presentan estas síntesis es el porcentaje de NP esféricas generadas junto a los AuNR<sup>57</sup>. En la actualidad, la optimización de los parámetros de crecimiento<sup>58</sup> permite aumentar enormemente la eficiencia de la reacción y ajustar a voluntad la relación de aspecto (RA) de las nanoestructuras sintetizadas. Los efectos que los distintos parámetros de síntesis generan en la geometría final de las NP son bien conocidos y pueden ser empleados en el diseño de los AuNR<sup>48,59</sup>.

La asimetría en el tamaño longitudinal y transversal de esta geometría hace que las oscilaciones plasmónicas de los electrones dependan de la dirección en que son excitados. Cada una de estas oscilaciones genera un máximo de extinción en el espectro de absorción de los AuNR. El primero de ellos, asociado al plasmón transversal, aparece en la región visible del espectro. En la región infrarroja (IR) del espectro aparece un segundo máximo asociado al plasmón longitudinal. La principal ventaja que presentan los AuNR es que la frecuencia de las resonancias de estos dos plasmones puede ser ajustada de manera sencilla y precisa cambiando su RA.

A diferencia de otras geometrías como las nanocortezas o las nanoestrellas<sup>60</sup>, los AuNR desarrollan una resonancia plasmónica de alta intensidad en la región IR manteniendo tamaños de NP inferiores a los 50 nm. Una ventaja adicional es que la curvatura de su superficie facilita la adhesión de moléculas y permite realizar recubrimientos diferenciados entre los extremos y las caras laterales de los mismos<sup>50</sup>.

## 1.4 NANOPARTÍCULAS MAGNETO-PLASMÓNICAS HÍBRIDAS

En los últimos años, el avance de los procesos de síntesis ha permitido desarrollar NP inorgánicas multifuncionales en las que se combinan diferentes propiedades complementarias en una sola entidad. Una de las familias de NP multifuncionales más atractivas para la ciencia de materiales son las que presentan respuestas magnética y plasmónica de manera simultánea conocidas como NP magneto-plasmónicas. Aunque el estudio de este tipo de NP es reciente<sup>61</sup>, en la [Figura 1.6](#) se puede observar que el número de publicaciones referentes a las nanopartículas magneto-plasmónicas ha crecido exponencialmente en los últimos años, así como su número de citas. Esto refleja el enorme interés que suscitan estas nanoestructuras en la comunidad científica.



**Figura 1.6** Evolución del número de (a) publicaciones y (b) citas de artículos sobre MPNP según Web Of Science<sup>TM</sup>.

No obstante, existen pocos ejemplos de materiales que presenten propiedades magnéticas y plasmónicas (metálicas) en una sola fase. Los más comunes son los metales de transición del grupo 3d entre los que se encuentran el Fe, el Co o el Ni<sup>62-64</sup> y su aleaciones con otros metales como el CoPt o el FeAu<sup>65,66</sup>. Sin embargo, la alta inestabilidad química de estos elementos –especialmente en la nanoescala– hace que se oxiden fácilmente degradándose sus propiedades fisicoquímicas<sup>67,68</sup>. Por esta razón la mayoría de los estudios magnetoplasmónicos que se llevan a cabo actualmente se basan en nanopartículas magneto-plasmónicas híbridas (NPMPH) o multicomponente, en las que se fusionan materiales magnéticos y plasmónicos para formar un nanocomposite multifuncional.

Como se indicó anteriormente, los efectos de intercara y de proximidad que aparecen en los materiales híbridos pueden modificar sensiblemente las propiedades físicas de cada una de las fases. Por este motivo, resulta de gran importancia evaluar los efectos de interacción que tienen lugar entre las fases que forman parte de las NPMPH.

Por una parte, las oscilaciones plasmónicas resultan enormemente sensibles a la naturaleza de su entorno dieléctrico<sup>69</sup>, ya que los electrones se extienden más allá de las fronteras de la fase metálica y explorar el medio que los rodea. Por este motivo, es común observar cambios en la resonancia plasmónica de la fase metálica<sup>70</sup> como consecuencia del cambio de permitividad de su entorno dieléctrico<sup>71,72</sup>. Otros efectos como el cambio en la densidad electrónica en la superficie del metal, pueden también alterar el comportamiento plasmónico de esta fase. Si durante la hibridación, el enlace de los dos materiales induce un desplazamiento de carga en la intercara, el número de electrones en la superficie metálica se reduce y las oscilaciones colectivas se ven condicionadas<sup>73</sup>. Este hecho se hace especialmente patente en uniones de metales con semiconductores<sup>74,75</sup> pero existen evidencias de efectos similares tras la hibridación con óxidos magnéticos<sup>76-78</sup>. Un tercer fenómeno observado en este tipo de uniones es la deslocalización de carga de la fase metálica<sup>79</sup>. Este efecto resulta especialmente importante en nanoestructuras que acumulan una gran cantidad de defectos cerca de la intercara entre los dos materiales como son las NP anisótropas<sup>80</sup>.

Por otra parte, las propiedades magnéticas también pueden verse modificadas a causa de su hibridación con materiales metálicos, bien sea por la modificación directa de su superficie o por efectos de más largo alcance. Estudios sobre el magnetismo de NPMPH muestran que la presencia de una fase metálica puede suponer cambios en la coercitividad y la imanación del material magnético; en los procesos de inversión de la imanación; e incluso generar nuevas anisotropías mediadas por canje (Exchange bias)<sup>70,74,81-83</sup>. Las causas detrás de estos fenómenos son diversas y algunas de ellas siguen siendo motivo de debate hoy en día. Algunos fenómenos de intercara que se postulan como el posible origen de estas interacciones son: cambios de parámetro de red inducidos por el acople de las redes cristalinas de las fases<sup>81</sup>, la alteración del ordenamiento de los momentos en la intercara (spin canting)<sup>84</sup> o una transferencia de carga entre fases como la mencionada anteriormente<sup>78</sup>. Estos efectos han demostrado ser especialmente relevantes en NPMPH como las nanoflores de Au@FeO<sup>85</sup> en las que existe un gran número de superficies magnéticas en contacto con la fase metálica.

Uno de los posibles métodos para atenuar estos efectos de interacción en las NPMPH y evitar así un detrimento de sus propiedades consiste en introducir un tercer material (orgánico o inorgánico) que actúe como separador entre ellos. Esta interfase, permite regular la proximidad entre las fases y de esta manera reducir el grado de interacción que tiene lugar en la nanoestructura<sup>86</sup>.

Debe señalarse por último que existen efectos que van más allá de una mera influencia en los estados electrónicos o el potencial cristalino entre las fases magnética y plasmónica de materiales híbridos. Se tratan de efectos intrínsecamente magnetoplasmónicos, en los que las propiedades magnéticas pueden ser modificadas mediante excitación lumínica<sup>87</sup> o por el contrario, la respuesta plasmónica resulta sensible al campo magnético aplicado<sup>88</sup>.

La profundización en el estudio de este tipo de sistemas magneto-plasmónicos no solo ha generado un enorme desarrollo de las teorías de la física condensada<sup>61</sup>. La aplicabilidad de estos fenómenos en campos como la catálisis<sup>77</sup>, la óptica no lineal<sup>89</sup> o la biomedicina<sup>90</sup>, hace que la NPMPH susciten un enorme interés tecnológico en la actualidad. Esta tesis se centrará en la aplicación de NPMPH sintetizadas en diferentes campos del ámbito biomédico.

## 1.5 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNETO-PLASMÓNICAS

### 1.5.1 Materiales biocompatibles

El uso de NP inorgánicas en el campo de la biomedicina es entendido actualmente como un proceso normalizado y estandarizado. La proximidad de escala entre las NP y las moléculas asociadas a ciertos mecanismos celulares, permite una intervención local en los procesos biológicos así como, en muchos casos, una incorporación inocua de agentes nanométricos (nanoagentes) en organismos vivos. Además, la alta reactividad superficial de las NP y su elevada relación superficie-volumen los convierte en una plataforma ideal a la hora de adherir biomoléculas con funciones específicas, proceso conocido como biofuncionalización.

Estas ventajas, entre muchas otras, han permitido que tanto las NP como los materiales nanoestructurados encuentren un amplio rango de aplicación en campos de la biomedicina como la imagen médica, la terapia mediada por NP o la biodetección. Sin embargo, existen muy pocos materiales biocompatibles que presenten propiedades magnetoplasmónicas en una sola fase<sup>66,91,92</sup>. Esto obliga generalmente a crear NPMPH a partir de materiales cuya biocompatibilidad haya sido ampliamente demostrada.

Entre los materiales considerados como biocompatibles destacan tres que han atraído una especial atención a nivel científico y tecnológico<sup>93</sup>:

- El óxido de Fe ha demostrado ser uno de los materiales biocompatibles más versátiles en el ámbito biomédico. Aunque otros materiales ferromagnéticos como el Fe, Co o Ni presentan propiedades tecnológicamente interesantes, como una alta imanación o una alta anisotropía magnética, su enorme capacidad oxidativa supone un lastre en muchos casos insalvable para su aplicación en biomedicina. Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la presencia de NP basadas en metales de transición producen especies reactivas de oxígeno que pueden ser letales para los sistemas vivos<sup>94,95</sup>. No obstante, estos materiales podrían llegar a ser utilizados si se recubren adecuadamente<sup>96</sup>.

Este problema desaparece si en vez de utilizar la forma metálica de estos materiales se utilizan NPM basadas en sus óxidos. Generalmente, las propiedades magnéticas se ven perjudicadas por la preeminente disposición

antiferromagnética o ferrimagnética de los espines en las estructuras cristalinas de estos óxidos<sup>97</sup>. No obstante, ciertas fases del óxido de Fe, como la magnetita o la maghemita, preservan una alta imanación y una susceptibilidad considerable, lo que hace de ellas unas candidatas tecnológicamente competitivas. Además, la gran cantidad de métodos de síntesis reportados<sup>98</sup> han situado a las NP basadas en óxidos de Fe como los bioagentes más comunes entre las NPM.

Aunque existen estudios *in vitro* que demuestran que óxidos de Fe como la ferrita de Mn o la ferrita de Co, pueden ser asimilados por los sistemas biológicos en dosis adecuadas sin efectos citotóxicos graves<sup>99</sup>, por el momento, las NP de magnetita y maghemita son las únicas NPM aprobadas por la FDA para su uso en humanos<sup>100,101</sup>.

- Otro óxido metálico que ha atraído el interés de numerosos grupos de investigación es el óxido de silicio o sílice. Entre las ventajas que este material ofrece podrían destacarse las tres siguientes<sup>102</sup>:
  - Existe una química bien establecida respecto a la biofuncionalización de las superficies de sílice, tanto con grupos cargados que mejoran las propiedades coloidales como con biomoléculas funcionales<sup>103</sup>.
  - La porosidad de la sílice preparada coloidalmente permite cargar estas NP con fármacos anticancerígenos o de cualquier otra índole<sup>104,105</sup>. Esta característica ha hecho que las NP de sílice sean uno de los nanoagentes inorgánicos más comúnmente utilizados en el suministro de fármacos<sup>102</sup>.
  - En tercer lugar, la versatilidad de los procesos de síntesis de la sílice ha generalizado su uso como recubrimiento inorgánico de NP. El recubrimientos con sílice permiten mejorar la hidrofobicidad de las NP recubiertas, reducir su toxicidad y preservar las propiedades fisicoquímicas, entre otras muchas funcionalidades<sup>106</sup>.

El reciente artículo de Lu y col. permitió dilucidar las dudas sobre la citotoxicidad de la sílice<sup>107</sup>. En este trabajo se realizaron estudios serológicos, hepatológicos e histopatológicos en ratones y se demostró que la cantidad necesaria para observar efectos nocivos en estos sistemas debe ser superior a 1mg, lo que está muy por encima de las cantidades utilizadas en los tratamientos basados en este tipo de NP.

- El Au es uno de los materiales más utilizados para los estudios con NP plasmónicas en el campo de la nano-medicina. A diferencia de otros materiales metálicos, los metales nobles presentan una baja reactividad química, lo que atenúa su efecto oxidativo sobre los sistemas celulares<sup>108</sup>. Sin embargo, los efectos biocidas observados en otros metales como la Ag o el Cu<sup>109</sup> han supuesto que el Au encontrase un mayor rango de aplicabilidad en campos como la imagen o las terapias mediadas por NP.

Aún sigue existiendo cierta controversia respecto al carácter inocuo de las NP de Au. Si bien, se ha demostrado que las NP de Au más pequeñas (< 3nm) son rápidamente expulsadas por el sistema excretor, algunos estudios muestran que NP de tamaños superiores pueden obstruir la nefronas y quedar acumulados en los riñones<sup>110</sup>. Los diferentes tamaños, geometrías, recubrimientos y dosis utilizados hacen difícil realizar una valoración general sobre la toxicidad de las NP de Au<sup>111,112</sup>, las revisiones más reciente parecen concluir que aunque las rutas de asimilación de este tipo de NP por parte del organismo sigue siendo aun desconocida<sup>113</sup>, su efecto citotóxico en sistemas celulares es pequeño para concentraciones que no superen los 75µg/mL<sup>114</sup>.

Además de los tres materiales mencionados, existen otros que son habitualmente utilizados en estudios biomédicos como las NP semiconductoras conocidas como puntos cuánticos<sup>115</sup>, NP basadas en tierras raras (UCNP)<sup>116</sup> o las nanoestructuras basadas en carbono: fulerenos, nanotubos de carbono o grafeno<sup>117</sup>. Si bien este tipo de estructuras presentan propiedades interesantes para diferentes campos de la biología y la medicina, su biocompatibilidad sigue siendo aún muy cuestionada<sup>118-120</sup>.

Como se puede colegir de los argumentos expuestos en esta sección, la mayor parte de las NPMPH que aspiran a ser utilizadas en el ámbito biomédico actualmente están formadas por una combinación de NP de óxido de Fe, sílice y Au<sup>121-124</sup>. Sin ánimo de ser exhaustivos, describiremos a continuación algunos ejemplos destacados de posibles aplicaciones de las NPMPH en campos como la imagen médica o la terapia anticancerígena.

### 1.5.2 Técnicas de imagen magneto-plasmónicas

Una de las aplicaciones más interesantes de las NP multifuncionales y en especial de las NPMPH es la posibilidad de combinar técnicas de imagen médica en lo que se conoce como imagen multimodal<sup>125</sup>. La fusión de las imágenes obtenidas por diferentes técnicas permite contrastar la información obtenida en cada una de ellas y explotar sus posibles sinergias en el ámbito del diagnóstico médico<sup>126</sup>. Aunque esta es una práctica que se viene realizando desde antes de la aparición de la nanotecnología<sup>127</sup>, la posibilidad de crear agentes de contraste duales ha supuesto un enorme avance y se postula como una verdadera revolución en el campo para los próximos años<sup>125</sup>.

La tomografía computerizada de rayos X (CT) y la imagen de resonancia magnética (MRI) son dos de las técnicas de imagen más utilizadas en el diagnóstico médico. La adquisición simultánea de ambas técnicas permite generar un mapa conjunto de los tejidos duros y blandos del cuerpo<sup>128</sup>. Por este motivo, una de las primeras aplicaciones biomédicas de las NP híbridas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y Au fue el utilizarlas como agentes de contraste de imagen multimodal MRI/CT<sup>129</sup>.

En el caso de la imagen CT/MRI se combina la respuesta magnética del  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y el elevado peso atómico del Au para generar un contraste dual. Sin embargo, el potencial del Au en las NPMPH va más allá de su absorción de rayos X. Sus propiedades plasmónicas permiten combinar la MRI con otras técnicas ópticas como la tomografía de coherencia óptica (OCT)<sup>130</sup>, espectroscopía Raman (SERS)<sup>66</sup>, la fotoluminiscencia (PL)<sup>131</sup> o la imagen fotoacústica (PA)<sup>132</sup>, entre otras.

Esta combinación de técnicas de imagen médica permite mejorar la resolución y la fiabilidad de las mismas, lo que supone un importante avance hacia diagnósticos médicos personalizados<sup>133</sup>.

### 1.5.3 Terapias magneto-plasmónicas

El uso de NP multifuncionales en biomedicina, no se restringe al uso como agentes de contraste. Existe también un amplio campo de investigación en el desarrollo de terapias mediadas por NP. Entre ellas, uno de los ámbitos que más esfuerzos concentra es el de los tratamientos anticancerígenos. Las NP pueden ser utilizadas en este tipo de terapias tanto como plataformas de transporte de fármacos como aprovechando de manera activa sus propiedades fisicoquímicas en la nanoescala.

Una de las aproximaciones más comunes para el uso activo de NP para el tratamiento del cáncer consiste en elevar la temperatura local de los tejidos tumorales hasta los 42°C, temperatura a la que se consigue inducir una muerte apoptótica de las células cancerígenas. Para llevar a cabo esta disipación de calor local se puede utilizar tanto la excitación de plasmones localizados en NP metálicas en lo que se conoce como terapia fototérmica (PT) como los procesos de disipación de calor de las NPM para la hipertermia magnética (HTM).

Las NPMPH, al presentar ambos mecanismos de disipación, permiten combinar estas dos modalidades de hipertermia, multiplicando así la eficiencia del tratamiento y reduciendo la dosis de radiación requerida. Uno de los primeros trabajos en los que se exploró esta posibilidad es el de Manaka y col., en el que se utilizaron NPM de óxido de hierro cúbicas recubiertas con Au<sup>134</sup>. Desde entonces, se han propuesto diferentes NPMPH para esta tarea<sup>135-137</sup>. Recientemente, Wilhelm y col. observaron que este tipo de terapias pueden ser llevadas a cabo con NP de óxido de Fe sin recubrir aprovechando los procesos de calentamiento inducidos por láser en este tipo de NP, lo que simplifica enormemente la aplicación de este tipo de terapias<sup>138</sup>.

También cabe mencionar que existen otras modalidades de terapias magneto-plasmónicas combinadas como la PT aumentada mediante concentración magnética<sup>139</sup> o la HTM con la terapia fotodinámica<sup>140</sup>.

### 1.5.4 Técnicas de teragnosis magneto-plasmónicas

En el desarrollo de terapias personalizadas, uno de los grandes avances conceptuales ha sido la idea de la teragnosis<sup>141</sup>. Este nuevo vocablo surge de la composición de los términos terapia (tera-) y diagnóstico (-gnosis), y encierra dentro de sí la idea de una terapia personalizada en la que la imagen médica permite llevar a cabo el tratamiento local una vez analizada la biodistribución de los fármacos en el organismo<sup>133</sup>. Los procedimientos teragnósticos suponen una mejora significativa en la eficiencia de los tratamientos y en la reducción de los posibles efectos secundarios.

Como se puede colegir de lo descrito hasta el momento, las NPMPH presentan una enorme potencialidad en el campo de la teragnosis. Uno de las aproximaciones más comunes consiste en utilizar su componente plasmónica en tratamientos de PT al mismo tiempo que se estudia el contraste generado por la componente magnética en la imagen de MRI<sup>51</sup>. Para llevar a cabo esta modalidad de teragnosis comúnmente se han utilizado nanoestructuras híbridas como las NP núcleo corteza de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  NP<sup>121</sup>, las NP núcleo-satélite-corteza  $\text{SiO}_2@\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ <sup>122</sup>, las NP núcleo-corteza-corteza  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{Au}$ <sup>123</sup> o las NP yema-cascara  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ <sup>124</sup>.

No obstante, existe una multitud de alternativas aún por explorar como la terapia PT con imagen PL y MRI<sup>142</sup>, dosificación de drogas con imagen multifotónica y MRI<sup>143</sup>, la terapia PT con imagen MRI y PA<sup>144</sup>, y otras muchas que aún están por inventar. La realización de esta tesis pretende ser un paso más en el desarrollo de estas nuevas posibilidades biomédicas y un estímulo para la traslación de los agentes magneto-plasmónicos al ámbito de la nanomedicina personalizada.

## 1.6 REFERENCIAS

1. Devreese, J. T. Sensing the importance of nanosensors: Feynman's visionary 1959 Christmas lecture. *Somnologie* 11, 268–271 (2007).
2. Drexler, K. E. & Minsky, M. *Engines Of Creation: The coming Era of Technology*. Fourth Estate (1986).
3. Taniguchi, N. Current Status in, and Future Trends of, Ultraprecision Machining and Ultrafine Materials Processing. *CIRP Ann. - Manuf. Technol.* 32, 573–582 (1983).
4. Moreau, W. M. in *Label: Moreau1988 kein volltext book 952* (1988). doi:10.1007/978-1-4613-0885-0
5. Overbeek, J. T. G. Monodisperse colloidal systems, fascinating and useful. *Adv. Colloid Interface Sci.* 15, 251–277 (1982).
6. Oatley, C. W. The early history of the scanning electron microscope. *J. Appl. Phys.* 53, R1–R13 (1982).
7. Binnig, G., Quate, C. F. & Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933 (1986).
8. Binnig, G. & Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscopy: from Birth to Adolescence (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed. English* 26, 606–614 (1987).
9. Roco, M. C., Mirkin, C. A. & Hersam, M. C. Nanotechnology Research Directions for Societal Needs in 2020 Retrospective and Outlook. (2010).
10. Atwater, H. A. & Polman, A. Plasmonics for improved photovoltaic devices. *Nat. Mater.* 9, 865–865 (2010).
11. Korkein, A., Gusev, E., Labanowski, H. K. & Luryi, S. *Nanotechnology for Electronic Materials and Devices*. Us, Springer 49, 6221 (2007).
12. Webb, J. a & Bardhan, R. Emerging advances in nanomedicine with engineered gold nanostructures. *Nanoscale* 2502–2530 (2014). doi:10.1039/c3nr05112a
13. ISO. TC 229: Nanotechnologies. [http://www.iso.org/iso/standards\\_development/technical\\_committees/list\\_of\\_iso\\_technical\\_committees/iso\\_technical\\_committee.htm?commid=381983](http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983)
14. Moriarty, P. Nanostructured materials. *Reports Prog. Phys.* 64, 297–381 (2001).
15. Goya, G. F., Berquó, T. S., Fonseca, F. C. & Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* 94, 3520–3528 (2003).
16. Coffey, W. T. et al. Thermally Activated Relaxation Time of a Single Domain Ferromagnetic Particle Subjected to a Uniform Field at an Oblique Angle to the Easy Axis: Comparison with Experimental Observations. (1998).
17. Kalmykov, Y. P. The relaxation time of the magnetization of uniaxial single-domain ferromagnetic particles in the presence of a uniform magnetic field. *J.*

- Appl. Phys. 96, (2004).
18. Néel, L. Influence des fluctuations thermiques a l'aimantation des particules ferromagnétiques. C. R. Acad. Sci. 228, 664–668 (1949).
  19. Mamiya, H. & Hiroaki. Recent Advances in Understanding Magnetic Nanoparticles in AC Magnetic Fields and Optimal Design for Targeted Hyperthermia. J. Nanomater. 2013, 1–17 (2013).
  20. Hunter, R. J. Foundations of colloid science. (Oxford University Press, 2001).
  21. Jean-Paul Fortin, † et al. Size-Sorted Anionic Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia. (2007). doi:10.1021/JA067457E
  22. Hergt, R., Dutz, S. & Zeisberger, M. Validity limits of the Néel relaxation model of magnetic nanoparticles for hyperthermia. Nanotechnology 21, 15706 (2010).
  23. Mamiya, H. et al. Hyperthermic effects of dissipative structures of magnetic nanoparticles in large alternating magnetic fields. Sci. Rep. 1, 157 (2011).
  24. Ota, S., Kitaguchi, R., Takeda, R., Yamada, T. & Takemura, Y. Rotation of Magnetization Derived from Brownian Relaxation in Magnetic Fluids of Different Viscosity Evaluated by Dynamic Hysteresis Measurements over a Wide Frequency Range. Nanomaterials 6, 1–11 (2016).
  25. Varón, M. et al. Dipolar Magnetism in Ordered and Disordered Low-Dimensional Nanoparticle Assemblies. Sci. Rep. 3, 3443–3449 (2013).
  26. Serantes, D. et al. Multiplying magnetic hyperthermia response by nanoparticle assembling. J. Phys. Chem. C 118, 5927–5934 (2014).
  27. Dormann, J. L., Bessais, L. & Fiorani, D. A dynamic study of small interacting particles: superparamagnetic model and spin-glass laws. J. Phys. C Solid State Phys. 21, 2015 (1988).
  28. Mørup, S. & Tronc, E. Superparamagnetic relaxation of weakly interacting particles. Phys. Rev. Lett. 72, 3278–3281 (1994).
  29. Mørup, S., Hansen, M. F. & Frandsen, C. Magnetic interactions between nanoparticles. Beilstein J. Nanotechnol. 1, 182–190 (2010).
  30. El-Hilo, M. & Bsoul, I. Interaction effects on the coercivity and fluctuation field in granular powder magnetic systems. Phys. B Condens. Matter 389, 311–316 (2007).
  31. Lu, J. J., Kuo, C. C., Huang, H. L. & Introduction, I. Hysteretic behavior of magnetic particles with dipole interaction. J. Appl. Phys. 85, 5558–5560 (1999).
  32. Serantes, D. et al. Magnetic ordering in arrays of one-dimensional nanoparticle chains. J. Phys. D. Appl. Phys. 42, 215003 (2009).
  33. Daniel, M.-C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. Chem. Rev. 104, 293–346 (2004).
  34. Reddy, V. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications. Synlett 2006, 1791–1792 (2006).

35. Faraday, M. The Bakerian lecture: experimental relations of gold (and other metals) to light. ... *Trans. R. Soc. ...* 147, 145–181 (1857).
36. Wood, R. W. On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum. *Proc. Phys. Soc. London* 18, 269–275 (1902).
37. Mie, G. Beitr??ge zur Optik tr??ber Medien, speziell kolloidaler Metall??sungen. *Ann. Phys.* 330, 377–445 (1908).
38. Rayleigh, Lord. On the Dynamical Theory of Gratings. *Proc. R. Soc. London A Math. Phys. Eng. Sci.* 79, (1907).
39. Pines, D. & Bohm, D. A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Phys. Rev.* 85, 338–353 (1952).
40. Bohm, D. & Pines, D. A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Phys. Rev.* 82, 625–634 (1951).
41. Bohm, D. & Pines, D. A Collective Description of Electron Interactions: III. Coulomb Interactions in a Degenerate Electron Gas. *Phys. Rev.* 92, 609–625 (1953).
42. Horvath, H. Gustav Mie and the scattering and absorption of light by particles: Historic developments and basics. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 110, 787–799 (2009).
43. Pala, R. A., White, J., Barnard, E., Liu, J. & Brongersma, M. L. Design of plasmonic thin-film solar cells with broadband absorption enhancements. *Adv. Mater.* 21, 3504–3509 (2009).
44. Butet, J., Raziman, T. V., Yang, K.-Y., Bernasconi, G. D. & Martin, O. J. F. Controlling the nonlinear optical properties of plasmonic nanoparticles with the phase of their linear response. *Opt. Express* 24, 17138–48 (2016).
45. Anker, J. N. et al. Biosensing with plasmonic nanosensors. *Nat. Mater.* 7, 442–453 (2008).
46. Sannomiya, T. & Vörös, J. Single plasmonic nanoparticles for biosensing. *Trends Biotechnol.* 29, 343–351 (2011).
47. Grazú, V. & De La Fuente, J. M. Nanobiotechnology - Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles. *Frontiers of Nanoscience* 4, 443–485 (2012).
48. Grzelczak, M., Perez-Juste, J., Mulvaney, P. & Liz-Marzan, L. M. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* 37, 1783–1791 (2008).
49. Garcia, M. A. Surface plasmons in metallic nanoparticles: fundamentals and applications. *J. Phys. D* 44, 283001 (2011).
50. Chen, H., Shao, L., Li, Q. & Wang, J. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* 42, 2679–2724 (2013).
51. Bayazitoglu, Y., Kheradmand, S. & Tullius, T. K. An overview of nanoparticle assisted laser therapy. *Int. J. Heat Mass Transf.* 67, 469–486 (2013).
52. Moon, J.-M. & Wei, A. Uniform gold nanorod arrays from polyethylenimine-

- coated alumina templates. *J. Phys. Chem. B* 109, 23336–41 (2005).
53. Yang Tian, \*,†, Haiqing Liu, †, Guohua Zhao, † and Tatsuma‡, T. Shape-Controlled Electrodeposition of Gold Nanostructures. (2006). doi:10.1021/JP065292Q
  54. Köppe, R., Schmid, G., Schneider, S. & Schnöckel, H. Template-fabricated gold nanowires from gas-phase transport reactions. *Eur. J. Inorg. Chem.* 3657–3661 (2005). doi:10.1002/ejic.200500373
  55. Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. A. Evidence for bilayer assembly of cationic surfactants on the surface of gold nanorods. *Langmuir* 17, 6368–6374 (2001).
  56. Jana, N. R., Gearheart, L. & Murphy, C. J. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv. Mater.* 13, 1389–1393 (2001).
  57. Smith, D. K. & Korgel, B. A. The Importance of the CTAB Surfactant on the Colloidal Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods. (2007). doi:10.1021/la703625a
  58. Scarabelli, L., S??nchez-Iglesias, A., P??rez-Juste, J. & Liz-Marz??n, L. M. A ‘Tips and Tricks’ Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* 6, 4270–4279 (2015).
  59. You, H., Yang, S., Ding, B. & Yang, H. Synthesis of colloidal metal and metal alloy nanoparticles for electrochemical energy applications. *Chem. Soc. Rev.* 42, 2880–904 (2013).
  60. Khlebtsov, N. et al. Analytical and Theranostic Applications of Gold Nanoparticles and Multifunctional Nanocomposites. *Theranostics* 3, 167–180 (2013).
  61. Armelles, G., Cebollada, A., García-Martín, A. & González, M. U. Magnetoplasmonics: Magnetoplasmonics: Combining Magnetic and Plasmonic Functionalities (Advanced Optical Materials 1/2013). *Adv. Opt. Mater.* 1, 2–2 (2013).
  62. Ordal, M. A. et al. Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. *Appl. Opt.* 22, 1099 (1983).
  63. Chen, J. et al. Plasmonic nickel nanoantennas. *Small* 7, 2341–2347 (2011).
  64. Melle, S. et al. Magneto-optical properties of nickel nanowire arrays. *Appl. Phys. Lett.* 83, 4547–4549 (2003).
  65. Vasquez, Y., Sra, A. K. & Schaak, R. E. One-pot synthesis of hollow superparamagnetic CoPt nanospheres. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12504–12505 (2005).
  66. Amendola, V. et al. Magneto-plasmonic Au-Fe alloy nanoparticles designed for multimodal SERS-MRI-CT imaging. *Small* 10, 2476–2486 (2014).
  67. Karim, W. et al. Size-dependent redox behavior of iron observed by in-situ single nanoparticle spectro-microscopy on well-defined model systems. *Sci. Rep.* 6, 18818 (2016).

68. Blaber, M. G. et al. A review of the optical properties of alloys and intermetallics for plasmonics. *J. Phys. Condens. Matter* 22, 143201–15 (2010).
69. Cortie, M. B. & Mcdonagh, A. M. Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 111, 3713–3735 (2011).
70. Zeng, H. & Sun, S. Syntheses, properties, and potential applications of multicomponent magnetic nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* 18, 391–400 (2008).
71. Korobchevskaya, K. et al. Ultrafast carrier dynamics in gold/iron-oxide nanocrystal heterodimers. *Appl. Phys. Lett.* 99, (2011).
72. Velasco, V. et al. Chemically synthesized Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanostructures with controlled optical and magnetic properties. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 48, 35502 (2015).
73. Daniel, M. C. & Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* 104, 293–346 (2004).
74. Shi, W. et al. A general approach to binary and ternary hybrid nanocrystals. *Nano Lett.* 6, 875–881 (2006).
75. Mokari, T., Rothenberg, E., Popov, I., Costi, R. & Banin, U. Selective Growth of Metal Tips onto Semiconductor Quantum Rods and Tetrapods. *Science* (80-. ). 304, 1787–1790 (2004).
76. Yu, H. et al. Dumbbell-like Bifunctional Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Nano Lett.* 5, 379–382 (2005).
77. Lee, Y., Garcia, M. A., Frey Huls, N. A. & Sun, S. Synthetic Tuning of the Catalytic Properties of Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Angew. Chemie Int. Ed.* 49, 1271–1274 (2010).
78. Pineider, F. et al. Spin-polarization transfer in colloidal magnetic-plasmonic au/iron oxide hetero-nanocrystals. *ACS Nano* 7, 857–866 (2013).
79. Comin, A., Korobchevskaya, K., George, C., Diaspro, A. & Manna, L. Plasmon bleaching dynamics in colloidal gold-iron oxide nanocrystal heterodimers. *Nano Lett.* 12, 921–926 (2012).
80. George, C. et al. Optical and electrical properties of colloidal (spherical Au)-(spinel ferrite nanorod) heterostructures. *Nanoscale* 3, 4647 (2011).
81. Chandra, S. et al. Exchange bias effect in Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites. *Nanotechnology* 25, 55702 (2014).
82. Pierce, J. P. et al. Ferromagnetic stability in Fe nanodot assemblies on cu(111) induced by indirect coupling through the substrate. *Phys. Rev. Lett.* 92, 237201–1 (2004).
83. Feygenson, M. et al. Exchange bias effect in Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dumbbell nanoparticles induced by the charge transfer from gold. *Phys. Rev. B* 92, 54416 (2015).
84. Frey, N. A., Srinath, S., Srikanth, H., Wang, C. & Sun, S. Static and Dynamic Magnetic Properties of Composite Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

- formulatype='inline'><tex>\$\_{3}\$</tex></formula>O<formula  
 formulatype='inline'><tex>\$\_{4}\$</tex></formula>Nanoparticles. IEEE Trans.  
 Magn. 43, 3094–3096 (2007).
85. Frey, N. a. et al. Interparticle interactions in coupled Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. J. Appl. Phys. 105, 07B502 (2009).
  86. Nguyen, T.-D. & Tran, T.-H. Multicomponent nanoarchitectures for the design of optical sensing and diagnostic tools. RSC Adv. 4, 916–942 (2014).
  87. Bogani, L. et al. Photocoercivity of nano-stabilized Au:Fe superparamagnetic nanoparticles. Adv. Mater. 22, 4054–4058 (2010).
  88. Pineider, F. et al. Circular magnetoplasmonic modes in gold nanoparticles. Nano Lett. 13, 4785–9 (2013).
  89. Maksymov, I. S. Magneto-Plasmonic Nanoantennas: Basics and Applications (Review). (2016).
  90. Zhang, Y. et al. Magnetic Manipulation and Optical Imaging of an Active Plasmonic Single-Particle Fe À Au Nanorod. 1056, 15292–15298 (2011).
  91. Espinosa, A. et al. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. ACS Nano 6, 11462–11472 (2014).
  92. Amendola, V. et al. Coexistence of plasmonic and magnetic properties in Au 89 Fe 11 nanoalloys. doi:10.1039/c3nr01119d
  93. Anselmo, A. C. & Mitragotri, S. A Review of Clinical Translation of Inorganic Nanoparticles. AAPS J. 17, 1041–54 (2015).
  94. Sanvicens, N. & Marco, M. P. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. Trends Biotechnol. 26, 425–433 (2008).
  95. Auffan, M., Jérôme, R., Wiesner, M. R. & Bottero, J. Chemical stability of metallic nanoparticles : A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. Environ. Pollut. 157, 1127–1133 (2009).
  96. Goya, G. F. et al. Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles. Cell Biol Int 32, 1001–1005 (2008).
  97. Tartaj, P., Morales, M. P., Gonzalez-Carreño, T., Veintemillas-Verdaguer, S. & Serna, C. J. The iron oxides strike back: From biomedical applications to energy storage devices and photoelectrochemical water splitting. Adv. Mater. 23, 5243–5249 (2011).
  98. Laurent, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. Chem. Rev. 108, 2064–2110 (2008).
  99. Zachanowicz, E. et al. Cytotoxic Effects of Co 1–x Mn x Fe 2 O 4 Ferrite Nanoparticles Synthesized under Non-Hydrolytic Conditions (Bradley’s Reaction) – In Vitro. doi:10.1002/ejic.201600720
  100. Tartaj, P. & Serna, C. J. Synthesis of Monodisperse Superparamagnetic Fe/Silica

- Nanospherical Composites. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 15754–15755 (2003).
101. Khandhar, A. P., Ferguson, R. M., Simon, J. A. & Krishnan, K. M. Tailored magnetic nanoparticles for optimizing magnetic fluid hyperthermia. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 100A, 728–737 (2012).
  102. Vallet-Regí, M., Balas, F. & Arcos, D. Mesoporous Materials for Drug Delivery. *Angew. Chemie Int. Ed.* 46, 7548–7558 (2007).
  103. Zhuravlev, L. T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 173, 1–38 (2000).
  104. Liu, J. et al. Gold nanorods coated with mesoporous silica shell as drug delivery system for remote near infrared light-activated release and potential phototherapy. *Small* 11, 2323–2332 (2015).
  105. Sahoo, B. et al. Biocompatible mesoporous silica-coated superparamagnetic manganese ferrite nanoparticles for targeted drug delivery and MR imaging applications. *J. Colloid Interface Sci.* 431, 31–41 (2014).
  106. Sotiriou, G. A. et al. Hybrid, silica-coated, Janus-like plasmonic-magnetic nanoparticles. *Chem. Mater.* 23, 1985–1992 (2011).
  107. Lu, J., Liong, M., Li, Z., Zink, J. I. & Tamanoi, F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small* 6, 1794–1805 (2010).
  108. Nagender Reddy Panyala, Eladia María Peña-Méndez & Josef Havel. Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives. *J Appl Biomed* 7, 75–91 (2009).
  109. Palza, H. Antimicrobial Polymers with Metal Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci* 16, 2099–2116 (2015).
  110. Liu, J., Yu, M., Zhou, C. & Zheng, J. Renal clearable inorganic nanoparticles: a new frontier of bionanotechnology. *Mater. Today* 16, 477–486 (2013).
  111. Li, Y. F. & Chen, C. Fate and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications. *Small* 7, 2965–2980 (2011).
  112. Khlebtsov, N. & Dykman, L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of in vitro and in vivo studies. *Chem. Soc. Rev* 40, 1647–1671 (2011).
  113. Zhu, M. et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. *Acc. Chem. Res.* 46, 622–31 (2013).
  114. Rosa, S., Connolly, C., Schettino, G., Butterworth, K. T. & Prise, K. M. Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nanotechnol.* 8, 2 (2017).
  115. Michalet, X. et al. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science* (80-. ). 307, (2005).
  116. Nguyen, P.-D., Son, S. J. & Min, J. Upconversion nanoparticles in bioassays, optical imaging and therapy. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 14, 157–74 (2014).

117. Gogotsi, Y. & Presser, V. in *Advanced Materials and Technologies Series* (2014).
118. Hardman, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ. Health Perspect.* 114, 165–72 (2006).
119. Zhang, Y. et al. Cytotoxicity Effects of Graphene and Single-Wall Carbon Nanotubes in Neural Phaeochromocytoma-Derived PC12 Cells. *ACS Nano* 4, 3181–3186 (2010).
120. Beddoes, C. M., Case, C. P. & Briscoe, W. H. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Advances in Colloid and Interface Science* 218, 48–68 (2015).
121. Larson, T. a, Bankson, J., Aaron, J. & Sokolov, K. Hybrid plasmonic magnetic nanoparticles as molecular specific agents for MRI/optical imaging and photothermal therapy of cancer cells. *Nanotechnology* 18, 325101 (2007).
122. Kim, J. et al. Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45, 7754–7758 (2006).
123. Ji, X. et al. Bifunctional Gold Nanoshells with a Superparamagnetic Iron Oxide–Silica Core Suitable for Both MR Imaging and Photothermal Therapy. *J. Phys. Chem. C* 111, 6245–6251 (2007).
124. Huang, Y. et al. Multifunctional metal rattle-type nanocarriers for MRI-guided photothermal cancer therapy. *Mol. Pharm.* 11, 3386–3394 (2014).
125. Smith, B. R. & Gambhir, S. S. *Nanomaterials for In Vivo Imaging.* (2017). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00073
126. Martí-Bonmatí, L., Sopena, R., Bartumeus, P. & Sopena, P. Multimodality imaging techniques. *Contrast Media Mol. Imaging* 5, 180–189 (2010).
127. Kuhl, D. E., Hale, J. & Eaton, W. L. Transmission Scanning: A Useful Adjunct to Conventional Emission Scanning for Accurately Keying Isotope Deposition to Radiographic Anatomy. *Radiology* 87, 278–284 (1966).
128. Dao, T. T. et al. Multimodal medical imaging (CT and dynamic MRI) data and computer-graphics multi-physical model for the estimation of patient specific lumbar spine muscle forces. *Data Knowl. Eng.* 96, 3–18 (2015).
129. Zhu, J. et al. Synthesis of Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> heterostructured nanoparticles for in vivo computed tomography and magnetic resonance dual model imaging. *Nanoscale* 6, 199–202 (2014).
130. Nebelung, S. et al. Quantitative OCT and MRI biomarkers for the differentiation of cartilage degeneration. *Skeletal Radiol.* 45, 505–516 (2016).
131. Wang, X. et al. Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@P(St/MAA)@Chitosan@Au Core/Shell Nanoparticles for Dual Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5, 4966–4971 (2013).
132. Bogdanov, A. A. et al. Synthesis and Testing of Modular Dual-Modality Nanoparticles for Magnetic Resonance and Multispectral Photoacoustic

- Imaging. *Bioconjug. Chem.* 27, 383–390 (2016).
133. Shin, T., Choi, Y., Kim, S. & Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem. Soc. Rev.* 44, 4501–16 (2015).
  134. Abdulla-Al-Mamun, M., Kusumoto, Y., Zannat, T., Horie, Y. & Manaka, H. Au-ultrathin functionalized core-shell (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au) monodispersed nanocubes for a combination of magnetic/plasmonic photothermal cancer cell killing. *RSC Adv.* 3, 7816 (2013).
  135. Das, R. et al. Boosted Hyperthermia Therapy by Combined AC Magnetic and Photothermal Exposures in Ag/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoflowers. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 8, 25162–25169 (2016).
  136. Lai, J.-J., Lai, W.-R., Chen, C.-Y., Chen, S.-W. & Chiang, C.-L. Multifunctional magnetic plasmonic nanoparticles for applications of magnetic/photo-thermal hyperthermia and surface enhanced Raman spectroscopy. *J. Magn. Mater.* 331, 204–207 (2013).
  137. Espinosa, A. et al. Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia? *Nanoscale* 7, 18872–18877 (2015).
  138. Espinosa, A. et al. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano* 10, 2436–2446 (2016).
  139. Bhana, S. et al. Near-infrared-absorbing gold nanopopcorns with iron oxide cluster core for magnetically amplified photothermal and photodynamic cancer therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 11637–11647 (2015).
  140. Di Corato, R. et al. Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. 9, 2904–2916 (2015).
  141. Sáez-Fernández, E., Pérez-Artacho, B., Martínez-Soler, G. I., Gallardo, V. & Arias, J. L. Teragnosis: un nuevo concepto en el tratamiento del cáncer. *Ars pharm* 51, 177–181 (2010).
  142. Bardhan, R., Lal, S., Joshi, A. & Halas, N. J. Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer. *Acc Chem Res.* 44, 936–946 (2011).
  143. Zhou, Y.-M. et al. Yolk-type Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanospheres for drug delivery, MRI and two-photon fluorescence imaging. *Dalt. Trans.* 42, 9906 (2013).
  144. Huang, L. et al. Magneto-Plasmonic Nanocapsules for Multimodal-Imaging and Magnetically Guided Combination Cancer Therapy. *Chem. Mater.* 28, 5896–5904 (2016).

# Capítulo II

## **Técnicas Experimentales**

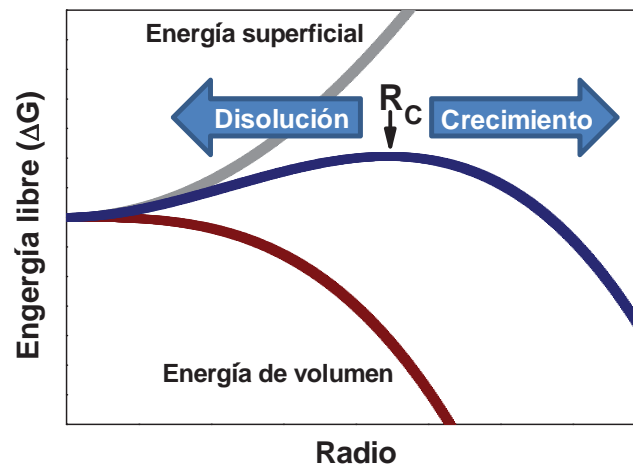


## 2.1 RUTAS DE SÍNTESIS QUÍMICA

### 2.1.1 Crecimiento coloidal de NP de Au mediado por semillas

En 1950 LaMer y Dinegar propusieron una teoría capaz de explicar el crecimiento coloidal de nanocristales<sup>1</sup>. En este modelo, se parte de una disolución sobresaturada de especies reactivas y estudia la formación de estructuras cristalinas a lo largo del tiempo. Para ello el proceso de formación de las NP es dividía en dos etapas: la nucleación y el crecimiento.

La etapa de nucleación se inicia cuando la concentración de especies precursoras supera la concentración de saturación del disolvente. En esta situación de sobresaturación, para las especies precursoras resulta energéticamente favorable formar pequeños agregados atómicos que denominaremos núcleos. De acuerdo con la teoría clásica de la nucleación, en estas estructuras aparecen dos contribuciones a la energía libre del sistema, la energía de volumen (negativa) y la energía superficial (positiva), que crecen de manera desigual con el radio del núcleo ([Figura 2.1](#)).



**Figura 2.1** Energía libre de los núcleos en función del tamaño según la teoría de nucleación clásica.

El balance energético entre estas dos contribuciones hace que mientras los núcleos sean pequeños y la energía superficial sea mayor que la energía de volumen, la energía libre del sistema resulte positiva. En esta situación, la agitación térmica hace que los núcleos se descompongan disolviéndose de nuevo en el medio. Cuando el tamaño de los núcleos supera un cierto radio crítico ( $R_c$ ) en el que la energía libre alcanza un máximo, el sistema prefiere minimizar su energía aumentando el tamaño del núcleo. A partir de este

momento, el núcleo se considera estable. El radio crítico de los núcleos depende tanto de la temperatura de reacción como de su grado de sobresaturación, por lo que la etapa de formación de los núcleos podrá ser modificada ajustando estos parámetros de reacción.

Una vez que la concentración de especies se reduce, la formación de núcleos se detiene y las especies restantes se incorporan por difusión a la superficie de los núcleos formados en lo que se conoce como etapa de crecimiento. Existe un punto en el que la concentración de precursores en el medio desciende y el número de especies que difunden hacia la superficie de los cristales es igual al de especies que se separan de él. A partir de entonces, quedan dos mecanismos por los que los cristales pueden continuar aumentando su tamaño, el envejecimiento de Ostwald<sup>2</sup> y el crecimiento por coalescencia o agregación<sup>3</sup>. En el primero de los casos, los núcleos más estables aumentan su tamaño incorporando a su red cristalina las especies liberadas al medio por las partículas más pequeñas. En cambio, en el proceso de coalescencia o agregación, las redes cristalinas de las partículas se unen entre sí para minimizar su energía superficial formando cristales de mayor tamaño. Según sea el ensamblado de los núcleos, este mecanismo de crecimiento puede dar lugar a NP policristalinas o monocristalinas<sup>4,5</sup>.

Una de las condiciones fundamentales para obtener coloides de NP monodispersos, i.e. con una única población de tamaños, es que las etapas de nucleación y crecimiento se encuentren separadas temporalmente. Además, la nucleación debe producirse en un periodo de tiempo corto de manera que el crecimiento de los núcleos sea simultáneo y presenten un tamaño similar cuando se detenga la síntesis.

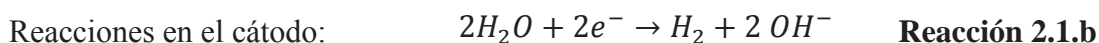
Por este motivo, una estrategia común para separar estas dos etapas es el crecimiento coloidal de NP mediado por semillas o nucleación heterogénea. En este tipo de síntesis, la formación de NP se lleva a cabo en dos etapas. En una primera etapa, se induce la formación de semillas (NP de unos pocos nanómetros) mediante un proceso de nucleación instantánea. La concentración de reactivos en esta etapa es ajustada para evitar el crecimiento de los núcleos. Las semillas formadas, son añadidas en una segunda etapa a una solución de crecimiento que contiene nuevas especies reactivas en la que se produce un crecimiento lento de los cristales. La separación forzada de estas dos etapas permite obtener NP de tamaños grandes (>50 nm) con una alta uniformidad de tamaños.

Para la síntesis de AuNR se escogió el método de crecimiento coloidal mediado por semillas de El-Sayed<sup>6</sup>. En primer lugar, se sintetizó una suspensión coloidal de pequeñas semillas de Au (~2-3 nm) para que actuaran como centros de nucleación durante el crecimiento. En una segunda etapa, estas semillas fueron añadidas a una disolución con una alta cantidad de precursores de Au en la que se consiguió inducir el crecimiento anisótropo de los AuNR. En la síntesis de AuNR la separación de las etapas de nucleación y crecimiento permitió además reducir el número de partículas esféricas presentes en el coloide final.

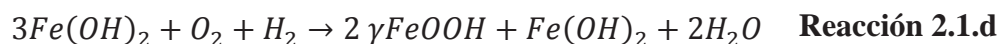
Para conseguir NP coloidalmente estables es común añadir moléculas surfactantes que se unan a la superficie de las NP para evitar que las fuerzas de atracción como Van der Waals, o dipolar magnética en el caso de las NPM, generen una agregación descontrolada de las mismas. En función de su naturaleza, la fuerza de repulsión producida por los surfactantes se clasifica en electrostática o estérica<sup>7</sup>. En el caso de las NP de Au, el recubrimiento con Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (CTAB) jugó un papel crucial tanto en el crecimiento anisótropo como en la estabilización coloidal de las mismas.

### 2.1.2 Síntesis electroquímica de NP basadas en óxidos Fe

Las NPM basadas en óxidos de Fe fueron producidas mediante una ruta de síntesis electroquímica. Esta técnica se fundamenta en la liberación de iones metálicos al medio electrolítico, que se producen cuando se oxida un electrodo de dicho metal (ánodo) con la consiguiente reducción de otra especie en el cátodo. Como cátodo se utiliza generalmente otra placa metálica. Para el caso particular de la síntesis electroquímica de la magnetita, las [Reacciones 2.1a-e](#) muestran las reacciones que tienen lugar en el ánodo, en el cátodo y en el medio electrolítico.



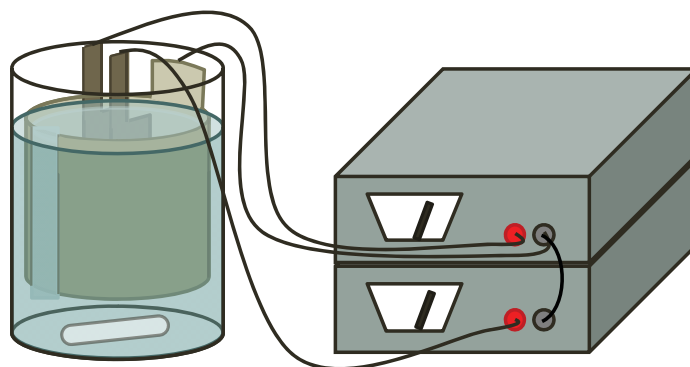
Reacciones en el medio electrolítico:



De acuerdo con los estudios más recientes<sup>8</sup>, la corriente suministrada al ánodo produce la oxidación de las especies metálicas ( $\text{Fe} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$ ). Estos iones reaccionan con los  $\text{OH}^-$  producidos en el cátodo formando hidróxidos metálicos ([Reacción 2.1.c](#)). Para que los grupos hidróxido alcancen el ánodo y reaccionen con los iones metálicos de forma más rápida es necesaria una agitación intensa en el medio electrolítico.

Una vez formados, los hidróxidos metálicos reaccionan con el oxígeno disuelto en el medio para formar oxihidróxidos en los que las especies metálicas pasan de estado  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta transformación resulta imprescindible para la formación de óxidos como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) así como otras ferritas ( $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$ ), ya que estas estructuras requieren una proporción 2:1 entre los estados de oxidación  $\text{M}^{3+}$ :  $\text{M}^{2+}$ . La necesidad de estos oxihidróxidos como especie intermedia fue corroborada por Herrasti y col.<sup>8</sup> estudiando rutas de síntesis sin  $\text{O}_2$  en las que se observó una inhibición en la formación de los óxidos de Fe.

En la última etapa, [Reacción 2.1.e](#), tiene lugar la formación de los óxidos metálicos a partir de la reacción entre los oxihidróxidos y los hidróxidos metálicos presentes en el medio. Parámetros de reacción como la temperatura, la agitación, la corriente o la geometría del electrodo habían sido ya optimizados previamente en el laboratorio para obtener NP de magnetita, así como de otras ferritas, con alta homogeneidad y reproducibilidad<sup>9</sup>.



**Figura 2.2** Esquema del montaje experimental utilizado en la síntesis electroquímica de las ferritas de Mn, Co y Ni.

En esta tesis, la síntesis de NP de magnetita fue llevada a cabo utilizando dos electrodos planos de  $1\text{cm}^2$  y  $4\text{cm}^2$  respectivamente, enfrentados entre sí y separados 1 cm. En cambio para la síntesis de las ferritas de Mn, Co y Ni resultó necesario introducir un

segundo ánodo en el sistema, de manera que se dispuso un sistema de dos ánodos planos de 1 cm<sup>2</sup>, rodeados por un cátodo cilíndrico de Fe como el que se muestra en la [Figura 2.2](#). La celda electroquímica fue situada sobre una placa calefactora con agitación magnética. En el caso de las síntesis a baja temperatura se empleó una celda electroquímica termostataada.

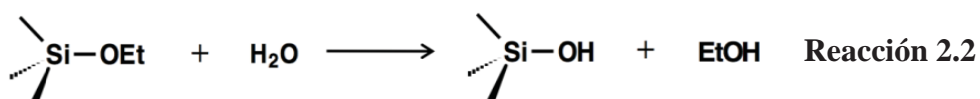
La síntesis electroquímica de NP presenta múltiples ventajas frente a otro tipo de síntesis de NPM:

- Permite la producción directa de NP coloidales en medio acuoso. Evitando etapas posteriores de transferencia propias de las síntesis en medio orgánico.
- Resulta una ruta versátil a la hora de controlar el tamaño y la composición de las NP sintetizadas. Por ejemplo, el uso de electrodos múltiples permite sintetizar NP de óxidos de Fe mixtos como la ferrita de Co, Mn, Ni o Zn.
- La estequiometría de las NP puede ser finamente ajustada variando la corriente que se aplica a los electrodos.
- Se trata de un proceso escalable e industrializable. Estudios recientes en nuestro laboratorio demuestran que el uso de sistemas de síntesis en flujo permite alcanzar un ritmo de producción mínimo de 1 g/h, en generación continua.

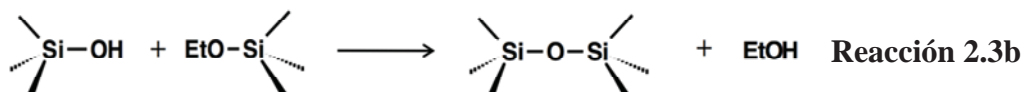
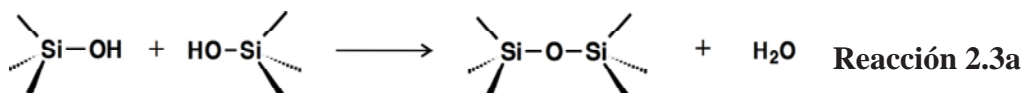
### 2.1.3 Método de Stöber para el recubrimiento de NP con óxido de Si

El conocido como método de Stöber es una ruta de síntesis basada en reacciones sol-gel para la producción de NP de sílice o para el recubrimiento de superficies con capas delgadas de sílice. En este método se lleva a cabo la hidrólisis de alcoxisilanos (como el tetraetilortosilicato (TEOS), entre otros) en un medio con hidratación limitada utilizando como catalizador una base fuerte (NH<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>OH, etc.). En los métodos de Stöber basados en TEOS se distinguen tres etapas sol-gel: hidrólisis, condensación y polimerización.

En la primera de ellas, los radicales alcohólicos del TEOS reaccionan con una molécula de agua para convertirse en grupos hidroxilos generando una molécula de etanol, tal y como se indica en el [Reacción 2.2](#).



Tras la etapa de hidrólisis, los grupos hidroxilos generados entorno al centro de Si, pueden reaccionar con otras moléculas de TEOS hidrolizadas produciendo agua (**Reacción 2.3.a**), o bien hacerlo con radicales no hidrolizados para producir etanol (**Reacción 2.3.b**).



Como se puede observar, al final de ambos procesos se genera la unión de los centros de Si a través de un átomo de O. La última etapa, la polimerización, consiste en la repetición del proceso de condensación sobre el resto de radicales libres del TEOS, generando así, una red sólida de óxido de Si o sílice (SiO<sub>2</sub>). Observando detenidamente la secuencia de reacciones, se puede deducir que el control de la proporción de etanol y agua en el medio, así como de otros posibles disolventes, juega un papel fundamental en las estructuras de sílice obtenidas por este método.

En los recubrimientos con sílice por el método de Stöber, los procesos de sol-gel descritos tienen lugar en la superficie de las NP. Por este motivo, es común utilizar surfactantes con grupos activos que catalicen la formación controlada de la sílice. En el desarrollo de la tesis, se utilizó una variación del método de Stöber para llevar a cabo el ensamblado de las NPM y los AuNR en un proceso de recubrimiento conjunto mediado por las moléculas de su superficie.

## 2.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES

### 2.2.1 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM)

La resolución óptica de las técnicas de microscopía basadas en luz resulta insuficiente a la hora de estudiar la estructura de los materiales en la nanoescala. Por este motivo en 1933 Knoll, Ruska y von Borries desarrollaron una nueva familia de microscopios que utilizaba la naturaleza ondulatoria de los electrones, recientemente descubierta por la teoría cuántica, para aumentar el límite de resolución de los equipos.

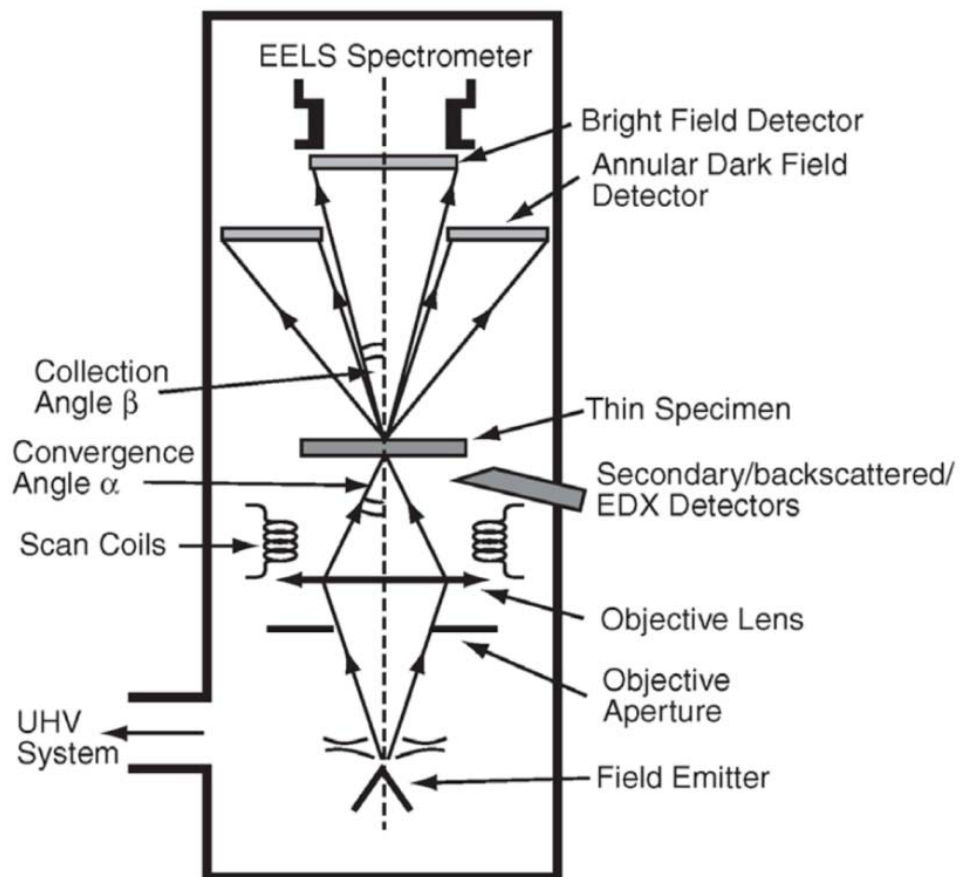
La microscopía electrónica de transmisión (TEM) caracteriza las propiedades de una muestra analizando la cantidad de electrones dispersados por el material al ser atravesado por un haz de electrones de alta energía<sup>10</sup>. En función del espesor de la muestra y la naturaleza de los átomos que componen el material, los electrones pueden resultar parcial o totalmente dispersados. Esto permite, mediante un conjunto de lentes electromagnéticas, reconstruir una imagen del material en la que se recoge información sobre la geometría, la estructura cristalina y la composición de las fases que lo componen.

La resolución del TEM puede ser aumentada focalizando el haz electrónico en un único punto y barrer toda la muestra reconstruyendo la imagen pixel por pixel. En este modo, conocido como microscopía electrónica de transmisión por barrido (STEM), los detectores son situados en distintos rango angulares a la hora de reconstruir la imagen. La [Figura 2.3](#) muestra un esquema general de un STEM.

Para el estudio de NP coloidales por TEM o STEM, la muestra es generalmente preparada secando una muestra diluida del coloide sobre rejillas de Cu o Ni recubiertas de con un soporte polimérico que actúa como fondo homogéneo en la imagen. Se han desarrollado múltiples estrategias para conseguir una buena dispersión de partículas sobre la rejilla cuando el medio es evaporado<sup>11</sup>. A pesar de ello, la fuerzas de atracción entre nanopartículas hace que éstas aparezcan en la rejilla con un cierto grado de agregación tras el secado. Esta agregación resulta especialmente significativa en el caso de las NPM donde las interacciones dipolares atraen más fuertemente las NP a medida que se evapora el medio de dispersión.

### 2.2.1.a Espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX)

La espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) utiliza los rayos X producidos en la interacción del haz electrónico y la muestra para realizar un análisis composicional del material. Cuando un electrón choca con un átomo, este puede interactuar con los electrones de los orbitales internos expulsándolo del átomo. El electrón expulsado deja entonces un hueco en las capas profundas del átomo que es rellenado por otro electrón de las capas más externas. Cuando esto sucede, el exceso de energía generado en la transición puede relajarse expulsando alguno de los electrones más externos del átomo (electrones Auger) o emitiendo radiación de rayos X. La energía de los rayos X emitidos está en relación con el peso atómico del elemento del que proviene así como del tipo de transición electrónica que lo produce ( $L \rightarrow K$ ,  $M \rightarrow L$ , etc.). Esto permite conocer la composición de la muestra analizando la energía de los rayos X recogidos por un detector próximo a la muestra.



**Figura 2.3** Esquema general de un microscopio STEM equipado con sistemas de espectroscopía EDX y EELS (tomada de Livi y col.<sup>12</sup>).

### 2.2.1.b Microscopía de difracción de ángulo alto en campo oscuro (HAADF)

Aunque la aproximación más sencilla para reconstruir la imagen TEM es situar el diafragma del microscopio en el camino del haz transmitido, si se estudian los electrones dispersados por la muestra, es posible extraer información adicional sobre las propiedades de muestra. Este modo de reconstrucción de la imagen se conoce como campo oscuro. En la imagen de campo oscuro del modo STEM, se utiliza un detector en forma de anillo como el que se muestra en la [Figura 2.3](#) para recoger únicamente los electrones dispersados por la muestra con mayor ángulo y excluir el haz principal de electrones transmitidos. Esta técnica se conoce como campo oscuro anular de alto ángulo (HAADF). En la imagen HAADF, los materiales que más electrones dispersan aparecen en el detector como una señal brillante sobre un fondo oscuro y el contraste de las fases depende aproximadamente del cuadrado de su peso atómico ( $Z^2$ ). El uso del campo oscuro permite además eliminar de la imagen fases amorfas que dificultan el estudio de la estructura cristalina del materiales<sup>13</sup> y realizar análisis de alta resolución sobre la distribución composicional de los elementos en compuestos, aleaciones y materiales nanoestructurados<sup>14</sup>.

### 2.2.1.c Espectroscopía electrónica de pérdida de energía (EELS)

La espectroscopía electrónica de pérdida de energía (EELS)<sup>14</sup> analiza los electrones que han sido dispersados por la muestra de manera inelástica (intercambiando energía con la red) para conocer la naturaleza química de los átomos que producen esta dispersión. Para ello, el haz de electrones recogido es introducido en un espectrómetro con una pieza polar que lo descompone separando los electrones del haz en función de su energía. La intensidad de electrones registrados en función de la energía permite la identificación de las especies presentes en cada pixel de la muestra y sus posibles estados de oxidación.

En la tesis se utilizó un equipo de TEM (JEM1400, 120kV, JEOL) equipado con un detector EDX (SSD, resolución 127 eV) y un equipo TEM de alta resolución (HRTEM, JEM 3000F, JEOL) del Centro Nacional de Microscopía. Además, se solicitaron medidas STEM-EELS (TITAN, FEI Company) de la Universidad de Zaragoza.

### 2.2.2 Patrones de difracción de rayos X (XRD)

El análisis de los patrones de difracción de rayos X (XRD) es una de las técnicas que más avances ha producido en la ciencia de materiales durante el siglo XX. Desde su descubrimiento en 1895<sup>15</sup>, la XRD ha sido intensivamente utilizada en el análisis microestructural de los materiales, así como en el estudio de sus cambios de fase o de su cristalinidad.

La periodicidad de los planos atómicos hace que al iluminar una material cristalino con un haz de rayos X, la interferencia de los haces refractados solamente resulte constructiva para una serie de ángulos. La ley de Bragg permite relacionar los ángulos de interferencia constructiva ( $\theta_{klh}$ ), i.e. picos de difracción del patrón de XRD, con la separación de los planos cristalinos del material ( $d_{klh}$ ), según indica la [Ecuación 2.1](#).

$$n\lambda = 2d_{klh} \text{sen}(\theta_{klh}) \quad \text{Ecuación 2.1}$$

Donde  $n$  son números enteros y  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de rayos X incidente. Haciendo uso de esta ley, es posible analizar la estructura cristalina y la cristalinidad de los compuestos que la componen mediante la posición e intensidad de los picos de difracción del patrón de XRD.

La anchura de los picos de XRD está directamente relacionada con la extensión de las redes cristalinas que los producen, es decir, con el tamaño de los cristales que componen la muestra. La ecuación de Scherrer ([Ecuación 2.2](#)), permite estimar el tamaño medio del cristal ( $\langle D \rangle$ ) a partir la anchura a media altura de sus picos de difracción ( $\beta$ ).

$$\langle D \rangle = \frac{K \lambda}{\beta \cos(\theta_{klh})} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

Donde  $K$  es la constante de Scherrer, cuyo valor típico es de 0,9, y  $\theta_{klh}$  es el ángulo correspondiente al pico analizado. Para que esta ecuación sea válida, la anchura a media altura registrada experimentalmente debe ser corregida extrayendo la contribución instrumental. Esta contribución puede ser medida a partir del difractograma XRD de una muestra patrón de silicio monocristalino. A la hora de analizar la anchura de los picos, debe tenerse en consideración que la anchura experimental de los picos de difracción puede verse afectada por las tensiones inhomogéneas en la muestra, por lo que, si no realizan las correcciones adecuadas, el valor obtenido por la ecuación de Scherrer debe ser considerado una estimación<sup>15</sup>.

Las medidas de XRD que se muestran en esta tesis fueron obtenidas mediante un equipo X'pert MPD de Philips definiendo un paso de  $0,03^\circ$  y un tiempo de adquisición en el paso de 3 s. Estas medidas fueron solicitadas al Centro de Atención a la Investigación de la Universidad Complutense de Madrid (CAI-UCM).

### **2.2.3 Espectrometría visible-infrarroja (Vis-IR)**

Se denominan espectros visible-infrarrojos (Vis-IR) a las mediciones de extinción óptica que analizan longitudes de onda desde el principio del espectro visible (400nm) hasta el infrarrojo cercano (1200 nm). No obstante los límites de estos espectros pueden ser modificados en función de la muestra que se desee analizar.

Para obtener el coeficiente de absorción de un coloide de NP, la muestra es iluminada con un haz de luz procedente de un monocromador en el que se selecciona la longitud de onda que se desea analizar. La intensidad de luz transmitida para la longitud de onda seleccionada es registrada por un fotodetector y comparada haz de referencia que atraviesa una cubeta idéntica que es rellenada con el medio de dispersión.

Los espectros Vis-IR fueron adquiridos en un espectrómetro Perkin Elmer Precisely Lambda 35 con fuente de luz blanca (incluyendo IR cercano) con cubetas cuadradas de cuarzo de 1 cm de lado y un volumen de muestra de 3 mL.

### **2.2.4 Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)**

La espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) es una técnica de espectroscopía cuantitativa que permite determinar las trazas presentes en una muestra en disolución acuosa para una gran variedad de elementos. Para analizar la concentración de los diferentes elementos, el volumen de muestra es transportado mediante una bomba peristáltica hasta un plasma de acoplamiento inductivo donde se nebuliza y se eleva su temperatura hasta 10000 K de modo que los átomos queden parcialmente ionizados o altamente excitados. Los fotones emitidos por los elementos al relajar su energía se registran mediante un sistema de espectroscopía óptica donde se analiza su energía e intensidad. La energía de los fotones emitidos se relaciona unívocamente con la naturaleza de los átomos presentes en la muestra y mediante la intensidad de los picos es posible cuantificar la cantidad y proporción de cada uno de ellos.

En el caso de las NP, la preparación de la muestra exige digerir los materiales de manera que se eliminen elementos masivos y se puedan analizar los iones individualmente. Una vez digeridas en agua regia, las muestras fueron diluidas en agua destilada hasta un volumen conocido. Las medidas de ICP-OES se realizaron mediante un plasma de argón acoplado a un espectrómetro Perkin Elmer Optima 2100DV. Estas medidas fueron solicitadas a la Unidad de Análisis Químico del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid.

### **2.2.5 Espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier (FT-IR)**

La espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FT-IR) es una técnica de caracterización molecular que analiza los procesos de vibración y torsión de grupos moleculares a partir de los espectros de absorción de luz en el IR medio y lejano. Cuando la vibración o torsión de estos grupos moleculares modifica su momento dipolar neto, los espectros de absorción FT-IR muestran picos característicos en la energía asociada a estas transiciones.

El análisis por transformada de Fourier de los picos de absorción de luz IR permite caracterizar los grupos moleculares presentes en la muestra analizada, la proporción entre ellos y en algunos casos, su estado de interacción con su entorno.

Las muestras analizadas en esta tesis fueron preparadas como pastillas rígidas prensando una mezcla del polvo resultante de la liofilización de la muestra de NP con polvos de KBr deshidratado. Para analizar la correcta unión de los recubrimientos orgánicos con la superficie de las NP, los coloides fueron dializados durante 2 días en agua destilada con un cambio asiduo del medio de liofilización a fin de eliminar cualquier molécula no adherida. El equipo utilizado en la caracterización por absorción FT-IR es un Bruker IFS 66V-S con un rango de frecuencias  $7000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ . Las medidas fueron solicitadas al Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid (SIDI-UAM).

### **2.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico (TGA) utiliza una báscula del alta precisión para analiza las variaciones de peso que se producen en una muestra sólida al elevar su temperatura en una atmósfera controlada. Esta técnica permite, entre otras cosas, conocer la proporción de material orgánico de una muestra a partir de la pérdida de peso experimentada. Además, conociendo las temperaturas de calcinación de los compuestos orgánicos es posible analizar la naturaleza y la proporción de los recubrimientos.

Para realizar los estudios de TGA se utilizó un equipo TGA Q500 de TA Instruments que opera en un rango de temperaturas entre temperatura ambiente y 1000 °C con una sensibilidad en peso de 300  $\mu$ g. Las medidas fueron solicitadas al SIDI-UAM.

### **2.2.7 Dispersión dinámica de Luz (DLS)**

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una de las técnicas de caracterización coloidal más importantes de la actualidad. Esta técnica permite conocer el tamaño hidrodinámico de fases sólidas dispersadas en un medio líquido, así como su carga superficial o su peso molecular. Para la caracterización coloidal de las NP se utilizó como sistema de DLS un Zetasizer Nano (Malvern) con longitud de onda 633 nm que fue facilitado por el Instituto de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC).

#### **2.2.7.a Medición del tamaño hidrodinámico**

Las medidas de tamaño hidrodinámico de una suspensión coloidal de NP por DLS, se fundamentan en la relación directa que existe entre el tamaño de las NP y su agitación Browniana. Según la ecuación de Stokes-Einstein<sup>16</sup>, cuanto menor es el tamaño de las NP mayor agitación experimentan en un medio con una viscosidad y temperatura dadas.

El sistema de DLS mide la agitación Browniana de las NP estudiando la correlación entre la luz dispersada por el coloide en un ángulo de 173° y un haz de referencia. En el caso de las partículas más pequeñas la correlación entre los haces decae rápidamente, mientras que las partículas más grandes muestran tiempos de correlación mayores. Existen diferentes métodos para relacionar el tiempo de correlación con el tamaño de las NP (acumulativo, CONTIN, etc.). En esta tesis se utilizaron los datos generados por el equipo usando el modo de intensidad de luz dispersada. El índice de polidispersidad (ICP) de la medida es utilizado como indicador de la homogeneidad de la muestra.

Para realizar una medición óptima del tamaño hidrodinámico la concentración de la muestra debe ser ajustada en función del tamaño de las NP de modo que se obtenga una intensidad de luz dispersada suficiente para el análisis y se eviten efectos de dispersión de luz múltiple. Por este motivo, el valor del tamaño hidrodinámico fue medido repetidamente sobre coloides de concentración cada vez más diluida hasta obtener un valor reproducible.

### 2.2.7.b Medición del potencial Z

Según la teoría de la doble capa<sup>17</sup>, cuando una NP con carga superficial es dispersada en un medio acuoso, parte de los contraiones del medio quedan adsorbidos sobre la superficie de las NP formando una capa denominada capa interna o compacta, que apantalla parcialmente la carga superficial de las NP. La carga remanente hace que en el entorno de esta primera capa aparezca una segunda región con una descompensación de iones y contraiones denominada capa difusa, que se desplaza con la NP en su movimiento Browniano. De acuerdo con esta teoría, el potencial Z se define como el potencial electrostático de la superficie exterior de la capa difusa que rodea las NP y está correlacionado con la carga superficial de la NP.

La medición del potencial Z mediante DLS se fundamenta en la respuesta electroforética de las NP cuando son sometidas a un campo eléctrico. En las medidas de potencial Z, este campo es generado en el interior de la cubeta mediante dos electrodos metálicos situados a ambos extremos de un capilar de plástico transparente. El campo generado en los electrodos desplaza las NP del medio en la dirección del campo o en oposición a este con una velocidad proporcional a su carga superficial. Las medidas de DLS permiten conocer el desplazamiento inducido y, de esta manera, calcular el potencial Z de las NP mediante un procesamiento de los datos patentado por la casa comercial (M3-PALS) que combina técnicas de velocimetría laser por efecto Doppler y el análisis de la fase de la luz dispersada<sup>16</sup>.

En términos generales, el cálculo del potencial a partir del desplazamiento electroforético se hace uso de la ecuación de Henry<sup>16</sup>. Esta ecuación tiene en cuenta la viscosidad del medio, su constante dieléctrica relativa y un parámetro de ajuste entre 1 y 1,5 que depende de la aproximación teórica que se escoja para su resolución, Smoluchowski o Hückel. En los datos presentados se escogió la primera aproximación.

Debe tenerse en cuenta además que el tamaño y la carga de la doble capa, depende de la ionicidad y del pH del medio. Por este motivo, para mantener constante su fuerza iónica y poder realizar medidas contrastables, las muestras fueron dispersadas en un electrolito inerte de  $\text{KNO}_3$   $10^{-2}\text{M}$ . El valor del pH en el medio se ajustó mediante disoluciones diluidas de  $\text{KOH}$  y  $\text{HNO}_3$ .

### 2.2.8 Magnetometría SQUID

La caracterización magnética de las muestras fue realizada principalmente en un magnetómetro SQUID (Superconduction Quantum Interference Device). Esta técnica combina el efecto de cuantización del flujo magnético de una espira superconductora y el efecto Josephson de las uniones superconductoras<sup>18</sup>. El uso conjunto de estos dos efectos permite realizar una medida precisa del cambio de flujo en el interior de un anillo superconductor con uno o dos separadores aislantes para medir la magnetización de la muestra analizada con una elevada precisión.

No obstante, los magnetómetros comerciales no realizan las medidas del cambio de flujo sobre las uniones Josephson directamente. En el montaje experimental de un SQUID basado en corrientes AC, la magnetometría se lleva a cabo haciendo atravesar la muestra a través de un sistema de cuatro espiras conectadas en serie-oposición dos a dos<sup>19</sup>. La corriente inducida en estas bobinas por el paso de una muestra es transportada hasta una bobina transmisora que se acopla inductivamente con el anillo superconductor. La unión Josephson del anillo superconductor transforma este cambio de flujo magnético en una corriente eléctrica, que es registrada mediante una segunda bobina también acoplada al anillo superconductor en la que se amplifica la señal para su adquisición.

Las medidas magnéticas realizadas en esta tesis se centran en las curvas de magnetización frente a campo, denominadas curvas M-H, y las curvas de susceptibilidad frente a temperatura para muestras enfriadas sin campo aplicado y con campo aplicado, denominadas curvas ZFCFC. Al tratarse de una caracterización magnética de muestras coloidales se realizaron dos tipos de preparaciones: en polvo y en dispersión. Las muestras en polvo se prepararon moliendo ligeramente el material obtenido tras liofilizar los coloides y comprimiéndolo ligeramente con algodón en una cápsula de gelatina. Las medidas en dispersión se realizaron en cápsulas herméticas de parafina con un volumen de muestra de 50  $\mu\text{L}$ . El magnetómetro SQUID utilizado es un MPMS XL-5 de Quantum Design que opera a temperaturas comprendidas entre 1,7 K y 400 K y alcanza campos de 55 kOe con una sensibilidad de equipo es de  $10^{-7}$  emu.

### 5.2.9 Magnetometría de alta frecuencia

La medición de la respuesta magnética a alta frecuencia fue realizada en un equipo casero desarrollado en la Universidad de Toulouse<sup>20</sup>. El montaje experimental se compone de dos bobinas cilíndricas concéntricas en las que se sitúa un volumen de muestra de 500  $\mu\text{L}$ . La bobina generadora de campo (exterior), está compuesta por 120 vueltas de cable de Litz (480x0.071mm) y es alimentada con un amplificador de corriente HSA 4201 ( $I=\pm 2.8\text{A}$ ,  $V=\pm 150\text{V}$ ,  $\omega = 500\text{ kHz}$ ) conectado a un generador de funciones (MTX 3240, Metrix). La bobina captadora o pick-up (interior) se compone de dos bobinas idénticas compuestas de 7 vueltas de cable de Cu (0,7 mm), separadas 2 cm entre si y conectadas en serie. Con el fin de anular la corriente generada en la bobina captadora por el campo aplicado, las dos bobinas fueron bobinadas en direcciones opuestas de manera que, en ausencia de muestra, la fuerza electromotriz fuese nula.

Este sistema permite registrar de manera simultánea el campo aplicado (H) y la magnetización de la muestra (M). Para ello, se registra en un osciloscopio el potencial inducido por el campo en la bobina captadora sin muestra ( $V_1$ ) y en el conjunto de bobinas en serie ( $V_2$ ). Estos dos voltajes se relacionan con los valores de H y de M respectivamente, de acuerdo con las [Ecuaciones 2.3a y b](#)<sup>20</sup>.

$$\mu_0 H(t) = \frac{\int V_1 dt}{n S_{coil}} \quad \text{Ecuación 2.3a}$$

$$M(t) = \frac{\int V_2 dt}{\mu_0 n \rho [NP] S_{coil}} \quad \text{Ecuación 2.3b}$$

Donde  $S_{coil}$  y  $n$  son la superficie y el número de vueltas de la bobina captadora, respectivamente;  $\rho$  es la densidad de las NP y  $[NP]$  es la concentración de NP. Analizando las señales integradas es posible obtener los ciclos M-H de las muestras a alta frecuencia. Estas medidas fueron realizadas por la estudiante de doctorado Irene Morales durante una estancia breve de investigación.

### 5.2.10 Calorimetría local inducida por radiación

La generación de calor por parte de las NP magnéticas y plasmónicas al ser irradiadas con un campo magnético de radiofrecuencia y con luz laser respectivamente, fue evaluada de manera análoga. En ambos casos, se utilizó una sonda de temperatura óptica (Calex Electronics Limited) con una sensibilidad de  $0,1^{\circ}\text{C}$  que se introdujo en el volumen de muestra y se conectó a un sistema computarizado de registro de temperatura.

En el caso del calentamiento magnético, los campos magnéticos AC de alta frecuencia fueron generados mediante un equipo casero desarrollado también en la Universidad de Toulouse compuesto por un núcleo de Ni-Zn en forma de C con un entrehierro de 1,1 cm, bobinado con dos bobinas de 20 vueltas de cable de Litz ( $24 \times 10 \times 0.05$  mm) a ambos lados del entrehierro<sup>21</sup>. Las bobinas fueron alimentadas con un sistema amplificador y un generador de funciones similar al descrito en el apartado anterior. Estas medidas fueron también realizadas por la estudiante de doctorado Irene Morales.

Para el calentamiento por excitación plasmónica se utilizó un láser IR de 785 nm (Thorlabs LDM785, 20mW) focalizado en el extremo de un vial cilíndrico de 1,5 mm de diámetro interno y 2,5 mm de diámetro externo donde se colocó la dispersión de NP. El láser fue focalizado para obtener una cintura de haz de 3 mm x 2,1 mm.

La inhomogeneidad del campo magnético en el caso de las hipertermia magnética y del haz laser en el caso de la hipertermia óptica no permitieron descartar cierta subestimación del valor del SAR como consecuencia de procesos convectivos y radiativos del sistema. Para minimizar estos efectos, se utilizó un volumen pequeño de la muestra (500  $\mu\text{L}$  para el calentamiento magnético y 40  $\mu\text{L}$  para el calentamiento óptico)<sup>22</sup>.

## 2.3 TÉCNICAS DE IMAGEN Y DETECCIÓN BIOMÉDICAS

### 2.3.1 Imagen de ultrasonidos (US)

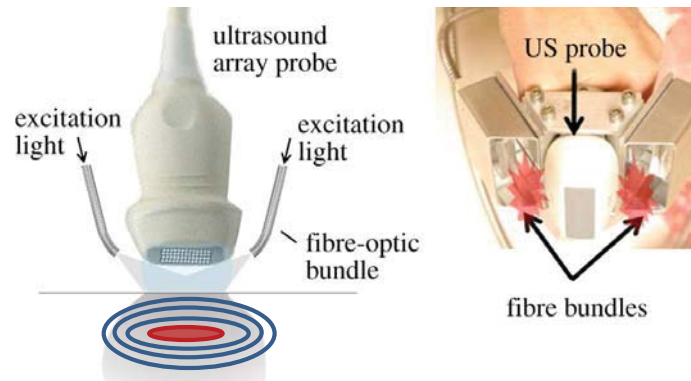
La imagen de ultrasonidos (US) es una de las técnicas de diagnóstico médico más utilizadas en campos como la oncología, la ginecología o cardiología. En esta técnica de imagen utiliza la señal reflejada por un frente de US al atravesar dos medios con diferente impedancia acústica, para componer una imagen 2D o 3D de los órganos internos de un organismo, mediante técnicas de reconstrucción inversa<sup>23</sup>. La coherencia de las ondas reflejadas al propagarse por el organismo, permite obtener información de órganos profundos con una pérdida de resolución relativamente baja. En los sistemas de imagen por US actuales se consigue alcanzar una resolución submilimétrica en órganos situados en profundidades de varios centímetros.

### 2.3.2 Imagen fotoacústica (PA)

Una variante más reciente de la imagen por US es la imagen PA<sup>24</sup>. La imagen PA se basa en el efecto foto-acústico descubierto por Alexander Graham Bell en 1880<sup>25</sup>. Este efecto explica la conversión de ondas electromagnéticas pulsadas (generalmente luz láser) en ondas de presión por parte de agentes absorbentes de luz (moléculas, NP, etc.).

La [Figura 2.4](#) muestra el esquema básico de un sistema PA convencional. En primer lugar, se ilumina la región de estudio con radiación pulsada de alta intensidad usando un periodo de pulsos del orden de los ns o ps, según el rango de frecuencias en el que se desee trabajar. Esta radiación es absorbida y disipada en forma de calor por los agentes fotosensibles presentes en la región iluminada. El incremento de temperatura se traduce en un máximo de presión local que, generado de forma periódica, produce un frente de ondas de US que viajan a través del medio. Las ondas generadas en estos puntos son recogidas por un transductor de ultrasonidos que reconstruye la posición de los focos donde fueron emitidas. Mediante un cálculo de reconstrucción inversa similar al utilizado en la imagen por US, es posible determinar la posición de los agentes absorbentes de luz dentro de la región iluminada. La resolución de la microscopía fotoacústica puede ser aumentada ajustando el foco del pulso de excitación de luz o el del detector de US<sup>26</sup>. A pesar de su enorme potencial, el efecto fotoacústico no fue utilizado como técnica de imagen médica hasta 1981, un siglo después del descubrimiento de Graham Bell<sup>27</sup>. Desde entonces, la mejora en las fuentes de emisión,

transductores de US y agentes de contraste han permitido mejorar la imagen PA y aplicarla al ámbito biomédico<sup>28,29</sup>.



**Figura 2.4** Sistema comercial de imagen fotoacústica (modificada de Kim y col.<sup>30</sup>).

A diferencia de la imagen de US, donde el contraste entre regiones se fundamenta en la diferente respuesta mecánica de los tejidos, la intensidad señal PA depende principalmente de la composición química y de su capacidad de absorción de luz. Por este motivo, estas dos técnicas son utilizadas generalmente de manera combinada, enviando pulsos alternos de luz y US. La señal acústica generada en cada pulso es registrada por un transductor común que reconstruye una imagen mecano-funcional de los tejidos<sup>31</sup>.

Los estudios de imagen de US y PA presentados en esta tesis fueron realizados en un montaje experimental casero de la Universidad de Washington compuesto por un oscilador óptico paramétrico (Surelite OPO plus, Continuum) alimentado por un laser YAG (Surelite I-20, Continuum) con una longitud de onda de 800 nm para generar un pulso de 5 ns, como fuente de excitación, y un detector de US Vantage 128 (Verasonics) equipado con un transductor de US lineal de 128 elementos (L7-4, ATL) que opera a una frecuencia de 25MHz y tiene una profundidad focal de 25,4 mm.

La luz láser fue transportada hasta la región de estudio mediante dos fibras ópticas de 1.5 mm. Las imágenes combinadas de US/PA fueron obtenidas emitiendo los pulsos de US 30  $\mu$ s después de los pulsos de luz. La coordinación de los pulsos y el registro de las señales lo realizó un programa propio de Matlab. Para la imagen PA mejorada con resolución magneto-motriz se utilizó un electroimán compuesto por un núcleo de Fe dulce en forma de U, con un brazo cónico y el otro terminado en forma rectangular. El brazo cónico fue bobinado con hilo de Cu y alimentado con un generador de funciones unido a un amplificador (AFG-3252, Tektronix).

## 2.4 TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

### 2.4.1 Cultivo de células tumorales tipo HeLa

Para los ensayos de toxicidad, internalización y evaluación de la efectividad de los tratamientos llevados a cabo en esta tesis se utilizó como modelo una línea tumoral de adenocarcinoma humano de cérvix: HeLa (ATCC® CCL-2.2TM)

#### 2.4.1.a Descongelación y preparación de cultivos celulares

Para el cultivo de esta línea celular se partió de un vial de células HeLa congeladas en una mezcla de 1 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) y 9 mL de suero fetal bovino (FBS). La descongelación se realizó dispersando el volumen de células congeladas en un frasco de cultivo (F-25) con 4mL medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado con 50 unidades/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina y un 10% de FBS. Las células fueron incubadas en un incubador a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y un 90% de humedad relativa. El medio de cultivo fue renovado a las 4 h y a las 24 h para eliminar los restos de DMSO. La manipulación de las células se realizó en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar.

#### 2.4.1.b Preparación de placas de cultivo para experimentación

Una vez obtenida una monocapa de células HeLa en el F-25, las células se sembraron en placas de cultivo de 12 y 24 pocillos (COSTAR) para su incubación con NP. La siembra se realizó despegando la capa de células HeLa mediante un proceso de tripsinización. La tripsina es una enzima que rompe las proteínas que unen las células al sustrato y permite que estas sean resuspendidas para su transferencia a las placas de cultivo. No obstante, una exposición prolongada a la tripsina puede dañar las células. Por ello, la tripsinización se detiene rápidamente añadiendo medio de cultivo.

Para llevar a cabo la tripsinización, se extrajo en primer lugar el medio de cultivo de los F-25 y se añadió 1 mL de tripsina. Este primer mL fue descartado y sustituido por 1 mL de tripsina fresca. Tras 30 segundos, se extrajo la mayor parte de la tripsina y se introdujo el F-25 en la incubadora durante 2 min. Transcurrido este tiempo, se terminó de despegar las células golpeando con la mano las paredes laterales del frasco. Una vez despegadas, la tripsinización fue detenida añadiendo 4 mL de medio de cultivo. Las placas de cultivo de 24 pocillos y 12 pocillos se sembraron con 8 µL y 16 µL de suspensión celular por pocillo y 0,5 mL y 1 mL de medio de cultivo, respectivamente.

## 2.4.2 Visualización celular mediante microscopía óptica

### 2.4.2.a Métodos de microscopía óptica

La modalidad de microscopía óptica más habitual es la microscopía de campo claro. En este modo, la luz atraviesa la muestra y es recogida por un conjunto de lentes que amplían la imagen y la proyectan en una cámara para su adquisición. No obstante, las células HeLa utilizadas son transparentes a la luz visible y por tanto no presentan ningún tipo de contraste en el campo claro. Por este motivo, para obtener imágenes de campo claro es necesario fijar las células y teñirlas para poder identificar su geometría.

Una modalidad alternativa que permite la visualización de las células sin necesidad de tinción es el contraste de fase. Este modo utiliza el desfase que sufren las ondas de luz al atravesar medios con diferente índice de refracción. Mediante un desfasador ( $\lambda/4$ ) es posible generar una interferencia con los rayos de la luz transmitidos y la luz incidente que resulta destructiva o constructiva dependiendo del desfase introducido por el material iluminado. En las imágenes de contraste de fase, las células pueden ser observadas sin ser tener que ser teñidas, lo que permite un control no destructivo de los ritmos de crecimiento celular y una evaluación preliminar del estado de su membrana plasmática.

La tercera modalidad de microscopía es el campo oscuro. Como se explicó en el **Apartado 2.2.1.b** en este tipo de imágenes se analiza la luz dispersada por la muestra. A diferencia de la microscopía electrónica por HAADF, el microscopio óptico de campo oscuro utiliza el mismo sistema de lentes objetivas que las de campo claro en la reconstrucción de la imagen. Para conseguir aislar los fotones dispersados, en este caso se bloquea el haz de luz incidente con un filtro circular, de manera que los rayos de luz que llegan a la muestra lo hagan únicamente con incidencia oblicua y el objetivo solamente recoja aquellos haces de luz que modifiquen su trayectoria rectilínea. Esta modalidad permite la identificación sencilla de NP a partir de la luz dispersada, pudiendo resolver la luz dispersada por una única NP.

### 2.4.2.b Tinción celular con azul de metileno

Para los estudios de internalización de las NP mediante microscopía óptica de campo claro, las células se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio esterilizados con etanol y pasados por la llama de un mechero Bunsen. Tras 24 h de incubación con las NP, las células fueron fijadas en etanol frío (70%) durante 90 s, se dejaron secar y se tiñeron con una solución acuosa de azul de metileno (0,5 mg/mL) durante 1 minuto, se dejaron secar al aire y se montaron en un portamuestras con DePeX (Serva). Esta tinción confiere a los nucleolos una coloración azul oscuro, la cromatina se tiñe de un azul algo más claro y el citoplasma aparece teñido azul pálido. Los agregados de NP aparecen en el microscopio con una coloración marrón oscura, lo que permite su identificación.

### 2.4.3 Ensayo de proliferación y viabilidad celular por tinción con azul de tripán

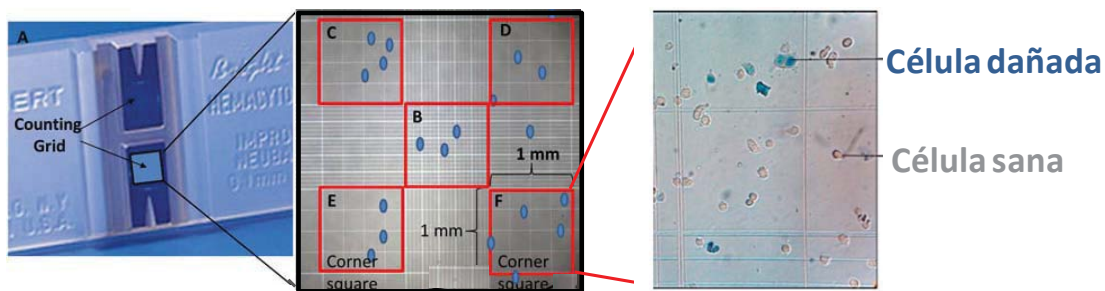
Los ensayos de proliferación y viabilidad celular con azul de tripán se basan en la tinción diferenciada entre las células sanas (permanecen refringentes) y aquellas que han perdido la integridad de su membrana celular (tintan su citoplasma en azul) cuando son mezcladas con azul de tripán<sup>32</sup>. Mediante el recuento celular de una suspensión de células en volumen conocido de líquido, se puede calcular el número total de células que tenemos en ella, así como determinar también, la proporción de células vivas y muertas que hay en esa suspensión.

#### 2.4.3.a Ensayo de proliferación

Para conocer el número de células de una población, en primer lugar, se tripsinizó la placa de cultivo estudiada y se detuvo la tripsinización con un volumen conocido de medio de cultivo celular. De esta suspensión celular, se tomó una pequeña muestra, que se mezcló con una solución de azul tripán (Sigma Aldrich) diluido en tampón fosfato al 50%. Una vez realizada la dilución se agitó bien la mezcla y se introdujo en un hemocitómetro como el que se muestra en la [Figura 2.5](#). El número de células se obtuvo contando las células que se observan en la rejilla. Este hemocitómetro está provisto de dos cámaras y cada cámara tiene habitualmente 9 celdillas, cuyo perímetro está delimitado por tres líneas paralelas. Cada uno de esos cuadrados tiene 1 mm de lado.

Contando las células que se encuentran en cada uno de esos cuadrados, obtenemos el número de células contenido en 1 mm x 1 mm x 0,1 mm (distancia del cubreobjetos al hemocitómetro) = 0,1 mm<sup>3</sup> = 10<sup>-4</sup> mL. El número de células (X) por mL = X/10<sup>-4</sup> = X·10<sup>4</sup>, se corresponde al número de células por mL que hay en la solución de azul tripán/PBS.

Multiplicando este valor por el factor de dilución fue posible conocer el número de células por mL de la suspensión original. El número de células y su error estadístico se obtuvo a partir del conteo realizado en las cuadrículas de las esquinas y el centro del hemocitómetro.



**Figura 2.5** Hemocitómetro utilizado en ensayo de proliferación celular por azul de tripán (modificada de Carrera Páez y col.<sup>33</sup>).

#### 2.4.3.b Ensayo de viabilidad

El ensayo de azul de tripán fue utilizado también para estimar la efectividad de los tratamientos anticancerígenos mediante un conteo por microscopía óptica. Para ello se dividió el número de células en dos grupos, las que aparecieron brillantes y sin teñir, que correspondían a las células vivas y las que aparecieron teñidas de azul que eran las células muertas. El porcentaje de supervivencia se obtuvo dividiendo el número de células vivas por número de las células totales.

### 2.4.4 Ensayo de viabilidad celular por MTT

El ensayo de viabilidad MTT es un test colorimétrico que mide la actividad metabólica celular<sup>34</sup>. En este ensayo, placas de 24 pocillos, sembradas con idéntico número de células se incuban con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) durante 4 horas aproximadamente. Las mitocondrias metabólicamente activas transforman, a través de la enzima succinato-deshidrogenasa, el MTT hidrosoluble y de color amarillo, en cristales hidrófobos de formazán de color azul que crecen en el interior de las células en forma de aguja. Transcurridas 4 horas de ensayo, el medio es retirado y los cristales de formazán son disueltos con 0,5 mL de DMSO. En este tipo de ensayos, la formación de cristales de formazán y consecuentemente la absorción óptica (en 542 nm) resulta proporcional a la cantidad de células metabólicamente activas.

El porcentaje de viabilidad se calculó dividiendo el promedio de la absorbancia de los pocillos analizados por el promedio de la absorbancia de los pocillos control y multiplicando por 100. Para el estudio colorimétrico de los ensayos MTT se utilizó un espectrofotómetro con lector de placas Tecan Spectra Fluor del Departamento de Biología de la UAM. La posible interferencia de de las NP en las medidas de absorción fue eliminada centrifugando los volúmenes de DMSO con formazán de cada pocillo a 10000 rpm durante 15' y transfiriendo el sobrenadante de DMSO coloreado a placas nuevas para su análisis.

## 2.5 REFERENCIAS

1. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847–4854 (1950).
2. Voorhees, P. W. The theory of Ostwald ripening. *J. Stat. Phys.* **38**, 231–252 (1985).
3. Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles ? a new perspective. *CrystEngComm* **17**, 6809–6830 (2015).
4. Penn, R. L. Imperfect Oriented Attachment: Dislocation Generation in Defect-Free Nanocrystals. *Science (80-. )*. **281**, 969–971 (1998).
5. Li, D. *et al.* Direction-Specific Interactions Control Crystal Growth by Oriented Attachment. *Science (80-. )*. **336**, 1014–1018 (2012).
6. Nikoobakht, B. & El-sayed, M. A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods ( NRs ) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **15**, 1957–1962 (2003).
7. Polte, J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles ? a new perspective. *CrystEngComm* **17**, 6809–6830 (2015).
8. Lozano, I., Casillas, N., de León, C. P., Walsh, F. C. & Herrasti, P. New Insights into the Electrochemical Formation of Magnetite Nanoparticles. *J. Electrochem. Soc.* **164**, D184–D191 (2017).
9. Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P. & Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochim. Acta* **53**, 3436–3441 (2008).
10. Reimer, L. & Kohl, H. *Transmission Electron Microscopy Physics of Image Formation. Springer series in optical sciences* **51**, (2008).
11. Majumder, M. *et al.* Overcoming the Coffee-Stain Effect by Compositional Marangoni-Flow-Assisted Drop-Drying. *J. Phys. Chem. B* **116**, 6536–6542 (2012).
12. Brydson, R., Brown, A., Benning, L. G. & Livi, K. Analytical Transmission Electron Microscopy. *Rev. Mineral. Geochemistry* **78**, (2014).
13. Pennycook, S. J. & Boatner, L. A. Chemically sensitive structure-imaging with a scanning transmission electron microscope. *Nature* **336**, 565–567 (1988).
14. Browning, N. D. *et al.* in 11–40 (Springer US, 2012). doi:10.1007/978-1-4614-2191-7\_2
15. Cullity, B. D. Elements of X-Ray Diffraction. *Phys. Today* **10**, 50–51 (1957).
16. Malvern Instruments. *Zetasizer Nano User Manual*. (2007).
17. Hunter, R. J. *Foundations of Colloid Science*. (2000). doi:10.1016/S0927-7757(02)00170-X
18. Alario, A. & Vicent, J. L. *Superconductividad*. (Eudema Universidad, 1991).
19. Magnetic Property Measurement System MPMS MultiVu Application User's Manual.

20. Connord, V., Mehdaoui, B., Tan, R. P., Carrey, J. & Respaud, M. An air-cooled Litz wire coil for measuring the high frequency hysteresis loops of magnetic samples – a useful setup for magnetic hyperthermia applications.
21. Lacroix, L.-M., Carrey, J. & Respaud, M. A frequency-adjustable electromagnet for hyperthermia measurements on magnetic nanoparticles.
22. Teran, F. J. *et al.* Accurate determination of the specific absorption rate in superparamagnetic nanoparticles under non-adiabatic conditions. *Appl. Phys. Lett.* **101**, (2012).
23. Chan, V. & Perlas, A. *Basics of Ultrasound Imaging. Atlas of Ultrasound-Guided Procedures in Interventional Pain Management* (2011). doi:10.1007/978-1-4419-1681-5
24. Mehrmohammadi, M., Yoon, S. J., Yeager, D. & Emelianov, S. Y. Photoacoustic Imaging for Cancer Detection and Staging. *Curr. Mol. Imaging* **2**, 89–105 (2013).
25. Bell, A. G. THE PRODUCTION OF SOUND BY RADIANT ENERGY. *Science (80- )*. **os-2**, 242–253 (1881).
26. Beard, P. Biomedical photoacoustic imaging. *Interface Focus* **1**, 602–31 (2011).
27. Bowen, T. Radiation-Induced Thermoacoustic Soft Tissue Imaging. *IEEE Trans Sonics Ultrason.* 817–822 (1981). doi:10.1109/ULTSYM.1981.197737
28. Kruger, R. A. & Liu, P. Photoacoustic ultrasound: Pulse production and detection in 0.5% Liposyn. *Med. Phys.* **21**, 1179–1184 (1994).
29. Wang, X. *et al.* Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain. *Nat. Biotechnol.* **21**, 803–806 (2003).
30. Kim, C., Erpelding, T. N., Jankovic, L., Pashley, M. D. & Wang, L. V. Deeply penetrating in vivo photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system. *Biomed. Opt. Express* **1**, 278–284 (2010).
31. Emelianov, S. Y. *et al.* Synergy and applications of combined ultrasound, elasticity, and photoacoustic imaging. in *Proceedings - IEEE Ultrasonics Symposium* **1**, 405–415 (2006).
32. Carrera Páez, L. C. *et al.* *Comparison of cell culture HeLa and HEp-2: Studies prospects Chlamydia trachomatis.* *Nova* **13**, (Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2003).
33. Carrera Páez, L. C. *et al.* *Comparison of cell culture HeLa and HEp-2: Studies prospects Chlamydia trachomatis.* *Nova* **13**, (Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2003).
34. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63 (1983).

# Capítulo III

## **Síntesis y Caracterización de Nanopartículas Magneto- Plasmónicas Híbridas**



## **3.1 INTRODUCCIÓN**

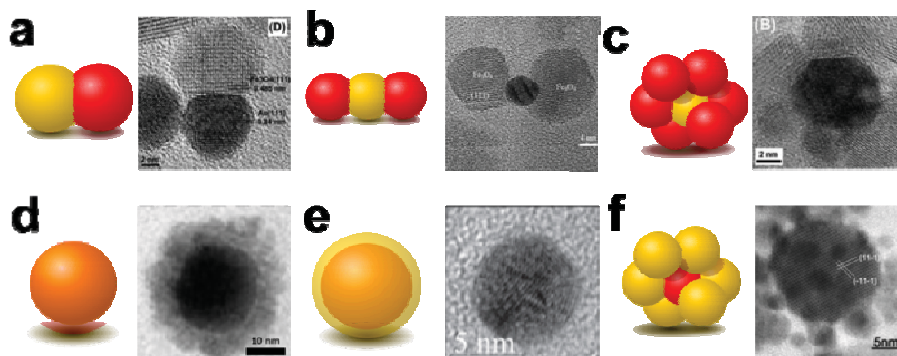
### **3.1.1 Síntesis de NPMPH**

Aunque existen algunos ejemplos de NP formadas por una sola fase en la que se combinan propiedades ferromagnéticas y plasmónicas (metálicas). Principalmente, se trata de metales de transición del grupo  $3d^{1-3}$ , o aleaciones de los mismos como el CoPt o AuFe<sup>4,5</sup>. Sin embargo, como se explicó en el capítulo de introducción, los metales de transición sufren un grave problema de oxidación<sup>6</sup>, además de un baja biocompatibilidad<sup>7</sup>. Algunos metales nobles como el Au también pueden presentar este doble comportamiento en escalas nanométricas, si son funcionalizados con moléculas tioladas<sup>8,9</sup>. No obstante, la imanación inducida por su funcionalización resulta insuficiente para su aplicación en biomedicina.

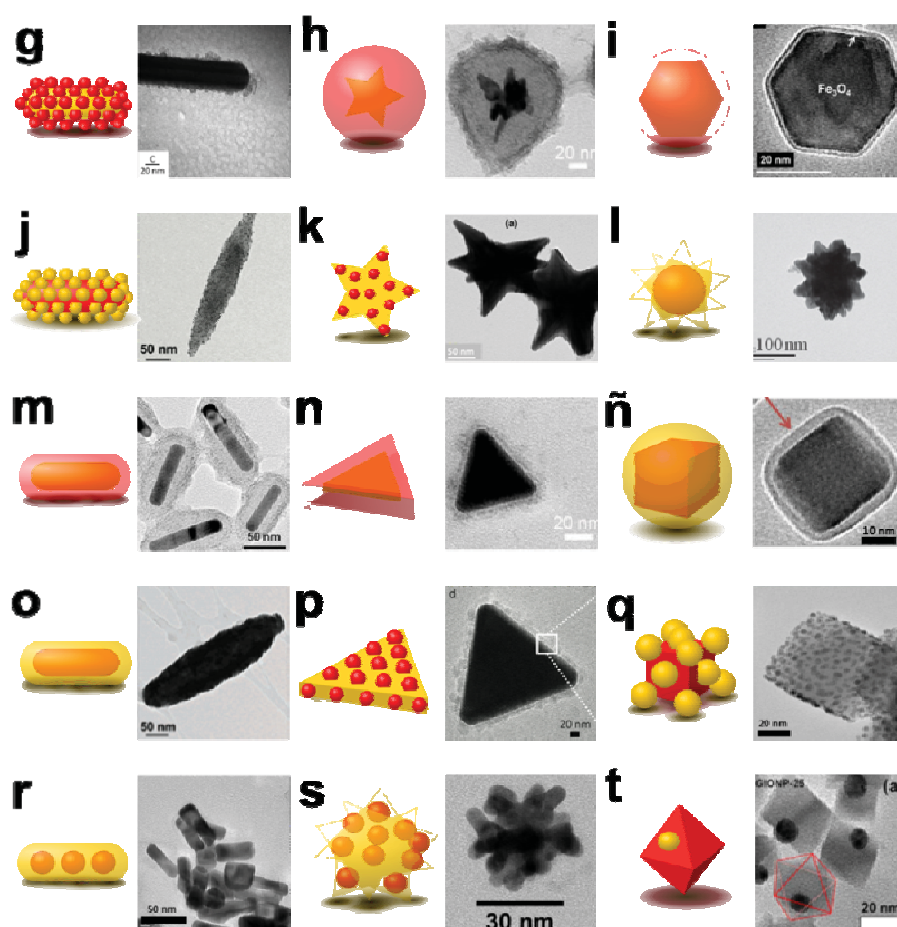
Con el fin de obtener NP con propiedades magneto-plasmónicas que resuelvan estas limitaciones y puedan ser utilizadas como agentes biomédicos, se han desarrollado diferentes rutas de síntesis que permiten producir suspensiones coloidales de NPMPH. Una de las primeras y más exitosas aproximaciones ha sido la síntesis por parte del grupo de Sun y col. de NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au con estructuras tipo dímero, núcleo-corteza y núcleo-satélite, mediante la descomposición de precursores de Fe y Au a alta temperatura<sup>10</sup>. Este trabajo supuso el germen del posterior desarrollo de NPMPH con diferentes características físico-químicas<sup>11-13</sup>, así como del estudio de las propiedades magnéticas y plasmónicas en este tipo de nanoestructuras<sup>14,15</sup>. Además de la optimización de la síntesis de Sun, a principios de siglo se desarrollaron rutas alternativas para la síntesis de NPMPH como son las microemulsiones directas e inversas<sup>16,17</sup>, las deposiciones capa a capa<sup>18</sup>, las reacciones redox<sup>19</sup>, la ablación láser<sup>20,21</sup>, las micelas inversas<sup>22</sup> o las rutas sonoquímicas<sup>23</sup>.

En la actualidad, el control de las rutas de síntesis<sup>24-38</sup> permite diseñar tanto la geometría como la disposición de las fases en los nanocomposites produciendo una plétora de nanoestructuras con características magneto-plasmónicas específicas. La **Figura 3.1** recoge un esquema general de las nanoestructuras híbridas compactas (se excluyen las estructuras huecas) que pueden ser producidas hoy en día mediante la mezcla de fases de óxido de Fe y Au. Los cambios en la proporción de las fases, su disposición o su geometría, permiten realizar un ajuste preciso de las propiedades magneto-plasmónicas de cada nanoestructura<sup>39-41</sup>.

### Nanocomposites esféricos



### Nanocomposites no esféricos



**Figura 3.1** Nanocomposites magneto-plasmónicas basados en Au (amarillo) y óxidos de Fe (rojo): (a) Dímero Au/FeO<sub>x</sub><sup>10</sup>, (b) trímero FeO<sub>x</sub>/Au/FeO<sub>x</sub><sup>24</sup>, (c) núcleo-satélite Au@FeO<sub>x</sub><sup>10</sup>, (d) núcleo-corteza Au@FeO<sub>x</sub><sup>25</sup>, (e) núcleo-corteza FeO<sub>x</sub>@Au<sup>26</sup>, (f) núcleo-satélite FeO<sub>x</sub>@Au<sup>27</sup>, (g) núcleo-satélite Au nanocilindro(NR)@FeO<sub>x</sub><sup>28</sup>, (h) núcleo-corteza Au nanoestrella(NS)@FeO<sub>x</sub><sup>29</sup>, (i) núcleo-corteza FeO<sub>x</sub> nanohexágono@Au<sup>30</sup>, (j) núcleo-satélite FeO<sub>x</sub>NR@Au<sup>31</sup>, (k) núcleo-satélite AuNS@FeO<sub>x</sub><sup>32</sup>, (l) núcleo-corteza FeO<sub>x</sub>@AuNS<sup>33</sup>, (m) núcleo-corteza AuNR@FeO<sub>x</sub><sup>29</sup>, (n) núcleo-corteza Au nanotriángulo(NT)@FeO<sub>x</sub><sup>29</sup>, (ñ) núcleo-corteza FeO<sub>x</sub> nanocubo(NC)@Au<sup>30</sup>, (o) núcleo-corteza FeO<sub>x</sub>NR@Au<sup>31</sup>, (p) núcleo-satélite AuNT@FeO<sub>x</sub><sup>34</sup>, (q) núcleo-satélite FeO<sub>x</sub>NC@Au<sup>35</sup>, (r) multinúcleo-corteza FeO<sub>x</sub>@AuNR<sup>36</sup>, (s) multinúcleo-corteza FeO<sub>x</sub>@AuNS<sup>37</sup>, (t) Dímero Au/FeO<sub>x</sub> nanooctahédro<sup>38</sup>.

La proximidad entre las fases en este tipo de estructuras hace que no solo se sumen sus propiedades magnéticas y plasmónicas, sino que aparezcan fuertes efectos de interacción entre ellas. Estas interacciones pueden producirse por efectos de intercara<sup>42,43</sup> o por efectos de corto alcance<sup>44</sup>. En ambos casos, pueden suponer un cambio drástico en las propiedades magneto-plasmónicas de las NP y deben ser tenidas en cuenta a la hora de escoger la distribución de las fases en las nanoestructuras.

El diseño de las fases en los nanocomposites también juega un papel fundamental en la reactividad química de las NP. Por ejemplo, el recubrimiento del óxido de Fe con Au pueden proporcionar una mayor estabilidad química a la NP evitando procesos de oxidación del núcleo<sup>22,45,46</sup> o facilitando su funcionalización con moléculas biológicas<sup>47,48</sup>. En cambio, si lo que se busca es usar las NP en procesos catalíticos puede resultar interesante que sea el óxido de Fe el que se encuentre en la superficie del material recubriendo el núcleo de Au<sup>49,50</sup>. Por tanto el diseño óptimo de los nanocomposites vendrá determinado en última instancia por el tipo de aplicación en la que vayan a ser utilizadas.

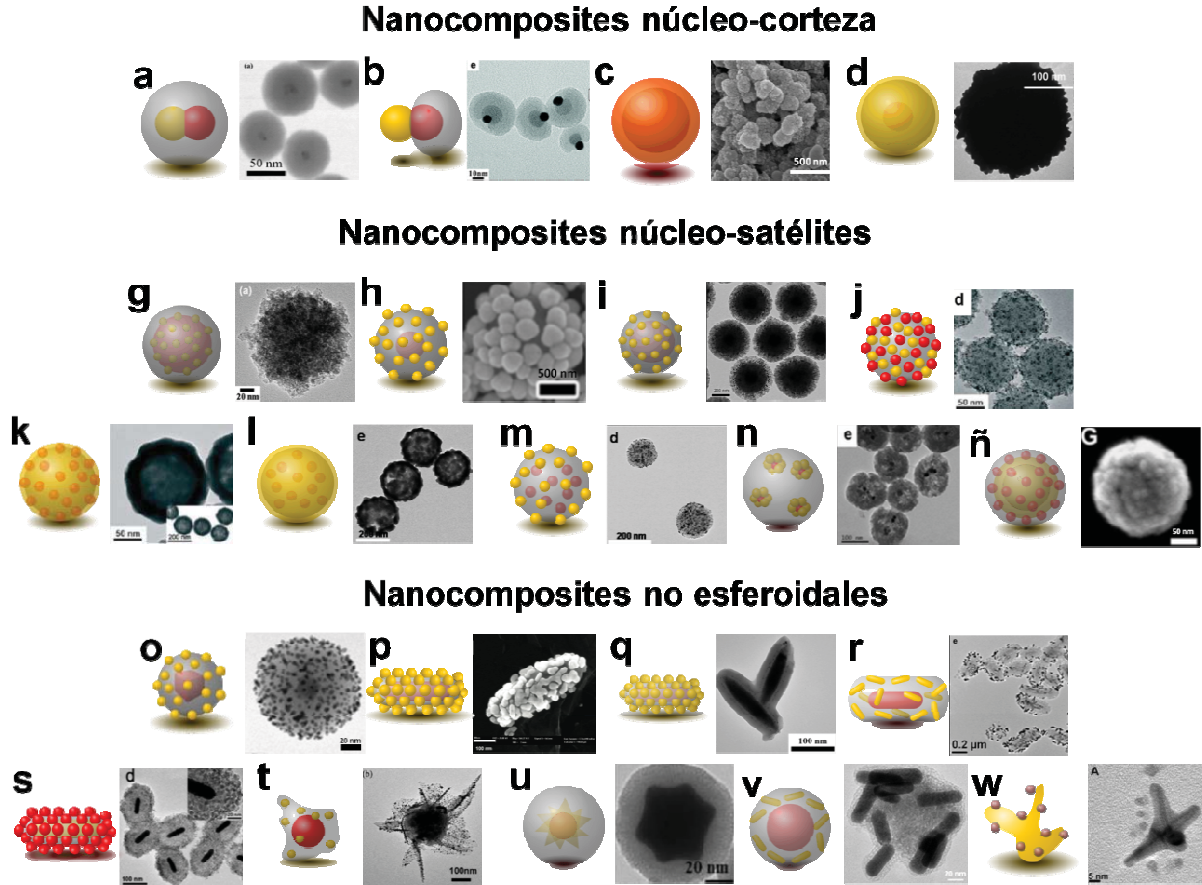
### **3.1.2 Relevancia de la sílice en las NPMPH**

En el Capítulo 1 se destacó la sílice como un tercer material biocompatible que si bien no posee propiedades magnéticas o plasmónicas propias, puede jugar un papel fundamental en el comportamiento de las NPMPH. Incorporar una tercera fase de sílice en la síntesis de NPMPH basadas en óxidos de Fe y Au introduce una nueva variable de diseño que amplía aún más si cabe el abanico de nanocomposites disponibles en la actualidad. La [Figura 3.2](#) muestra cómo las posibilidades aumentan al considerar sistemas magneto-plasmónicos tricomponente y pone de manifiesto las innumerables posibilidades que quedan aún por explorar. En esta figura se clasifican este tipo de nanoestructuras híbridas como: estructuras núcleo-corteza, estructuras núcleo-satélite, y nanoestructuras no esféricas.

Algunas de las ventajas del uso de la sílice en el diseño de NPMPH biofuncionales son:

- Las fases magnética y plasmónica de las NPMPH pueden ser recubiertas con una capa de sílice que evite la degradación de sus propiedades al ser expuestas a un medio biológico<sup>51</sup>.
- Los recubrimientos con sílice permiten homogenizar la superficie de las NPMPH tipo Jano (con superficies inhomogéneas)<sup>52,53</sup>. Esto simplifica los procesos de funcionalización de las NP y garantiza la interacción unívoca con agentes biológicos. Además, como ya se comentó, existe una química ampliamente desarrollada para la biofuncionalización de la sílice<sup>54</sup>.
- La sílice puede servir como interfase para la unión de las fases magnética y plasmónica atenuando los efectos de interacción directa entre ellas. Introducir esta interfase ofrece la posibilidad de optimizar las propiedades magnéticas y plasmónicas de las NP de forma independiente, y que estas queden preservadas tras el proceso de hibridación<sup>55</sup>.
- La unión a través de una tercera fase, permite modificar la proporción entre los componentes magnético y plasmónico en el nanocomposite, así como la separación entre ellos. Esto abre la posibilidad de elegir el peso que posee cada componente en el comportamiento global de la nanoestructura y de este modo controlar los efectos de interacción.
- Los recubrimientos de sílice aportan una extraordinaria estabilidad mecánica que previene la posible deformación de las nanoestructuras. Esta prestación resulta fundamental a lo hora de aplicar a los AuNR pulsos láser de alta intensidad.

Como se verá más adelante, el diseño escogido para las NPMPH sintetizadas en este trabajo de tesis consiste en un núcleo de Au en forma de cilindro que se rodea con una matriz de sílice donde se insertan NPM a modo de satélites.



**Figura 3.2** Nanocomposites magneto-plasmónicas basados en Au (amarillo), óxidos de Fe (rojo) y sílice (gris): (a) Dímereo@corteza  $(Au/FeO_x)@SiO_2$ <sup>66</sup>, (b) Dímereo/núcleo@corteza  $Au/(FeO_x@SiO_2)$ <sup>67</sup>, (c) núcleo-corteza-corteza  $SiO_2@Au@FeO_x$ <sup>68</sup>, (d) núcleo-corteza-corteza  $FeO_x@SiO_2@Au$ <sup>69</sup>, (e), (f), (g) núcleo-satélite-corteza  $FeO_x@SiO_2@Au$ <sup>70</sup>, (h) núcleo-corteza-satélite  $FeO_x@SiO_2@Au$ <sup>71</sup>, (i) núcleo-corteza-satélite-corteza  $FeO_x@SiO_2@Au@SiO_2$ <sup>72</sup>, (j) núcleo-satélite  $SiO_2@FeO_x/Au$ <sup>73</sup>, (k) núcleo-satélite-corteza  $SiO_2@FeO_x@Au$ <sup>73</sup>, (l) multinúcleo-corteza-corteza  $m-FeO_x@SiO_2@Au$ <sup>74</sup>, (m) multinúcleo-corteza-satélite  $m-FeO_x@SiO_2@Au$ <sup>74</sup>, (n) multinúcleo(núcleo-satélite)-corteza  $m-(FeO_x@Au)@SiO_2$ <sup>75</sup>, (ñ) núcleo-corteza-satélite-corteza  $SiO_2@Au@FeO_x@SiO_2$ <sup>76</sup>, (o) núcleo-corteza-satélite  $FeO_xNC@SiO_2@Au$ <sup>77</sup>, (p) núcleo-corteza-satélite  $FeO_xNR@SiO_2@Au$ <sup>78</sup>, (q) núcleo-corteza-satélite-corteza  $FeO_xNR@SiO_2@Au@SiO_2$ <sup>55</sup>, (r) núcleo-corteza-satélite  $FeO_xNR@SiO_2@AuNR$ <sup>79</sup>, (s) núcleo-corteza-satélite  $AuNR@SiO_2@FeO_x$ <sup>61</sup>, (t) núcleo-corteza-satélite  $FeO_xNR@SiO_2NS@Au$ <sup>80</sup>, (u) núcleo-corteza-corteza  $FeO_xNR@AuNS@SiO_2$ <sup>81</sup>, (v) núcleo-satélite-corteza  $FeO_x@AuNR@SiO_2$ <sup>82</sup>, (w) núcleo-satélite(núcleo-corteza)  $AuNS@(FeO_x@SiO_2)$ <sup>83</sup>.

Una de las estrategias más comúnmente utilizadas a la hora de sintetizar NP AuNR@NPM tipo núcleo-satélite, consiste en conjugar los componentes usando biomoléculas conectoras. Sin embargo, tanto si este enlace se produce de forma covalente<sup>58,59</sup> como si viene mediado por interacciones electrostáticas<sup>28</sup>, la exposición a pHs extremos o a altas temperaturas puede condicionar la estabilidad de las nanoestructuras formadas al ser utilizadas en sistemas biológicos<sup>60</sup>. Por este motivo Bardah y col. propusieron el recubrimiento con sílice como una alternativa de mayor estabilidad que permitan la unión de fases magnéticas y plasmónicas de forma robusta<sup>57</sup>.

Recientemente Su y col.<sup>61</sup> hicieron uso de esta aproximación para la conjugación de AuNR y NPM en ausencia de moléculas orgánicas mediadoras. La ruta propuesta consistía en recubrir los AuNR con una capa de sílice y generar mediante un ataque químico, nanoporosos donde se pudieran depositar NP de óxido de hierro ([Figura 3.2s](#)). Esta estrategia, a pesar de haberse demostrado efectiva, no permite controlar de forma independiente las propiedades de la fase magnética, ya que su tamaño y morfología vienen delimitados por los poros generados en el recubrimiento de sílice.

En el método desarrollado en esta tesis, los componentes magnéticos y plasmónicos son sintetizados independientemente antes de su hibridación. Gracias a ello, tanto la geometría como las propiedades de cada componente pueden ser diseñadas de forma individual. Esto permite un mejor ajuste de las propiedades magneto-plasmónicas de las NP híbridas, así como el estudio de los efectos de interacción que tienen lugar entre las fases. Para desarrollar este proceso de síntesis, se exploró una variación del método de Stöber<sup>62</sup> basándonos en las investigaciones llevadas a cabo en los grupos de Cardoso y col.<sup>63</sup> y Leite y col.<sup>64,65</sup>.

### **3.1.3 Hibridación de moléculas orgánicas en recubrimientos de sílice por sol-gel**

Uno de los métodos más empleados en el recubrimiento de NP con sílice es el conocido como método de Stöber<sup>62</sup>. Este método permite producir tanto NP coloidales de sílice<sup>84</sup> como recubrimientos de sílice<sup>85,86</sup> mediante un proceso controlado de sol-gel<sup>87</sup>.

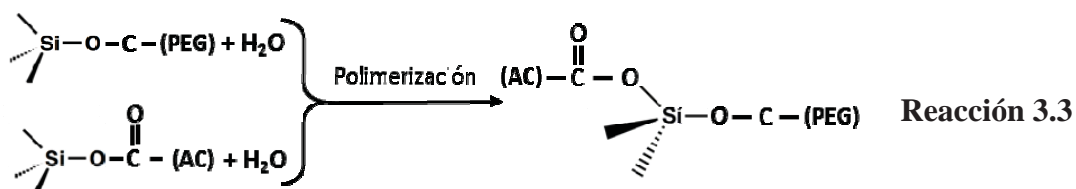
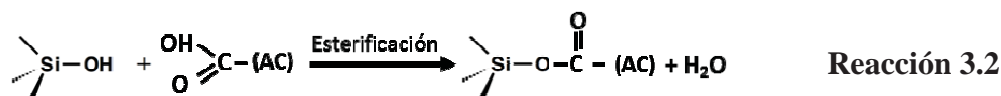
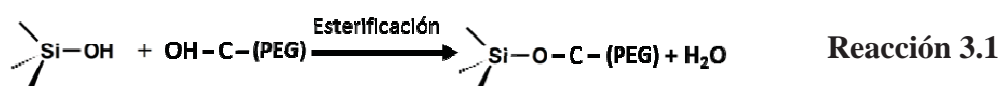
En el caso del recubrimiento de NP con sílice, el control de los procesos de nucleación del SiO<sub>2</sub> resulta fundamental para obtener un recubrimiento uniforme. Por este motivo, es común funcionalizar las NP que se desean recubrir, con moléculas orgánicas que permitan controlar y homogeneizar el crecimiento del SiO<sub>2</sub> sobre su superficie.

Para el caso de las NP de Au, la funcionalización de la superficie con moléculas de polietilenglicol (PEG) permite homogeneizar el recubrimiento y realizar un ajuste preciso de su espesor<sup>88,89</sup>. Esto es debido a que el elevado número de grupos hidroxilos a lo largo de la cadena polimérica favorece el crecimiento de la capa de sílice modulando el espesor de la misma<sup>90</sup>.

Por otra parte, se ha observado que también los grupos carboxílicos pueden servir como catalizadores para el recubrimiento de NP por el método de Stöber<sup>91</sup>. En concreto el ácido cítrico (AC) ha sido ampliamente utilizado en el recubrimiento de NPM por la sencillez de la funcionalización y la elevada repulsión electrostática que aportan los grupos carboxílicos en la superficie<sup>92</sup>. Los grupos carboxílicos del AC permiten catalizar los procesos de sol-gel del TEOS para producir un recubrimiento homogéneo e individual de las NPM<sup>93,94</sup>.

Las reacciones sol-gel conocidas como método de Pechini es una extendida ruta de síntesis que utiliza la interacción entre las moléculas de PEG y AC para llevar a cabo un crecimiento controlado de NP cerámicas<sup>95-98</sup>. Sin embargo, fueron Cardoso y col. los primeros en incorporarlas al método de Stöber para producir superficies de sílice híbridas<sup>63</sup>. Estos autores observaron que cuando los procesos de hidrólisis y condensación del TEOS se llevan a cabo en presencia del AC y el PEG, los centros de silicio actúan como conectores entre los grupos funcionales de ambas moléculas mediante enlaces covalentes. Estudios empíricos en primer lugar<sup>63,64</sup> y simulaciones por dinámica molecular después<sup>65</sup>, dieron evidencias claras de la polimerización de estas moléculas durante el proceso de condensación del TEOS, tal como se indica en las

#### **Reacciones 3.1-3.3.**



A pesar de la versatilidad de estas reacciones, el entrecruzamiento del PEG y el AC no había sido utilizado anteriormente en el auto-ensamblado de nanoestructuras. Como se estudiará a lo largo del capítulo, este entrecruzamiento permitió la hibridación de las NPM y los AuNR a partir de una simple funcionalización de sus superficies y una reacción de silanización conjunta. El control de parámetros de reacción como la agitación, el tiempo de reacción, el pH del medio, o la proporción de NP, permitieron llevar a cabo un proceso controlado de hibridación, así como el ajuste de las propiedades magneto-plasmónicas de las NPMPH resultantes.

### 3.1.4 Objetivos del capítulo

En este capítulo se abordará la síntesis y caracterización de NPMPH basadas en AuNR y NPM de diferentes ferritas. En primer lugar se llevará a cabo un estudio estructural y composicional de los componentes plasmónicos y magnéticos empleados. Después, tras optimizar los parámetros de síntesis de las NPMPH, se llevará a cabo un estudio de sus propiedades estructurales y morfológicas. Finalmente se compararán las propiedades plasmónicas y magnéticas de cada uno de los componentes por separado con los de las NPMPH y analizarán los efectos de interacción que aparecen tras el proceso de hibridación.

## **3.2 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Síntesis de AuNR por crecimiento mediado por semillas**

#### **3.2.1.a Producción de semillas**

Para la producción de las semillas, se preparó una solución de 250 mL de CTAB 0,1M en agua destilada ultra-pura (Panreac AppliChem,  $\rho=10^{-6} \Omega^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Resultó de gran importancia el uso de agua ultra-pura que asegure una muy baja ionicidad en el medio y un pH neutro<sup>99</sup>. Todas las disoluciones que se describirán a continuación fueron preparadas con este disolvente. A la solución de CTAB se le añadió 12,7 mL de HAuCl<sub>4</sub> con una concentración 0,1 mM. La mezcla con el CTAB produjo un cambio de color en la disolución de Au desde un amarillo pálido a un naranja intenso, lo que sirvió como indicador de la coordinación de los enlaces del Au con los átomos de Br del CTAB.

Para comenzar la nucleación y formación de semillas, se separaron 5 mL de la mezcla descrita, a los que se les añadió 300  $\mu\text{L}$  de NaBH<sub>4</sub> enfriados con hielo. El resto de la disolución se reservó para la etapa de crecimiento. La formación de núcleos le dio a la disolución un tono parduzco. Para asegurar el crecimiento homogéneo de las semillas, la dispersión se dejó reposar durante una hora a 27°C antes de ser añadida a la disolución de crecimiento.

#### **3.2.1.b Disolución de crecimiento**

Para preparar la disolución de crecimiento, se añadieron 1,2 mL de ácido ascórbico (10 mM) a los 257,7 mL previamente preparados de la disolución de Au y CTAB. La adicción del ascórbico produjo que la disolución se volviese incolora, este hecho es un signo inequívoco de la reducción de los iones Au (III) a Au (I). Un exceso de ácido ascórbico puede suponer la reducción a Au (0) produciendo una indeseable segunda nucleación en la etapa de crecimiento. Además del ácido ascórbico se adicionaron 2 mL de AgNO<sub>3</sub> (10 mM) como catalizador de la reacción<sup>100,101</sup>.

Por último, se añadió a esta solución una cantidad de las semillas variable con el fin de modificar la geometría de los AuNR. Se dejó reposar la mezcla en un baño térmico de 27°C durante 6 horas. Los reactivos sobrantes se limpiaron mediante triple centrifugación a 10000 rpm durante 30 min, desechando el sobrenadante y redispersando los AuNR en agua destilada.

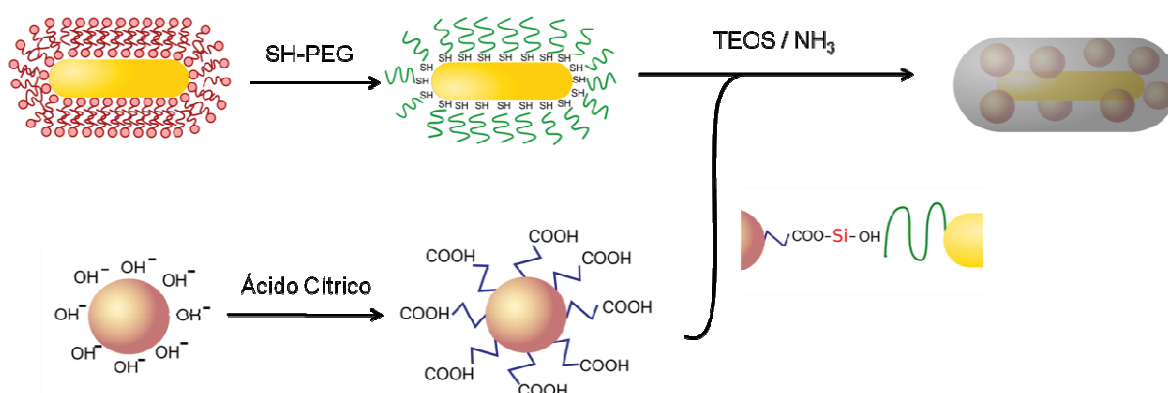
### 3.2.2 Síntesis electroquímica de NPM basadas en óxidos de Fe

La síntesis electroquímica de NP descrita en el **capítulo 2** fue utilizada para la producción de NPM basadas en ferritas de diferentes metales de transición. La síntesis de NP de magnetita/maghemita se llevó a cabo mediante un sistema de dos electrodos planos con una corriente de  $45 \text{ mA/cm}^2$  durante 30 min, siguiendo los protocolos de los trabajos desarrollados previamente en el grupo<sup>102</sup>. En cambio, para producir las ferritas de Mn, Co y Ni se empleó un sistema de 3 electrodos (2 ánodos planos + 1 cátodo común cilíndrico). Mientras que la corriente del ánodo de Fe se mantuvo en  $45 \text{ mA/cm}^2$ , para los ánodos de Mn, Co y Ni, se emplearon corrientes de  $40 \text{ mA/cm}^2$ ,  $25 \text{ mA/cm}^2$  y  $45 \text{ mA/cm}^2$  respectivamente<sup>103-105</sup>. En todos los casos se utilizó como electrolito 100 mL de disolución 0,04 M de Bromuro de tetrabutil amonio (TBAB) y se fijó la temperatura de la reacción en  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  con una celda electroquímica termostataada.

Trascurridos 30 min, la corriente se detuvo y los electrodos fueron extraídos del medio. Las NPM fueron entonces precipitadas por decantación magnética mediante un imán de NdFeB de  $\sim 6 \text{ kOe}$  y el medio fue sustituido por agua destilada nueva para eliminar los subproductos no magnéticos de la reacción. Este proceso fue repetido por triplicado.

### 3.2.3 Síntesis de NPMPH

La síntesis de las NPMPH se llevó a cabo en dos etapas, tal y como se muestra en la **Figura 3.3**. En una primera etapa, se funcionalizó la superficie de los AuNR con SH-PEG y la superficie de las NPM mediante un tratamiento ácido con ácido cítrico. En la segunda etapa, se realizó un proceso de silanización conjunta de estas NP.



**Figure 3.3** Esquema simplificado de la síntesis de las NPMPH.

### **3.2.3.a Funcionalización de AuNR con SH-PEG**

Para la funcionalización de los AuNR se empleó el compuesto comercial SH-PEG con peso molecular de 6000 Da. Éste consiste en una molécula de PEG con un grupo tiol al final de la cadena polimérica. La alta afinidad de los tioles con las superficies de Au permitió la funcionalización de los AuNR de manera rápida y sencilla<sup>106,107</sup>.

Se disolvieron 13,25 mg de SH-PEG en 1,33 mL de agua destilada y fueron mezclados mediante ultrasonidos durante 25 min. Una vez disuelto, se añadió la disolución de PEG a un volumen de 5 mL de AuNR con una densidad óptica a 400 nm ( $OD_{400}$ ) de 2 ( $\sim 0,8$  mM de Au)<sup>108</sup>. El intercambio de ligando se llevó a cabo mediante agitación magnética a 300 rpm durante 6 horas. Un lavado por centrifugación triple a 9000 rpm durante 30 min permitió la eliminación del CTAB desplazado y el SH-PEG no reactivo a la vez que se realizó una progresiva dispersión de los AuNR recubiertos de PEG (Au@PEG) en etanol de alta pureza.

### **3.2.3.b Funcionalización de NPM con ácido cítrico**

El recubrimiento de las NPM con AC se llevó a cabo haciendo reaccionar la dispersión de NPM recién preparadas con 50 mg de AC. Tras disolver el AC en la dispersión de NPM, el pH del medio se elevó hasta pH=5 mediante una solución diluida de KOH. La mezcla se dejó reaccionar durante 2 horas a 80 °C. Las NPM recubiertas de AC (NPM@AC) se limpiaron de nuevo por triple decantación magnética.

### **3.2.3.c Hibridación de AuNR@PEG y NPM@AC**

Para la síntesis de las NPMPH, se mezclaron en un tubo de ensayo de plástico 1,64 mL de NPM dispersadas en agua con una concentración de 1,14 mg/mL y 5 mL de AuNR@PEG dispersadas en etanol con una densidad óptica a 400 nm de 2,4 ( $\sim 1$  mM de Au). El pH de la solución fue ajustado mediante la adición de 15  $\mu$ L de  $NH_3$ . Finalmente, se añadió a la mezcla un volumen de tetraetil ortosilicato (TEOS) igual al volumen de agua de las NPM, es decir 1,64 mL. La silanización de las NP se mantuvo en un baño de ultrasonidos de alta intensidad durante 2 horas, manteniendo la temperatura del baño por debajo de 50°C.

### 3.2.4 Teoría de Mie-Gans para el cálculo de los espectros de extinción

Para el cálculo teórico de los espectros de extinción de los AuNR, se empleó en primer lugar la teoría de Mie-Gans<sup>109</sup>. Esta teoría permite obtener la sección eficaz de extinción de NP metálicas elipsoidales con permitividad “ $\epsilon = \epsilon_1 + i\epsilon_2$ ” rodeadas por un medio dieléctrico homogéneo con permitividad  $\epsilon_m$ . La deducción de las ecuaciones se recoge en el **Apéndice A** de la tesis.

Asumiendo la aproximación dipolar<sup>109</sup>, la sección eficaz ( $\sigma_{ext}$ ) de elipsoides de revolución prolados ( $a = b \neq c$ ) pueden reducirse a la expresión que se muestra en la **Ecuación 3.1 a, b y c**.

$$\sigma_{ext} = \frac{\omega}{3c} \epsilon_m^{3/2} V \sum_{j=a}^c \frac{\left(\frac{1}{P_j^2}\right) \epsilon_2(\omega)}{\left[\epsilon_1(\omega) + \left(\frac{1-P_j}{P_j^2}\right) \epsilon_m(\omega)\right]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad \text{Ecuación 3.1a}$$

$$P_c = \frac{1-e^2}{e^2} \left[ \frac{1}{2e} \ln \left( \frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right]; P_a = P_b = \frac{1-P_c}{2} \quad \text{Ecuación 3.1b}$$

$$e = \left[ 1 - \left( \frac{2R}{L} \right)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación 3.1c}$$

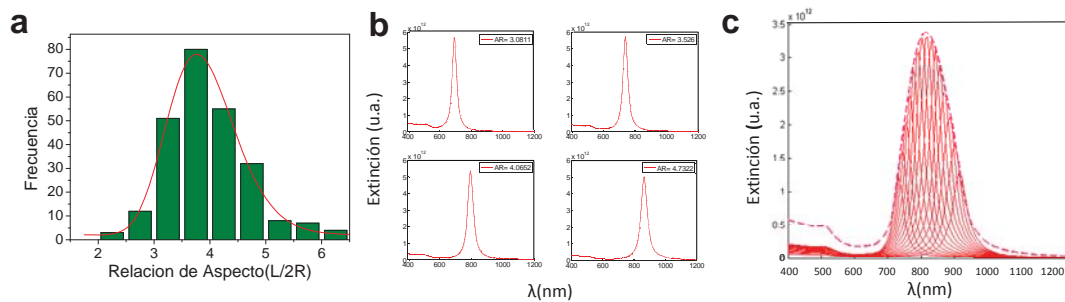
Donde  $2R$ ,  $L$  son el eje menor y mayor de las NP metálicas respectivamente;  $V$  es el volumen de la NP;  $\omega$  es la frecuencia del campo incidente; y  $P_a$ ,  $P_b$  y  $P_c$ , son los factores de despolarización de cada uno de los ejes, que dependerán de la elipticidad  $e$  de los proloides.

El cálculo de los espectros de extinción a partir de la teoría de Mie-Gans permite analizar el efecto que tienen tanto la geometría de las partículas como las constantes dieléctricas de los medios estudiados en las propiedades de absorción de éstas a lo largo del espectro de frecuencias.

#### 3.2.4.a Influencia de la dispersión de tamaños

A pesar de la optimización en los procesos de síntesis, las poblaciones de NP siempre presentan un cierto grado de inhomogeneidad en sus tamaños<sup>110</sup>. Para que la teoría de Mie-Gans refleje fielmente los resultados experimentales de una población real de NP, debe tenerse en cuenta su dispersión de tamaños.

La [Figura 3.4](#) muestra el procedimiento seguido en esta tesis para tener en cuenta esta inhomogeneidad en el caso de los AuNR. El histograma de la [Figura 3.4a](#) recoge la distribución de RA observada en las imágenes de TEM de una de las muestras sintetizadas en la tesis. A partir de las [Ecuaciones 3.1](#) se obtuvo el espectro de extinción correspondiente a cada una de las RA observadas en la muestra algunos ejemplos de los cuales aparecen en la [Figura 3.4b](#). Una vez calculados los espectros de extinción de cada RA, estos fueron multiplicados por la frecuencia con la que aparece cada RA en la distribución. Finalmente, en la [Figura 3.4c](#) se representan en rojo los espectros de extinción de cada RA una vez ponderados y con una línea rosa discontinua el espectro de extinción resultante de la suma de todos ellos. Este procedimiento fue aplicado sobre las muestras sintetizadas para reproducir de forma teórica los espectros observados experimentalmente.



**Figura 3.4** (a) *Histograma y función de distribución de las RA obtenida experimentalmente mediante las imágenes de TEM de una muestra de AuNR.* (b) *Espectros de extinción calculados a partir de las [Ecuaciones 3.1](#) para cada una de las RA registradas.* (c) *Promedio de los espectros de extinción ponderados a la frecuencia observada de las distintas RA.*

### 3.2.4.b Teoría de Mie-Gans en un medio inhomogéneo

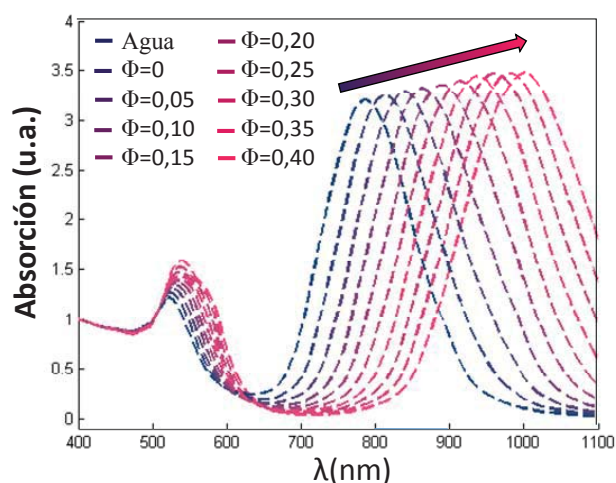
Volviendo a la [Ecuación 3.1](#), vemos que la teoría de Mie-Gans predice un cambio en la frecuencia de resonancia del plasmón cuando se modifica la permitividad dieléctrica del medio que rodea a la NP ( $\epsilon_m$ ).

Sin embargo, en el caso de recubrimientos homogéneos, no existe un valor único de  $\epsilon_m$  que defina la frecuencia a la que ocurre la resonancia. Para poder trabajar con un medio homogéneo, algunos autores sustituyen este medio homogéneo por un medio dieléctrico equivalente que recoge las características de las distintas fases del medio<sup>41,111</sup>. El valor de  $\epsilon_m$  en este medio equivalente se calcula como el promedio ponderado de las

permitividades de los medios que componen el entorno dieléctrico de la NP. En nuestro caso, necesitaremos considerar como medios dieléctricos, el óxido de silicio y la magnetita, de este modo la expresión de  $\epsilon_m$  puede calcularse con la [Ecuación 3.2](#).

$$\epsilon_m(\omega) = \Phi \cdot \epsilon_{Fe_3O_4}(\omega) + (1 - \Phi) \cdot \epsilon_{SiO_2}(\omega) \quad \text{Ecuación 3.2}$$

En la que  $\epsilon_{SiO_2}$  es la permitividad del óxido de silicio tomada de la referencia<sup>112</sup>,  $\epsilon_{Fe_3O_4}$  es la permitividad del  $Fe_3O_4$  tomada de la referencia<sup>113</sup>, y  $\Phi$  es el tanto por uno del  $Fe_3O_4$  en la matriz de óxido de silicio. La [Figura 3.5](#) muestra los espectros de extinción calculados para un AuNR de RA=3,85 al considerar una constante dieléctrica promedio con diferentes valores de  $\Phi$ .



**Figura 3.5** Espectros de extinción calculados a partir de la teoría de Mie-Gans asumiendo un medio efectivo de sílice con diferentes cantidades de magnetita ( $\Phi$ ).

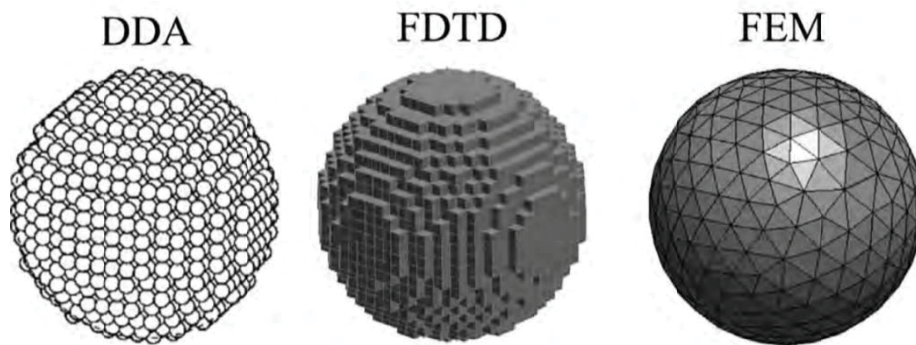
Se observa que el aumento del porcentaje de  $Fe_3O_4$  ( $n_{Fe_3O_4} \sim 2,37$ ) en el entorno dieléctrico de sílice ( $n_{SiO_2} \sim 1,45$ ) produce un desplazamiento hacia el rojo, i.e. hacia longitudes de ondas mayores, de los plasmones longitudinal y transversal. Además se observa un aumento en la intensidad de las resonancias a medida que el índice de refracción del medio aumenta.

### 3.2.5 Simulación de la respuesta óptica por el método de elementos finitos

La teoría de Mie y su extensión por parte de Gans permiten de describir con precisión el comportamiento plasmónico de geometrías simples como son los esferoides metálicos rodeados por un medio homogéneo. Sin embargo, las estructuras estudiadas presentan geometrías complejas, los cálculos analíticos pueden no ser capaces de reproducir el comportamiento experimental registrado.

En estos casos, motivo se optó por utilizar métodos de simulación numérica que permitieran analizar la respuesta plasmónica de estas nanoestructuras y conocer las causas que están detrás de los espectros de absorción observados.

La [Figura 3.6](#) recoge algunos de los métodos electromagnéticos que se utilizan hoy en día para la simulación de plasmones como son: la aproximación de dipolos discretos (DDA), método de diferencias finitas de dominio temporal (FDTD) y los métodos de elementos finitos (FEM).



**Figura 3.6** *Métodos numéricos de simulación de la respuesta plasmónica de una esfera: Aproximación de dipolos discretos (DDA), diferencias finitas de dominio temporal (FDTD) y método de elementos finitos (FEM). Tomada de Davletshin<sup>114</sup>.*

La DDA consiste en considerar el material a simular como una red cúbica de dipolos independientes con parámetro de red “d” y calcular la polarización de cada uno en función del campo generado por el resto de ellos<sup>115,116</sup>. La distancia entre dipolos (d) debe cumplir el criterio “ $|n'|kd < 0,5$ ” donde  $|n'|$  es el módulo del índice de refracción complejo y  $k$  es el número de onda. Cuando el índice de refracción es grande se requiere una distancia entre dipolos pequeña y por tanto un mayor número de ellos. Esto

aumenta enormemente el tiempo de computación cuando se busca una geometría con buena resolución.

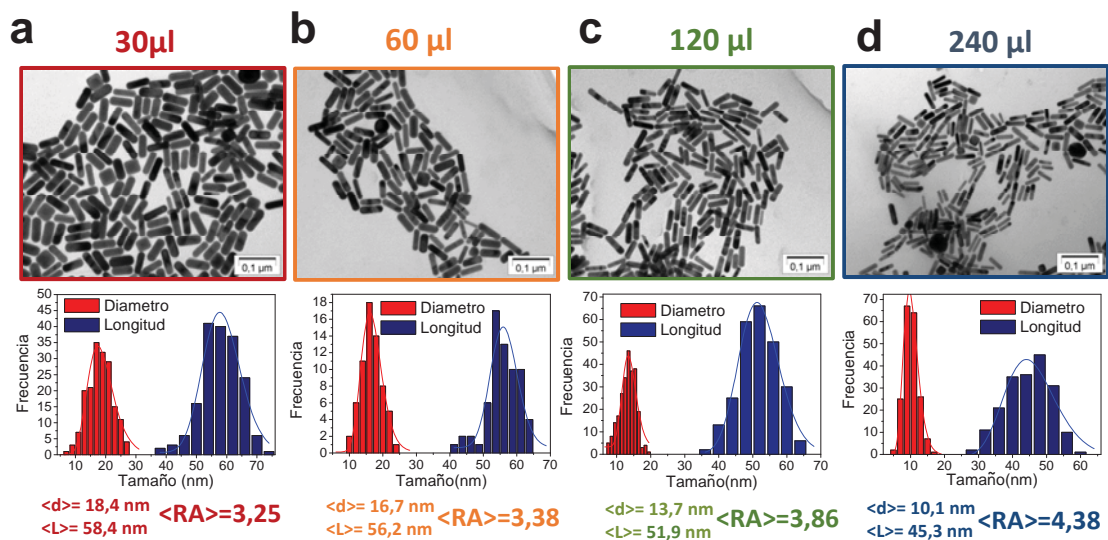
La FDTD, por el contrario disminuye el tiempo de cálculo siendo por este motivo una aproximación más utilizada para el cálculo plasmónico de NP metálicas<sup>117,118</sup>. Este método discretiza las variables temporales y espaciales de las ecuaciones de Maxwell para llevar a cabo una resolución numérica del problema. Mediante este método se pueden abordar el estudio de sistemas inhomogéneos o con geometrías complejas. Sin embargo, como se muestra en la [Figura 3.6](#), la discretización espacial se realiza de forma cúbica. Por tanto, en geometrías esféricas como las que se abordan en esta tesis se requeriría una gran cantidad de elementos que reproduzcan su curvatura, lo que complica los procesos de cálculo.

El FEM, en cambio, permite realizar mallas que se ajusten de forma específica a la geometría del sistema. La libre elección del tamaño de los elementos, permite aumentar la resolución del mado en zonas de mayor inhomogeneidad y dejar elementos de mayor tamaño en las regiones con mayor homogeneidad. Para realizar las simulaciones por FEM de esta tesis se utilizó el programa comercial de simulación COMSOL Multiphysics®. Los detalles sobre los parámetros de simulación escogidos se muestran en el **Apéndice B** de la tesis.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1 Caracterización estructural de los componentes plasmónicos y magnéticos

Como se mencionó en el **Capítulo 1**, los AuNR ofrecen la posibilidad de modificar las frecuencias de resonancia plasmónicas mediante el ajuste de su RA. De acuerdo con la bibliografía, una de las aproximaciones más sencillas para ajustar la RA de los AuNR consiste en modificar la cantidad de semillas que son añadidas en la solución de crecimiento<sup>119,120</sup>. En la **Figura 3.7** se muestran las micrografías obtenidas por TEM de los AuNR al ir variando esta cantidad.



**Figura 3.7** Imágenes TEM de las muestras de AuNR sintetizadas a partir de diferentes cantidades de semillas: (a) 30 μL, (b) 60 μL, (c) 120 μL y (d) 240 μL. Bajo las microscopías aparecen las distribuciones de diámetros (rojo) y longitudes (azul) correspondientes a cada muestra junto a los valores medios de diámetro (<d>) longitud (<l>) y relación de aspecto (<RA>).

Los histogramas de longitud y diámetro de los AuNR que se muestran debajo de cada una de las muestras, fueron obtenidos mediante la medida de más de 150 AuNR en cada una de las muestras. Junto a cada distribución se indican los valores medios de longitud y diámetro obtenidos a partir de un ajuste log-normal de ambos histogramas, así como el valor de RA que se deduce de estos. Los ajustes log-normal, como el que se muestra en la **Ecuación 3.3**, son comúnmente utilizados para obtener los valores medios estadísticos de los tamaños de una población de NP observadas por microscopía<sup>121-123</sup>:

$$f(x) = \frac{1}{x\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(\ln(x)-x_0)^2/2\sigma^2} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

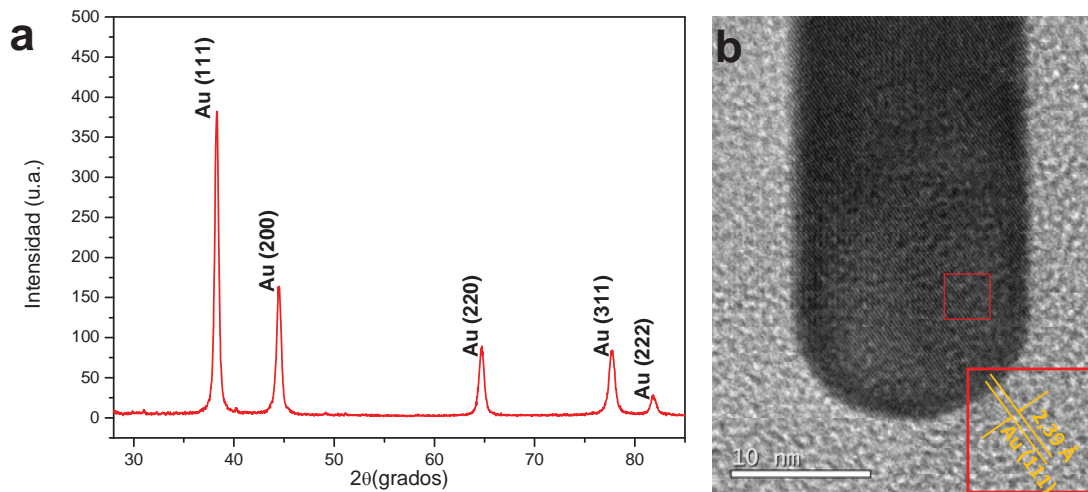
En los que  $x_0$  es el tamaño medio de la distribución,  $\sigma$  es la desviación estadística (dispersión) de la muestra y  $x$  es la variable de tamaños. En las cuatro muestras se obtuvieron valores de  $\sigma$  inferiores a 0,2 tanto en el ajuste de los diámetros como el de las longitudes, lo que es indicativo de la alta homogeneidad de las poblaciones.

Resulta claro, observando estas imágenes, que al aumentar el número de semillas añadidas a la disolución de crecimiento se generan AuNR de menor tamaño pero con una RA mayor. Esta evolución concuerda con las etapas de crecimiento reportadas para los AuNR. Según lo observado en la bibliografía<sup>124</sup>, tras un rápido crecimiento de las semillas en su dirección preferencial (100), el balance energético de deposición del Au para las distintas facetas cristalográficas se modifica y el crecimiento preferencial en la dirección longitudinal del AuNR deja de resultar favorable. Si una vez alcanzado este tamaño crítico sigue habiendo especies de Au en la disolución, el crecimiento del eje transversal de los AuNR pasa a ser más rápido que el de su eje longitudinal<sup>125,126</sup> y la RA de los AuNR se va reduciendo progresivamente. Como veremos más adelante, la variación progresiva de la RA modifica de la respuesta óptica de los AuNR y permite ajustar las frecuencias de resonancia de sus plasmones transversal y longitudinal.

Además de su anisotropía, la cristalinidad de los AuNR supone un factor relevante en sus propiedades ópticas. Los patrones de difracción de rayos X de la [Figura 3.8a](#) muestran los picos característicos de la estructura cúbica centrada en caras del Au. La posición del pico de mayor intensidad nos indica que la distancia interplanar en la dirección (111) es de 2,35 Å. Las microscopía de alta resolución (HR-TEM) de la [Figura 3.8b](#) permite observar los planos atómicos asociados a esta reflexión. La distancia medida entre los planos de la imagen es de 2,39 Å, lo que concuerda razonablemente bien con el valor obtenido por XRD en la dirección (111). Por tanto, las imágenes TEM de alta resolución nos permiten concluir que los AuNR sintetizados están compuestos por un monocristal cuya dirección (100) se alinea con el eje longitudinal de los mismos.

El origen del crecimiento anisótropo de las semillas en la dirección (100) ya fue estudiado por El-Sayed y col. en 1999<sup>127</sup>. En la actualidad, el crecimiento preferencial en esta dirección se explica por el cambio en la energía deposición de los iones de Au

en los distintos planos cristalográficos de las semillas<sup>128,129</sup>. Como se señaló anteriormente, la adición de la plata resulta un factor fundamental en la homogenización del crecimiento de los AuNR. Según Liu y Guyot-Sionnest<sup>130</sup>, los iones de Ag utilizados en la homogenización del crecimiento, encuentran posiciones de adhesión preferenciales en los planos {110} del Au a causa de su menor compacidad. Esto produce una inhibición del crecimiento de las semillas en estas caras y consecuentemente un crecimiento preferencial en la dirección (100), lo que explica parcialmente la formación de los AuNR. Debe señalarse también que la naturaleza de la bicapa de CTAB, y especialmente de los contraiones de Br, parecen jugar también un papel importante en el crecimiento anisótropo de las NP de Au<sup>131-133</sup>.

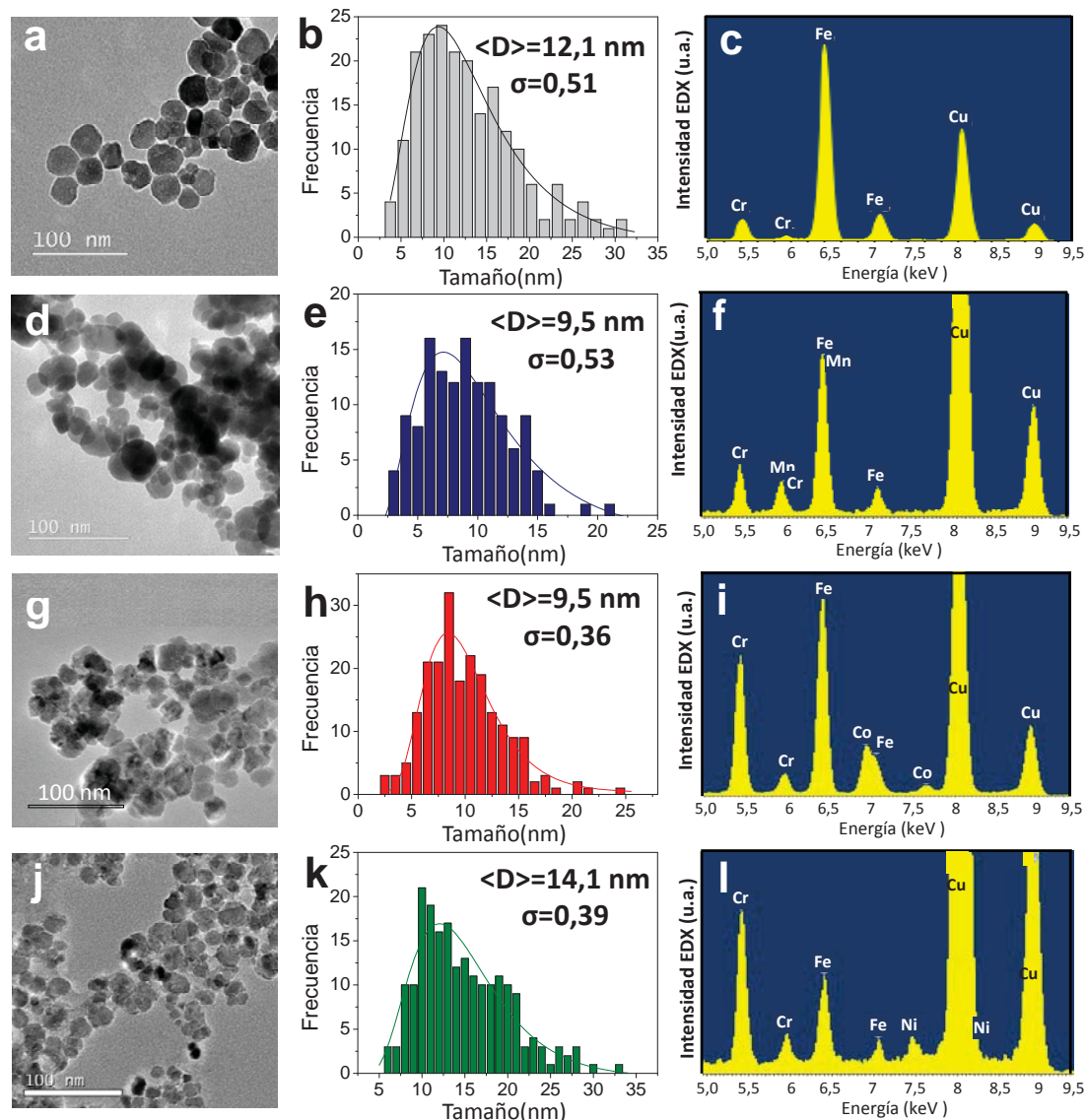


**Figura 3.8** (a) Patrón de difracción de rayos X de las muestras en polvo de AuNR. (b) Imagen de HR-TEM de un AuNR en el que aparecen señalados la distancia interplanar registrada y la dirección cristalográfica correspondiente.

De forma independiente, se sintetizaron por rutas electroquímicas suspensiones coloidales de NPM de óxido de Fe y de ferritas de Mn, Co y Ni. Las imágenes de TEM que aparecen en la [Figura 3.9](#) muestran las NPM obtenidas en cada uno de los casos. Las ferritas producidas presentan una geometría irregular y una polidispersidad significativa. Sin embargo, este tipo de síntesis permitió obtener NPM de tamaño relativamente grande de forma sencilla y sin necesidad de emplear disolventes orgánicos.

Las distribuciones y los valores medios de los tamaños de NP que se muestran al lado de cada una de las figuras fueron obtenidos de manera análoga a los AuNR. Atendiendo

a los histogramas de tamaños de las diferentes ferritas encontramos que para todas ellas el valor de la moda se encuentra en  $9 \pm 1$  nm. Sin embargo, la dispersidad de tamaños hace que el tamaño medio de las diferentes ferritas varíe entre los 9 nm y los 14 nm.



**Figura 3.9** Imágenes de TEM de las NPM sintetizadas para las diferentes ferritas: (a) Fe, (d) Mn, (g) Co y (j) Ni. Distribución de tamaños de las diferentes ferritas: (b) Fe, (e) Mn, (h) Co y (k) Ni. Espectros obtenidos por EDX de las diferentes ferritas: (c) Fe, (f) Mn, (i) Co y (l) Ni.

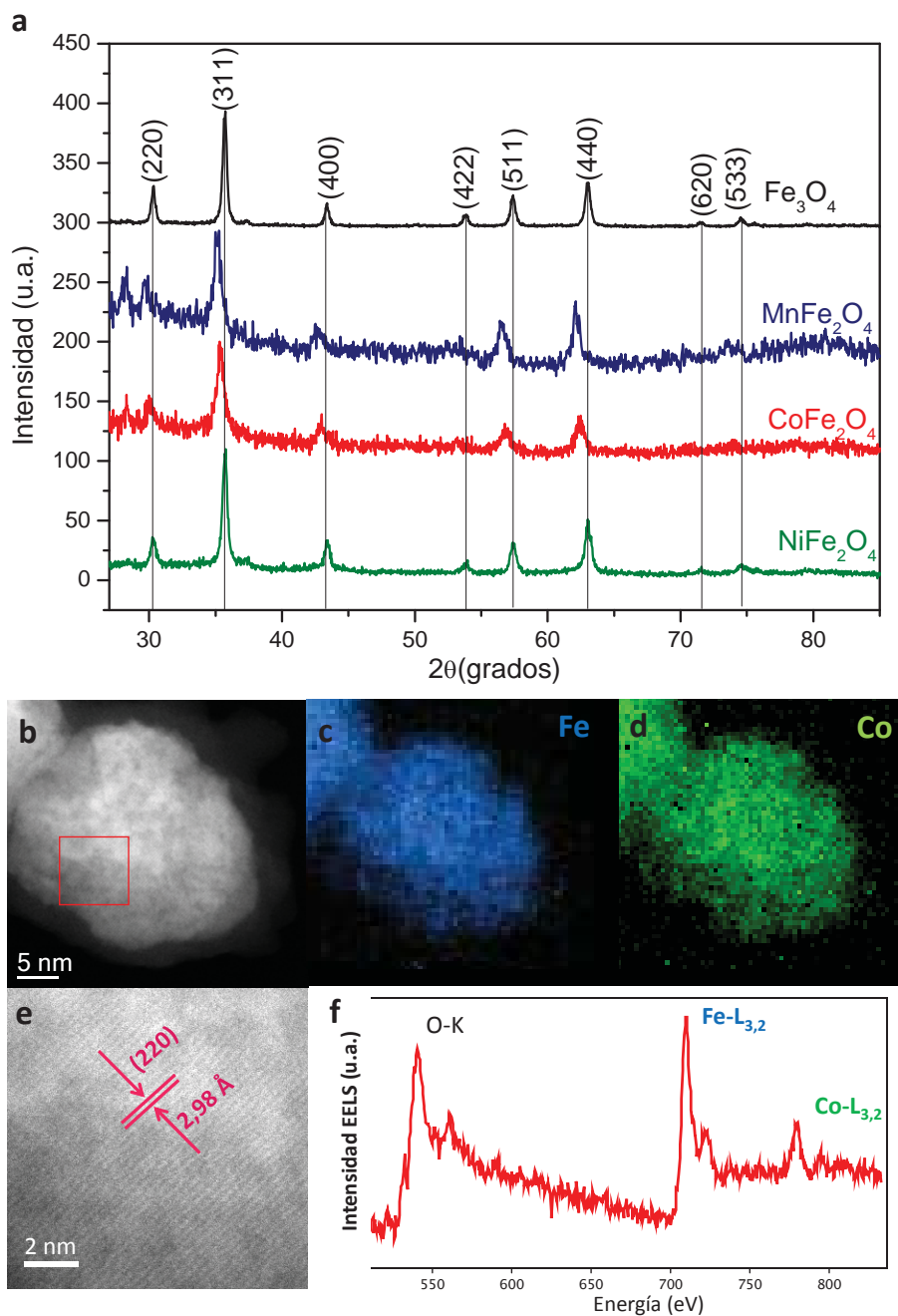
Para comprobar la composición química de las muestras, se realizó un análisis elemental por EDX sobre cada tipo de ferrita. Los espectros obtenidos, muestran un pico común a todas ellas en 6,4 keV atribuible a la emisión  $K\alpha$  del Fe. Además, los picos adicionales en 5,9, 7,7 y 7,4 keV de los espectros (f), (i) y (l) permiten la

identificación de cada muestra como ferritas de Mn, Co y Ni, respectivamente. El resto de emisiones características de estos elementos aparecen solapadas con otros picos y no resultan suficientemente claras para su análisis. Los picos identificados como Cu y Cr se deben a la composición química del portamuestras del microscopio electrónico utilizado.

Los patrones de XRD que se muestran en la [Figura 3.10a](#) muestran que la síntesis electroquímica de las NPM produce una única fase cristalográfica con estructura de tipo espinela. Se indica sobre cada reflexión, la dirección cristalográfica asociada a los planos de esta estructura. Mediante un ajuste de los espectros por el método de Rydberg, se obtuvieron tanto los tamaños de cristal calculado por la ecuación de Scherrer, como el parámetro de red en la dirección (311) para cada una de ellas. La [Tabla 3.1](#) recoge los valores resultantes de estos ajustes. Observamos que la sustitución de algunos iones de Fe de la magnetita/maghemita por otros metales de transición produce variaciones de centésimas de Å en el parámetro de red del cristal.

Para estudiar en mayor profundidad cómo se encuentran distribuidas las especies atómicas en estas ferritas, se realizó un estudio composicional de la ferrita de Co. La [Figura 3.10b, c y d](#) muestran la imagen de HRTEM-HAADF de una NPM junto con su correspondiente análisis composicional por EELS. Este conjunto de imágenes permiten visualizar la distribución de cada uno de los elementos en la NPM. De los mapas obtenidos para la señal de Fe y de Co se desprende que no existe una segregación de especies en las NPM, sino que la distribución es homogénea para los elementos en todo el volumen.

La [Figura 3.10e](#) muestra una ampliación de la región recuadrada en rojo sobre la [Figura 3.10b](#). En ella se observa una distancia interplanar de 2,93 Å que corresponde a la dirección (220) de la estructura espinelas de las ferritas. Esta secuencia de planos periódicos se observa en todo el volumen de la NP, lo que confirma la buena cristalinidad de las mismas. La [Figura 3.10f](#) muestra el espectro de pérdida de energía de los electrones con los picos de Fe y Co correspondiente a sus transiciones  $L_{3,2}$  empleados en el análisis composicional. La mayor señal registrada para el Fe respecto al Co está en concordancia con la relación 2:1 que presentan las ferritas cuya composición está próxima a la estequiometría.



**Figura 3.10** (a) Difractograma de rayos X de las ferritas sintetizadas. (b) Imagen de STEM-HAADF de una NPM de ferrita de Co. Mapa composicional obtenido por EELS del (c) Fe y el (d) Co sobre la imagen mostrada en (b). (e) Ampliación del recuadro rojo de la imagen mostrada en (b). Espectro de EELS para la identificación de los picos asociados a la transición K del O y la transición  $L_{3,2}$  del Fe y del Co.

	Magnetita	Ferrita de Mn (X=Mn)	Ferrita de Co (X=Co)	Ferrita de Ni (X=Ni)
$D_{Scherrer}$ (nm)	27,1	9,9	7,8	12,2
$a_{(311)}$ (Å)	2,51	2,53	2,49	2,51
[Fe] <sub>ICP-MS</sub>	1,315	1,194	0,312	1,244
[X] <sub>ICP-MS</sub>	-	0,367	0,125	0,558
$M_xFe_{3-x}O_4$	$Fe_3O_4$	$M_{0,7}Fe_{2,3}O_4$	$M_{0,9}Fe_{2,1}O_4$	$M_{0,9}Fe_{2,1}O_4$

**Tabla 3.1** Valores obtenidos para las diferentes ferritas de: Tamaño de cristal según la fórmula de Scherrer ( $D_{Scherrer}$ ) y parámetro de red ( $a$ ) obtenidos a partir de los difractogramas de rayos X; concentración de Fe ( $[Fe]_{ICP-OES}$ ) y el ión correspondiente a cada ferrita ( $[X]_{ICP-OES}$ ) obtenidos por ICP-OES; y proporción de los iones sustitutivos de cada una de las ferritas ( $[X]_{ICP-OES}/[Fe]_{ICP-OES}$ ).

Para confirmar la proporción de iones metálicos en las diferentes ferritas se llevó a cabo una digestión de las mismas con agua regia en un volumen controlado y se realizó un análisis de ICP-OES. Esto permitió conocer la cantidad de iones metálicos por unidad de volumen y la proporción de los mismos. Gracias a ello, se pudo calcular tanto la concentración de material magnético como la estequiometría de las ferritas. La [Tabla 3.1](#) muestra los resultados obtenidos mediante esta técnica. A la vista de los resultados, podemos concluir que las ferritas sintetizadas muestran una composición muy cercana a la estequiométrica. Esto resulta importante a la hora de comparar el efecto que tiene la sustitución de unos cationes por otros en las propiedades magnéticas de las NPM.

### **3.3.2 Funcionalización de los componentes plasmónicos y magnéticos**

Como se explicó en la introducción del capítulo, para la hibridación de los componentes magnético y plasmónico se hizo uso de los procesos de polimerización que tienen lugar entre las moléculas de PEG y AC durante el proceso de silanización conjunta<sup>63,64</sup>. Para ello fue necesario llevar a cabo la funcionalización de los AuNR y las NPM con moléculas de SH-PEG y AC respectivamente.

La [Figura 3.11a](#) muestra los espectros FT-IR obtenidos para los AuNR antes y después de su funcionalización. En el espectro de los AuNR recubiertos con CTAB (Au@CTAB) aparecen: dos picos en 719 y 730  $\text{cm}^{-1}$  asociados al balanceo (rocking) de los grupos  $\text{CH}_2$ <sup>134</sup>; otros dos picos en 910 y 960  $\text{cm}^{-1}$  asociados al estiramiento del grupo C-N<sup>135</sup>; y tres picos en 1461-1462-1485  $\text{cm}^{-1}$  de los que los dos primeros son producidos por el tijereteo (scissoring) de los grupos  $\text{CH}_2$  y el último caracteriza el tijereteo del grupo N- $\text{CH}_3$  de la cabeza polar del CTAB<sup>136</sup>. Todos estos picos desaparecen tras la funcionalización de los AuNR con SH-PEG, dando lugar a los picos característicos de esta molécula. En el nuevo espectro de absorción representado en verde, se pueden identificar un pico en 950  $\text{cm}^{-1}$  asociado al estiramiento del grupo C-O-C<sup>137</sup>; y un par de picos en 1035  $\text{cm}^{-1}$ -1105  $\text{cm}^{-1}$  asociados a la vibración del esqueleto (skeletal) de la cadena polimérica<sup>137</sup>.

En el caso de las NPM, los espectros FT-IR que muestra la [Figura 3.11b](#) indican también una correcta funcionalización de las mismas. En azul y rojo aparecen los espectros de las NPM antes y después del tratamiento ácido respectivamente. El pico observado en 1380  $\text{cm}^{-1}$ , presente antes y después de la funcionalización, es atribuible a la deformación por flexión (bending deformation) de los grupos  $\text{CH}_3$  en el caso del TBAB y a una vibración simétrica por tensión de los grupos carboxílicos  $\nu_s(\text{COO}^-)$  en el caso del ácido cítrico<sup>138</sup>. El resto de picos del espectro FT-IR se modifican tras funcionalizar las NPM con ácido cítrico. Además de desaparecer los picos característicos del tetrabutilo en 2958  $\text{cm}^{-1}$ , 2875  $\text{cm}^{-1}$  y 1474  $\text{cm}^{-1}$ , aparecen nuevos picos en 1715  $\text{cm}^{-1}$  y 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Estos dos picos se atribuyen comúnmente a los grupos carboxílicos del ácido cítrico<sup>139</sup>. Se ha observado que el pico de absorción correspondiente a la vibración de los grupos C=O del ácido cítrico se mueve desde 1715  $\text{cm}^{-1}$  hasta 1618  $\text{cm}^{-1}$  cuando estos grupos se enlazan a la superficie de las NP de óxido de Fe<sup>139</sup>. En este caso, la mayor intensidad del pico 1618  $\text{cm}^{-1}$  sugiere que dos de los tres grupos carboxilos del AC se encuentran enlazados a la superficie de la NPM asegurando el enlace bidentado del AC.

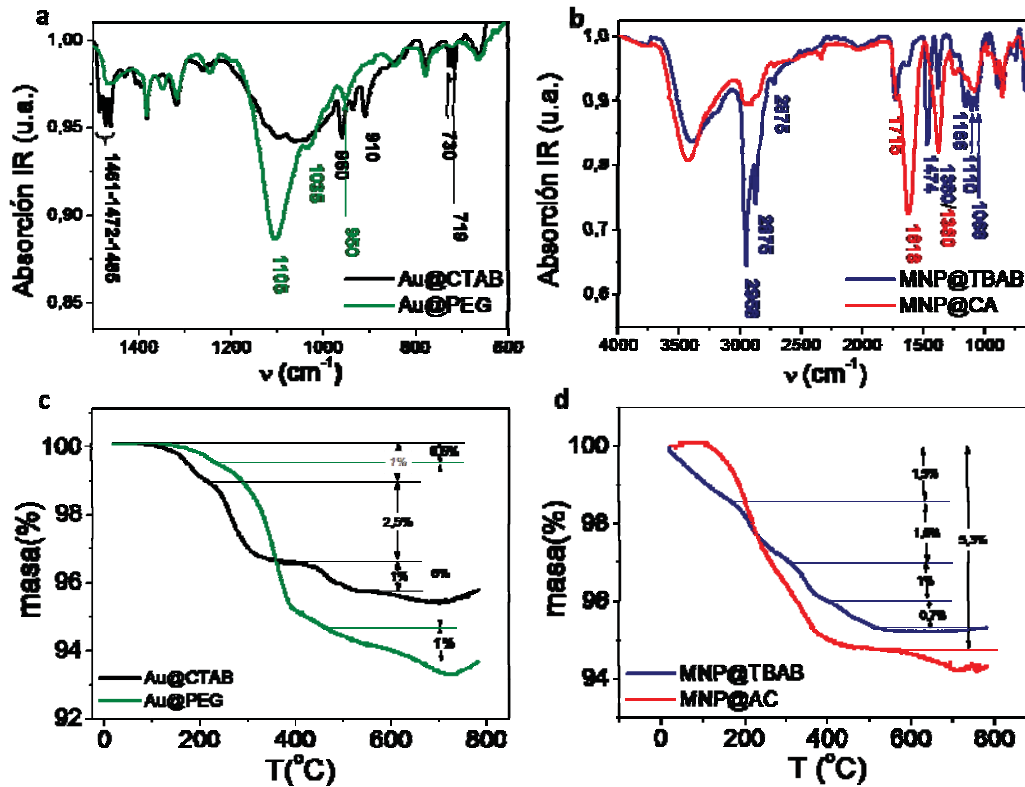


Figura 3.11 Espectros de absorción FT-IR de: (a) AuNR recubiertos de CTAB (Au@CTAB, negro) y SH-PEG (Au@PEG, verde); (b) NPM recién preparadas (NPM@TBAB, azul) y recubiertas de ácido cítrico (MNP@CA, rojo). Curvas de análisis termogravimétrico de (c) AuNR antes (Au@CTAB, negro) y después del recubrimiento (Au@PEG, verde); (d) NPM antes (NPM, azul) y después (MNP@CA, rojo) del tratamiento ácido.

Aunque los resultados de FT-IR parecen indicar la correcta funcionalización de las NP con moléculas orgánicas, para confirmar la adhesión de estas moléculas a su superficie y medir la proporción en peso que suponen estos recubrimientos, se llevaron a cabo ensayos de TGA sobre las muestras una vez dializadas y liofilizadas.

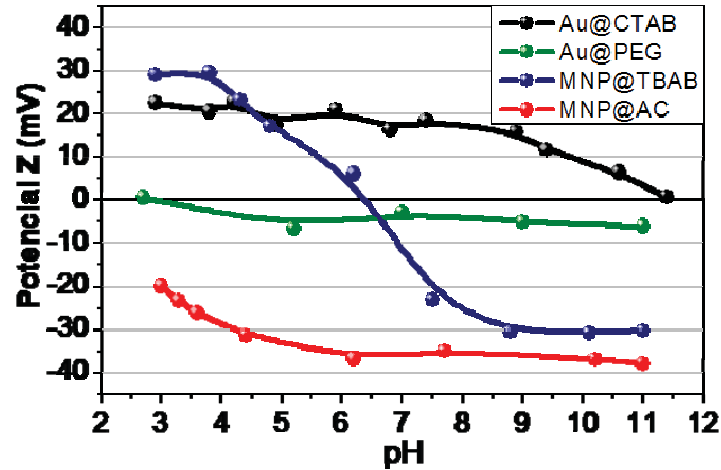
En la [Figura 3.11c](#) se muestran los ensayos realizados sobre las muestras de Au antes y después del recubrimiento con PEG. La pérdida de masa con la temperatura mostró evoluciones diferentes en cada caso. Mientras que los AuNR recubiertos con CTAB muestran una pérdida de masa en tres etapas cuya principal pérdida de peso ocurre a los 270°C, en el caso del PEG la disminución de masa hasta los 300°C es inferior al 0,5% y resulta necesario elevar la temperatura por encima de los 400°C para terminar de quemar el PEG por completo<sup>140</sup>. El mayor tamaño de la molécula de PEG hace que el

porcentaje de masa eliminada al final del ensayo crezca desde un 4,5% hasta un 7,5% del peso total de la NP, lo que concuerda con las variaciones de peso observadas en la bibliografía<sup>140,141</sup>.

La **Figura 3.11d** muestra un estudio análogo sobre la funcionalización de las NPM. En este caso, ambas curvas presentan una caída de peso similar (~ 5%) cuando la temperatura alcanza los 600°C. Sin embargo, la forma de la curva resultó distinta para cada surfactante. Cuando el surfactante que recubre las NPM es el TBAB, se pueden distinguir hasta 4 caídas de peso a lo largo del calentamiento. En cambio, en el caso del AC, se observa que la caída de peso ocurre de manera drástica a la temperatura de combustión del AC (240°C)<sup>142</sup>. La caída escalonada de las curvas de TGA ha sido observada previamente cuando este se encuentra adherido a la superficie de NP.<sup>143</sup>

Una evidencia indirecta de la funcionalización de ambas NP, que además proporciona información sobre su comportamiento coloidal, es la modificación de su potencial Z. En la **Figura 3.12** observamos cómo la carga superficial de los AuNR se modifica completamente tras la funcionalización con SH-PEG. En el caso de las Au@CTAB, las partículas presentan un potencial Z positivo de unos 20 mV que empieza a decrecer a pH altos y se vuelve completamente neutra (punto isoeléctrico) en torno a pH=11,5. Sin embargo, tras el recubrimiento con SH-PEG, la carga superficial se vuelve ligeramente negativa, alcanzando el punto isoeléctrico a pHs ácidos (pH=3). Esto nos indica que la estabilidad coloidal de estas NP ha pasado de estar producida por la repulsión electrostática de las cabezas polares del CTAB, a tratarse de un efecto predominantemente estérico entre las cadenas poliméricas del PEG.

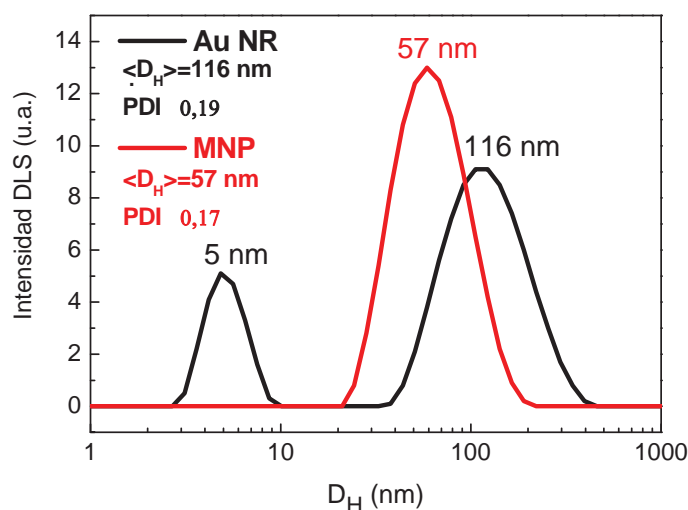
También se observa un claro contraste en el caso de las NPM. El potencial Z de las NPM antes del recubrimiento pasa de valores de +30mV cuando el pH es ácido a -30mV cuando el pH es básico, situando su punto isoeléctrico en torno a pH neutro. Tras el tratamiento ácido, la carga superficial pasa a tomar valores negativos (-40 mV) en todo el rango de pH analizado. Valores superiores a  $\pm 30$  mV en un tampón de  $10^{-2}$ M aseguran una buena estabilidad coloidal del sistema.



**Figura 3.12** Dependencia del potencial Z con el pH para los AuNR recubiertos de CTAB (Au@CTAB, negro) y SH-PEG (Au@PEG, verde) y de las NPM recién preparadas (NPM@TBAB, azul) y recubiertas de ácido cítrico (MNP@CA, rojo).

Los procesos de desprotonación del AC permiten explicar la alta carga superficial observada tras la funcionalización de las NPM. Los pHs de desprotonación del ácido cítrico son  $pK_{a1}=3,1$ ,  $pK_{a2}=4,7$  y  $pK_{a3}=6,4$ . Durante la funcionalización de las NPM, el pH del medio fue ajustado de forma que  $pK_{a2} < pH < pK_{a3}$ . Esto hace que solamente dos de los grupos carboxilo se encuentren activos en la molécula durante el tratamiento ácido. Por tanto, la adhesión de estas moléculas a la NPM será unidentada o bidentada en función de la necesidad estérica y la curvatura de la superficie<sup>144,145</sup>, pero en ambos casos dejarán al menos uno de los grupos ácidos expuesto hacia el exterior de la NPM. Cuando se reduce la acidez del medio hasta pH fisiológico, el grupo funcional expuesto se desprotona adquiriendo carga negativa. Este hecho, junto con el pequeño tamaño de la molécula de ácido cítrico, permite decorar la superficie de la NPM con una gran cantidad de grupos cargados negativamente y producir potenciales Z tan elevados.

Las medidas por DLS permitieron conocer además el tamaño hidrodinámico que adquieren las NP cuando se encuentran en dispersión. En la [Figura 3.13](#) se muestran las distribuciones de intensidad de luz dispersada en función del tamaño de los AuNR y las NPM. En ellas se indican los tamaños hidrodinámicos ( $D_H$ ) medios y los índices de polidispersidad (PDI) obtenidos.



**Figura 3.13** Medidas de DLS del radio hidrodinámico de los AuNR y las NPM junto con los tamaños medios hidrodinámicos ( $\langle D_H \rangle$ ) e índices de polidispersidad correspondiente (PDI).

En el caso de los AuNR, las medidas obtenidas por DLS deben ser analizadas con cautela ya que la anisotropía de la geometría hace que no siga los patrones de agitación Browniana típicos de una esfera. Por una parte, existen dos dimensiones características para la partícula y por tanto el resultado de la medida no puede ser unívoco. Por otra parte, en las NP anisótropas, además de los fenómenos de traslación Browniana aparece procesos de rotación<sup>146,147</sup>. Esto hace que la curva de correlación sufra dos procesos de relajación que generan a su vez dos picos en la señal de intensidad dispersada como los que aparecen en la [Figura 3.13](#).

El primero de estos picos, es atribuible a los procesos de rotación de la NP, mientras que el segundo sufre contribuciones tanto de la rotación como de la traslación en el medio<sup>148</sup>. El estudio detallado de estos procesos va más allá de los objetivos de esta tesis. Baste considerar que, obviando la agregación, las posiciones de los picos observados por DLS acotan el tamaño de los ejes observados por TEM para los AuNR.

Para las NPM recubiertas con AC encontramos que el patrón de dispersión de la luz presenta un único pico en 57 nm con un PDI de 0,17. El  $D_H$  observado es claramente superior al observado por TEM para las NPM. Las discrepancias entre el tamaño medido por DLS y por TEM es algo lógico ya que las medidas de dispersión de luz no solo miden el tamaño de la partícula sino todas las moléculas adsorbidas en la superficie

de la misma. Además, el carácter magnético de las NP de ferrita hace que tenga lugar un cierto grado de agregación cuando son dispersadas en medio acuoso y que produzca que estos agregados actúen como una unidad en el proceso de dispersión de luz. De esta manera, es común observar una duplicación o incluso triplicación del tamaño hidrodinámico respecto al observado por TEM cuando se estudian NPM con tamaños superiores a los 10 nm<sup>85,149</sup>.

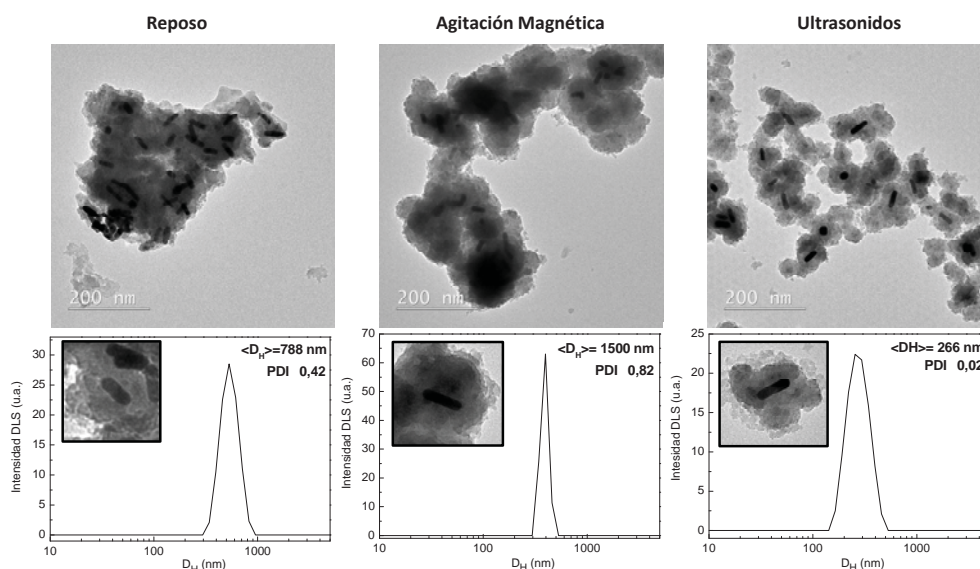
### 3.3.3 Influencia de los parámetros de síntesis de las NPMPH

Con el fin de optimizar la ruta de síntesis desarrollada, se llevó a cabo un estudio de la influencia de los parámetros de reacción sobre el tamaño y la morfología de las NPMPH sintetizadas. Los parámetros de reacción analizados fueron: las condiciones de agitación, el tiempo de reacción, el pH del medio y la proporción de NPM/AuNR.

La morfología y la disposición de las fases en las nanoestructuras producidas, fueron estudiadas en primer lugar mediante las microscopías TEM de las muestras. No obstante, el efecto de agregación de las NPMPH durante el secado de las rejillas de TEM dificultó la observación de la geometría individual de las NPMPH e hizo difícil evaluar el tamaño real de las nanoestructuras producidas. Por este motivo se ha incluido junto a las imágenes de TEM de cada muestra, las medidas de tamaño hidrodinámico obtenidas por DLS.

#### 3.3.3.a Efecto de la agitación

En primer lugar, se estudió el efecto del método de agitación durante el proceso de síntesis, comparando las NPMPH obtenidas en reposo, con agitación magnética y usando un baño de US. La [Figura 3.14](#) muestra, mediante imágenes TEM y medidas de tamaño hidrodinámico, el resultado obtenido en cada método.



**Figura 3.14** Imágenes TEM y medidas por DLS de las NPMPH preparadas en distintas condiciones de agitación: (a) NPMPH preparadas en reposo, (b) NPMPH preparadas mediante agitación magnética y (c) NPMPH preparadas en baño de US.

Las imágenes de TEM muestran que cuando el proceso de silanización se lleva a cabo sin ningún tipo de agitación, se obtienen como resultado estructuras de sílice que engloban múltiples AuNR y NPM y que no poseen una geometría definida. El gran tamaño hidrodinámico de estas estructuras ( $D_H=788$  nm) y su elevada dispersidad de tamaños ( $PDI=0.4$ ) evidencian la falta de control de los procesos de silanización. La sedimentación observada en la muestra al final de la síntesis indica su baja estabilidad coloidal y el crecimiento descontrolado de la sílice.

La agitación magnética de la muestra tampoco fue capaz de producir NPMPH independientes. Aunque las imágenes de TEM muestran geometrías lobulares en los recubrimientos de sílice, el tamaño hidrodinámico obtenido se encuentra por encima de la micra, y la incertidumbre de la medida ( $PDI=0,82$ ) advierte de su baja fiabilidad. La presencia de campos magnéticos favorece la agregación de las NP e impide la formación individual de recubrimientos generando así composites de tamaños micrométrico.

En cambio, la síntesis realizada en el baño de ultrasonidos, permitió llevar a cabo un proceso de hibridación controlada y reducir tanto el tamaño de las NPMPH como su PDI. A pesar del problema de la agregación, en las imágenes de TEM se pueden encontrar NPMPH individuales en las que el AuNR aparece insertado junto con las NPM dentro de una matriz de sílice común. El tamaño obtenido mediante DLS (266nm) y su baja dispersidad ( $PDI=0,2$ ) evidencian un mayor control de los recubrimientos para la síntesis con ultrasonidos, aunque sigue resultando superior al observado en las imágenes de TEM de NPMPH individuales.

Es conocido que el uso de ultrasonidos durante el recubrimiento de NPM por el método de Stöber no solo evita la agregación y la sedimentación de las mismas, sino que favorece la hidrólisis y condensación de las moléculas TEOS<sup>150</sup> evitando el recubrimiento conjunto de múltiples NP<sup>151</sup>. Estos fenómenos pueden estar también detrás de los tamaños de NP obtenidos por este procedimiento en el caso de las NPMPH.

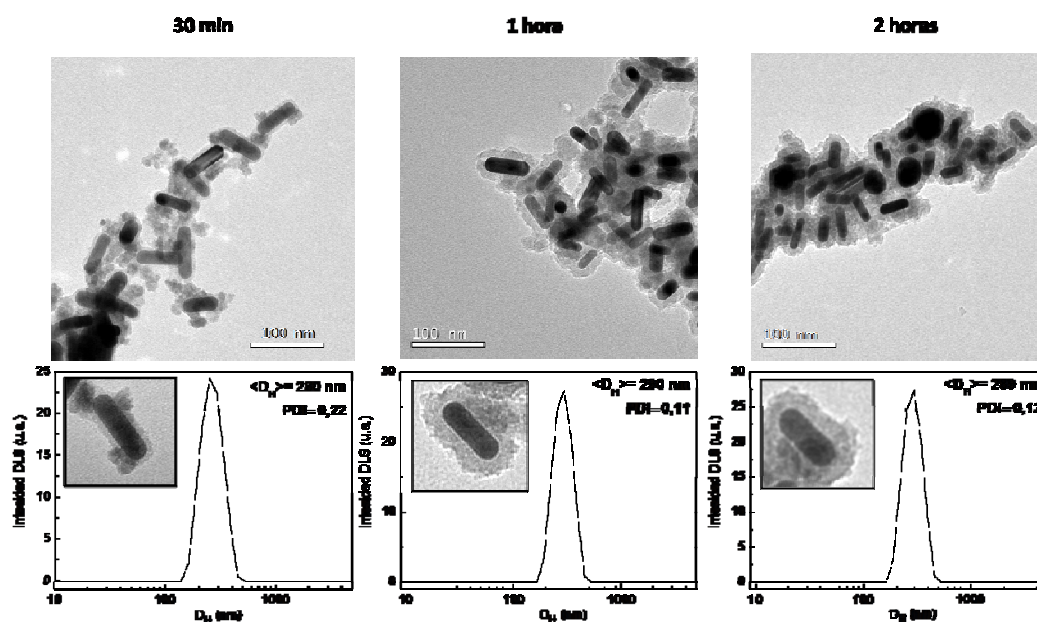
Por último cabe indicar que, a diferencia de las medidas de DLS de los AuNR, en este caso aparece un único pico de intensidad. Esto es debido a que el recubrimiento con sílice y la hibridación con las NPM suavizan la anisotropía de forma de las NP, disminuyendo así la importancia de los procesos de rotación en las medidas de dispersión de luz.

### 3.3.3.b Efecto del tiempo de reacción

El segundo parámetro de síntesis que se estudió fue el tiempo de reacción. Para este estudio, se fueron extrayendo alícuotas del volumen de reacción que fueron diluidas con etanol puro e inmediatamente centrifugadas. Esto nos permitió conocer de manera indirecta la cinética de los procesos de hibridación.

La [Figura 3.15](#) muestra la geometría que presentan las NPMPH en las distintas etapas de la reacción. Se observa que a los 30 min de reacción ya se ha formado una fina capa de sílice de  $2,9 \pm 0,3$  nm en torno a los AuNR en la que aparecen insertadas algunas NPM. Sin embargo, en la superficie de las NPM que no está en las proximidades del AuNR no aparece ningún signo de recubrimiento apreciable. Atendiendo a las medidas de DLS, las NPMPH formadas a los 30 min muestran un tamaño hidrodinámico en torno a los 280 nm. Se observa que este valor varía levemente al aumentar el tiempo de reacción.

Transcurrida 1 hora de reacción, la mayoría de las NPMPH aparecen recubiertas por una capa de sílice en la que los dos componentes quedan atrapados. Al final de las 2 horas, la silanización se ha completado en todo el conjunto de NPMPH y las fases han quedado finalmente hibridizadas.



**Figura 3.15** Imágenes TEM y medidas por DLS de las NPMPH producidas a diferentes tiempos de reacción: (a) 30 minutos, (b) 1 hora y (c) 2 horas.

Si analizamos detenidamente las etapas del proceso de hibridación, lo primero que observamos es que el espesor del recubrimiento de SiO<sub>2</sub> producido a los 30 min sobre la superficie de los AuNR, coincide con el tamaño típico de los recubrimientos con PEG de 6000 Da<sup>152,153</sup>.

Esto nos indica que son los grupos hidroxilos de las cadenas de PEG los que más rápido catalizan el proceso de condensación del TEOS. Además, la presencia de NPM insertadas en esta fina capa señala la importancia del proceso de polimerización entre el ácido cítrico y el PEG en la formación de las NPMPH. La ausencia de sílice en la superficie de las NPM indica que no se trata por tanto de un simple proceso de silanización conjunta, sino que aparecen efectos de autoensamblado entre los componentes mediados por la polimerización de los grupos funcionales que cubren ambas superficies.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en el D<sub>H</sub> de las muestras cuando la capa de sílice es de unos pocos nanómetros y cuando recubre las nanoestructuras completamente. Lo cual parece señalar que los agregados de NP observados por TEM no se deben a un entrecruzamiento de NP a través de la sílice, sino a la agregación posterior de componentes individuales.

#### **3.3.3.c Efecto del pH**

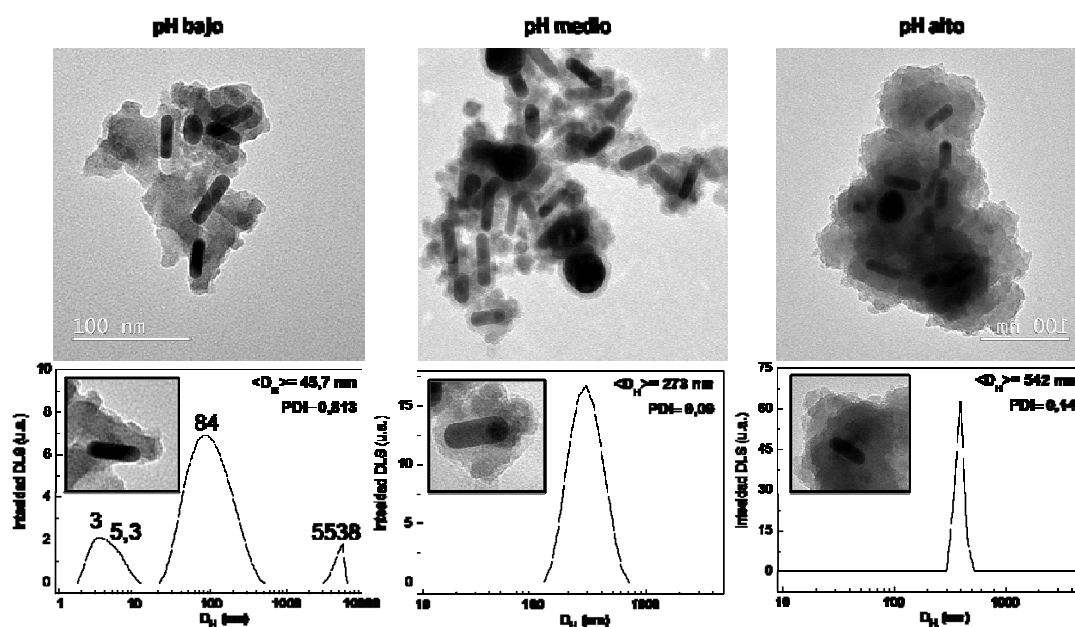
El tercero de los parámetros que fue estudiado es el efecto del pH. Dado que resulta difícil conocer el valor del pH cuando se trabaja con una mezcla de medios (agua/etanol), las cantidades de NH<sub>3</sub> añadidas a la reacción fueron modificadas para variar las condiciones de basicidad de la misma.

En la [Figura 3.16a](#) se puede observar, que si la cantidad de base añadida resulta insuficiente, los recubrimientos de las NP se producen de manera incompleta, dejando parte de su superficie expuesta y conectando unas NP con otras a través de microestructuras de sílice. En las medidas de DLS correspondientes aparece una secuencia de picos que recuerda a los obtenidos en los AuNR sin recubrir. Al igual que en el caso de los AuNR, aparece un pico de dispersión de luz a los pocos nm asociado a la rotación de los AuNR que no hayan sido incorporados a las estructuras de sílice, y picos de tamaños mayores asociados a la difusión de las NP en el medio. En este caso, aparece en la región de las micras, un pico adicional debido a la presencia de

microestructuras como la que se observa en la foto de TEM. No obstante, la polidispersidad de la muestra (PDI=0,82) impide un análisis fiable de la medida.

Por otra parte, si la cantidad de base es excesiva, se forman estructuras de gran tamaño en las que varios núcleos de AuNR son recubiertos por una misma matriz como las que se muestran en la [Figura 3.16c](#). Las estructuras formadas, a pesar de superar los 500 nm de tamaño hidrodinámico, muestran un valor PDI extremadamente bajo.

Usando una cantidad adecuada de  $\text{NH}_3$  (15  $\mu\text{L}$ ), se consiguen formar NPMPH con un recubrimiento de espesor controlado. Las reacciones llevadas a cabo en medios moderadamente básicos generan NPMPH con tamaños hidrodinámicos por debajo de los 300 nm y valores de PDI menores que 0,1.



**Figura 3. 16** Imágenes TEM y medidas por DLS de las NPMPH preparadas con diferentes cantidades de  $\text{NH}_3$ : (a) 7,5  $\mu\text{L}$ , (b) 15  $\mu\text{L}$  y (c) 30  $\mu\text{L}$ .

Esta dependencia con el pH puede ser explicada atendiendo a los procesos de sol-gel que tienen lugar en el método de Stöber. Es comúnmente aceptado que el aumento del pH en el medio favorece la separación de las etapas de hidrólisis y condensación del TEOS<sup>154</sup>. Cuando estas dos etapas ocurren de manera diferenciada, las moléculas O que resultan de la condensación de dos moléculas de TEOS ([Reacciones 3.2](#) y [3.3](#)) presentan 6 posiciones hidrolizadas para las posteriores condensaciones, lo cual favorece un crecimiento arbóreo del  $\text{SiO}_2$ . En cambio, si la condensación se inicia antes

de que se complete la hidrólisis de todos los radicales, las estructuras que se forman adquieren una disposición lineal<sup>155</sup>. Por este motivo, el uso de condiciones básicas en el método de Stöber reduce los procesos de entrecruzamiento de los núcleos de sílice y favorece la formación de nanopartículas independientes<sup>156</sup>.

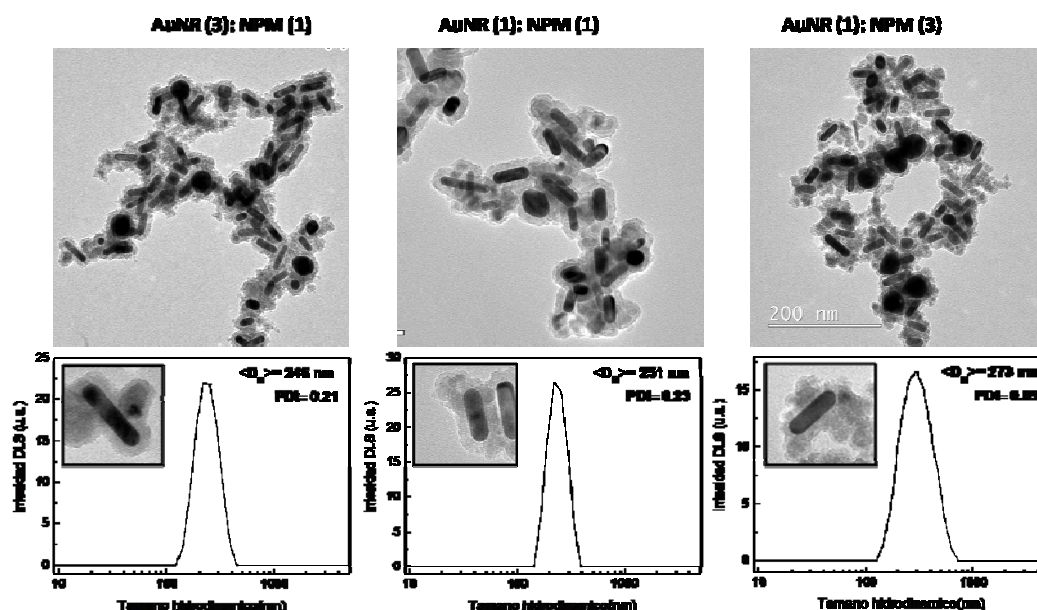
De acuerdo con estos experimentos, nuestra hipótesis es que un pH bajo genera procesos de entrecruzamiento descontrolado entre NP que anulan los efectos de autoensamblado mediados por la unión PEG-AC. Esto genera nanoestructuras de gran tamaño e impide controlar la disposición de las fases en la NPMPH.

Por el contrario, si el pH es demasiado alto, el proceso de condensación se cataliza en exceso y los recubrimientos de SiO<sub>2</sub> no se limitan a un único AuNR rodeado de NPM. Por este motivo aparecen al final del proceso estructuras de sílice con múltiples núcleos de AuNR y NPM insertadas en su interior. El uso de la cantidad correcta de base, permite formar NPMPH individuales con una estructura núcleo-satélite como la propuesta al inicio del capítulo.

#### **3.3.3.d Efecto de la proporción de los componentes plasmónico y magnético**

Cambiar la proporción de los AuNR y las NPM permite modificar el peso de las propiedades magneto-plasmónicas de estas nanoestructuras. Por este motivo, se estudió si un cambio en la proporción de AuNR y NPM (AuNR:NPM) tiene efectos sobre los procesos de hibridación. Para mantener fija la proporción de agua/etanol en el medio se ajustó la concentración de las NPM de manera que se obtuvieran relaciones AuNR:NPM de 3:1, 1:1 y 1:3.

En la [Figura 3.17](#), observamos que la geometría de las NPMPH no se modifica significativamente cuando se aumenta la proporción AuNR:NPM. La mayor cantidad de NPM en el medio produce una mayor presencia de estas en la matriz de sílice. La [Figura 3.17c](#) muestra que cuando el número de NPM es excesivo, una parte de ellas no se internaliza en la matriz de sílice de las NPMPH y quedan dispersas en el medio de forma independiente.



**Figura 3.17** Imágenes TEM y medidas por DLS de las NPMPH preparadas con diferentes relaciones de AuNR vs MNP. (a) 3:1 (b) 3:3 y (c) 1:3.

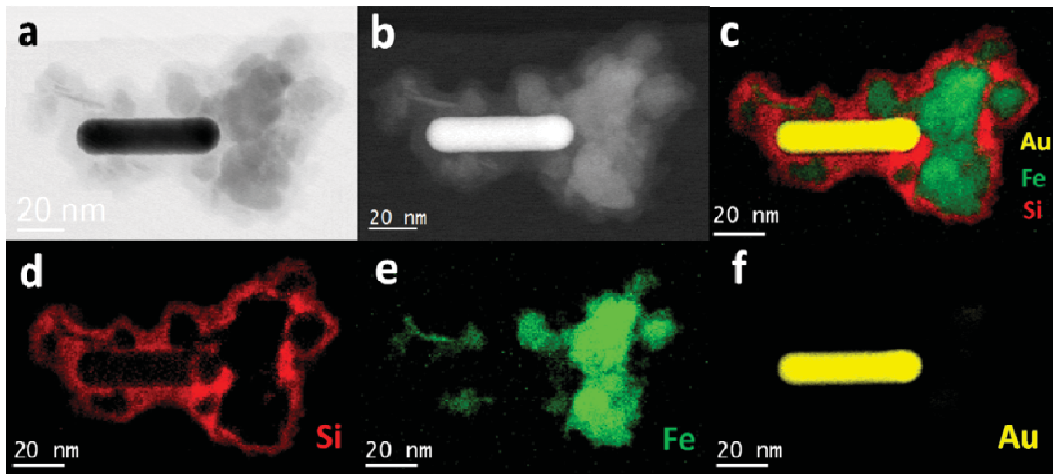
Las medidas de DLS muestran un ligero incremento del radio hidrodinámico cuando ~~al~~ aumenta la concentración de NPM en el medio. Este aumento del tamaño puede deberse a dos motivos, por una parte la internalización de un mayor número de NP en la corteza de las NPMPH produce un aumento del tamaño global de la estructura. Por otra parte, al aumentar el número de NPM en la nanoestructura los efectos de interacción magnética dipolar resultan mayores, favoreciendo la agregación de las mismas. Sin embargo, no parece que el aumento del número de NPM introduzca grandes modificaciones en los procesos sol-gel que tienen lugar durante la hibridación.

Por tanto, el método de síntesis desarrollado permite escoger la importancia que se le desea otorgar a los componentes magnéticos y plasmónicos en las NPMPH sin que esto suponga una alteración significativa de su morfología y tamaño.

### 3.3.4 Caracterización estructural de las NPMPH

Una vez escogidos los parámetros óptimos para la hibridación de los AuNR y las NPM, se realizó un análisis estructural y composicional de las NPMPH sintetizadas. Las [Figuras 3.18a, b y c](#) muestran las imágenes de TEM en campo claro, STEM de campo oscuro (HAADF) y STEM composicional (STEM-EELS) de una NPMPH individual. Aunque el núcleo de Au de las NPMPH resulte fácil de identificar en la imagen TEM de campo claro, la pequeña diferencia de contraste entre las NPM y la sílice impide diferenciar con claridad la distribución de las fases en la corteza.

La imagen de campo oscuro que se muestra en la [Figura 3.18b](#), nos permite distinguir con mayor claridad las fases presentes en la corteza y confirmar el ordenamiento núcleo-satélite de la nanoestructura. Esto se debe a que, como se indicó en el **capítulo 2**, en la imagen de campo oscuro el contraste de las fases depende de la dispersión de electrones que producen, y por tanto se elimina la contribución de las fases amorfas<sup>157,158</sup>.



**Figura 3.18** Imagen TEM de una NPMPH en (a) campo claro y (b) campo oscuro. (c) Imagen del mapeado composicional obtenido mediante EELS de la NPMPH mostrada en (a). El mapeado de cada elemento se muestra de manera diferenciada en: (d) Si, (e) Fe y (f) Au.

Aunque las imágenes de microscopía 2D presentadas no permiten conocer con exactitud las disposiciones tridimensionales de la nanoestructura, las NPM y la superficie de los AuNR parecen estar separadas por distancias nanométricas, lo que apoya la hipótesis de la hibridación mediada por surfactantes.

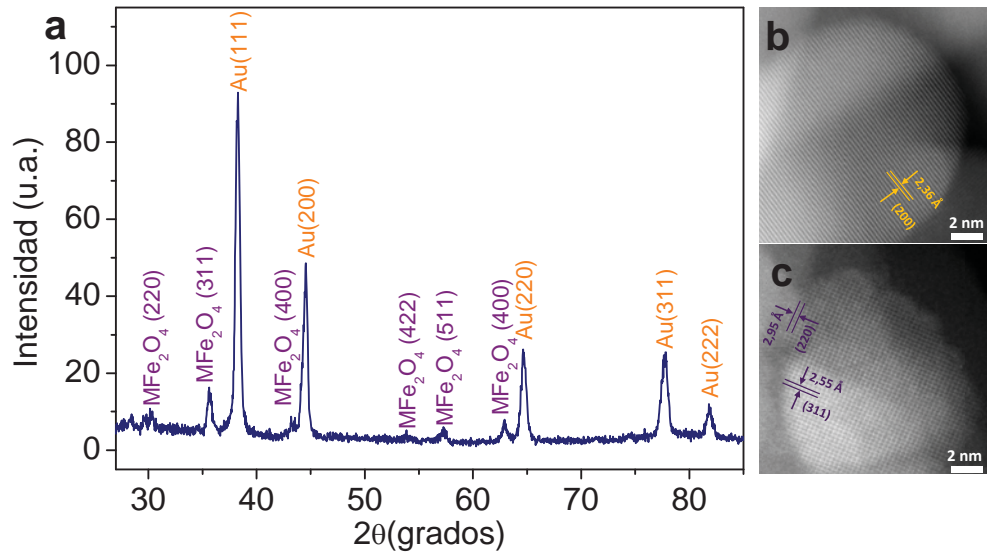
El mapa composicional por EELS de la [Figura 3.18c](#) confirma la distribución de fases propuesta en la [Figura 3.3](#). En ella observamos un núcleo de Au en el centro que reproduce la geometría del AuNR rodeado por cúmulos de Fe en las posiciones satelitales observadas en la imagen de STEM, lo que nos permite identificarlos como NP de óxido de hierro. Se observa además, cómo la señal de Si envuelve completamente el conjunto de NP a modo de matriz y separa la intercara de las fases.

En la [Figura 3.19a](#), el difractograma de rayos X obtenido para la muestras de NPMPH de magnetita/maghemita, muestra claramente la coexistencia de las fases de Au y la espinela propia de las ferritas. La diferencia en los parámetros de red obtenidos mediante el ajuste de Rydberg<sup>159</sup> de estos difractogramas con los mostrados anteriormente para cada uno de los componentes es menor a 1 pm.

Por otra parte observamos que el recubrimiento de SiO<sub>2</sub> producido por el método de Stöber no posee una estructura cristalina<sup>156</sup> que introduzca reflexiones en el patrón de difracción de rayos X. La banda asociada al silicio amorfo en la región de los 20-30°<sup>160</sup> queda enmascarada a causa de la alta cristalinidad de las NP.

La falta de estructura cristalina en la sílice supone una gran ventaja a la hora de preservar las propiedades magnéticas y plasmónicas de las fases ya que, a diferencia de otro tipo de nanoestructuras<sup>15,161,162</sup>, la unión mediante una interfase amorfa evita las tensiones generadas en su intercara y su carácter aislante previene la transferencia de carga entre ellas. De esta manera se evitan las principales causas del detrimento de las propiedades magneto-plasmónicas tras su hibridación de las fases<sup>15,24,164-166</sup>.

Junto a los patrones de XRD se muestran las imágenes HAADF-STEM de cada uno de los componentes al formar parte de las NPMPH. En la [Figuras 3.19b](#), los planos atómicos de la NP de Au muestran una distancia interplanar de 2.36 Å asociada a la dirección (111) del Au. En la [Figura 3.19c](#), la imagen de una NPM dentro de la matriz de sílice muestra dos ejes cristalográficos ortogonales cuyas separaciones entre planos son de 2,95 Å y 2,55 Å, lo que corresponden a las direcciones (220) y (311) de las ferritas respectivamente. Sendas microscopías muestran parámetros de red similares a las estructuras cristalinas que se midieron en cada componente antes de la hibridación (ver [Figura 3.4](#) y [3.6](#)) incluso en las regiones más próximas entre ambas fases.



**Figura 3.19** (a) Difractogramas de rayos X de las NPMPH. Imágenes de HR-STEM en campo oscuro del (b) AuNR y una (c) NPM que componen el núcleo y el satélite de las NPMPH.

De esta manera, podemos concluir que el proceso de hibridación entre los AuNR y las NPM a través de una matriz amorfa de sílice permite una unión estable de los componentes sin modificar significativamente sus parámetros cristalinos ( $\leq 3$  pm). No obstante, se debe tener en consideración que, aunque se haya evitado la intercara entre las fases de Au y ferrita, la proximidad subnanométrica observada en las microscopías electrónicas obliga a tener en cuenta los efectos de interacción de medio alcance que tiene lugar en el seno de las NPMPH sintetizadas.

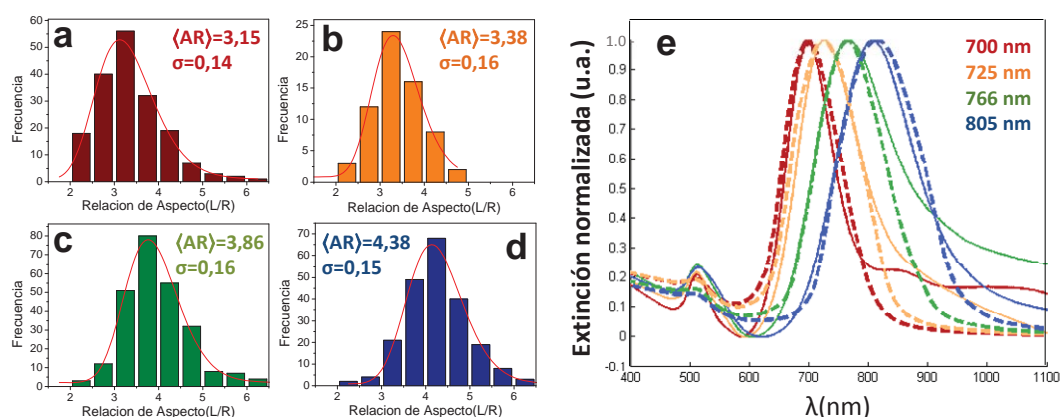
### 3.3.5 Estudio de la respuesta plasmónica de los AuNR y las NPMPH

En esta sección estudiaremos desde un punto de vista experimental y teórico cómo la geometría y el entorno dieléctrico afectan a las propiedades plasmónicas de los AuNR y cómo estas se modifican cuando forman parte de las NPMPH.

#### 3.3.5.a Ajuste de la resonancia plasmónica y efecto de la dispersión de tamaños

La [Figura 3.20](#) muestra las distribuciones de RA obtenidas para los AuNR a partir de las imágenes de TEM que se mostraron en la [Figura 3.4](#). En ellas se indican junto con los valores de RA medio y la anchura ( $\sigma$ ) del ajuste log-normal de los histogramas. Para una fácil identificación de las muestras, se respetó el código de colores utilizado en la [Figura 3.4](#). A partir de estos ajustes, se calcularon los espectros de extinción de cada una de las muestras y se compararon con sus respectivos espectros experimentales, tal como se muestra en la [Figura 3.20e](#).

Aparece en todos ellos un primer pico de extinción en la región visible del espectro asociado al plasmón transversal de los AuNR y un segundo pico de mayor intensidad en el IR cercano debido a la excitación plasmónica del eje longitudinal. Observamos que el cambio en la RA de los AuNR, permite desplazar el plasmón longitudinal a lo largo del IR cercano desde los 700 nm para RA=3.25 hasta 805 nm para RA=4.38 mientras que la resonancia transversal apenas modifica su posición.



**Figura 3.20.** Distribución de RA de las muestras de AuNR preparadas con diferentes cantidades de semillas: (a) 30  $\mu\text{L}$  en granate, (b) 60  $\mu\text{L}$  en amarillo, (c) 120  $\mu\text{L}$  en verde y (d) 240  $\mu\text{L}$  en azul. (e) Espectros de extinción normalizados obtenidos experimentalmente (línea continua) y mediante la teoría de Mie-Gans (línea discontinua) siguiendo los colores de cada una de las muestras.

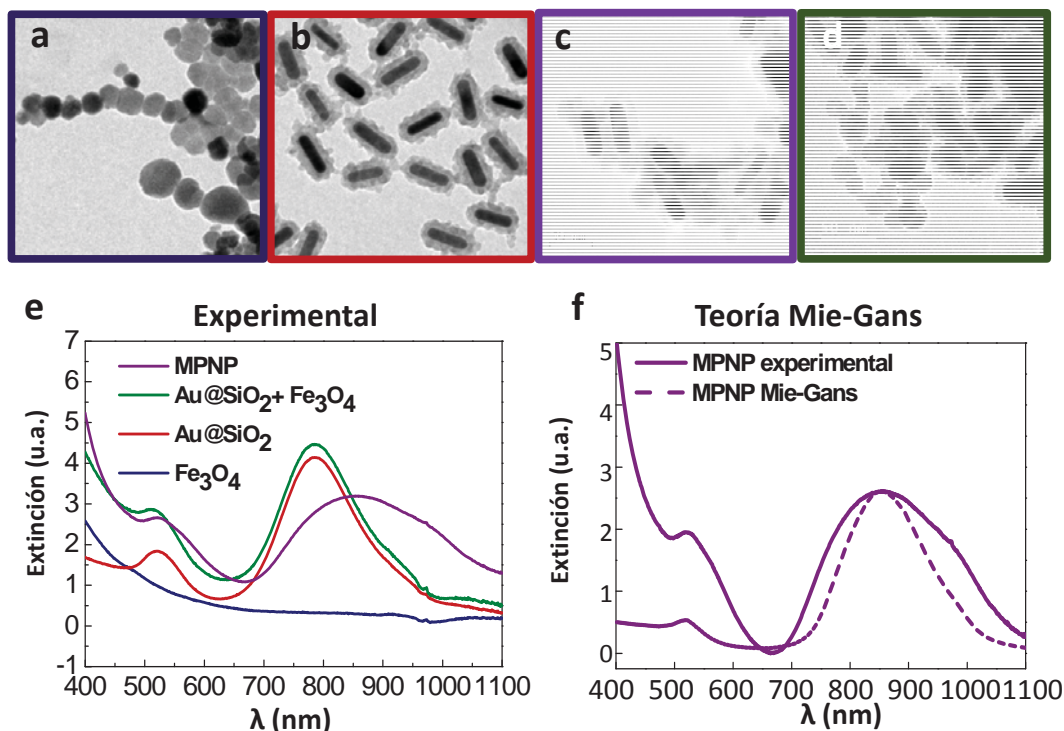
Como se observa en estos espectros, la teoría de Mie-Gans es capaz de predecir con gran exactitud la evolución del plasmón longitudinal de los AuNR al ir modificando su RA. Si nos fijamos en la [Ecuación 3.1](#) es fácil darse cuenta de que un cambio en la relación de aspecto modifica los coeficientes de polarizabilidad, lo que hace que la frecuencia a la que el denominador se anula (resonancia) corresponda a longitudes de onda mayores. No obstante, se observa también que estas predicciones teóricas se alejan del comportamiento experimental en las longitudes de onda más altas.

### **3.3.5.b Efecto del entorno dieléctrico**

Otro aspecto importante a la hora de estudiar las propiedades de los plasmones de superficie localizados, es su sensibilidad con el entorno dieléctrico. La oscilación de la nube electrónica en la frontera del material hace que los plasmones de las NP metálicas sean sensibles a la naturaleza dieléctrica de las regiones que las rodean separadas hasta decenas de nanómetros su superficie. Esto nos obliga a considerar los efectos que tienen los diferentes recubrimientos sobre las propiedades plasmónicas de los AuNR.

En la [Figura 3.21](#) se muestran las imágenes de TEM de las muestras utilizadas en este estudio y los espectros de extinción correspondientes. Con el fin de estudiar el efecto que produce la presencia de las NPM en el entorno dieléctrico de los AuNR, se preparó una muestra control de AuNR con RA=3,86 recubiertos por una capa de sílice de unos 8 nm aproximadamente (AuNR@SiO<sub>2</sub>), tal y como se muestra en la [Figura 3.21b](#). También se preparó un segundo control mezclando estos AuNR@SiO<sub>2</sub> con NPM en una proporción similar a la empleada en la síntesis de las NPMPH ([Figura 3.21d](#)).

Analizando la absorción de las NPM de las distintas ferritas se observó que todas ellas presentan un espectro similar al que se muestra en [Figura 3.21e](#) con línea azul. En él observamos una extinción máxima en la región UV que decae rápidamente en la región IR. Por otra parte, se observó que el recubrimiento de los AuNR con sílice supone un cambio en el índice de refracción del medio que desplaza la resonancia plasmónica longitudinal hasta los 785 nm (línea marrón). El coloide resultante de la mezcla de estos dos componentes (línea verde) muestra un espectro de extinción que resulta igual a la suma de los espectros de cada componente por separado. Esto nos permite descartar los efectos de interacción cuando la separación entre los componentes es grande, como ocurre en el caso de la mezcla de coloides.



**Figura 3.21** Imágenes de TEM de: (a) NPM, (b) AuNR@SiO<sub>2</sub>, (c) NPMPH y (d) mezcla de AuNR@SiO<sub>2</sub> con NPM. (e) Espectros de extinción de los coloides mostrados siguiendo los colores de sus márgenes. (f) Comparativa del espectro de extinción predicho por la teoría de Mie-Gans para las NPMPH y el obtenido experimentalmente.

En cambio, en el caso de las NPMPH (línea morada), la presencia de las NPM en el entorno cercano de la superficie del Au hace que el plasmón longitudinal se desplace hasta los 865nm y que su anchura a media altura sea 1,8 veces mayor que la se observa en la muestra control de AuNR@SiO<sub>2</sub>. Además, en comparación con el espectro de los AuNR@SiO<sub>2</sub>, la intensidad de la resonancia longitudinal se ve atenuada y aparece una mayor asimetría en el pico de extinción.

Las diferencias entre los espectros de la mezcla de coloides y las NPMPH son una evidencia clara de la interacción electromagnética que tiene lugar entre los AuNR y las NPM que forman las NPMPH. Asumiendo la aproximación de medio equivalente que se explicó en la sección de Materiales y Métodos, se calculó el porcentaje de magnetita necesario para explicar el desplazamiento observado experimentalmente. El parámetro  $\Phi$  que mejor ajusta la posición del plasmón longitudinal es 0,09, tal como se muestra en la [Figura 3.21f](#).

Esto significaría que solamente el 9% de la matriz de sílice debería estar compuesta por magnetita, lo que resulta un porcentaje por debajo del observado en las imágenes obtenidas por TEM. Además, la anchura a media altura del pico de absorción del plasmón longitudinal de las NPMPH (265 nm) resulta mucho mayor que el que predice esta teoría para una  $\Phi$  de 0,09 (160 nm). Esta cantidad de magnetita solamente supondría un ensanchamiento del pico de 1,05 respecto al espectro calculado para un recubrimiento homogéneo de sílice ( $\Phi=0$ ).

Las discrepancias señaladas entre los experimentos y la teoría indican que la aproximación de medio equivalente no resulta apropiada para reproducir el comportamiento de las NPMPH que estudiamos. Algunos autores señalan que la interacción inhomogénea entre las fases de un nanocomposite puede producir un ensanchamiento y una atenuación de los picos de extinción del cual no da cuenta la teoría de Mie-Gans<sup>44,53,167</sup>.

#### **3.3.5.c Simulación de la respuesta plasmónica mediante elementos finitos**

En la [Figura 3.22 a-c](#) se muestran las tres geometrías diseñadas para simular el comportamiento de los AuNR, los AuNR@SiO<sub>2</sub> y las NPMPH. Las imágenes que aparecen bajo cada una de las estructuras corresponden al aumento del campo eléctrico cercano generado por los plasmones en el entorno cercano de las NP. Las [Figuras 3.22 d-f](#) fila muestran la excitación del plasmón transversales en las longitudes de onda correspondientes a su resonancia, mientras que las [Figuras 3.22 g-i](#) muestran el campo inducido por el plasmón longitudinal. Cabe destacar que la escala de colores fue aumentada un orden de magnitud en el caso de los plasmones longitudinales para reproducir los detalles de las geometrías que adquiere el campo eléctrico en el entorno cercano.

Si nos fijamos en la respuesta de los AuNR rodeados solamente por agua, observamos que el aumento de campo eléctrico en su superficie, sigue el patrón de una emisión típica de una antena dipolar tanto en su eje transversal como en el longitudinal. Esto hace que muchos autores se refieran a las NP con respuesta plasmónica como nanoantenas<sup>168</sup>, aunque su comportamiento se deba a procesos electrónicos distintos<sup>169</sup>.

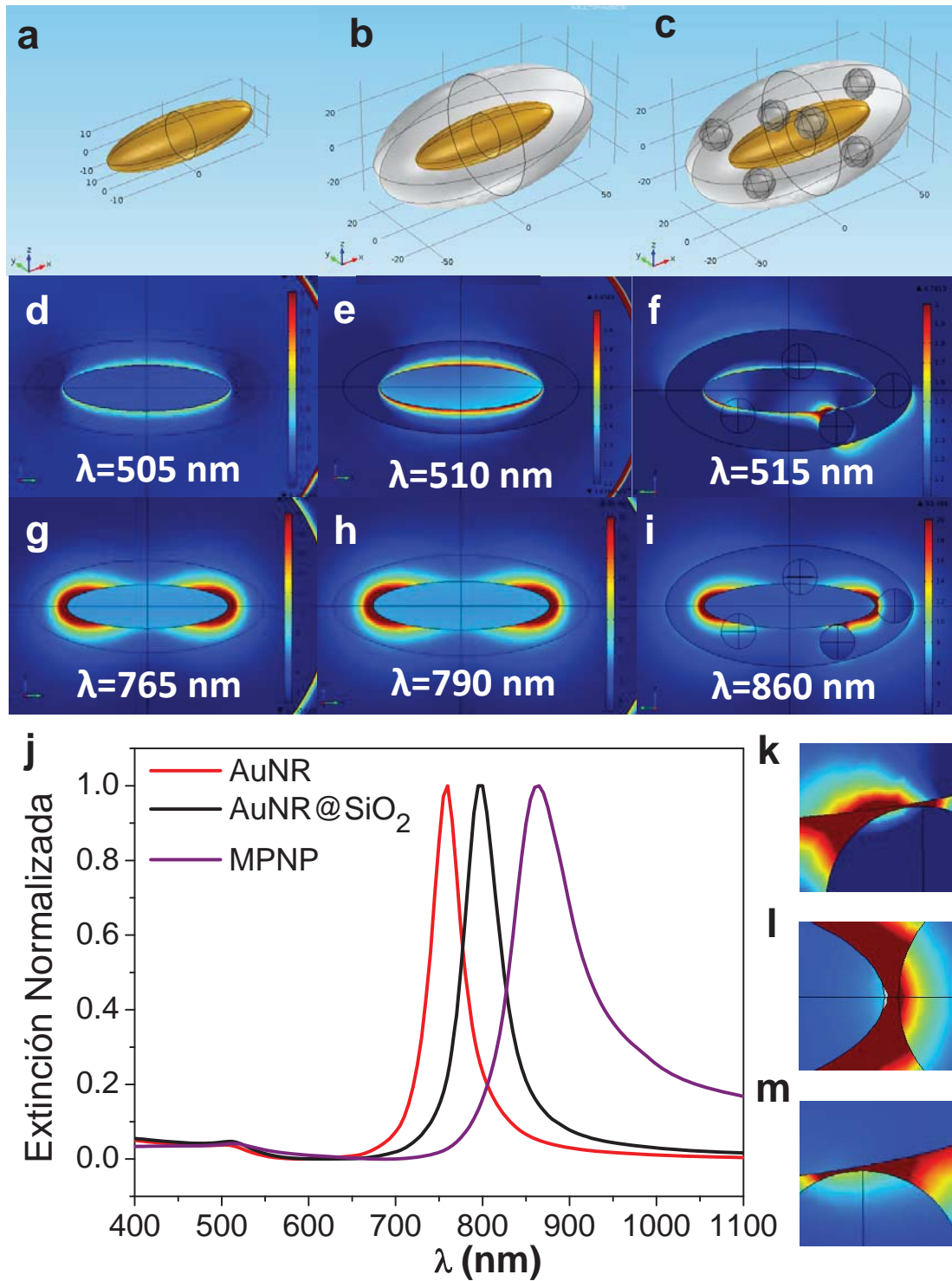
Cuando los AuNR son recubiertos con sílice, el patrón sigue siendo el propio de una emisión dipolar. Sin embargo, a causa del carácter dieléctrico del recubrimiento se

produce una polarización de la carga que se opone al campo del plasmón y que hace que este se atenúe en la interfase. Como consecuencia de esta polarización, aparece un aumento del campo eléctrico en la cara externa de la sílice que reproduce la geometría del plasmón del Au, pero con una intensidad menor.

En el caso de las NPMPH, confirmamos que la inhomogeneidad que introducen las NPM en el entorno dieléctrico del recubrimiento supone una ruptura de simetría en las oscilaciones plasmónicas de los AuNR. La presencia de las NPM en el entorno cercano de la superficie del Au intensifica el campo eléctrico de los plasmones en los intersticios que forman las dos superficies. Las [Figuras 3.22 k-m](#) permiten observar con mayor claridad las regiones en que se produce esta acumulación de campo. Estas regiones, conocidas como puntos calientes o *hot spots*<sup>170,171</sup>, resultan de gran interés en campos como los biosensores Raman<sup>172</sup>, la inducción de calor<sup>173</sup> o la imagen biomédica<sup>174</sup> y parecen estar detrás de la forma de los espectros de extinción de las NPMPH.

Según las predicciones teóricas y los trabajos experimentales, estos puntos calientes aparecen cuando la proximidad entre dos NP plasmónicas es inferior a 2.5 veces su diámetro<sup>175</sup>. En este rango de distancias, el acoplamiento de la oscilación de sus nubes electrónicas produce un desplazamiento al rojo de la resonancia y un ensanchamiento de su pico de absorción<sup>132,176</sup>, así como una pérdida de la simetría de este. En el caso de las ferritas, aunque no puedan considerarse materiales metálicos, la permitividad dieléctrica obtenida empíricamente muestra una componente compleja que permite la polarización de su carga eléctrica<sup>66</sup>.

Por tanto, el cambio en el comportamiento plasmónico de los AuNR no puede explicarse únicamente como un aumento de la constante dieléctrica del medio dieléctrico que los rodea<sup>177</sup>, sino que la polarizabilidad eléctrica de las NPM de magnetita generan acumulaciones de campo que perturban las oscilaciones plasmónicas de los AuNR y afectan a las propiedades ópticas de las NPMPH.



**Figura 3.22.** Geometrías empleadas en los estudios de simulación por FEM de las excitaciones plasmónicas de: (a) AuNR, (b) AuNR@SiO<sub>2</sub> y (c) MPNP. Distribución del campo eléctrico de plasmón transversal (d,e,f) y longitudinal (g,h,i) de las geometrías (a,b,c) respectivamente. (j) Espectros de extinción teóricos obtenidos a partir de simulaciones por FEM. (k,l,m) Acumulaciones de campo cercano en los espaciados nanométricos observadas en la simulación de la NPMPH.

Para estudiar cómo afecta esta asimetría a las propiedades ópticas de los NPMPH, se calcularon los espectros de extinción asociados a cada una de las estructuras simuladas, tal y como se muestran en la [Figura 3.22j](#). En ellos observamos que la resonancia del plasmón longitudinal sufre un desplazamiento que va desde los 760 nm para los AuNR hasta los 865 nm para las NPMPH. El plasmón transversal sufre también un desplazamiento hacia el rojo pero de mucha menor intensidad. Además, observamos cómo a medida que la resonancia se desplaza a longitudes de onda mayores los picos de extinción se van ensanchando. Concretamente, si comparamos la anchura a media altura del pico de extinción en el IR de los Au@SiO<sub>2</sub> y las NPMPH encontramos una proporción de 1,8 similar a la que se observa en los espectros experimentales. Además, se observa que el pico de absorción calculado para las NPMPH deja de ser simétrico y adquiere una cola de absorción para longitudes de onda superiores que se asemeja al observado en la [Figura 3.21](#).

Al tratarse de un estudio sobre una única NP los picos de extinción obtenidos resultan mucho más estrechos que los observados experimentalmente. No obstante, la coincidencia en el desplazamiento, el ensanchamiento y la asimetría de los picos, permiten señalar a la interacción plasmónica entre los AuNR y las NPM como el origen del comportamiento óptico observado para las NPMPH.

### **3.3.6 Estudio de la respuesta magnética de las NPM y las NPMPH**

El uso de diferentes ferritas permite modificar las propiedades magnéticas de las nanoestructuras híbridas como su imanación, su coercitividad o su anisotropía, mediante el ajuste de su composición y tamaño. Por este motivo se estudió la respuesta magnética de cada una de las NPM sintetizadas y se analizó cómo esta respuesta se ve modificada cuando pasan a formar parte de la NPMPH.

#### **3.3.6.a Respuesta magnética de las NPM**

La [Figura 3.23](#) muestra los ciclos de histéresis M-H de las NPM de óxido de Fe (negro) y las ferritas de Mn (azul), Co (rojo) y Ni (verde), medidas en forma de polvo. En ellos se observa que la imanación ( $M_S$ ) y el campo coercitivo ( $H_C$ ) de los ciclos se modifican al sustituir los iones de Fe de la red cristalina por otros elementos del grupo 3d con diferentes magnetones de Bohr e interacciones de canje<sup>178,179</sup>.

En los ciclos medidos a 10K observamos que la imanación de las NPM sigue una progresión similar a la que se observa en sus materiales masivos:  $M_S(\text{MgFe}_2\text{O}_4) > M_S(\text{Fe}_3\text{O}_4) > M_S(\text{CoFe}_2\text{O}_4) > M_S(\text{NiFe}_2\text{O}_4)$ <sup>178</sup>. En cambio al analizar los ciclos a temperatura ambiente, este orden se ve alterado por la pérdida de imanación de las NP de menor tamaño ( $\text{MgFe}_2\text{O}_4$  y  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), como se muestra en la [Tabla 3.2](#). En las NPM, los espines de superficie sufren un desalineamiento que aumenta a medida que se eleva la temperatura, lo que se traduce en una pérdida de la imanación total de la NPM<sup>180</sup>. La relevancia de los espines de superficie aumenta cuanto menor es el tamaño de las NPM, lo que supone una pérdida de imanación mayor.

Las [Figuras 3.23 c y d](#) muestran la zona central de los ciclos y permiten observar que, aunque todas las ferritas presente una baja remanencia por su carácter superparamagnético, los diferentes valores de anisotropía y tamaño medio de las ferritas producen variaciones en los valores de  $H_C$  y susceptibilidad ( $\chi$ ) del ciclo.

La ferrita de Mn por ejemplo, al tratarse de un material magnéticamente blando ( $K_{1\text{Bulk}} = -3 \text{ KJ/m}^3$ ), el valor de su  $H_C$  a temperatura ambiente se encuentra dentro del error experimental de la medida. Esta baja anisotropía hace que su respuesta magnética frente al campo aplicado sea alta y su  $\chi$  sea superior a la del resto de ferritas. Observamos que a campos bajos (100-300Oe), esta ferrita es la que mayor valor de la imanación alcanza, lo que resulta de gran utilidad en aplicaciones biomédicas en las que los campos aplicados son de baja intensidad como son la hipertermia o la acumulación magnética.

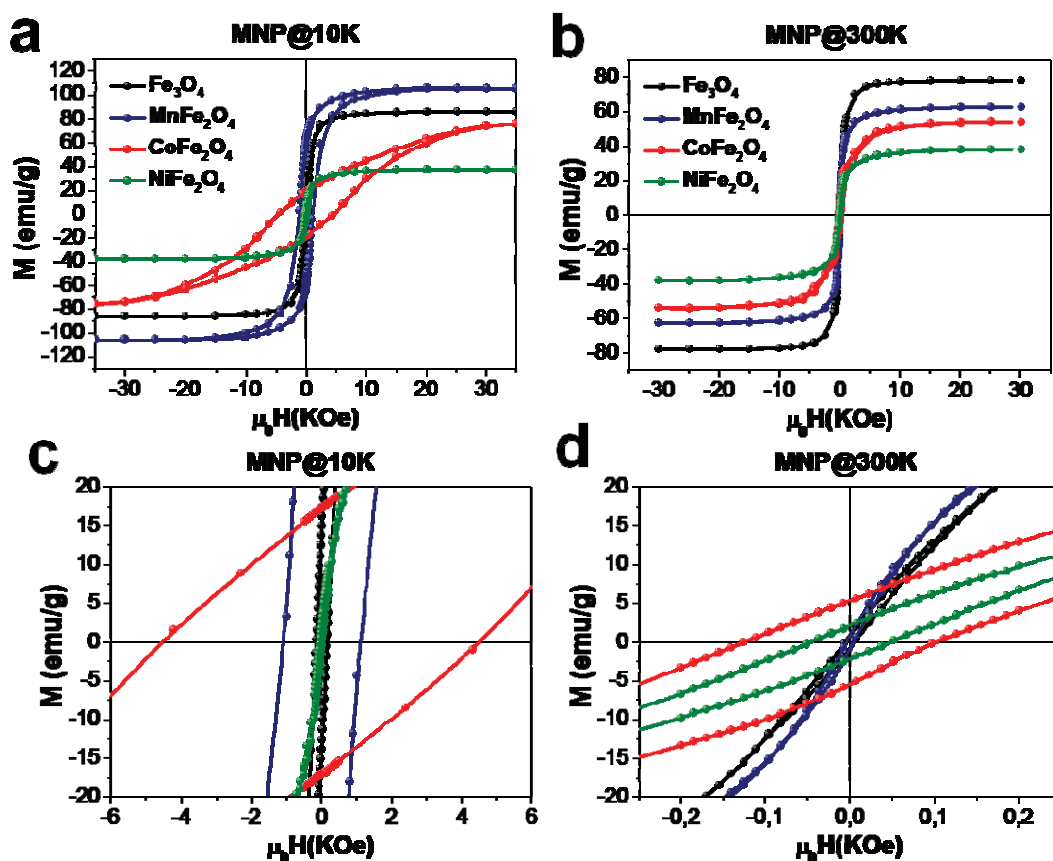


Figura 3.23 Ciclos de histéresis M-H de diferentes ferritas a 10 K y a 300 K: Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en negro, MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en azul, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en rojo y NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> en verde.

Las NP de óxido de Fe, son las que mayor valor de  $M_S$  presentan, 76 emu/g. Sin embargo, a campos bajos ( $< 300$  Oe) su  $\chi$  resulta menor al de la ferrita de Mn. Por este motivo, la idoneidad de estas partículas dependerá en gran medida de los campos a los que sean expuestas. El  $H_C$  de la muestra sigue pudiendo considerarse nula aunque su valor resulte ligeramente superior.

En el caso la ferrita de Ni, a pesar de tener valores de anisotropía magnetocristalina similares a la magnetita, los ciclos M-H aparecen abiertos y su coercitividad no debe ser despreciada (Tabla 3.2). El mayor tamaño medio de la ferrita de Ni supone que el valor de la energía de anisotropía ( $K_V V$ ) sea mayor y la muestra no se encuentre desbloqueada a temperatura ambiente. Su bajo valor de  $M_S$  supone que la imanación de las ferritas de Ni resulte la mitad que la de la magnetita a campos bajos.

La ferrita de Co es la más dura de los materiales magnéticos estudiados, con valores de anisotropía magnetocristalina un orden de magnitud por encima del resto. Esto hace que aunque el tamaño de las NP sea relativamente pequeño, el  $H_C$  de su ciclo de histéresis

siga siendo considerable a temperatura ambiente. La ferrita de Co, debido a su alta anisotropía, es la que más alejada se encuentra del estado superparamagnético. Al igual que en el caso de la ferrita de Ni, su bajo valor de magnetización le confiere un valor de  $\chi$  pequeño.

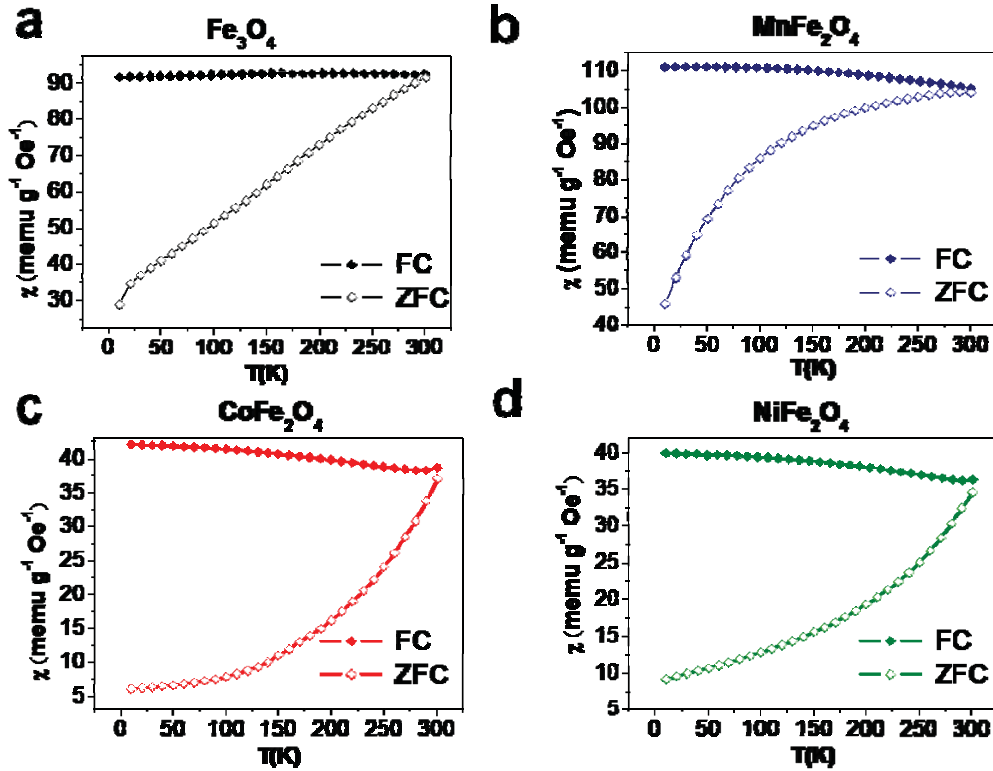


Figura 3.24. Curvas de susceptibilidad ZFC y FC de las diferentes ferritas:  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en negro,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  en azul,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  en rojo y  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  en verde.

A partir de las curvas ZFCFC se puede obtener información sobre la evolución de la  $\chi$  con la temperatura y sobre la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) de las diferentes muestras. La [Figura 3.24](#) muestra las curvas obtenidas para cada ferrita según el código de colores utilizado en los ciclos de histéresis M-H. En ellas observamos como la susceptibilidad FC ( $\chi_{FC}$ ) decae de en torno a un 5% cuando se pasa de 10K a 300K, salvo en el caso de la magnetita en que apenas se registró variación. Esto concuerda con la variación observada en la imanación de saturación de los ciclos M-H.

Se observa además que las curvas de ZFC y FC se aproximan entre sí a temperatura ambiente lo que confirma la proximidad a la transición al estado superparamagnético. La [Tabla 3.2](#) recoge las diferentes temperaturas de máxima susceptibilidad de la curva ZFC ( $T_{ZFC, \text{máx}}$ ) y la temperatura a la cual las curvas de ZFCFC coinciden, conocida como temperatura de irreversibilidad ( $T_{\text{irr}}$ ).

	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	MnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	NiFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
M <sub>S</sub> (emu/g)	77,6	63	54	38
H <sub>C</sub> (Oe)	35	5	115	45
χ <sub>100Oe</sub> (memu g <sup>-1</sup> Oe <sup>-1</sup> )	93	105	39	36
T <sub>B,max.</sub> (K)	≤10	≤10	290	160
T <sub>ZFC,máx.</sub> (K)	300	280	>300 (340)	>300 (320)
K <sub>dist.</sub> (J/m <sup>3</sup> )	7	10	255	50
K <sub>ZFC</sub> (J/m <sup>3</sup> )	112	27	261	75
K <sub>1 bib</sub>   (kJ/m <sup>3</sup> )	13	3	290	7

**Tabla 3.2** Parámetros magnéticos de las diferentes ferritas. M<sub>S</sub>: Imanación de saturación a 300K. H<sub>C</sub>: Campo coercitivo a 300K. χ: Susceptibilidad a 300K y 100 Oe. T<sub>B</sub>: Temperatura de bloqueo. K<sub>exp</sub>: Anisotropía obtenida a partir de las curvas de ZFCFC. K<sub>1 bib</sub>: Anisotropía recogida de la referencia<sup>181</sup>.

Aunque algunos autores definen la T<sub>B</sub> de un sistema de nanopartículas a partir de la T<sub>ZFC,máx.</sub>. Lo cierto es que en una población de NP con una cierta dispersidad de tamaños, la temperatura de bloqueo no puede ser definida como un único valor sino que debe ser tratada como una distribución que depende del volumen de las NPM.

Asumiendo un único valor de anisotropía para todas las NP, esta distribución de temperaturas de bloqueo se relaciona linealmente con la distribución de tamaños de la muestra mediante la siguiente expresión<sup>182</sup>:

$$25K_B \int_0^{\infty} f(T_B)dT = K_V \int_0^{\infty} f'(V)dV \quad \text{Ecuación 3.4}$$

Donde  $f(T_B)$  y  $f'(V)$  son las distribuciones de T<sub>B</sub> y volumen de NP, respectivamente, K<sub>B</sub> es la constante de Boltzman y K<sub>V</sub> es la constante de anisotropía magneto-cristalina del material. Por tanto, si somos capaces de conocer la distribución de T<sub>B</sub> del sistema y la distribución de volúmenes de las NPM, es posible calcular de forma indirecta la constante de anisotropía propia del sistema.

Para obtener la distribución de temperaturas de bloqueo de manera experimental, basta con calcular la diferencia entre las curvas de susceptibilidad ZFC-FC y derivar por la temperatura según muestra la [Ecuación 3.5](#)<sup>182</sup>:

$$f(T_B(T)) \propto \frac{d(\chi_{ZFC}(T) - \chi_{FC}(T))}{dT} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

En la [Figura 3.25](#) se muestran los valores que toma esta distribución en cada una de las ferritas sintetizadas. Las distribuciones mostradas fueron ajustadas mediante una distribución log-normal y comparadas con la distribución de tamaños observados por TEM para calcular el parámetro lineal que las relaciona. Los valores de anisotropía magnética ( $K_{\text{dist}}$ ) obtenidos al ajustar estas dos distribuciones mediante la [Ecuación 3.4](#) se muestran en la [Tabla 3.2](#). Para que esta relación resulte más intuitiva, en el eje superior de la gráfica se muestran los tamaños de cristal correspondientes a cada  $T_B$  según la anisotropía calculada para cada ferrita. Se observa que a medida que aumenta la anisotropía del material, el valor máximo de la distribución de  $T_B$  se desplaza, alcanzando valores superiores a la temperatura ambiente para la ferrita de Co.

A modo de comparativa, se calculó el valor de la constante de anisotropía asumiendo como  $T_B$  el valor de  $T_{ZFC, \text{máx}}$  ( $K_{ZFC}$ ) y calculando el volumen a partir del tamaño medio de las distribuciones obtenidas para cada ferrita ( $R = \langle D \rangle / 2$ ). Esto permite deducir una función simplificada de la [Ecuación 3.4](#), como la que se muestra en la [Ecuación 3.6](#):

$$K_V = \frac{75 K_B T_B}{4 \pi R^3} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

Atendiendo a la [Tabla 3.2](#), podemos comparar los valores de anisotropía magnetocrystalina estimados a partir de las distribuciones ( $K_{\text{dist}}$ ) y los calculados a partir de la  $T_{ZFC, \text{máx}}$  ( $K_{ZFC}$ ), con los valores reportados para los materiales masivos. Observamos que al tener en cuenta la distribución de temperaturas de bloqueo obtenemos valores de la anisotropía más próximos a los valores medidos en materiales masivos. A pesar de ello, los valores de anisotropía calculados siguen estando por encima de los que aparecen reportados en la bibliografía<sup>181</sup>.

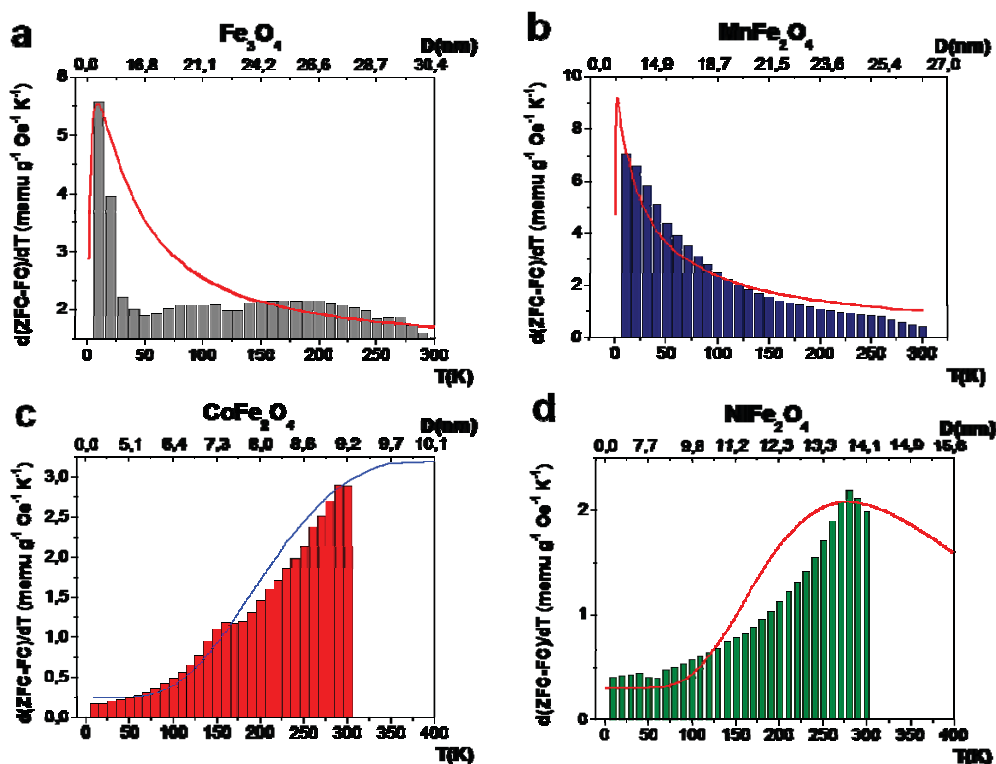


Figura 3.25 Distribución de  $T_B$  calculadas a partir de las curvas de las susceptibilidades ZFCFC de la [Figura 3.24](#) y la [Ecuación 3.4](#).

La falta de estequiometría de las ferritas o la anisotropía de forma asociada a la no esfericidad de las NP podrían explicar esta contribución extra a la anisotropía<sup>183</sup>. Pero como analizaremos en la siguiente sección, las interacciones dipolares que aparecen al caracterizar la muestra en forma de polvo introducen una fuerte contribución a las barreras de anisotropía que se traduce en un desplazamiento de las  $T_B$ <sup>184</sup>.

### 3.3.6.b Efectos de la hibridación sobre la respuesta magnética de las NPM

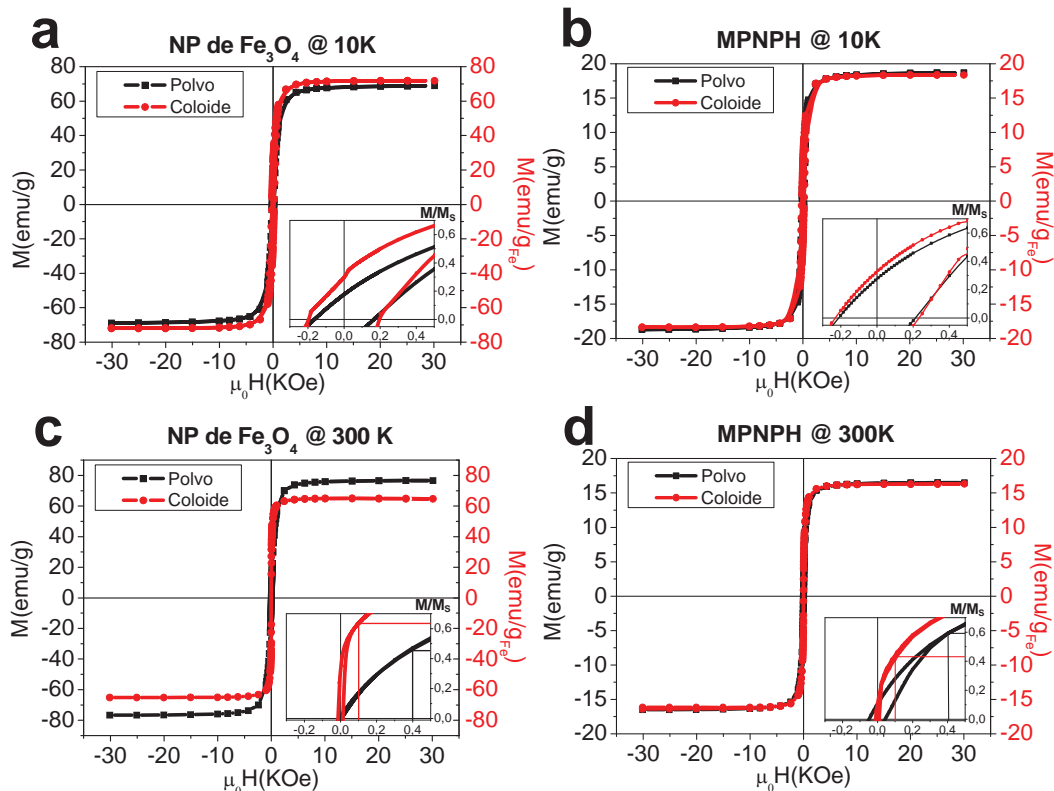
La proximidad entre las NPM que forman las NPMPH y el bloqueo de su rotación por parte de la matriz de sílice suponen un cambio drástico en las propiedades magnéticas de los sistemas híbridos. Para analizar los efectos del proceso de hibridación sobre su respuesta magnética se escogieron las NPM de óxido de Fe por la alta  $M_S$  a temperatura ambiente y por tratarse de un sistema más estandarizado a nivel bibliográfico.

El comportamiento magnético de estos sistemas fue evaluado comparando la respuesta magnética de las NPM y las NPMPH cuando son preparadas en estado sólido (polvo) y cuando son dispersadas en medio acuoso (coloide) con una concentración de 2 g/L. Las medidas magnéticas en estado coloidal permiten, por una parte aumentar la distancia

entre NP reduciendo así el efecto de las interacciones dipolares entre partículas, y por otra discernir la contribución Browniana a la susceptibilidad magnética de las mismas.

En las [Figuras 3.26a](#) y [3.26c](#) se muestra los ciclos de histéresis M-H de las NPM medidos a 10K y 300 K, respectivamente. Para estimar la imanación de las muestras coloidales se dividió el momento magnético de la muestra por el contenido de Fe obtenido por ICP-OES, como se muestra en el eje derecho de los ciclos. En el recuadro inferior derecho, se muestra la zona central de los ciclos una vez normalizados a su  $M_s$ .

Encontramos que cuando las NPM se encuentran a baja temperatura, y la fase líquida del coloide está congelada, los  $H_C$  de la muestra en polvo y en coloide pueden considerarse iguales. Sin embargo, la  $\chi$  y la remanencia del sistema disminuyen cuando la muestra es medida en polvo. Al calentar las muestras hasta la temperatura ambiente, las NPM transitan a un estado superparamagnético en el que el  $H_C$  del sistema se hace despreciable (5 Oe). En el caso de la muestra coloidal se produce un drástico crecimiento de la  $\chi$  a temperatura ambiente.



**Figura 3.26.** Comparativa de los ciclos de histéresis M-H en forma de polvo (negro) y en forma de coloide (rojo) de: (a) las NP de  $Fe_3O_4$  a 10K, (b) NPMPH de  $Fe_3O_4$  a 10K, (c) NP de  $Fe_3O_4$  a 300K y (d) NPMPH de  $Fe_3O_4$  a 300K.

Comparando estos ciclos con los obtenidos para las NPMPH de las [Figuras 3.26b](#) y [3.26d](#), se aprecia de forma inmediata una bajada en la  $M_S$  de 76 emu/g a 19 emu/g. El menor porcentaje de material magnético presente en la muestra explica esta bajada del momento magnético por unidad de masa<sup>185</sup>. Pero más allá de esta reducción de  $M_S$ , encontramos que la hibridación de las NPM con los AuNR modifica el comportamiento magnético de estas.

En el caso de las NPMPH, los ciclos medidos a baja temperatura no presentan diferencias significativas entre la muestra en polvo y en coloide. En cambio, a temperatura ambiente, la  $\chi$  y el  $H_C$  de la muestra dependen fuertemente del método de preparación. Las NPMPH en estado coloidal, muestran una alta  $\chi$  y un  $H_C$  despreciable, mientras que la  $\chi$  de la muestra en polvo no varía al subir la temperatura y su  $H_C$  se reduce hasta los 50 Oe aunque no llega a cancelarse completamente.

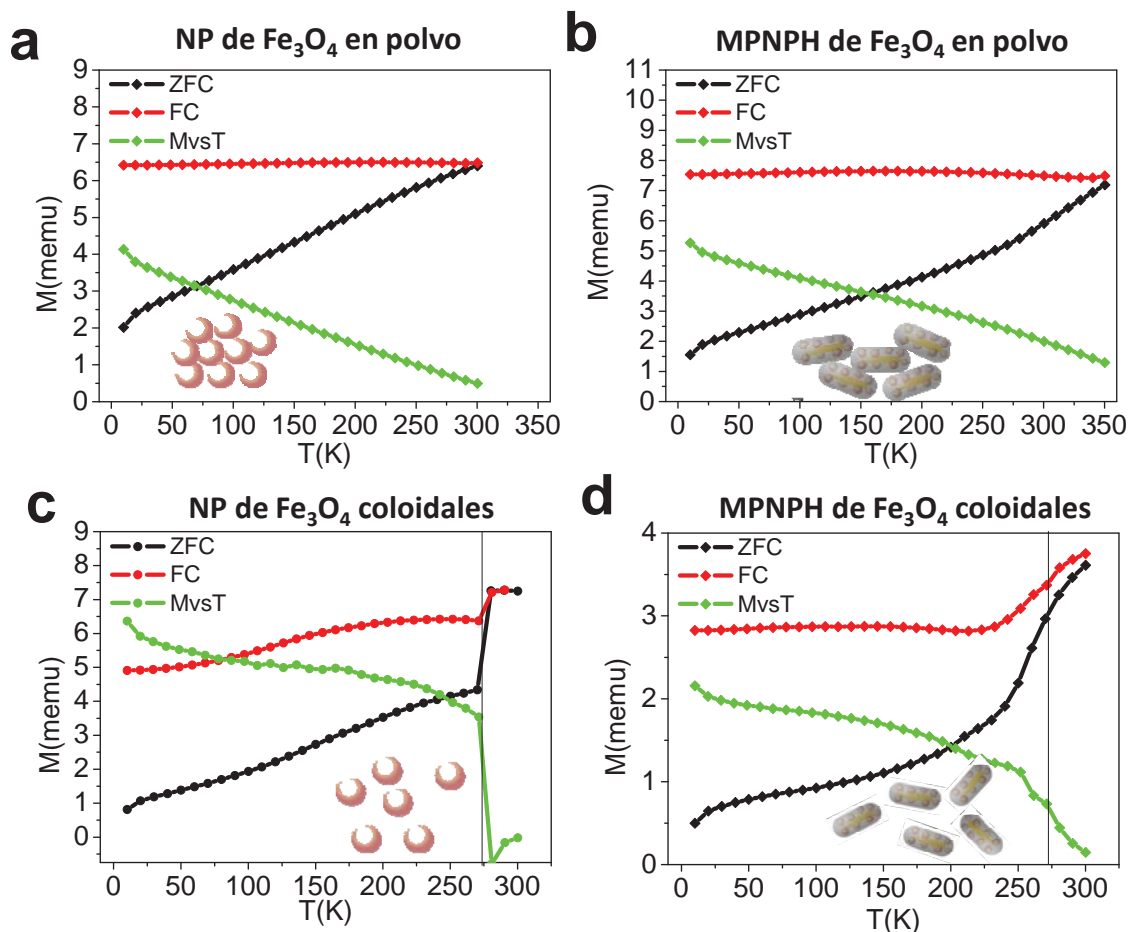
Si comparamos los ciclos normalizados de las NPM y las NPMPH a temperatura ambiente (recuadros de las [Figuras 3.26c](#) y [3.26d](#)), encontramos diferencias en la  $\chi$  que resulta interesante analizar en detalle. Para las muestras medidas en forma de coloide observamos que las NPM alcanzan el 63 % de su  $M_S$  a los 100 Oe (0,1kOe), mientras que la imanación de las NPMPH a este mismo campo solo es el 42% de su  $M_S$ . En cambio, al medir estas muestras en polvo comprobamos que una vez cerrado el ciclo (0,4kOe), las NPM alcanzan el 46% de su  $M_S$  y las NPMPH llegan hasta el 60%.

Para entender mejor las diferencias en la susceptibilidad de cada uno de los sistemas, se midieron sus curvas de susceptibilidad ZFC-FC y sus curvas de termoremanencia ([Figura 3.27](#)).

Como ya se indicó en la sección anterior, las NPM de  $Fe_3O_4$  medidas en polvo se encuentran totalmente desbloqueadas a temperatura ambiente. Por este motivo, a 300K las curvas ZFCFC de la [Figura 3.27a](#) coinciden, y la curva de termoremanencia muestra valores próximos a 0. En cambio las NPMPH en polvo de la [Figura 3.27b](#) no llegan a estar desbloqueadas a temperatura ambiente. Esto explica los valores de remanencia y coercitividad observados en los ciclos M-H. Fue necesario elevar la temperatura hasta los 350K para alcanzar la  $T_{ZFC,máx}$  del sistema.

Estas tendencias se modifican cuando las muestras son medidas en forma de coloide. Si nos fijamos en las susceptibilidades ZFC y FC de las NPM, vemos que crecen en todo el rango de temperaturas y que a 273K (temperatura de fusión del agua), este crecimiento presenta un salto en ambos casos. La remanencia de este sistema, sigue un proceso inverso. Decece lentamente hasta los 273K y cae a valores nulos, e incluso negativos.

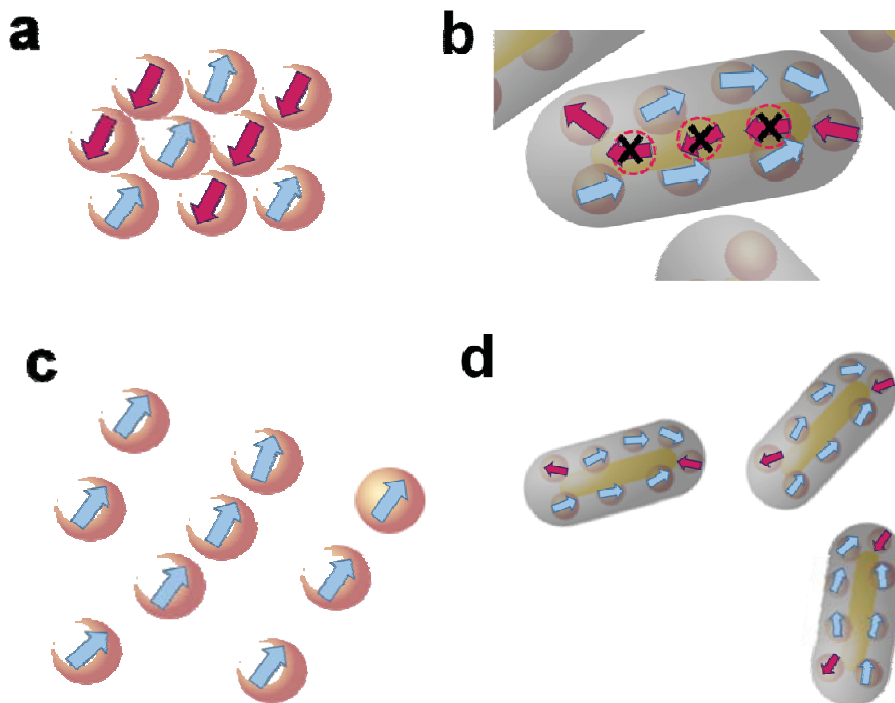
En las NPMPH observamos una tendencia similar pero con una evolución menos drástica. Las curvas ZFC-FC a bajas temperaturas resultan similares a las medidas sobre polvo, pero a medida que se acerca a los 273K empieza a crecer suavemente para terminar coincidiendo a temperatura ambiente. Del mismo modo, la remanencia del sistema cambia su ritmo de caída en los 250K y alcanza valores despreciables a temperatura ambiente.



**Figura 3.27.** Curvas de susceptibilidad ZFC/FC de las NP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y las MPNP de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en forma de polvo (a y b, respectivamente) y en suspensión coloidal (c y d, respectivamente).

Para explicar los fenómenos observados lo primero que se debe tener en cuenta es que por encima de los 273K, el medio en que se encuentran dispersas las NP se descongela, lo que les confiere un grado de libertad extra para relajarse por rotación Browniana. Esto les permite alinearse con el campo aplicado y se elimina la coercitividad de estos sistemas a temperatura ambiente. La diferencia entre el escalón observado en las NPM y el crecimiento suave de las NPMPH, puede explicarse fácilmente al tener en cuenta sus tamaños hidrodinámicos. Mientras que  $D_H$  de las NPM no superan los 50 nm, las NPMPH alcanzan valores de  $D_H \sim 260$  nm, esto supone que las primeras requieren menores temperaturas para llevar a cabo procesos de relajación por rotación y puedan seguir al campo aplicado de manera más eficiente.

Sin embargo para explicar el aumento de la  $T_B$  de las NPMPH cuando son medidas en polvo y su mayor  $\chi$  en los ciclos M-H, debe tenerse en cuenta tanto las interacciones dipolares que tiene lugar entre partículas independientes como las que ocurren en el interior de las NPMPH. La [Figura 3.28](#) muestra un esquema de la disposición energéticamente favorable para los momentos magnéticos de las NP cuando son preparadas en forma de polvo y de coloide.



**Figura 3.28** Esquema del ensamblado de momentos dipolares en: (a) NPM medidas en forma de polvo, (b) NPMPH medidas en forma de polvo, (c) NPM medidas en forma de coloide y (d) NPMPH medidas en forma de coloide.

Como se explicó en el capítulo de introducción, cuando las NPM forman estructuras compactas ([Figura 3.28a](#)), la disposición de momentos magnéticos más favorable es el alineamiento antiparalelo<sup>186</sup>. Este tipo de ensamblados tienden a reducir la coercitividad del sistema y reducir su susceptibilidad<sup>187,188</sup>. En cambio si las NPM se encuentran distantes unas de otras y son libres de alinearse en presencia de un campo externo ([Figura 3.28c](#)), las interacciones dipolares hacen que estas tiendan a formar cadenas<sup>189</sup> y disponer sus momentos en forma de cola-punta<sup>188,190,191</sup>. En esta disposición, los procesos de magnetización se ven potenciados por las interacciones y el sistema presenta un mayor valor de la  $\chi$  y  $H_C$ <sup>187,188</sup>.

En el caso de las NPMPH, aparecen dos diferencias significativas respecto a los sistemas de NPM. Por un lado, la presencia de los AuNR, evita posiciones de alineamiento antiparalelo dentro de la NPMPH ([Figura 3.28b](#)), lo que favorece su alineamiento cola-punta. Aunque no puede descartarse un alineamiento en forma de anillo cerrado, la falta de esfericidad de los AuNR y la distribución aleatoria de las NPM en torno a ellos, impide el cierre suave de las líneas de campo.

Por otra parte, el recubrimiento de sílice aumenta la distancia entre NPM pertenecientes a NPMPH diferentes. Esto provoca que las interacciones “inter-particulares” se vean atenuadas y sean las interacciones “intra-particulares” las que adquieran una mayor importancia en la respuesta magnética. Cuando estas nanoestructuras se encuentran dispersas en forma de coloide ([Figura 3.28d](#)), el conjunto de NPM que forman la NPMPH tienden a comportarse como una unidad y a alinearse con el campo de manera coherente.

Si revisamos los ciclos M-H de la [Figura 3.26](#) desde este prisma podemos explicar con mayor claridad la respuesta magnética del sistema. En los ciclos M-H de las NPM, se observó una mayor susceptibilidad en la muestra preparada en forma de coloide tanto a baja temperatura como a temperatura ambiente. De acuerdo con las curvas ZFCFC, la mayor susceptibilidad a temperatura ambiente debe ser atribuida principalmente a la rotación Browniana de las NPM. Sin embargo a baja temperatura, esta rotación está bloqueada y la principal diferencia entre las dos preparaciones reside en la distancia entre NP. El aumento de esta distancia supone una caída en las interacciones dipolares. Esto permite a cada NPM seguir el campo de manera independiente y de este modo poder orientarse con mayor facilidad.

En cambio, los ciclos medidos sobre las NPMPH a baja temperatura no mostraron diferencias significativas entre la muestra en polvo y en coloide. Esta independencia de la respuesta magnética con la distancia entre NP evidencia que para las NPMPH las interacciones inter-particulares poseen menor relevancia que las interacciones intra-particulares.

A temperatura ambiente, la susceptibilidad de las NPMPH en estado coloidal crece como consecuencia de la rotación Browniana al igual que las NPM. Como ya se justificó, el aumento de la susceptibilidad resulta menor en este caso por el mayor tamaño hidrodinámico de las NPMPH. Sin embargo, para los ciclos medidos en polvo, la susceptibilidad de las NPMPH se encuentra por encima de las NPM. Cuando la componente Browniana desaparece, las interacciones punta-cola que tienen lugar en las NPMPH parecen favorecer los procesos de magnetización respecto a la disposición antiparalela predicha para las NPM en forma de polvo. Estas interacciones tienen como consecuencia un aumento en la  $\chi$  y el  $H_C$  de la muestra.

El análisis detallado de las interacciones dipolares permite también explicar el desplazamiento de la temperatura de bloqueo observado en las curvas de ZFCFC. Los modelos de campo medio, predicen que la interacción dipolar entre partículas introduce un efecto desmagnetizador que se traduce en una reducción de la susceptibilidad y la coercitividad del sistema. Según los modelos de campo medio, la coercitividad de un sistema de dipolos magnéticos interactuantes debería decrecer al aumentar el factor de empaquetamiento ( $p$ ), es decir, según se reduce la distancia entre ellos ([Ecuación 3.8](#)).

$$H_C(p) = H_C(0)(1 - p) \quad \text{Ecuación 3.8}$$

Sin embargo, existen evidencias experimentales de que la tendencia puede ser la contraria en determinadas condiciones<sup>192,193</sup>. Cuando se emplean métodos numéricos en los que se tiene en cuenta la disposición de los agregados de NPM, se observa que las disposiciones punta-cola de los momentos dipolares aumentan la remanencia y la coercitividad del sistema<sup>187,188,194</sup>.

A partir de estos modelos, la diferencia observada en la coercitividad de los ciclos de las NPM y las NPMPH a temperatura ambiente puede ser explicada por el ensamblado de los momentos dipolares en cada caso. El aumento de la coercitividad del sistema en los

ensamblados de NPM se puede traducir en un aumento de la temperatura de bloqueo del sistema de hasta 50K<sup>195</sup>, similar a la que se observó en las curvas de ZFCFC.

Por tanto, podemos concluir que tanto los procesos de relajación Browniana como las interacciones dipolares entre partículas juegan un papel fundamental en la respuesta magnética de los sistemas estudiados. Esto hace que a la hora de introducir estas NP en sistemas biológicos, ambas consideraciones deban ser tenidas en cuenta. Por último, cabe mencionar que la presencia de la interfase de sílice entre los componentes de las NPMPH ha permitido descartar interacciones magnéticas como el canje<sup>196,197</sup>, la interacción RKKY<sup>198</sup> u otras más exóticas<sup>166</sup> que requieren una intercara común entre las fases y de esta forma simplificar los análisis.

### **3.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO**

En este capítulo se ha abordado la síntesis de las NPMPH híbridas sobre las que se centra este trabajo de tesis, realizando una profunda caracterización estructural y magnetoplasmónica de las mismas.

Para producir estas NPMPH se ha desarrollado un nuevo método de síntesis basado en el autoensamblado de los componentes magnético y plasmónico a través de la polimerización de los grupos funcionales de su superficie en un proceso de silanización simultáneo basado en el método de Stöber.

La optimización de los parámetros de síntesis ha permitido producir nanoestructuras magnetoplasmónicas coloidales con un tamaño y una geometría controlados. Las imágenes por STEM-EELS muestran que las nanoestructuras sintetizadas adquieren un ordenamiento tipo núcleo-satélites con un AuNR en el centro rodeado por una matriz de sílice donde se insertan las NPM.

Se ha observado que la interacción de los plasmones superficiales del AuNR con las NPM que lo rodean produce un desplazamiento de la resonancia plasmónica longitudinal hacia el IR y un ensanchamiento asimétrico del pico de absorción. De acuerdo con las simulaciones por FEM llevadas a cabo, la proximidad entre los AuNR y las NPM genera regiones con una alta concentración del campo eléctrico en los intersticios de estas dos fases conocidos como puntos calientes. Estos puntos calientes resultarán de gran importancia a la hora de utilizar estas NPMPH en aplicaciones biomédicas.

Por último, se ha observado un cambio significativo de la respuesta de las NPM cuando pasan a formar parte de las NPMPH. De la caracterización magnética llevada a cabo se desprende la enorme importancia que tienen los procesos de relajación Browniana y las interacciones dipolares en la respuesta magnética de las NPMPH.

### 3.5 REFERENCIAS

1. Ordal, M. A. *et al.* Optical properties of the metals Al, Co, Cu, Au, Fe, Pb, Ni, Pd, Pt, Ag, Ti, and W in the infrared and far infrared. *Appl. Opt.* **22**, 1099 (1983).
2. Chen, J. *et al.* Plasmonic nickel nanoantennas. *Small* **7**, 2341–2347 (2011).
3. Melle, S. *et al.* Magneto-optical properties of nickel nanowire arrays. *Appl. Phys. Lett.* **83**, 4547–4549 (2003).
4. Vasquez, Y., Sra, A. K. & Schaak, R. E. One-pot synthesis of hollow superparamagnetic CoPt nanospheres. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12504–12505 (2005).
5. Amendola, V. *et al.* Magneto-plasmonic Au-Fe alloy nanoparticles designed for multimodal SERS-MRI-CT imaging. *Small* **10**, 2476–2486 (2014).
6. Van Schooneveld, M. M. *et al.* Transition-metal nanoparticle oxidation in a chemically nonhomogenous environment revealed by 2p3d resonant X-ray emission. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 1161–1166 (2013).
7. Sanvicens, N. & Marco, M. P. Multifunctional nanoparticles - properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* **26**, 425–433 (2008).
8. Crespo, P. *et al.* Permanent magnetism, magnetic anisotropy, and hysteresis of thiol-capped gold nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 87204 (2004).
9. Guerrero, E. *et al.* Surface plasmon resonance and magnetism of thiol-capped gold nanoparticles. *Nanotechnology* **19**, 175701 (2008).
10. Yu, H. *et al.* Dumbbell-like Bifunctional Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *Nano Lett.* **5**, 379–382 (2005).
11. Zhang, L., Dou, Y. H. & Gu, H. C. Synthesis of Ag-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> heterodimeric nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **297**, 660–664 (2006).
12. Lu, Q. H. *et al.* Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores. *J. Magn. Magn. Mater.* **301**, 44–49 (2006).
13. Pellegrino, T. *et al.* Heterodimers based on CoPt<sub>3</sub>-Au nanocrystals with tunable domain size. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6690–6698 (2006).
14. Jain, P. K., Xiao, Y., Walsworth, R. & Cohen, A. E. Surface plasmon resonance enhanced magneto-optics (SuPREMO): Faraday rotation enhancement in gold-coated iron oxide nanocrystals. *Nano Lett.* **9**, 1644–1650 (2009).
15. Chandra, S. *et al.* Exchange bias effect in Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites. *Nanotechnology* **25**, 55702 (2014).
16. Lyon, J. L., Fleming, D. A., Stone, M. B., Schiffer, P. & Williams, M. E. Synthesis of Fe oxide Core/Au shell nanoparticles by iterative hydroxylamine seeding. *Nano Lett.* **4**, 719–723 (2004).
17. Maria Mikhaylova, \*,† *et al.* Superparamagnetism of Magnetite Nanoparticles: Dependence on Surface Modification. 2472–2477 (2004).
18. Spasova, M. *et al.* Magnetic and optical tunable microspheres with a magnetite/gold nanoparticle shell. *J. Mater. Chem.* **15**, 2095 (2005).

19. Lee, W. R. *et al.* Redox-transmetalation process as a generalized synthetic strategy for core-shell magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 16090–16097 (2005).
20. Zhang, J. *et al.* Laser-assisted synthesis of superparamagnetic Fe@Au core-shell nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **110**, 7122–7128 (2006).
21. Kawaguchi, K., Jaworski, J., Ishikawa, Y., Sasaki, T. & Koshizaki, N. Preparation of gold/iron-oxide composite nanoparticles by a unique laser process in water. *J. Magn. Magn. Mater.* **310**, 2369–2371 (2007).
22. Cho, S.-J., Jarrett, B. R., Louie, A. Y. & Kauzlarich, S. M. Gold-coated iron nanoparticles: a novel magnetic resonance agent for T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> weighted imaging. *Nanotechnology* **17**, 640–644 (2006).
23. Wu, W., He, Q., Chen, H., Tang, J. & Nie, L. Sonochemical synthesis, structure and magnetic properties of air-stable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au nanoparticles. *Nanotechnology* **18**, 145609 (2007).
24. Shi, W. *et al.* A general approach to binary and ternary hybrid nanocrystals. *Nano Lett.* **6**, 875–881 (2006).
25. Sun, H. *et al.* Investigating the multiple roles of polyvinylpyrrolidone for a general methodology of oxide encapsulation. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 9099–9110 (2013).
26. Wang, L. *et al.* Core@shell nanomaterials: gold-coated magnetic oxide nanoparticles. *J. Mater. Chem.* **18**, 2629 (2008).
27. Caruntu, D., Cushing, B. L., Caruntu, G. & Connor, C. J. Attachment of gold nanograins onto colloidal magnetite nanocrystals. *Chem. Mater.* **17**, 3398–3402 (2005).
28. Gole, A., Stone, J. W., Gemmill, W. R., zur Loye, H.-C. & Murphy, C. J. Iron oxide coated gold nanorods: synthesis, characterization, and magnetic manipulation. *Langmuir* **24**, 6232–6237 (2008).
29. Yang, Z., Ding, X. & Jiang, J. Facile synthesis of magnetic-plasmonic nanocomposites as T<sub>1</sub> MRI contrast enhancing and photothermal therapeutic agents. *Nano Res.* **9**, 787–799 (2016).
30. Abdulla-Al-Mamun, M., Kusumoto, Y., Zannat, T., Horie, Y. & Manaka, H. Au-ultrathin functionalized core-shell (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au) monodispersed nanocubes for a combination of magnetic/plasmonic photothermal cancer cell killing. *RSC Adv.* **3**, 7816 (2013).
31. Wang, H., Brandl, D. W., Le, F., Nordlander, P. & Halas, N. J. Nanorice: A hybrid plasmonic nanostructure. *Nano Lett.* **6**, 827–832 (2006).
32. Esenturk, E. N. & Hight Walker, A. R. Gold nanostar @ iron oxide core-shell nanostructures: Synthesis, characterization, and demonstrated surface-enhanced Raman scattering properties. *J. Nanoparticle Res.* **15**, (2013).
33. Song, H. M., Wei, Q., Ong, Q. K. & Wei, A. Plasmon-resonant nanoparticles and nanostars with magnetic cores: Synthesis and magnetomotive imaging. *ACS Nano* **4**, 5163–5173 (2010).
34. Yu, S. *et al.* Magnetic gold nanotriangles by microwave-assisted polyol synthesis. *Nanoscale* **7**, 14039–46 (2015).
35. Abbas, M., RamuluTorati, S. & Kim, C. Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au

- core/satellite nanocubes: an efficient chemical synthesis, characterization and functionalization of streptavidin protein. *Dalt. Trans.* **46**, 2303–2309 (2017).
36. Tamer, U. *et al.* Fabrication of magnetic gold nanorod particles for immunomagnetic separation and SERS application. *J. Nanoparticle Res.* **13**, 3167–3176 (2011).
  37. Ma, L. L. *et al.* Small multifunctional nanoclusters (Nanoroses) for targeted cellular imaging and therapy. *ACS Nano* **3**, 2686–2696 (2009).
  38. Li, L., Du, Y. M., Mak, K. Y., Leung, C. W. & Pong, P. W. T. Novel hybrid Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic octahedron-like nanoparticles with tunable size. *IEEE Trans. Magn.* **50**, 23–27 (2014).
  39. Zeng, B. H. & Sun, S. Syntheses, Properties, and Potential Applications of Multicomponent Magnetic Nanoparticles \*\*. **2912**, 391–400 (2008).
  40. Cortie, M. B. & Mcdonagh, A. M. Synthesis and Optical Properties of Hybrid and Alloy Plasmonic Nanoparticles. 3713–3735 (2011).
  41. Velasco, V. *et al.* Chemically synthesized Au–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanostructures with controlled optical and magnetic properties. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **48**, 35502 (2015).
  42. Pineider, F. *et al.* Spin-polarization transfer in colloidal magnetic-plasmonic au/iron oxide hetero-nanocrystals. *ACS Nano* **7**, 857–866 (2013).
  43. Schick, I. *et al.* Effect of Charge Transfer in Magnetic-Plasmonic Au@MO<sub>x</sub> (M = Mn, Fe) Heterodimers on the Kinetics of Nanocrystal Formation. *Chem. Mater.* 150624140617002 (2015). doi:10.1021/acs.chemmater.5b01968
  44. Mezni, A., Balti, I., Mlayah, A., Jouini, N. & Smiri, L. S. Hybrid Au – Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles: Plasmonic, Surface Enhanced Raman Scattering, and Phase Transition Properties. *J. Phys. Chem. C* **117**, 16166–16174 (2013).
  45. Mendez-Garza, J., Wang, B., Madeira, A., Giorgio, C. Di & Bossis, G. Synthesis and Surface Modification of Spindle-Type Magnetic Nanoparticles: Gold Coating and PEG Functionalization. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **4**, 222–228 (2013).
  46. Ravel, B., Carpenter, E. E. & Harris, V. G. Oxidation of iron in iron/gold core/shell nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **91**, 8195–8197 (2002).
  47. Zhao, X., Cai, Y., Wang, T., Shi, Y. & Jiang, G. Preparation of alkanethiolate-functionalized core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanoparticles and its interaction with several typical target molecules. *Anal. Chem.* **80**, 9091–9096 (2008).
  48. Freitas, M. *et al.* Highly Monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Superparamagnetic Nanoparticles as Reproducible Platform for Genosensing Genetically Modified Organisms. *ACS Sensors* acssensors.6b00182 (2016). doi:10.1021/acssensors.6b00182
  49. Gao, H., Liu, C., Jeong, H. E. & Yang, P. Plasmon-enhanced photocatalytic activity of iron oxide on gold nanopillars. *ACS Nano* **6**, 234–240 (2012).
  50. Yin, H., Ma, Z., Chi, M. & Dai, S. Heterostructured catalysts prepared by dispersing Au@Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> core-shell structures on supports and their performance in CO oxidation. *Catal. Today* **160**, 87–95 (2011).
  51. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chemie Int. Ed.* **46**,

- 1222–1244 (2007).
52. Sotiriou, G. A. *et al.* Hybrid, silica-coated, Janus-like plasmonic-magnetic nanoparticles. *Chem. Mater.* **23**, 1985–1992 (2011).
  53. Sotiriou, G. a. *et al.* Photothermal killing of cancer cells by the controlled plasmonic coupling of silica-coated Au/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoaggregates. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 2818–2827 (2014).
  54. Zhuravlev, L. T. The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **173**, 1–38 (2000).
  55. Chen, Z., Liang, Y., Hao, J. & Cui, Z.-M. Noncontact Synergistic Effect between Au Nanoparticles and the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Spindle Inside a Mesoporous Silica Shell as Studied by the Fenton-like Reaction. (2016). doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.6B03235
  56. Bardhan, R., Lal, S., Joshi, A. & Halas, N. J. Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer. *Acc Chem Res.* **44**, 936–946 (2011).
  57. Bardhan, R., Grady, N. K., Cole, J. R., Joshi, A. & Halas, N. J. Fluorescence Enhancement by Au Nanostructures: Nanoshells and Nanorods. *ACS Nano* **3**, 744–752 (2009).
  58. Wang, C., Chen, J., Talavage, T. & Irudayaraj, J. Gold Nanorod/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticle ‘nano-pearl- necklaces’ for simultaneous targeting, dual-mode imaging, and photothermal ablation of cancer cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 2759–2763 (2009).
  59. Hu, X. *et al.* Trapping and photoacoustic detection of CTCs at the single cell per milliliter level with magneto-optical coupled nanoparticles. *Small* **9**, 2046–2052 (2013).
  60. Leung, K. C.-F. *et al.* Gold and iron oxide hybrid nanocomposite materials. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1911 (2012).
  61. Huang, L. *et al.* Magneto-Plasmonic Nanocapsules for Multimodal-Imaging and Magnetically Guided Combination Cancer Therapy. *Chem. Mater.* **28**, 5896–5904 (2016).
  62. Stöber, W., Fink, A. & Bohn, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *J. Colloid Interface Sci.* **26**, 62–69 (1968).
  63. Campero, A., Cardoso, J. & Pacheco, S. Ethylene Glycol-Citric Acid-Silica Hybrid Organic-Inorganic Materials Obtained by the Sol-Gel Method. **539**, 535–539 (1997).
  64. Leite, E. R. *et al.* Development of metal-SiO<sub>2</sub> nanocomposites in a single-step process by the polymerizable complex method. *Chem. Mater.* **14**, 3722–3729 (2002).
  65. Leite, E. R., Souza, F. L., Bueno, P. R., de Lazaro, S. & Longo, E. Hybrid Organic–Inorganic Polymer: A New Approach for the Development of Decoupled Polymer Electrolytes. *Chem. Mater.* **17**, 4561–4563 (2005).
  66. Zhang, X. F., Clime, L., Ly, H. Q., Trudeau, M. & Veres, T. Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au/Porous Silica@Fluorescein Core/Shell Nanoparticles with Enhanced Fluorescence Quantum Yield. *J. Phys. Chem. C* **114**, 18313–18317 (2010).

67. Wu, B., Tang, S., Chen, M. & Zheng, N. Amphiphilic modification and asymmetric silica encapsulation of hydrophobic Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dumbbell nanoparticles. *Chem. Commun.* **50**, 174–176 (2014).
68. Keivani, S. N. A., Naderi, M. & Amoabediny, G. Superparamagnetic plasmonic nanocomposites: Synthesis and characterization studies. *Chem. Eng. J.* **264**, 66–76 (2015).
69. Salgueiriño-Maceira, V. *et al.* Bifunctional gold-coated magnetic silica spheres. *Chem. Mater.* **18**, 2701–2706 (2006).
70. He, X. *et al.* Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au@mesoporous SiO<sub>2</sub> microspheres: an ideal artificial enzymatic cascade system. *Chem. Commun.* **49**, 4643 (2013).
71. Hu, Y. & Sun, Y. Stable magnetic hot spots for simultaneous concentration and ultrasensitive surface-enhanced Raman scattering detection of solution analytes. *J. Phys. Chem. C* **116**, 13329–13335 (2012).
72. Ge, J., Zhang, Q., Zhang, T. & Yin, Y. Core-Satellite Nanocomposite Catalysts Protected by a Porous Silica Shell: Controllable Reactivity, High Stability, and Magnetic Recyclability. *Angew. Chemie Int. Ed.* **47**, 8924–8928 (2008).
73. Savka I. Stoeva, Fengwei Huo, Jae-Seung Lee, and & Mirkin\*, C. A. Three-Layer Composite Magnetic Nanoparticle Probes for DNA. (2005). doi:10.1021/JA055056D
74. Wang, X. *et al.* Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@P(St/MAA)@Chitosan@Au Core/Shell Nanoparticles for Dual Imaging and Photothermal Therapy. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **5**, 4966–4971 (2013).
75. Chen, F. *et al.* Multifunctional nanocomposites constructed from Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au nanoparticle cores and a porous silica shell in the solution phase. *Dalt. Trans.* **40**, 10857 (2011).
76. Bardhan, R. *et al.* Nanoshells with Targeted Simultaneous Enhancement of Magnetic and Optical Imaging and Photothermal Therapeutic Response. *Adv. Funct. Mater.* **19**, 3901–3909 (2009).
77. Fang, C.-L. *et al.* Monodisperse α-Fe(2)O(3)@SiO(2)@Au core/shell nanocomposite spheres: synthesis, characterization and properties. *Nanotechnology* **19**, 125601 (2008).
78. Xu, X. & Cortie, M. B. Precious metal core-shell spindles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 18135–18142 (2007).
79. Ma, M. *et al.* Au capped magnetic core/mesoporous silica shell nanoparticles for combined photothermo-/chemo-therapy and multimodal imaging. *Biomaterials* **33**, 989–998 (2012).
80. Xuan, S. *et al.* Hierarchical core/shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@γ-AlOOH@Au micro/nanoflowers for protein immobilization. *Chem. Commun.* **47**, 2514 (2011).
81. Li, W. P., Liao, P. Y., Su, C. H. & Yeh, C. S. Formation of oligonucleotide-gated silica shell-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au core-shell nanotrisoctahedra for magnetically targeted and near-infrared light-responsive theranostic platform. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 10062–10075 (2014).
82. Wang, D.-W. *et al.* Folate-conjugated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@gold nanorods@mesoporous SiO<sub>2</sub> hybrid nanomaterial: a theranostic agent for magnetic resonance imaging and photothermal therapy. *J. Mater. Chem. B* **1**,

- 2934 (2013).
83. Pallavicini, P. *et al.* Silane-coated magnetic nanoparticles with surface thiol functions for conjugation with gold nanostars. *Dalt. Trans.* **44**, 21088–21098 (2015).
  84. BOGUSH, G. H., TRACY, M. A. & ZUKOSKI IV, C. F. Preparation of monodisperse silica particles: Control of size and mass fraction. *J. Non. Cryst. Solids* **104**, 95–106 (1988).
  85. Roca, a G. *et al.* Surface functionalization for tailoring the aggregation and magnetic behaviour of silica-coated iron oxide nanostructures. *Nanotechnology* **23**, 155603 (2012).
  86. Kobayashi, Y., Correa-duarte, M. a & Liz-marzan, L. M. Sol - Gel Processing of Silica-Coated Gold Nanoparticles. *Langmuir* **17**, 6375–6379 (2001).
  87. Ciriminna, R. *et al.* The sol-gel route to advanced silica-based materials and recent applications. *Chem. Rev.* **113**, 6592–6620 (2013).
  88. Liu, S., Zhang, Z. & Han, M. Y. Nanometer-sized gold-loaded gelatin/silica nanocapsules. *Adv. Mater.* **17**, 1862–1866 (2005).
  89. Fernández-López, C. *et al.* Highly controlled silica coating of PEG-capped metal nanoparticles and preparation of SERS-encoded particles. *Langmuir* **25**, 13894–13899 (2009).
  90. Pastoriza-Santos, I., Pérez-Juste, J. & Liz-Marzán, L. M. Silica-coating and hydrophobation of CTAB-stabilized gold nanorods. *Chem. Mater.* **18**, 2465–2467 (2006).
  91. Green, W. H., Le, K. P., Grey, J., Au, T. T. & Sailor, M. J. White Phosphors from a Silicate-Carboxylate Sol-Gel Precursor That Lack Metal Activator Ions. *Science (80-. )*. **276**, 1826–1828 (1997).
  92. Răcuciu, M., Creangă, D. E. & Airinei, a. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. *Eur. Phys. J. E* **21**, 117–121 (2006).
  93. Deng, Y. H., Wang, C. C., Hu, J. H., Yang, W. L. & Fu, S. K. Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol-gel approach. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **262**, 87–93 (2005).
  94. Haw, C. Y. *et al.* Morphological studies of randomized dispersion magnetite nanoclusters coated with silica. *Ceram. Int.* **37**, 451–464 (2011).
  95. Pechini, M. P. & Adams, N. Method of preparing lead and alkaline earth titanates and niobates and coating method using the same to form a capacitor. *United states patent office* 01–07 (1967).
  96. Danks, A. E., Hall, S. R. & Schnepf, Z. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. *Mater. Horizons* **3**, 91–112 (2016).
  97. Wu, Y. & Wang, X. Preparation and characterization of single-phase  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nano-powders by Pechini sol–gel method. *Mater. Lett.* **65**, 2062–2065 (2011).
  98. Galceran, M., Pujol, M. C., Aguiló, M. & Díaz, F. Sol-gel modified Pechini method for obtaining nanocrystalline KRE(WO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (RE = Gd and Yb). *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **42**, 79–88 (2007).
  99. Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J. & Liz-Marzán, L. M. A ‘Tips and Tricks’ Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys.*

- Chem. Lett.* **6**, 4270–4279 (2015).
100. Hubert, F., Testard, F. & Spalla, O. Cetyltrimethylammonium bromide silver bromide complex as the capping agent of gold nanorods. *Langmuir* **24**, 9219–9222 (2008).
  101. Jackson, S. R., McBride, J. R., Rosenthal, S. J. & Wright, D. W. Where's the Silver? Imaging Trace Silver Coverage on the Surface of Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5261–3 (2014).
  102. Cabrera, L., Gutierrez, S., Menendez, N., Morales, M. P. & Herrasti, P. Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization. *Electrochim. Acta* **53**, 3436–3441 (2008).
  103. Galindo, R., Mazario, E., Gutiérrez, S., Morales, M. P. & Herrasti, P. Electrochemical synthesis of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Characterization and their catalytic applications. *J. Alloys Compd.* **536**, S241–S244 (2012).
  104. Mazarío, E., Herrasti, P., Morales, M. P. & Menéndez, N. Synthesis and characterization of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical method. *Nanotechnology* **23**, 355708 (2012).
  105. Mazarío, E. *et al.* High specific absorption rate and transverse relaxivity effects in manganese ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical route. *J. Phys. Chem. C* **119**, 6828–6834 (2015).
  106. Katz, E. & Willner, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 6042–6108 (2004).
  107. Sperling, R. a & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
  108. Scarabelli, L., Sánchez-Iglesias, A., Pérez-Juste, J. & Liz-Marzán, L. M. A ‘Tips and Tricks’ Practical Guide to the Synthesis of Gold Nanorods. *J. Phys. Chem. Lett.* **6**, 4270–4279 (2015).
  109. Mie, G. Contributions to the optics of turbid media, particularly of colloidal metal solutions. *Ann. Phys.* **25**, 377–445 (1908).
  110. Zijlstra, P. & Orrit, M. Single metal nanoparticles: optical detection, spectroscopy and applications. *Reports Prog. Phys.* **74**, 106401 (2011).
  111. Li, X., Wang, M. & Zhang, B. Equivalent medium theory of layered sphere particle with anisotropic shells. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* **179**, 165–169 (2016).
  112. Palik, E. *Handbook of Optical Constants of Solids. Handbook of optical constants of solids Band 1* (1985).
  113. Fontijn, W. F. J., Van Der Zaag, P. J., Devillers, M. A. C., Brabers, V. A. M. & Metselaar, R. Optical and magneto-optical polar Kerr spectra of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Mg<sup>2+</sup> or Al<sup>3+</sup>-substituted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *Phys. Rev. B* **56**, 5432–5442 (1997).
  114. Davletshin, Y. Modeling the optical properties of a single gold nanorod for use in biomedical applications. 71 (2010).
  115. Draine, B. T. & Flatau, P. J. Discrete-dipole approximation for scattering calculations. *J. Opt. Soc. Am. A* **11**, 1491–1499 (1994).

116. Alcaraz de la Osa, R., Albella, P., Saiz, J. M., Gonzalez, F. & Moreno, F. Extended discrete dipole approximation and its application to bianisotropic media. *Opt. Express* **18**, 23865–23871 (2010).
117. Atkinson, A. L., McMahon, J. M. & Schatz, G. C. FDTD studies of metallic nanoparticle systems. in *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology* 11–32 (2009). doi:10.1007/978-90-481-2590-6\_2
118. Oh, M. K., Park, S., Kim, S. K. & Lim, S. H. Finite difference time domain calculation on layer-by-layer assemblies of close-packed gold nanoparticles. *J. Comput. Theor. Nanosci.* **7**, 1085–1094 (2010).
119. Grzelczak, M., Perez-Juste, J., Mulvaney, P. & Liz-Marzan, L. M. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev* **37**, 1783–1791 (2008).
120. Ward, C. J., Tronndorf, R., Eustes, A. S., Auad, M. L. & Davis, E. W. Seed-Mediated Growth of Gold Nanorods: Limits of Length to Diameter Ratio Control. *J. Nanomater.* **2014**, 1–7 (2014).
121. Chantrell, R., Popplewell, J. & Charles, S. Measurements of particle size distribution parameters in ferrofluids. *IEEE Trans. Magn.* **14**, 975–977 (1978).
122. Miranda, M. G. M. *et al.* Transport and structure of Co<sub>10</sub>Cu<sub>90</sub> heterogeneous ribbons during annealing. *J. Magn. Magn. Mater.* **185**, 331–338 (1998).
123. Vargas, J., Ramos, C., Zysler, R. D. & Romero, H. Annealing effects on the magnetization of Co-Ni-B amorphous nanoparticles. *Phys. B Condens. Matter* **320**, 178–180 (2002).
124. Park, K. *et al.* Growth Mechanism of Gold Nanorods. doi:10.1021/cm303659q
125. Hubert, F., Testard, F., Rizza, G. & Spalla, O. Nanorods versus nanospheres: A bifurcation mechanism revealed by principal component TEM analysis. *Langmuir* **26**, 6887–6891 (2010).
126. Reza Hormozi-Nezhad, M., Robotjazi, H. & Jalali-Heravi, M. Thorough tuning of the aspect ratio of gold nanorods using response surface methodology. *Anal. Chim. Acta* **779**, 14–21 (2013).
127. Wang, Z. L., Mohamed, M. B., Link, S. & El-Sayed, M. A. Crystallographic facets and shapes of gold nanorods of different aspect ratios. *Surf. Sci.* **440**, (1999).
128. Carbó-Argibay, E. *et al.* The crystalline structure of gold nanorods revisited: Evidence for higher-index lateral facets. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 9397–9400 (2010).
129. Chen, H., Shao, L., Li, Q. & Wang, J. Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 2679–2724 (2013).
130. Liu, M. & Guyot-Sionnest, P. Mechanism of silver (I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *J. Phys. Chem. B* **109**, 22192–22200 (2005).
131. Gao, J., Bender, C. M. & Murphy, C. J. Dependence of the Gold Nanorod Aspect Ratio on the Nature of the Directing Surfactant in Aqueous Solution. *Langmuir* **19**, 9065–9070 (2003).
132. Chanana, M. & Liz-Marzán, L. M. Coating matters: The influence of coating materials on the optical properties of gold nanoparticles. *Nanophotonics* **1**, 199–220 (2012).

133. Almora-Barrios, N., Novell-Leruth, G., Whiting, P., Liz-Marzán, L. M. & López, N. Theoretical description of the role of halides, silver, and surfactants on the structure of gold nanorods. *Nano Lett.* **14**, 871–875 (2014).
134. Xue, W., He, H., Zhu, J. & Yuan, P. FTIR investigation of CTAB-Al-montmorillonite complexes. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **67**, 1030–1036 (2007).
135. Venkataraman, N. V. & Vasudevan, S. Hydrocarbon chain conformation in an intercalated surfactant monolayer and bilayer. *J. Chem. Sci.* **113**, 539–558 (2001).
136. Viana, R. B., Da Silva, A. B. F. & Pimentel, A. S. Infrared spectroscopy of anionic, cationic, and zwitterionic surfactants. *Adv. Phys. Chem.* **2012**, (2012).
137. Rusen, L. *et al.* Protein-resistant polymer coatings obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation. in *Applied Surface Science* **278**, 198–202 (2013).
138. Collins, G., Aureau, D., Holmes, J. D., Etcheberry, A. & O'Dwyer, C. Germanium oxide removal by citric acid and thiol passivation from citric acid-terminated Ge(100). *Langmuir* **30**, 14123–14127 (2014).
139. Goodarzi, a., Sahoo, Y., Swihart, M. T. & Prasad, P. N. Aqueous Ferrofluid of Citric Acid Coated Magnetite Particles. *MRS Proc.* **789**, 1–6 (2003).
140. Hussein-Al-Ali, S. H. *et al.* Novel kojic acid-polymer-based magnetic nanocomposites for medical applications. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 351–362 (2014).
141. Rahme, K. *et al.* AuNP92-PEGylated gold nanoparticles: polymer quantification as a function of PEG lengths and nanoparticle dimensions. *RSC Adv.* **3**, 6085 (2013).
142. Li, L. *et al.* Synthesis and morphology control of gold/iron oxide magnetic nanocomposites via a simple aqueous method. *IEEE Trans. Magn.* **50**, (2014).
143. Akçay, M. Characterization and adsorption properties of tetrabutylammonium montmorillonite (TBAM) clay: Thermodynamic and kinetic calculations. *J. Colloid Interface Sci.* **296**, 16–21 (2006).
144. Fauconnier, N., Pons, J. N., Roger, J. & Bee, A. Thiolation of Maghemite Nanoparticles by Dimercaptosuccinic Acid. *J. Colloid Interface Sci.* **194**, 427–433 (1997).
145. Lodhia, J., Mandarano, G., Ferris, N., Eu, P. & Cowell, S. Development and use of iron oxide nanoparticles (Part 1): Synthesis of iron oxide nanoparticles for MRI. *Biomed. Imaging Interv. J.* **6**, e12 (2010).
146. Rodríguez-Fernández, J., Pérez-Juste, J., Liz-Marzán, L. M. & Lang, P. R. Dynamic light scattering of short au rods with low aspect ratios. *J. Phys. Chem. C* **111**, 5020–5025 (2007).
147. Martchenko, I., Dietsch, H., Moitzi, C. & Schurtenberger, P. Hydrodynamic properties of magnetic nanoparticles with tunable shape anisotropy: prediction and experimental verification. *J. Phys. Chem. B* **115**, 14838–45 (2011).
148. Glidden, M. & Muschol, M. Characterizing gold nanorods in solution using depolarized dynamic light scattering. *J. Phys. Chem. C* **116**, 8128–8137 (2012).
149. Costo, R. *et al.* Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: Improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir* **28**, 178–185 (2012).

150. Edrissi, M., Soleymani, M. & Adinehnia, M. Synthesis of silica nanoparticles by ultrasound-assisted sol-gel method: Optimized by Taguchi robust design. *Chem. Eng. Technol.* **34**, 1813–1819 (2011).
151. Dang, F., Enomoto, N., Hojo, J. & Enpuku, K. Sonochemical coating of magnetite nanoparticles with silica. *Ultrason. Sonochem.* **17**, 193–199 (2010).
152. Hore, M. J. A. *et al.* Probing the Structure, Composition, and Spatial Distribution of Ligands on Gold Nanorods. *Nano Lett.* **15**, 5730–5738 (2015).
153. Yu, M., Huang, S., Yu, K. J. & Clyne, A. M. Dextran and polymer polyethylene glycol (PEG) coating reduce both 5 and 30 nm iron oxide nanoparticle cytotoxicity in 2D and 3D cell culture. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 5554–5570 (2012).
154. Tilgner, I. C., Bohnen, F. M., Rehage, H. & Maier, W. F. Effect of acidic, basic and fluoride-catalyzed sol-gel transitions on the preparation of sub-nanostructured silica. **5**, 77–90 (1995).
155. Danks, a. E., Hall, S. R. & Schnepf, Z. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. *Mater. Horizons* **3**, 91–112 (2016).
156. H. E. Bergna, W. O. R., Bergna, H. E. & Roberts, W. O. COLLOIDAL SILICA Fundamentals and Applications. *Int. J. Numer. Methods Fluids* **41**, 1–1 (2003).
157. Mayoral, A., Mejía-Rosales, S., Mariscal, M. M., Pérez-Tijerina, E. & José-Yacamán, M. The Co-Au interface in bimetallic nanoparticles: a high resolution STEM study. *Nanoscale* **2**, 2647–2651 (2010).
158. Epicier, T., Sato, K., Tournus, F. & Konno, T. Chemical composition dispersion in bi-metallic nanoparticles: Semi-automated analysis using HAADF-STEM. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 1–10 (2012).
159. Cullity, B. D. Elements of X-Ray Diffraction. *Phys. Today* **10**, 50–51 (1957).
160. Nallathambi, G., Ramachandran, T., Rajendran, V. & Palanivelu, R. Effect of silica nanoparticles and BTCA on physical properties of cotton fabrics. *Mater. Res.* **14**, 552–559 (2011).
161. Buck, M. R., Bondi, J. F. & Schaak, R. E. A total-synthesis framework for the construction of high-order colloidal hybrid nanoparticles. *Nat. Chem.* **4**, 37–44 (2011).
162. Robinson, I., Tung, L. D., Maenosono, S., Wälti, C. & Thanh, N. T. K. Synthesis of core-shell gold coated magnetic nanoparticles and their interaction with thiolated DNA. *Nanoscale* **2**, 2624–2630 (2010).
163. Bustami, Y., Moo-Young, M. & Anderson, W. a. Analysis of the heterogeneous structure of iron oxide/gold nanoparticles and their application in a nanosensor. *Sensors Actuators B Chem.* (2017). doi:10.1016/j.snb.2017.01.142
164. Comin, A., Korobchevskaya, K., George, C., Diaspro, A. & Manna, L. Plasmon bleaching dynamics in colloidal gold-iron oxide nanocrystal heterodimers. *Nano Lett.* **12**, 921–926 (2012).
165. Feyngenson, M. *et al.* Exchange bias effect in Au-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dumbbell nanoparticles induced by the charge transfer from gold. *Phys. Rev. B* **92**, 54416 (2015).
166. Pierce, J. P. *et al.* Ferromagnetic stability in Fe nanodot assemblies on cu(111) induced by indirect coupling through the substrate. *Phys. Rev. Lett.* **92**, 237201–1 (2004).

167. Ghosh, S. K. & Pal, T. Interparticle Coupling Effect on the Surface Plasmon Resonance of Gold Nanoparticles: From Theory to Applications. *Chem. Rev.* **107**, 4797–4862 (2007).
168. Krasnok, a E. *et al.* Optical nanoantennas. *Physics-Uspekhi* **56**, 539–564 (2013).
169. Novotny, L. & van Hulst, N. Antennas for light. *Nat. Photonics* **5**, 83–90 (2011).
170. Xu, H., Aizpurua, J., Käll, M. & Apell, P. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering. *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* **62**, 4318–4324 (2000).
171. Romero, I., Aizpurua, J., Bryant, G. W. & García De Abajo, F. J. Plasmons in nearly touching metallic nanoparticles: singular response in the limit of touching dimers. *Opt. Express* **14**, 9988–9999 (2006).
172. Stranahan, S. M., Titus, E. J. & Willets, K. A. Discriminating nanoparticle dimers from higher order aggregates through wavelength-dependent SERS orientational imaging. *ACS Nano* **6**, 1806–1813 (2012).
173. Ahijado-Guzmán, R. *et al.* Intracellular pH-Induced Tip-to-Tip Assembly of Gold Nanorods for Enhanced Plasmonic Photothermal Therapy. *ACS Omega* **1**, 388–395 (2016).
174. Chen, M. W., You, S., Suslick, K. S. & Dlott, D. D. Hot spots in energetic materials generated by infrared and ultrasound, detected by thermal imaging microscopy. *Review of Scientific Instruments* **85**, (2014).
175. Su, K. H. *et al.* Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles. *Nano Lett.* **3**, 1087–1090 (2003).
176. Funston, A. M., Novo, C., Davis, T. J. & Mulvaney, P. Plasmon coupling of gold nanorods at short distances and in different geometries. *Nano Lett.* **9**, 1651–1658 (2009).
177. Zeng, H. & Sun, S. Syntheses, properties, and potential applications of multicomponent magnetic nanoparticles. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 391–400 (2008).
178. Mccurrie, R. A. Ferromagnetic Materials Structure and Properties. *New York* (1994).
179. Lee, J.-H. *et al.* Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. doi:10.1038/nm1467
180. Goya, G. F., Berquó, T. S., Fonseca, F. C. & Morales, M. P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **94**, 3520–3528 (2003).
181. Coey, J. M. D. *Magnetism and Magnetic Materials*. (2004).
182. Knobel, M. *et al.* Superparamagnetism and Other Magnetic Features in Granular Materials: A Review on Ideal and Real Systems. (2008). doi:10.1166/jnn.2008.017
183. Sousa, E. C. *et al.* Experimental evidence of surface effects in the magnetic dynamics behavior of ferrite nanoparticles. in *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **289**, 118–121 (2005).
184. Moscoso-Londoño, O. *et al.* Different approaches to analyze the dipolar interaction effects on diluted and concentrated granular superparamagnetic systems. *J. Magn. Magn. Mater.* **428**, 105–118 (2017).

185. Sodipo, B. K. & Aziz, A. A. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. *J. Magn. Magn. Mater.* **416**, 275–291 (2016).
186. Talapin, D. V, Shevchenko, E. V, Murray, C. B., Titov, A. V & Král, P. Dipole–Dipole Interactions in Nanoparticle Superlattices. doi:10.1021/nl070058c
187. Lu, J. J., Kuo, C. C., Huang, H. L. & Introduction, I. Hysteretic behavior of magnetic particles with dipole interaction. *J. Appl. Phys.* **85**, 5558–5560 (1999).
188. Serantes, D. & Martínez-boubeta, C. Multiplying Magnetic Hyperthermia Response by Nanoparticle Assembling Multiplying Magnetic Hyperthermia Response by Nanoparticle Assembling. (2014). doi:10.1021/jp410717m
189. Faraudo, J., Andreu, J. S., Calero, C. & Camacho, J. Predicting the Self-Assembly of Superparamagnetic Colloids under Magnetic Fields. 1–22 (2016). doi:10.1002/adfm.201504839
190. De Las Cuevas, G., Faraudo, J. & Camacho, J. Low-gradient magnetophoresis through field-induced reversible aggregation. *J. Phys. Chem. C* **112**, 945–950 (2008).
191. Simeonidis, K. *et al.* In-situ particles reorientation during magnetic hyperthermia application: Shape matters twice. *Sci. Rep.* **6**, 38382 (2016).
192. Aslibeiki, B., Kameli, P. & Salamati, H. The effect of dipole-dipole interactions on coercivity, anisotropy constant, and blocking temperature of MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **119**, (2016).
193. Nadeem, K. *et al.* Effect of dipolar and exchange interactions on magnetic blocking of maghemite nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.* **323**, 1998–2004 (2011).
194. Mehdaoui, B. *et al.* Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results. **174419**, 1–10 (2013).
195. Andreu, I., Natividad, E., Solozábal, L. & Roubeau, O. Nano-objects for addressing the control of nanoparticle arrangement and performance in magnetic hyperthermia. *ACS Nano* **9**, 1408–1419 (2015).
196. Hansen, M., Koch, C. & Mørup, S. Magnetic dynamics of weakly and strongly interacting hematite nanoparticles. *Phys. Rev. B* **62**, 1124–1135 (2000).
197. Frandsen, C. *et al.* Oriented attachment and exchange coupling of alpha-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Phys. Rev. B* **72**, 214406 (2005).
198. Alonso, J. *et al.* Crossover from superspin glass to superferromagnet in Fe x Ag 100 – x nanostructured thin films ( 20 ≤ x ≤ 50 ). *Phys. Rev. B* **82**, 54406 (2010).

# Capítulo IV

## **Detección Fotoacústica de Células TumORAles**



## 4.1 INTRODUCCIÓN

### 4.1.1 Uso de nanopartículas como agentes de contraste de imagen fotoacústica para detección de cáncer

#### 4.1.1.a Resolución versus profundidad

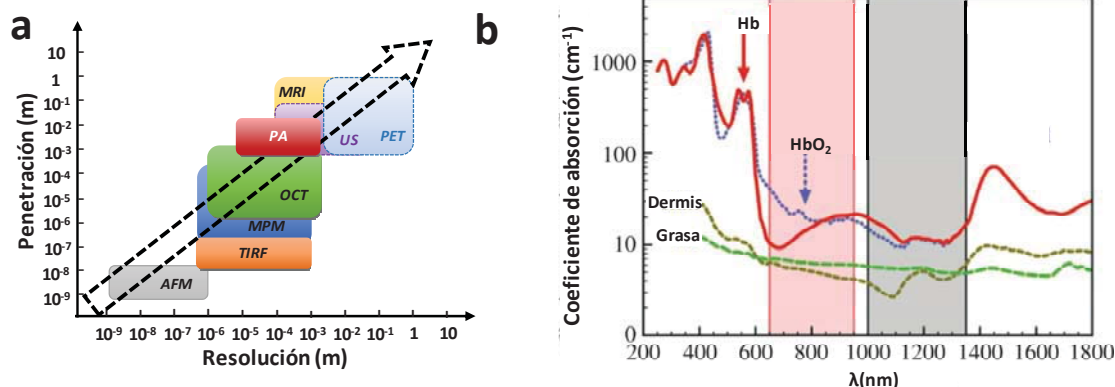
En los últimos años, la imagen médica ha experimentado un enorme progreso gracias al desarrollo de nuevas técnicas de imagen y a la mejora en la resolución de las técnicas ya existentes<sup>1,2</sup>. No obstante, sigue existiendo una limitación entre la resolución y la profundidad alcanzada por las técnicas de imagen disponibles. En la [Figura 4.1a](#) se muestra un esquema general de la resolución que presentan diferentes técnicas de imagen médica en función de la distancia de penetración alcanzada.

La imagen fotoacústica (PA) destaca frente al resto de técnicas por ser capaz de resolver entidades de decenas de micras que se encuentran a profundidades de hasta varios centímetros. Usando diferentes modalidades (tomografía computerizada<sup>3</sup>, microscopía<sup>4</sup>, super-resolución<sup>5</sup>, etc.), la imagen PA permite mantener una relación “resolución-profundidad” de aproximadamente 200 a diferentes escalas de tamaños<sup>6</sup>, lo que ofrece la posibilidad de estudiar sistemas biológicos tanto a nivel macroscópico ( $\sim 50\mu\text{m}$ - $3\text{cm}$ )<sup>3</sup> como de células individuales ( $\sim 0,1\mu\text{m}$ - $10\mu\text{m}$ )<sup>5</sup>. Además, la resolución temporal de la técnica (cientos de milisegundos) permite extender estos estudios a sistemas biológicos dinámicos. Un ejemplo de ello son los estudios realizados por Wang y col.<sup>7</sup>, en los que estudió el intercambio de oxígeno de un único glóbulo rojo a tiempo real en sistemas *in vivo*.

La resolución micrométrica que permite esta técnica incluso en profundidades de varios cm se basa en la coherencia que mantienen las ondas de ultrasonidos (US) cuando se propagan por tejidos biológicos<sup>8</sup>. La baja dispersión de las ondas sonoras en este tipo de medios, permite que una señal procedente de un órgano interno pueda llegar hasta el transductor de US preservando información sobre la geometría en que fueron originadas. Sin embargo, para que la señal PA sea generada en estas profundidades, la luz empleada debe ser capaz de penetrar hasta ellas manteniendo una intensidad capaz de excitar las moléculas fotosensibles presentes en los tejidos.

Por este motivo, para generar una imagen PA de tejidos profundos generalmente se emplean pulsos de luz cuyas longitudes de onda corresponden al IR cercano, ya que

como muestra la [Figura 4.1b](#) existe un rango conocido como primera ventana biológica (690–900 nm) en la que la absorción óptica de la dermis resulta mínima<sup>9</sup>. Existe también una segunda ventana biológica IR (950–1350 nm) en la que se podrían alcanzar niveles de penetración de hasta 10 cm pero los trabajos al respecto son aún escasos<sup>10</sup>.



**Figura 4.1** (a) Esquema de la relación penetración-resolución de diferente técnicas de imagen médica: Imagen de resonancia magnética (MRI), ultrasonidos (US), fotoacústica (PA), tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía de coherencia óptica (OCT), microscopía multifotónica (MPM), microscopía de fluorescencia de reflexión interna total (TIRF), microscopía de fuerza atómica (AFM) (adaptado de [photoacoustic.wikispaces.com](#)<sup>11</sup>). (b) Espectro de absorción óptica de las moléculas fotosensibles más comunes en tejidos biológicos donde se indica la posición de la primera (rojo) y segunda (gris) ventanas biológicas (adaptado de García y col.<sup>9</sup>).

Por otra parte, la diferencia en el grado de absorción óptica de las moléculas biológicas permite obtener información adicional sobre la composición de las imágenes PA obtenidas. Comúnmente, la diferencia en el coeficiente de absorción de la hemoglobina desoxigenada (desoxihemoglobina) y la oxigenada (oxihemoglobina) que se muestra la [Figura 4.1b](#), es empleada en estudios sobre la distribución de oxígeno en sistemas biológicos como el mencionado anteriormente<sup>7</sup>. Sin embargo, cuando se realizan estudios de detección de regiones tumorales mediante imagen PA, la presencia de moléculas fotosensibles en los tejidos biológicos puede suponer un impedimento, ya que éstas introducen señales adicionales que enmascaran la imagen y hacen necesario el uso de agentes de contraste.

### 4.1.1.b Agentes de contraste fotoacústicos para la detección de tumores

Los agentes de contraste biológicos son sustancias biocompatibles que al ser introducidas en un organismo aumentan o atenúan la señal proveniente de las regiones donde se encuentran localizados. Este cambio en la señal genera un mayor contraste entre tejidos contiguos y facilita su identificación en las imágenes obtenidas. En la actualidad, los agentes de contraste son utilizados en las técnicas de imagen médica para mejorar la resolución de la imagen y de este modo refinar los diagnósticos médicos<sup>12</sup>.

La aparición de NP biocompatibles y biofuncionalizables ha abierto un nuevo campo de exploración en el ámbito de los agentes de contraste<sup>13-15</sup>. Las NPM, por ejemplo, han sido incorporadas a los procesos clínicos de diagnóstico por MRI gracias al desarrollo de productos comerciales como el Feridex® o el Resovist, entre otros<sup>16</sup>. Una ventaja adicional del uso de NP como agentes de contraste, es que éstas pueden ser fácilmente vectorizadas con biomarcadores capaces de detectar moléculas diana dentro del organismo<sup>17-20</sup>. Gracias a esta funcionalización se consigue que las NP queden acumuladas en regiones específicas del paciente al ser inyectadas en el torrente sanguíneo, aumentando así su contraste dentro de la imagen y permitiendo su detección.

Los agentes de contraste basados en NP biofuncionalizadas han encontrado un gran campo de aplicabilidad en la detección de tejidos tumorales<sup>21-23</sup>. El uso de nanoagentes de contraste en técnicas de imagen como la MRI<sup>24</sup>, la CT<sup>14</sup> o imagen de US<sup>15</sup>, entre otros, permiten localizar y definir el volumen de regiones tumorales localizadas. La imagen de tumores localizados facilita su detección temprana, su extirpación quirúrgica y permite evaluar la efectividad de los tratamientos anticancerígenos.

No obstante, para poder conseguir una detección temprana del cáncer así como un diagnóstico correcto, las técnicas de imagen mediadas por agentes de contraste deben ser capaces de resolver regiones menores de 1-2 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 10<sup>5</sup> células cancerígenas), ya que a partir de este tamaño el tumor comienza a vascularizarse (cambio angiogénico) y su crecimiento se acelera<sup>6,25</sup>. Si el tumor llega a alcanzar volúmenes entre 1-2 cm<sup>3</sup> las probabilidades de supervivencia del paciente disminuyen significativamente<sup>26</sup>.

Por este motivo, las características de resolución-profundidad de la imagen PA ofrecen condiciones idóneas para la detección de regiones tumorales en sus primeras etapas de

desarrollo. Uno de los agentes de contraste más comúnmente utilizados y que mayor señal PA genera son los AuNR. Este tipo de NP destacan sobre otros materiales, como la magnetita<sup>27</sup> o los polímeros conductores<sup>28</sup>, por su alta capacidad de absorción de luz y su rápida conversión de la energía absorbida en energía térmica<sup>6,29</sup>. No obstante, se ha observado que al someter los AuNR a pulsos de luz de alta intensidad, se puede inducir en ellos una transición de forma hacia una geometría esférica<sup>30,31</sup> que modifica sus propiedades de absorción y reduce su eficiencia como agentes de contraste PA.

Este proceso de deformación (reshaping), puede ser prevenido recubriendo los AuNR con una capa inorgánica que actúe de molde y evite la migración de los átomos de Au de las puntas a las caras planas<sup>32,33</sup>. Los recubrimientos de sílice permiten de este modo que la señal PA de los AuNR se preserve durante al menos 300 ciclos siempre que la densidad de energía de los pulsos se mantenga por debajo de los  $18 \text{ mJ/cm}^2$ <sup>34,35</sup>. Según los trabajos de Emelianov y col., recubriendo con sílice no solamente se consigue una mayor estabilidad sino que se genera una señal PA de mayor intensidad<sup>34</sup>.

En el caso de las NPMPH, la respuesta magnética de las nanoestructuras puede resultar interesante a la hora de mejorar el contraste de la imagen PA o de concentrar magnéticamente células tumorales, tal y como se analizará en los siguientes apartados. De modo que, el uso de una capa de sílice para unir los AuNR y las NPM, presenta una doble funcionalidad a la hora de utilizar las NPMPH como agentes de contraste de imagen PA. Por una parte crea una estructura magneto-plasmónica robusta y estable, y por otra supone una protección frente a la deformación de los AuNR.

### 4.1.2 Imagen fotoacústica magneto-motriz

Como se señaló en el capítulo 1, uno de los grandes avances que han introducido las NPMPH en el campo de la biomedicina es la posibilidad de desarrollar sistemas de imagen médica duales. Usando este tipo de nanoestructuras es posible combinar técnicas de imagen óptica (campo oscuro, OCT, MPM, etc.) con técnicas basadas en la respuesta magnética de los agentes de contraste como la MRI<sup>36-38</sup>.

Sin embargo, la concomitancia de las respuestas magnética y plasmónica en una misma NP, permite ir un paso más y buscar sinergias que no serían posibles con agentes de contraste exclusivamente magnéticos o plasmónicos. Un ejemplo de ello es la imagen fotoacústica magneto-motriz (mmPA)<sup>39,40</sup>. En esta modalidad de imagen PA, el uso

agentes de contraste magneto-plasmónicos permite mejorar la resolución de la imagen aplicando de forma periódica campos magnéticos inhomogéneos.

El incremento de resolución producido por esta técnica se basa en el movimiento inducido en tejidos biológicos cargados con NPM cuando se les aplica un gradiente de campo magnético alterno<sup>41,42</sup>. En presencia de un campo inhomogéneo, los tejidos con NPM se desplazan hacia las zonas donde el campo magnético es máximo para minimizar su energía. Por el contrario, el resto de tejidos biológicos –principalmente diamagnéticos– permanecen inalterados frente al campo. El desplazamiento producido por el gradiente magnético puede ser registrado y correlacionado con el campo aplicado para discernir la señal proveniente de la región que se desea detectar de su entorno biológico.

Esta mejora de la resolución ha sido aplicada a otro tipo de técnicas de imagen biomédica como la imagen óptica de campo oscuro magneto-motriz (mmDF)<sup>43,44</sup>; la tomografía de coherencia óptica magneto-motriz (mmOCT)<sup>41,45</sup> o la imagen por ultrasonidos magneto-motriz (mmUS)<sup>46,47</sup>, mejorando significativamente la resolución de las mismas. No obstante, aún existe un campo de desarrollo en la mejora de los agentes de contraste magneto-motrices y en factores como la subjetividad de la técnica o los sistemas de inducción del campo.

### **4.1.3 Detección de células tumorales circulantes mediante imagen PA**

#### **4.1.3.a Detección in vivo de células tumorales circulantes**

Anteriormente se señaló que la resolución temporal de la imagen PA permite realizar estudios en sistemas biológicos dinámicos. Gracias a ello, la detección de células cancerígenas no queda restringida a tumores localizados sino que también las células tumorales liberadas al torrente sanguíneo durante el proceso de metástasis, conocidas como células tumorales circulantes (CTC), pueden ser detectadas mediante imagen PA.

La prevención de procesos de metástasis entre órganos distantes resulta de enorme importancia en el campo de la oncología, pues se ha observado que el 90% de las muertes por cáncer están asociadas a este tipo de fenómenos<sup>48</sup>. En pacientes con cáncer de pecho, por ejemplo, se ha observado que la presencia de las CTC en el torrente sanguíneo puede suponer que el tiempo de supervivencia del paciente se reduzca a la mitad<sup>49</sup>.

Por este motivo, en los últimos años ha aumentado el interés en la detección de CTC como biomarcadores de procesos de metástasis<sup>48,50,51</sup>. Sin embargo, el diagnóstico temprano requiere sistemas de diagnóstico capaces de detectar este tipo de células en el torrente sanguíneo cuando se encuentran aún en una concentración baja (1 célula/mL)<sup>48</sup>, lo que generalmente supone la extracción de una gran cantidad de sangre del paciente.

La alta resolución espacial y temporal de la imagen PA permite evitar estos inconvenientes realizando una detección *in vivo* de los CTC en el torrente sanguíneo del paciente. En el caso de los melanomas, por ejemplo, la mayor pigmentación de las células cancerígenas con melanina hace que estas presenten una señal PA superior a la de las células sanas, lo que permite su identificación y detección<sup>52,53</sup>. En cambio, otro tipo de células tumorales, necesitan ser marcadas con agentes de contraste PA vectorizados para poder diferenciar entre células sanas y cancerígenas<sup>54,55</sup>.

Aunque el uso de sistemas de imagen PA *in vivo* ha demostrado su eficacia en la detección de ciertos tipos de CTC marcadas con NP<sup>56</sup>, la baja concentración de CTC en el torrente sanguíneo sigue suponiendo un escollo para la generalización de la imagen PA como sistema de detección de metástasis. Por este motivo, se están desarrollando actualmente sistemas de concentración de CTC que permitan reducir el límite de detección de la técnica<sup>57</sup>.

### 4.1.3.b Concentración de células tumorales circulantes mediante campos magnéticos

Una de las primeras aproximaciones llevadas a cabo para aumentar el límite de detección de los sensores de CTC consiste en concentrar células marcadas con NPM mediante campos magnéticos.

En la actualidad, el único modelo de captura y detección de CTC aprobado por la FDA (CellSearch, Janssen Diagnostics, Raritan, NJ, USA), está basado en la acumulación *ex vivo* de CTC mediante NPM funcionalizadas con moléculas fluoróforas y anticuerpos específicos. La traslación de esta técnica a sistemas *in vivo* permitiría extender el análisis al torrente sanguíneo completo (5 L en adultos) y evitar de este modo la extracción de muestras del paciente<sup>48</sup>.

Galazha y col. utilizaron un sistema de imagen PA combinada con imanes permanentes para llevar a cabo la concentración y detección de las CTC en sistemas *in vivo*<sup>58</sup>. Para

marcar las CTC, utilizaron NPM de óxido de Fe y NP plasmónicas basadas en nanotubos de carbono recubiertos de Au, a los que vectorizaron con marcadores específicos de cáncer de pecho. Una vez marcadas con ambos tipos de NP, las CTC pudieron ser concentradas magnéticamente y detectadas a través de la señal PA generada por las NP plasmónicas de su interior.

Esta aproximación fue simplificada más tarde por Gao y col. utilizando nanoestructuras magneto-plasmónicas que requerían un único marcador cancerígeno<sup>59</sup>. Gracias a ello, se consiguió reducir los niveles de detección PA de CTC hasta 1 células/mL.

A pesar de estos desarrollos, existen pocos estudios sistematizados en los que se compare la eficiencia de captación de CTC por parte de los sistemas magnéticos. La localidad de los gradientes magnéticos utilizados (centenas de micras) y la dinámica de los sistemas de flujo, introducen una limitación importante a la hora de analizar cómo afecta la geometría y la intensidad del campo magnético inducido en el proceso de captación de las CTC.

### 4.1.4 Objetivos del capítulo

En este capítulo se utilizarán las NPMPH desarrolladas como agentes de contraste PA para la detección de células tumorales. En primer lugar se utilizará la imagen mmPA para detectar sistemas simulados de tumores localizados, optimizando parámetros como las propiedades magnéticas de los agentes de contraste magneto-motrices, el post-tratamiento de la imagen o los sistemas de inducción del campo. En segundo lugar, el carácter magnético de las NPMPH será utilizado para acumular CTC en un sistema mimético de flujo sanguíneo usando diferentes sistemas de captación magnética que favorezcan su detección mediante imagen PA.

## 4.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1 Preparación de sistemas miméticos de regiones tumorales localizadas

Para los estudios de la imagen mmPA se utilizaron patrones de gelatina preparados a partir de un volumen de 500mL de agua destilada a 65°C con un 6 % en peso de gelatina y un 1 % en peso de celulosa. Tras agitar vigorosamente, la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. La insolubilidad de la celulosa obligó a agitar de nuevo la mezcla momentos antes de su solidificación (26°C).

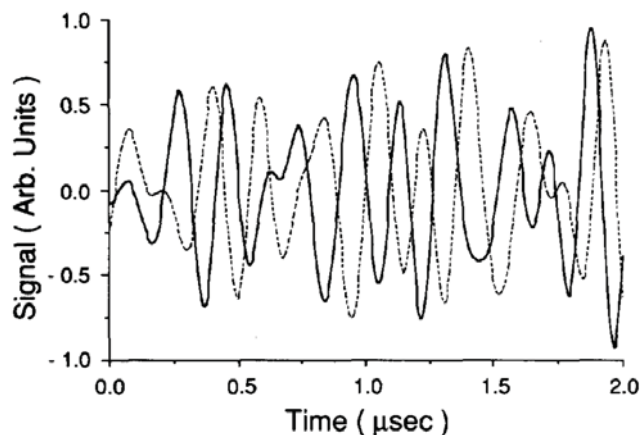
La inclusión de gelatina que simula las regiones tumorales localizadas se preparó mezclando 25  $\mu$ L de NPMPH con una concentración de NP aproximada de 8,8 nM y 25  $\mu$ L de agua a 65°C con un 12% en peso de gelatina y un 2% en peso de celulosa. Las NPMPH escogidas estaban formadas por un AuNR con una relación de aspecto de  $\sim$ 3,4 y NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $\sim$ 15 nm. Una vez mezclados, la inclusión fue enfriada rápidamente a -10° C para su gelificación. Para evitar cualquier tipo de desacoplo entre la inclusión y la matriz, la inclusión fue insertada momentos antes de su gelificación, de forma que el patrón obtenido resultase continuo y uniforme. Tras sumergir la inclusión, el patrón fue enfriado rápidamente en un molde cúbico.

### 4.2.2 Rastreo de puntos referenciales

El desplazamiento de los puntos de la imagen PA fue registrado mediante la técnica conocida como rastreo de puntos referenciales (speckel tracking). Los detalles del proceso de reconstrucción del movimiento aparecen expuestos en el **Apéndice C**.

En una aproximación sencilla, el rastreo de puntos referenciales consiste en descomponer la imagen 2D, en una secuencia de patrones 1D que recogen la intensidad de cada pixel hacen posible el seguimiento de los puntos más brillantes de la imagen. Los patrones 1D obtenidos en un tiempo “t” son autocorrelacionados con los patrones obtenidos en un tiempo posterior “t+dt” como el que se muestra en la [Figura 4.2](#). Analizando las transformadas de Fourier de estas dos señales, es posible relacionar la diferencia de fase entre ellas con el desplazamiento en el espacio real de los puntos más brillantes de la imagen (puntos referenciales).

Gracias a esta estrategia, los desplazamientos producidos por el campo magnético en la imagen mmPA de las NPMPH pudieron ser registrados, analizados y correlacionados con la señal del campo aplicado.



**Figura 4.2** Señales de US 1D antes ( $t$ )  $t$  después ( $t+dt$ ) del desplazamiento.<sup>60</sup>

### 4.2.3 Sistema mimético de detección de CTC en sistema de flujo

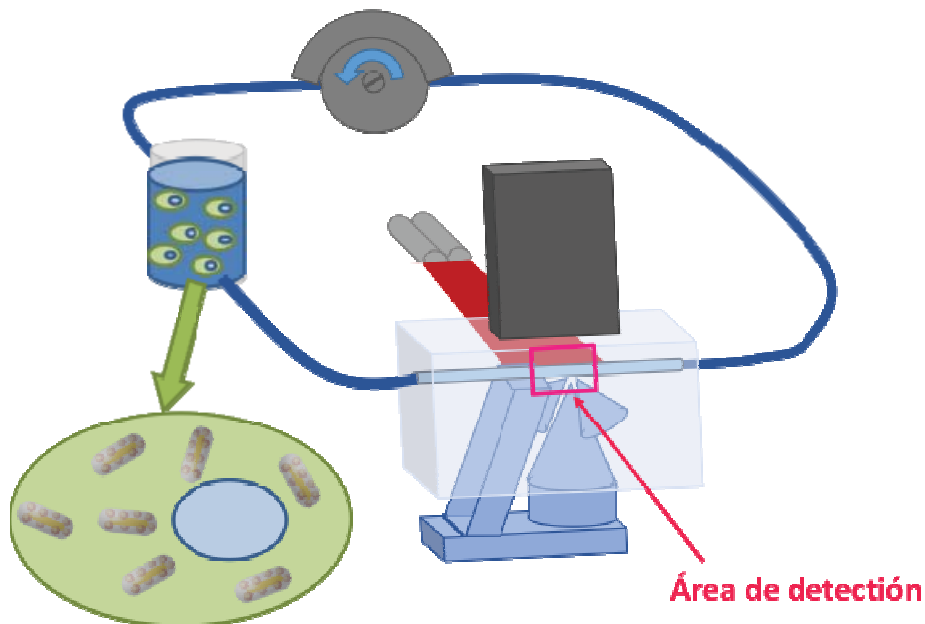
La circulación de las CTC en el torrente sanguíneo fue simulada mediante un circuito de flujo cerrado y continuo en el que se introdujo una suspensión de células marcadas con NPMPH similares a las utilizadas en los patrones de gelatina. A este circuito se le acopló un sistema de detección por imagen PA y un sistema de captación magnética, como los que aparecen representados en la [Figura 4.3](#).

Para dicho montaje se utilizó:

- Un tubo flexible de silicona de 3 mm acoplado a un tubo de mayor rigidez (SLTT-16-72, Zeus, WA) que simula el capilar, con diámetro interno es de 1,6 mm y una pared de 0,038 mm, en torno al cual se situaron los sistemas de captación magnética y detección PA.
- Una bomba peristáltica (WU-77301-20, MasterFlex, IL) con un flujo continuo de 10 mL/min .
- Un reservorio abierto que permitió la inserción de las CTC dentro del circuito de flujo.
- Un sistema de imagen PA como el descrito en el **Capítulo 2**.
- Un tanque de agua para acoplar las ondas de US generadas en el capilar con el transductor de US.

- Un sistema de refrigeración para la bobina del electroimán.
- Los siguientes sistemas de inducción magnética:
  - Sistema A: Conjunto de tres imanes permanentes cónicos de NdFeB con sus puntas apuntando hacia el capilar.
  - Sistema B: Electroimán con núcleo de Fe dulce en U, con un brazo terminado en forma cónica y el otro rectangular (plano).
  - Sistema C: Conjunto de dos imanes permanentes de NdFeB anexos al brazo cónico del electroimán descrito en el sistema B.

Haciendo uso de este sistema experimental, se pudo hacer un registro de la señal PA acumulada por cada uno de los sistemas de captación magnética a lo largo del tiempo. Para eliminar de la imagen la señal no proveniente de las CTC atrapadas, se sustrajo el promedio de los 10 primeros fotogramas registrados y las fluctuaciones en la potencia del láser fueron contrarrestadas normalizando la intensidad de la imagen con una señal proveniente de un foco de emisión PA de referencia externo al capilar.



**Figura 4.3** Sistema de simulación del flujo de CTC en un capilar para la acumulación magnética y detección PA.

#### **4.2.4 Simulaciones por el método de elementos finitos del campo inducido**

El campo magnético generado en el interior del capilar por los sistemas de captación magnética analizados, no pudieron ser evaluados experimentalmente a causa de las dimensiones de estos sistemas. Por este motivo, la distribución de campo magnético en el interior del capilar fue simulada mediante el programa comercial COMSOL Multiphysics® de cálculo numérico por FEM. Los detalles de las simulaciones aparecen recogidos en el Apéndice B.

#### **4.2.5 Marcado no específico de células tumorales HeLa con NPMPH**

Para la marcación no específica de células HeLa con NPMPH se preparó un cultivo celular de 4 millones de células a las que se añadió una mezcla de 4 mL de medio de cultivo con una concentración de NPMPH de 0,5 mg/mL. Tras 1 hora de incubación, las células marcadas fueron fijadas con formaldehído y lavadas por doble centrifugación a 1000 rpm durante 15 min para eliminar las NPMPH no internalizadas. Finalmente, la suspensión de células fue dispersada en PBS ajustando su concentración celular a  $2 \cdot 10^6$  células/mL.

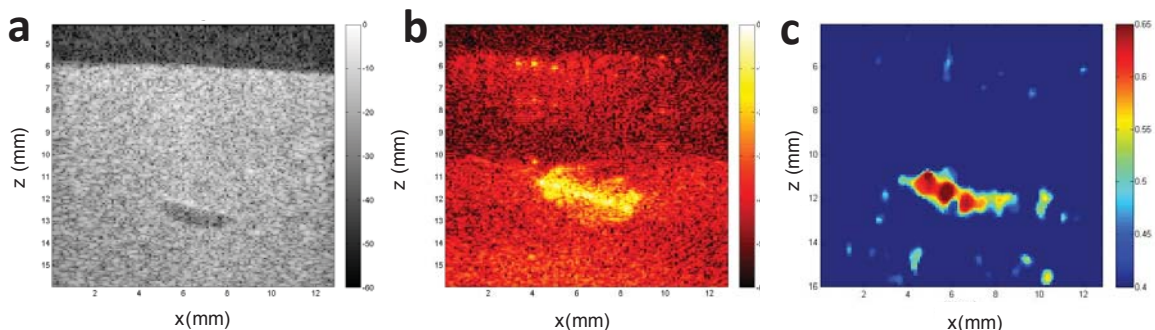
## 4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1 Imagen Fotoacústica magneto-motriz

Las imágenes de US, PA y mmPA del patrón de gelatina utilizado para la simulación de regiones tumorales localizadas aparecen representados en las [Figuras 4.4a, b y c](#), respectivamente. En este patrón, la inclusión de gelatina fue preparada con la mitad de concentración de celulosa para poder identificar su forma a partir de imagen de US, y de este modo poder evaluar la mejora en resolución de la imagen PA cuando se aplica el contraste magneto-motriz.

Como consecuencia de la menor concentración de celulosa, la inclusión de gelatina aparece en la [Figura 4.4a](#) como un óvalo oscuro a 13 mm de profundidad. En la imagen PA correspondiente ([Figura 4.4b](#)), los agentes de contraste añadidos en la inclusión hacen que ésta aparezca como una región brillante en el centro de la imagen. Se puede observar que alrededor de este óvalo aparece un fondo difuso y que en la parte superior izquierda de la imagen se generan algunos artefactos externos a la inclusión.

Tanto el fondo difuso como las señales espurias de la imagen PA desaparecen cuando se analiza la imagen de correlación con el campo de la [Figura 4.4c](#). Esta imagen representa el grado de correlación de las oscilaciones registradas en cada punto de la imagen con el campo magnético aplicado. Definiendo un límite inferior de 0,5 en la imagen mmPA de correlación, podemos obtener un patrón que reproduce de manera fidedigna la forma de la inclusión de la imagen de US.



**Figura 4.4** Imagen del patrón de gelatina con una inclusión de NPMPH obtenida mediante: (a) Imagen por US, (b) Imagen PA y (c) Imagen mmPA.

Estas imágenes demuestran que el uso de las NPMPH diseñadas en imagen mmPA permiten detectar regiones con distancias laterales del orden del milímetro (tamaño vertical de la inclusión).

Haciendo uso de estos modelos en patrones de gelatina, se buscó optimizar la calidad de imagen mmPA mediante 3 aproximaciones:

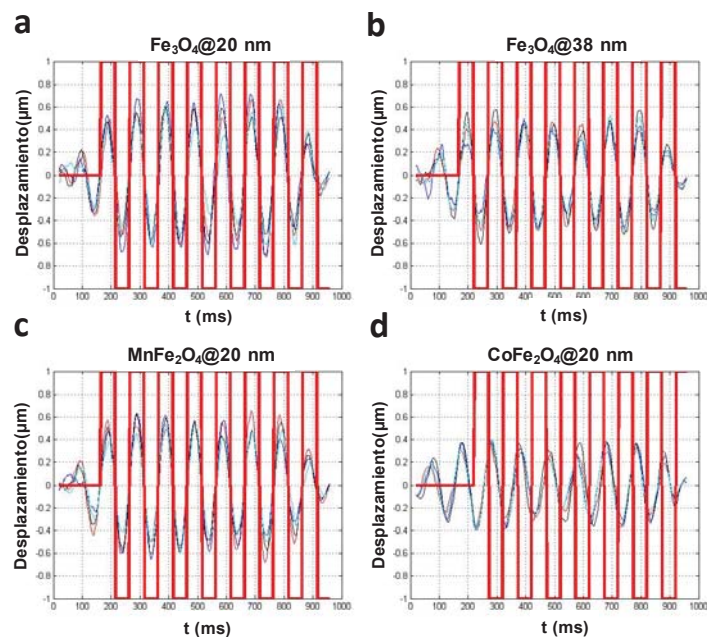
- Optimización de las propiedades magnéticas de los agentes de contraste magneto-motrices.
- Optimización del código de post-procesamiento de la imagen.
- Optimización de los sistemas de inducción de gradiente magnético.

### 4.3.1.a Análisis del desplazamiento magnético inducido en las diferentes ferritas

El primer punto propuesto para optimizar la resolución de la imagen mmPA consiste en evaluar la relevancia de los diferentes parámetros magnéticos de los agentes magneto-motrices. Para ello, se estudiaron NPM con diferentes composiciones y tamaños, analizando los desplazamientos registrados por rastreo de puntos referenciales en las regiones de máxima correlación de la imagen mmPA.

La [Figura 4.5](#) muestra el desplazamiento vertical inducido en 5 puntos referenciales del interior de la inclusión (líneas finas) para las muestras de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $15\pm 7$  nm,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $27\pm 2$  nm,  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  de  $13\pm 5$  nm y  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  de  $14\pm 5$  nm. En estos gráficos aparece representado con una línea roja más gruesa la señal de campo magnético reconstruido que se utilizó para analizar la correlación de los desplazamientos. En todas las muestras, las inclusiones de gelatina fueron situadas a la misma de profundidad (aproximadamente 6 mm) y los valores de intensidad (7A) y frecuencia (10Hz) de la señal aplicada al electroimán se mantuvieron constantes.

Podemos observar en la [Figura 4.5a](#) que una vez alcanzada su máxima amplitud, el movimiento registrado en las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 15 nm es de  $\sim 0,6$   $\mu\text{m}$ . Al aumentar el tamaño de las NPM hasta los 38 nm, el desplazamiento de éstas se reduce hasta los  $\sim 0,4$   $\mu\text{m}$ . Según lo observado en estos dos patrones, un mayor volumen de NPM no supone una mejora en el desplazamiento inducido sino que reduce significativamente el desplazamiento magneto-motriz de la inclusión. Esto puede deberse a que, para la misma concentración de masa, un mayor volumen de NP supone un menor número de NPM dispersas. Esto hace que la presión ejercida sea mayor y la respuesta elástica del medio aumente, lo que conlleva un menor desplazamiento de la inclusión.



**Figura 4.5** Desplazamiento vertical registrado por rastreo de puntos referenciales para 5 posiciones en el interior de las inclusiones de gelatina con NPM de: (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  15 nm, (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 27 nm, (c)  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  de 13 nm y (d)  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  de 14 nm.

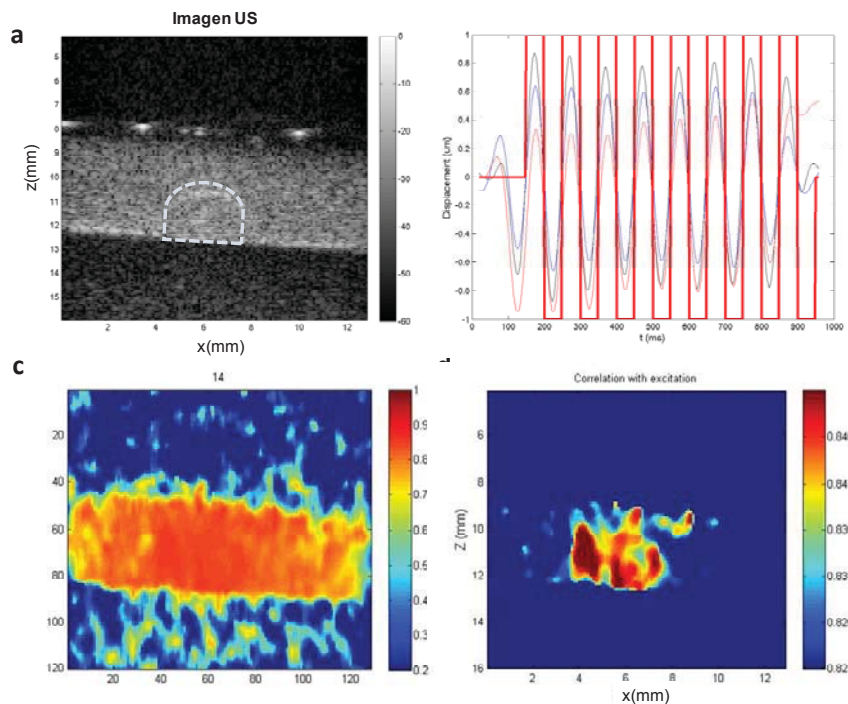
Comparando el movimiento registrado en las diferentes ferritas encontramos que las NPM de  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  presentan un desplazamiento de 0,5-0,6  $\mu\text{m}$  similar al de las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Por el contrario, el movimiento registrado para las NPM de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  apenas alcanza los 0,4  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con la caracterización magnética de las diferentes ferritas, el valor de la magnetización a campos bajos ( $M_S(\text{Fe}_3\text{O}_4) > M_S(\text{MnFe}_2\text{O}_4) > M_S(\text{CoFe}_2\text{O}_4)$ ), siguen la misma secuencia decreciente que la amplitud de las oscilaciones registradas. Esta progresión señala la gran relevancia del momento magnético de las NPM en su respuesta magneto-motriz.

El pequeño desplazamiento registrado para las NPM de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  sugiere que otros parámetros magnéticos como la coercitividad o la anisotropía magnetocristalina resultan de menor relevancia a la hora de inducir un desplazamiento mediante un gradiente magnético. A la vista de los resultados obtenidos, la optimización de los agentes de contraste magneto-motrices debe priorizar la maximización de la imanación de las NPM. Por este motivo, para el estudio del resto de parámetros se utilizaron NPM compuestas por NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de  $15 \pm 7$  nm.

#### 4.3.1.b Mejora en los sistemas de obtención de contraste por correlación

El segundo parámetro que se estudió fue el método de correlación empleado en el post-tratamiento de la señal registrada. Haciendo uso de los conocimientos que se tienen sobre el sistema de reconstrucción de la imagen, fue posible refinar los mapas de correlación de la imagen mmPA.

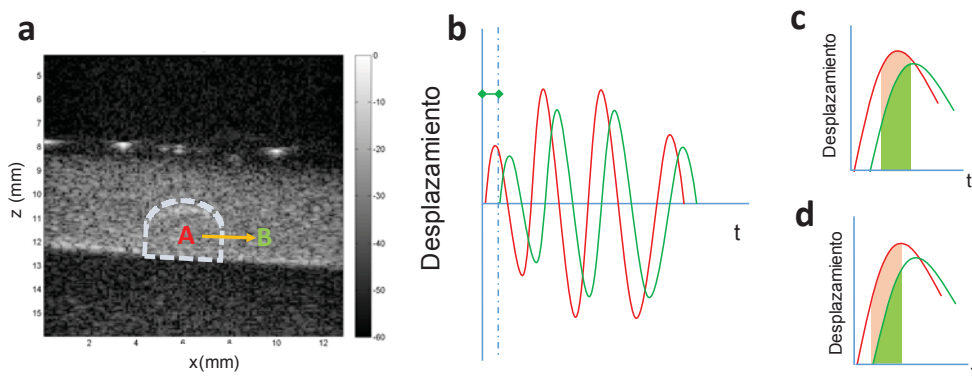
En la [Figura 4.6a](#) se muestra el patrón de gelatina empleado. En este caso, la posición de la inclusión que se indica con líneas discontinuas se obtuvo a partir de la imagen PA del patrón. En la [Figura 4.6b](#) se muestran los desplazamientos verticales registrados a lo largo del tiempo en tres puntos en el interior de la inclusión (líneas finas) y el valor de campo magnético reconstruido (línea roja gruesa) que se utilizó como función de correlación en el post-tratamiento de las imágenes. Vemos que el campo reconstruido y las oscilaciones registradas oscilan en fase y con la misma frecuencia. Como se mostró anteriormente, la correlación entre el campo reconstruido y los desplazamientos registrados en cada punto permite construir un mapa 2D de la señal mmPA como el que se muestra en la [Figura 4.6c](#).



**Figura 4.6** (a) Imagen de US del patrón de gelatina e inclusión de NPM (indicado por la línea blanca discontinua). (b) Desplazamiento inducido por el gradiente magnético en tres puntos referenciales del interior de la inclusión. (c y d) Mapas de correlación entre las oscilaciones y la función de correlación.

Ajustando la escala de la imagen de correlación ([Figura 4.6d](#)) fue posible definir una región de máxima correlación que coincide con la forma de la inclusión en la imagen de US. Sin embargo, las diferencias entre las [Figuras 4.6c y d](#) demuestra que la elección de los límites de correlación modifica significativamente la geometría de la región detectada. Esta dependencia con la escala, introduce un factor subjetivo en la imagen mmPA que impide su generalización como técnica de detección de regiones tumorales. Para reducir esta subjetividad, se desarrolló una aproximación de correlación alternativa que consiste en analizar la fase de las oscilaciones inducidas por el campo aplicado.

Idealmente, si cada punto de la imagen se desplazase de manera independiente, para identificar la posición de la inclusión magnética bastaría con distinguir entre los puntos que oscilan coherentemente con el campo y los que se mueve de manera aleatoria. Sin embargo, al tratarse de un medio continuo, la oscilación generada en el interior de la inclusión (punto A de la [Figura 4.7a](#)) se propaga a lo largo del medio produciendo oscilaciones de igual frecuencia -aunque de menor amplitud- fuera de la zona de la inclusión (punto B en la [Figura 4.7a](#)).



**Figura 4.7** (a) Imagen de US de un patrón de gelatina con una inclusión de NPM (indicado por la línea blanca discontinua). (b) Esquema del desplazamiento inducido en un punto del interior de la inclusión (rojo) y un punto externo (verde). Correlación entre el campo magnético reconstruido (gris) y las oscilaciones registradas dentro y fuera de la inclusión en situaciones de (c) máxima correlación y de (d) campo desfasado.

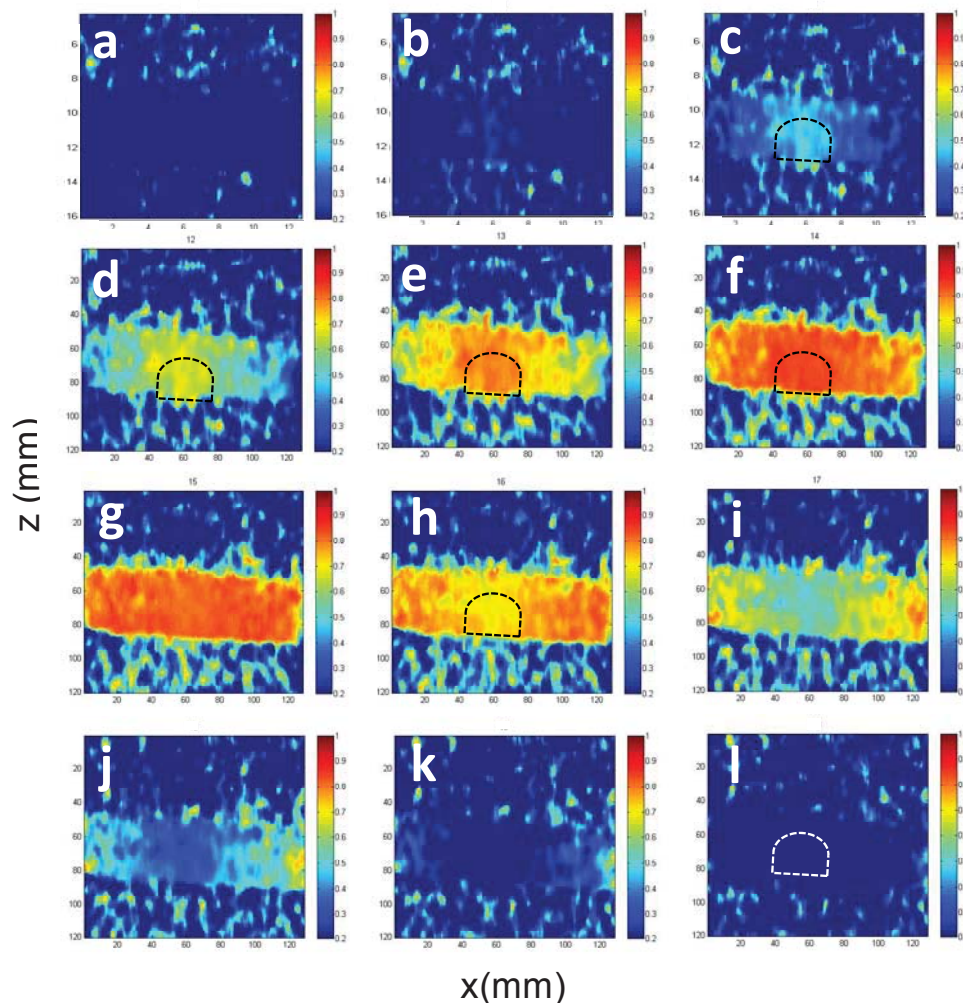
Como se puede observar en el esquema de la [Figura 4.7b](#), además de una menor amplitud, la oscilación propagada presenta un desfase temporal respecto a la oscilación que se genera en la inclusión. La estrategia que se propone en este apartado para

mejorar el contraste de la imagen mmPA consiste en utilizar este desfase como rasgo diferencial entre las regiones del interior de la inclusión (onda generada) y los alrededores de la misma (onda propagada).

Para ilustrar el fundamento de esta aproximación, resultará útil comparar el caso en que la correlación de la oscilación con el campo es máxima ([Figura 4.7c](#)) y en el caso en que la función de correlación se construye con un pequeño desfase ([Figura 4.7d](#)). Al tratarse de un campo cuadrático, podemos asumir que la correlación de cada señal con el campo reconstruido (gris) está relacionada directamente con el área encerrada bajo cada oscilación (coloreada con sus colores correspondientes).

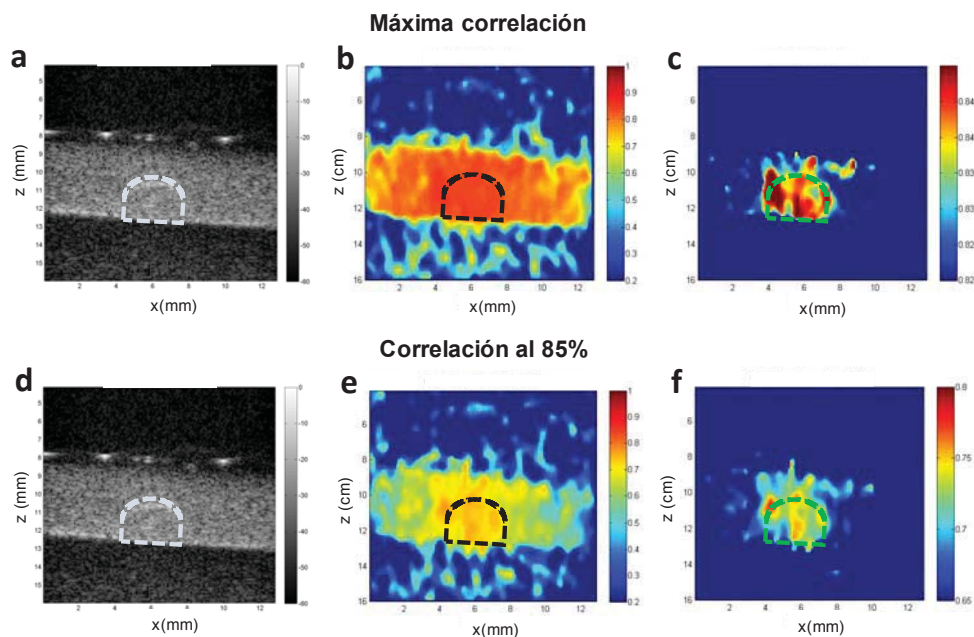
En la situación de máxima correlación, el área coloreada para la posición A es máxima y está por encima de la registrada para la posición B, pues la oscilación en B es de menor amplitud y está desfasada respecto al campo aplicado. Sin embargo, lo que muestra la [Figura 4.7d](#) es que si la fase del campo magnético reconstruido se sitúa antes de la situación de máxima correlación, la diferencia entre las áreas encerradas por las curvas A y B resulta máxima, y por tanto el contraste de señal magneto-motriz de estas dos posiciones aumenta.

En la [Figuras 4.8](#) se muestran los mapas de correlación 2D obtenidos experimentalmente para distintas fases del campo magnético reconstruido. De acuerdo con estos mapas, los máximos valores de correlación aparecen en la [Figura 4.8g](#). No obstante, este mapa no es el que mejor delimita el área de la inclusión. Por el contrario, fases de campo anteriores ([Figuras 4.8d y 4.8e](#)), cuyos valores de correlación son menores, presentan una mayor contraste entre los puntos de dentro de la inclusión y los puntos de fuera.



**Figura 4.8** Mapas 2D de correlación de la imagen mmUS para diferentes fases del campo magnético reconstruido.

En la [Figura 4.9](#) se observa con mayor claridad la mejora en resolución alcanzada al considerar la imagen obtenida al 85% del máximo de correlación. Mientras que en la [Figura 4.9b](#), la diferencia de señal mmPA dentro y fuera de la inclusión es menor de 0,08; en la [Figura 4.9e](#), los puntos internos de la inclusión oscilan con una correlación de 0,75 y los puntos externos a ella lo hacen con correlaciones que rondan valores de 0,5-0,6. De acuerdo con las [Figuras 4.9c y f](#), el rango de correlación necesario para definir con una precisión razonable el área de la inclusión pasa de ser 0,08 a 0,15 al utilizar esta nueva aproximación.



**Figura 4.9** (a y d) Imagen por US del patrón de gelatina con una inclusión de NPM (indicado por la línea blanca discontinua). Mapas de correlación entre las oscilaciones registradas y la función de correlación en situaciones de (b y c) máxima correlación y (e y f) al 85% de la máxima correlación.

Por tanto, aunque pueda resultar poco intuitivo, la reconstrucción del campo magnético en fases previas al máximo de correlación permite definir el área de la inclusión en imagen mmPA con una escala dos veces más amplia y reducir de este modo el grado de subjetividad de la técnica. Disminuir el carácter subjetivo de la técnica resulta crucial cuando se desea detectar regiones cuya posición y volumen son desconocidos.

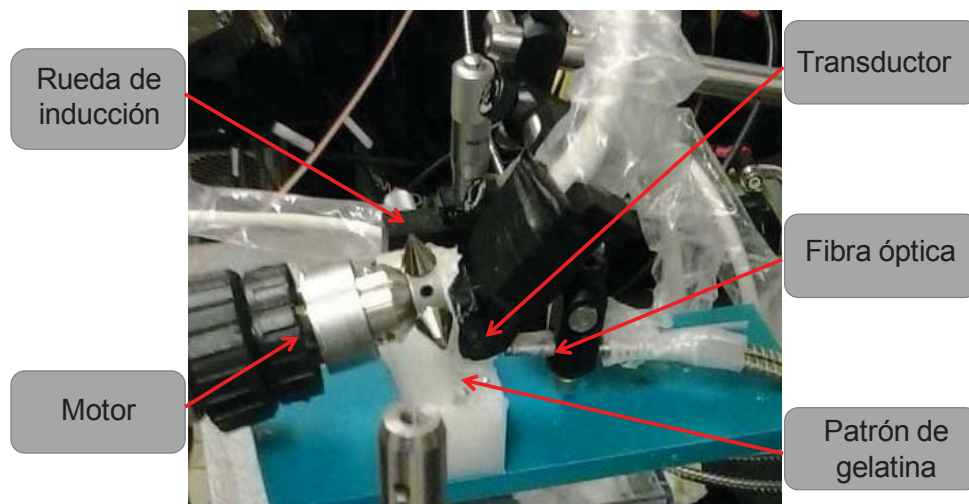
#### 4.3.1.c Sistema alternativo de inducción de gradiente magnético alterno

En tercer lugar se propuso un sistema alternativo para la generación del gradiente magnético pulsado. Por lo general, para generar un gradiente magnético alterno de alta intensidad, se emplean bobinas refrigeradas alimentadas por una fuente de corriente. El uso de bobinas en imagen mmPA presenta 4 limitaciones tecnológicas principalmente:

- Requieren un sistema de refrigeración para su funcionamiento en continuo.
- El tamaño y el peso de las bobinas suele ser elevado.
- Se emplean corrientes eléctricas de alta intensidad.
- La impedancia de la bobina crece con la frecuencia, lo que obliga a utilizar frecuencias por debajo de los 20 Hz.

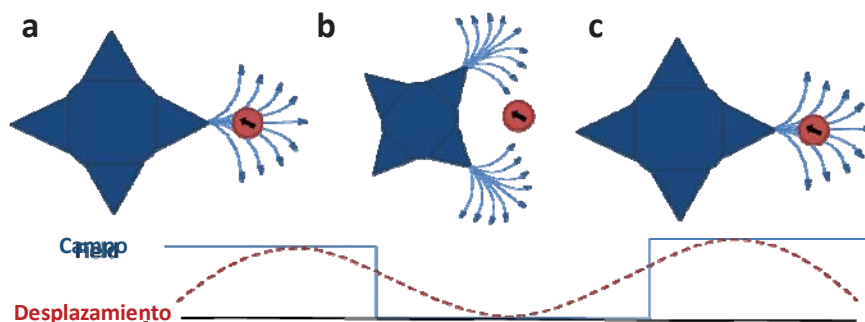
Estas limitaciones dificultan la incorporación de la técnica magneto-motriz a un sistema de imagen PA comercial sencillo y compacto. Además, a nivel experimental, la cuarta limitación mencionada supone una importante desventaja, ya que si se aumenta la frecuencia del campo aplicado se pueden filtrar oscilaciones asociadas al pulso sanguíneo o al sistema respiratorio, mejorando así la relación señal-ruido de las imágenes mmPA<sup>40</sup>.

Por este motivo se intentó desarrollar un sistema alternativo de inducción del gradiente magnético basado en imanes permanentes de NdFeB con geometría cónica como el que aparece en la [Figura 4.10](#). Para generar la alternancia del gradiente magnético, se adhirieron a una rueda de acero 4 imanes cónicos separados 90° entre sí y se acopló esta rueda a un motor de velocidad regulable. Además, para aislar la muestra de las posibles vibraciones del motor, el sistema de inducción magnética fue montado en una mesa independiente y se diseñó una cubierta de plástico que aislase los imanes del resto del sistema (no incluida en la figura).



**Figura 4.10** Montaje experimental de inducción de gradiente magnético alterno basado en un sistema rotatorio de imanes permanentes.

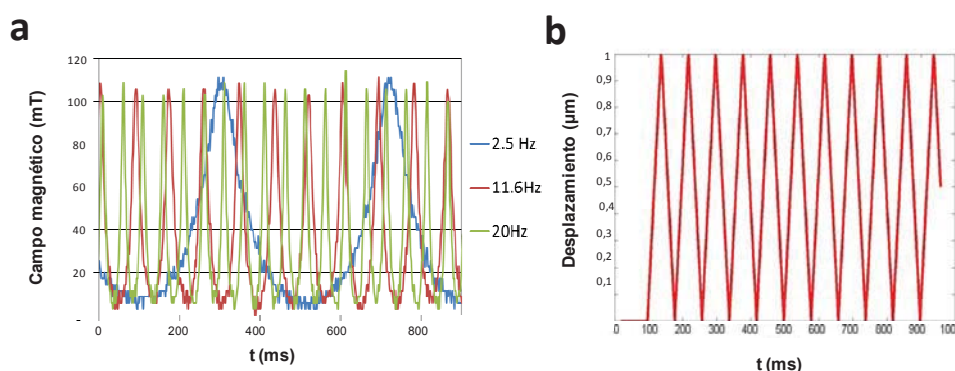
En la [Figura 4.11](#) se explica el funcionamiento del sistema inductor desarrollado. En la posición “a”, cuando la punta del imán se encuentra apuntando hacia las NPM, la fuerza magnética atractiva hace que las NPM se desplacen hacia la punta del imán. Al rotar hasta la posición “b”, el campo magnético desaparece y el sistema recupera elásticamente su posición. Alcanzados los 90° de giro, un segundo imán atrae de nuevo las NPM generando así una oscilación periódica de las NPM.



**Figura 4.11** Esquema del funcionamiento del sistema de gradiente magnético alterno inducido por el sistema rotatorio de imanes permanentes.

En el sistema propuesto, la intensidad del campo aplicado no depende de la frecuencia aplicada. Esto fue comprobado experimentalmente mediante una sonda Hall situada en las proximidades de los imanes durante la rotación de la rueda. La [Figura 4.12a](#) muestra los valores del campo registrado para frecuencias desde 2,5 hasta 20 Hz. El valor máximo alcanzado es de aproximadamente 120 mT para todas las frecuencias evaluadas.

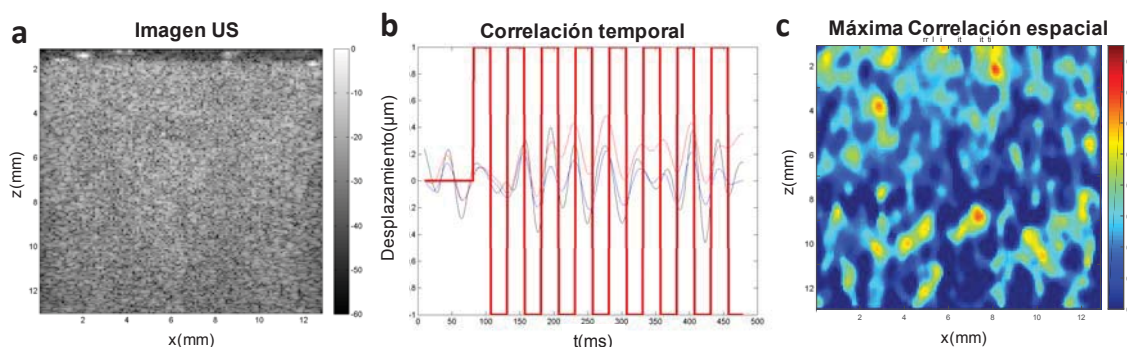
Tal y como muestra la señal registrada, la forma del campo inducido respecto al tiempo es muy diferente al de la señal sinusoidal típica de un electroimán. Por este motivo, para reconstruir la forma del campo aplicado, se utilizó una función de correlación triangular como la mostrada en la [Figura 4.12b](#).



**Figura 4.12** (a) Señal de campo magnético registrada en las proximidades de los imanes a diferentes velocidades de rotación. (b) Señal de correlación empleada en el post-tratamiento de la imagen mmPA.

La efectividad de este sistema de generación de campo fue evaluado mediante patrones de gelatina similares a los utilizados en apartados anteriores. La [Figura 4.13](#) muestra la

imagen de US del patrón utilizado junto con las oscilaciones registradas en diferentes puntos de la imagen y el mapa de correlación obtenido en la imagen mmPA.



**Figura 4.13** (a) Patrón de gelatina utilizado para el sistema de inducción magnético basado en imanes permanentes. (b) Oscilaciones verticales registradas mediante rastreo de puntos referenciales. (c) Mapa de correlación obtenido para los movimientos registrados.

Como se observa en la [Figura 4.13b](#), el movimiento registrado en este caso, no resulta estar correlacionado con el campo aplicado. A consecuencia de ello, el mapa de correlación que muestra la [Figura 4.13c](#) no es capaz de reproducir la geometría de la inclusión.

Esto puede ser debido a dos motivos, el primero es que el campo generado por los imanes cónicos, decrece rápidamente a medida que nos alejamos de la punta del imán. Por tanto, una separación de varios milímetros entre la inclusión y la punta de los imanes supone una gran reducción del campo aplicado. En segundo lugar, la [Figura 4.12a](#) muestra que en este sistema, el campo aplicado es máximo durante una fracción de tiempo mucho menor que en el caso de una señal sinusoidal. Medios viscosos como la gelatina utilizada en los patrones, requieren que la fuerza magnética inducida sea aplicada durante un periodo de tiempo prolongado para poder vencer la respuesta elástica del medio y generar de este modo una oscilación detectable en la inclusión.

Algunas aproximaciones aún por explorar para vencer estas limitaciones, consisten en utilizar imanes cúbicos o cilíndricos en lugar de imanes cónicos. Este tipo de imanes, presentan una superficie plana en la región próxima a la muestra, lo que hace que el campo generado alcance mayores distancias de penetración y resulte máximo más tiempo durante la rotación.

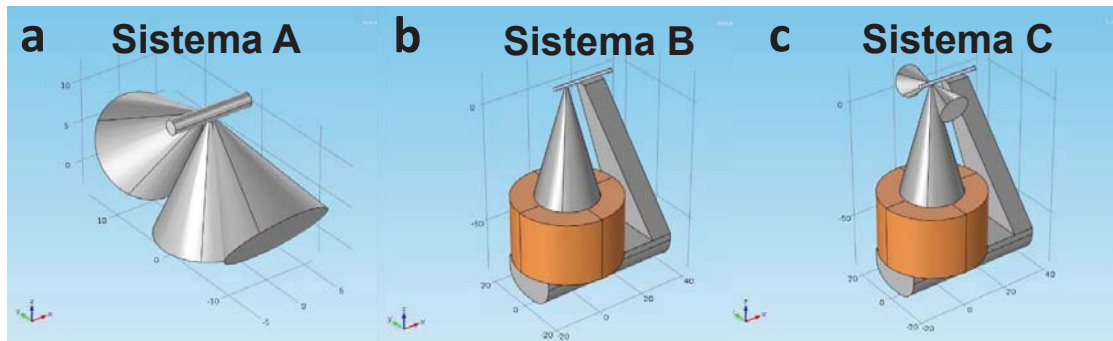
### 4.3.2 Captura y detección de células tumorales circulantes

Además de la mejora de la imagen mmPA, se llevaron a cabo estudios de detección de CTC mediante imagen PA. La componente magnética de los agentes de contraste magneto-plasmónicos se utilizó en este caso para concentrar las células tumorales dentro de la región de detección.

#### 4.3.2.a Simulación de campos magnéticos inducidos mediante elementos finitos

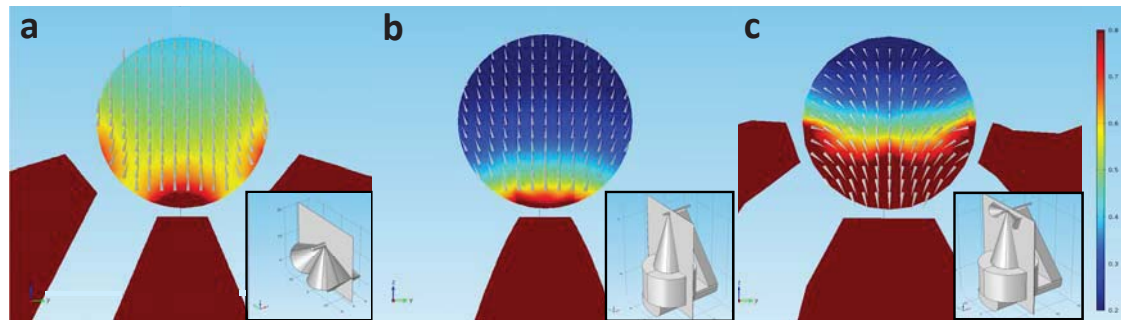
En el estudio de captación magnética de CTC, se emplearon tres sistemas de generación de gradiente de campo como los que aparecen en la [Figura 4.14](#): Una unión de 3 imanes de Neodimio-Hierro-Boro con geometría cónica (sistema A), un electroimán con núcleo de Fe terminado también en forma cónica (sistema B) y una combinación de ambos (sistema C).

Como se indicó con anterioridad, las dimensiones de los sistemas empleados impidieron la medida experimental del campo magnético generado por cada uno, por lo que la intensidad y la geometría del campo magnético en estos sistemas fueron estudiadas mediante simulaciones FEM.



**Figura 4.14** *Sistemas de inducción del gradiente magnético utilizados en la detección de CTC con imagen PA.*

La [Figura 4.15a](#) muestra la distribución de campo magnético inducido en una sección transversal del capilar por cada uno de los sistemas de captación. La intensidad del campo magnético es representada con un gradiente de colores que va de azul (0,2 T) a granate (0,8 T), y la dirección del campo magnético contenido en el plano mediante conos grises cuyo vértice apunta en la dirección del campo. Junto a cada figura se incluye un recuadro con una reproducción tridimensional del sistema correspondiente y la sección transversal analizada.

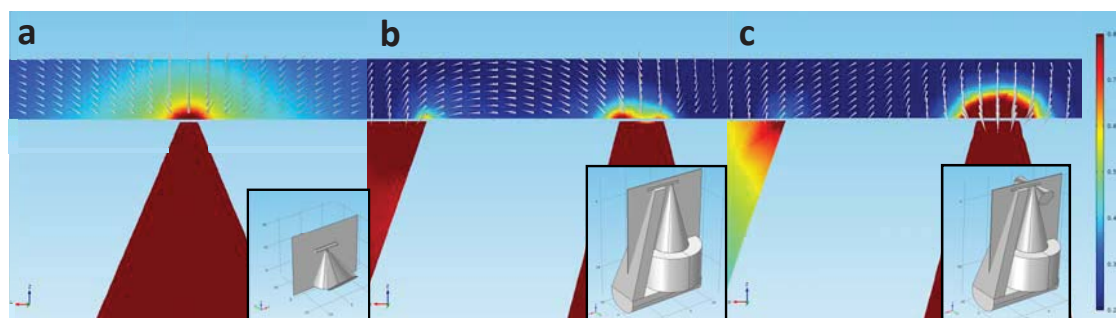


**Figura 4.15** (a) Intensidad del campo magnético calculado mediante simulaciones FEM en la sección transversal (Z-Y) del capilar en: (a) sistema A, (b) sistema B y (c) sistema C. Los conos grises indican la componente de campo contenida en el plano.

En el Sistema A, el campo magnético inducido presenta 3 máximos de campo magnético en las regiones más próximas a las puntas de los imanes. El campo generado en el capilar llega hasta los 0,9 T. Atendiendo a la dirección y sentido de los conos representados, se observa que las líneas de campo magnético que emanan de la punta de los imanes se confinan en el centro del capilar y suben verticalmente. La combinación de los tres imanes evita que las líneas de campo se dispersen y maximiza el campo inducido en el interior del capilar. En el sistema B, por el contrario, las líneas de campo se separan y el campo magnético decrece rápidamente al alejarse de la punta del electroimán. El máximo valor de campo registrado en el capilar en este caso es de 0,8 T.

En el sistema C, las líneas de campo quedan atrapadas entre las puntas de los imanes y el núcleo de Fe del electroimán. Este confinamiento de las líneas de campo genera un gradiente cuya máxima intensidad de campo alcanza los 2 T en los espacios que separan el núcleo de Fe del electroimán y los imanes de NdFeB. La distribución de campo en este caso muestra un máximo en la parte inferior del capilar al que acompañan dos regiones con alta intensidad de campo en ambos laterales.

Para analizar cómo se modifica el campo magnético cuando nos alejamos de la región de máxima intensidad, en la [Figura 4.16](#) se representan las secciones longitudinales del capilar en cada uno de los sistemas. Los parámetros empleados para la representación del campo son similares a los de la figura anterior.



**Figura 4.16** Intensidad del campo magnético calculado mediante simulaciones FEM en la sección longitudinal (Z-X) del capilar en: (a) sistema A, (b) sistema B y (c) sistema C. Los conos grises indican la componente de campo contenida en el plano.

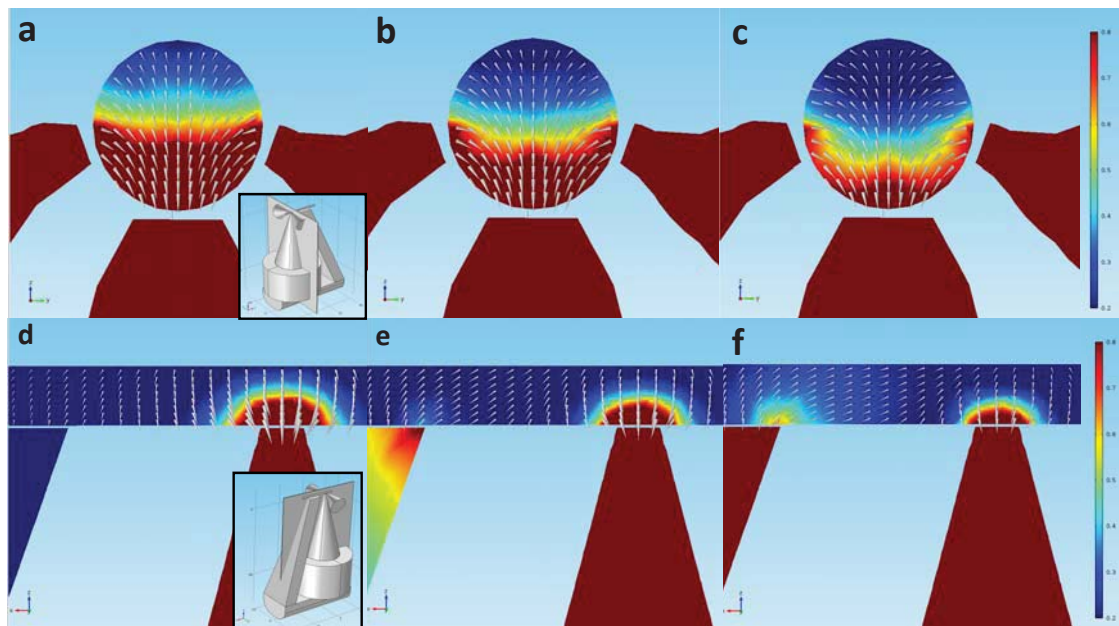
La [Figura 4.16a](#) muestra que la disposición de los imanes en el sistema A no produce un confinamiento del campo inducido en la dirección longitudinal del tubo, lo que produce una rápida atenuación del mismo al separarnos de la sección de máximo campo. En cambio, en el sistema B, las líneas de campo que nacen en el brazo cónico del electroimán atraviesan la dirección longitudinal del capilar y terminan en el brazo opuesto. En este caso, se observa una segunda región de concentración del campo magnético en las proximidades el brazo plano del electroimán. Por último, en el sistema C, las líneas de campo de los imanes permanentes son recogidas por ambos brazos del electroimán, lo que hace que aparezca un gradiente de campo extendido a lo largo del capilar y una región de alta intensidad de campo en la proximidad de los imanes cónicos.

La deslocalización de gradiente magnético presenta ciertas ventajas a la hora de acumular células tumorales. En primer lugar, un gradiente de campo extendido permite disponer de una región más amplia para la acumulación de las CTC y por tanto aumenta el número de células detectables. En segundo lugar, al tratarse de un sistema de flujo, un gradiente extendido aumenta el tiempo de exposición de las NPMPH al campo inducido mejorando la captación de las células, ya que para que queden atrapadas, la fuerza magnética debe vencer a la fuerza de arrastre desacelerando las células hasta su completa detención<sup>61</sup>.

Una ventaja adicional del sistema C, es la posibilidad de modificar la distribución de campo al variar la intensidad de corriente del electroimán. La [Figura 4.17](#) muestra la distribución de campo magnético en los casos extremos del sistema experimental (+7 A, 0 A y -7 A), en el plano transversal (arriba) y en el plano longitudinal (abajo). Al

invertir el sentido de la corriente, las líneas de campo generadas por el electroimán se oponen al campo de los imanes. Esto hace que la intensidad de campo magnético en el capilar se reduzca y la distribución del gradiente magnético se modifique. En las [Figuras 4.17a-c](#), se aprecia cómo el confinamiento de las líneas de campo de la zona superior del capilar se reduce al aplicar corriente negativa y la intensidad de campo en el centro del capilar cae sensiblemente.

El cambio en la distribución de campo resulta aún más evidente en la sección longitudinal del capilar. Como se puede observar en las [Figuras 4.17d-e](#), el campo magnético inducido por la corriente negativa del electroimán hacen que las líneas de campo a lo largo del tubo cambien su sentido y el gradiente de campo se desplace desde la zona puntiaguda del electroimán, hacia el brazo plano de este.



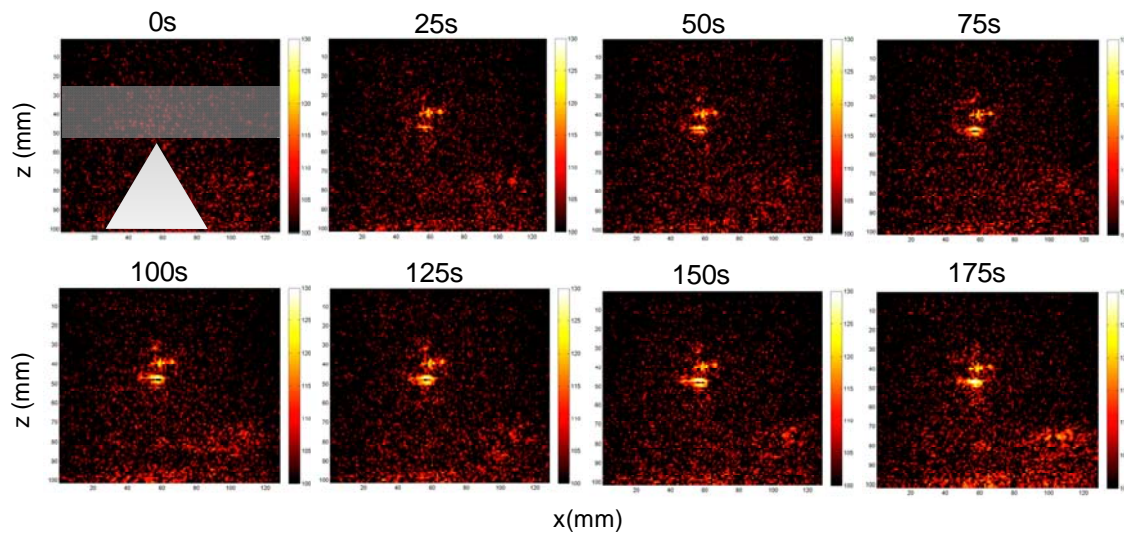
**Figura 4.17** Campo magnético calculado mediante simulaciones FEM en el sistema C al aplicar intensidades de corriente de: (a y d) 7 A, (b y e) 0 A y (c y f) -7 A. La primera y segunda fila muestran las secciones transversal (Z-Y) y longitudinal (Z-X) del capilar, respectivamente.

A la hora de llevar a cabo una detección *in vivo*, esta modificación de la intensidad de campo magnético permite desimanar las NPMPH de las células marcadas antes de que estas sean liberadas al torrente sanguíneo evitando posibles obstrucciones en los capilares más finos.

#### 4.3.2.b Detección fotoacústica de células tumorales circulantes atrapadas magnéticamente

Una vez analizados los campos magnéticos producidos por los distintos sistemas de inducción, se evaluó la señal PA generada por las CTC atrapadas en cada uno de los sistemas.

Para mostrar este proceso de captación, en la [Figura 4.18](#) se recoge una secuencia de imágenes PA de la sección longitudinal del capilar más próxima a los imanes del sistema A durante los primeros 175 s. En la primera imagen de la secuencia se incluyeron polígonos semitransparentes que indican la posición del capilar y los imanes de acuerdo con la imagen de US.



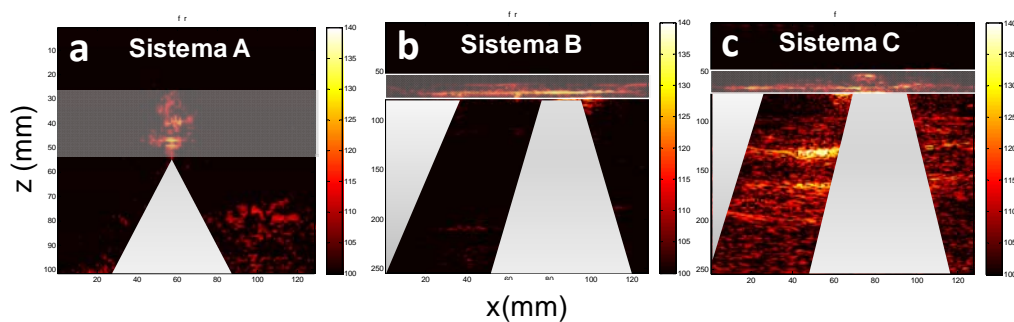
**Figura 4.18** Evolución de la imagen PA de la sección transversal del capilar en el sistema A a lo largo del tiempo.

Analizando esta secuencia de imágenes se puede apreciar cómo, en las proximidades de la punta de los imanes, se produce un aumento de la señal PA que se relaciona con el número de células que van quedando atrapadas a lo largo del tiempo. A los 25 s se pueden distinguir dos pequeñas regiones que destacan sobre el ruido de fondo. Estas regiones de mayor intensidad crecen progresivamente a medida que aumenta el número de células atrapadas hasta alcanzar un valor estable a los 175 s. En el **Vídeo 1** del material suplementario de esta tesis, se puede visualizar el vídeo completo del proceso de captación y detección de las CTC.

Experimentos similares fueron realizados en los sistemas B y C evaluando la señal PA registrada en cada uno de los casos. En la [Figura 4.19a-c](#) aparecen representadas las señales PA obtenidas en los sistemas A, B y C al final del proceso de acumulación magnética. Al igual que en la figura anterior, la posición de los sistemas de acumulación magnética y el capilar aparecen representadas por polígonos semitransparentes.

Podemos observar que la intensidad y la distribución de la señal PA a lo largo del capilar se modifican en función del sistema de captación utilizado. Mientras que el sistema A, genera una acumulación de células en una región localizada, cerca de la punta de los imanes, el sistema B muestra una señal PA distribuida a lo largo de la pared inferior del capilar ([Figura 4.19b](#)) y en el sistema C ([Figura 4.19c](#)) aparecen tanto una distribución de señal en la parte inferior del capilar como una señal más localizada en su parte central del mismo.

Comparando estas distribuciones con las predicciones de campo magnético mostradas en las [Figuras 4.15](#) y [4.16](#), resulta fácil identificar que la distribución de células a lo largo de la sección transversal coincide con las regiones de máximo campo calculadas por las simulaciones.



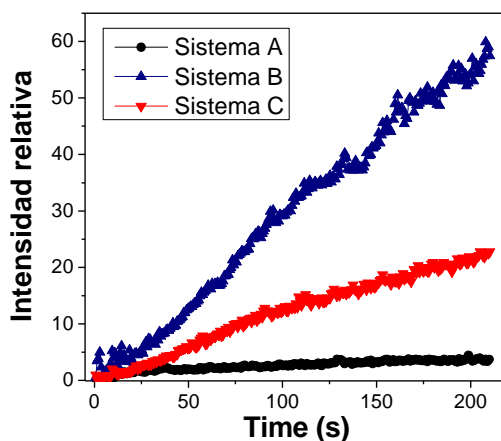
**Figura 4.19** Señal PA de las CTC atrapadas al final del proceso de acumulación en: (a) Sistema A, (b) Sistema B y (c) Sistema C. Las figuras blancas indican la posición del capilar y los sistemas de inducción del gradiente magnético.

En el sistema A, los tres máximos de campo que muestra la [Figura 4.15a](#) se traducen en una señal PA intensa pegada a la pared inferior del capilar y una señal algo más tenue en la parte central de la misma asociada a las células atrapadas en los laterales. La atenuación de la señal producida por las células en los laterales, es debida a que el transductor de US empleado está diseñado para reconstruir una imagen bidimensional del plano inmediatamente inferior a este. Por este motivo, la señal producida por las

NPMPH de las células acumuladas a ambos lados del capilar llega atenuada hasta el transductor y se visualizan con menor intensidad en la imagen PA.

En el sistema B, la [Figura 4.16b](#) muestra que el máximo de campo magnético se extiende entre los dos brazos del electroimán generando una amplia zona de gradiente magnético. Del mismo modo, la señal PA observada en la [Figura 4.19b](#) aparece distribuida a lo largo de la pared inferior del capilar con un máximo de señal de mayor intensidad en el brazo cónico del electroimán y otro de menor intensidad en el brazo plano del mismo.

En el sistema C, la distribución de campo magnético resulta más complicada. En este caso, las líneas de campo de los imanes van a parar tanto al brazo cónico del electroimán, generando un gradiente localizado ([Figura 4.15c](#)), como al brazo plano ([Figura 4.16c](#)), lo que extiende el campo magnético a lo largo de la pared inferior del capilar. Esta distribución de campo resulta coherente con la señal PA observada en la [Figura 4.19c](#). En ella aparece una señal brillante en la zona alta del capilar asociada a los máximos de campo más próximos a los imanes laterales y una distribución de señal en la parte inferior del mismo, asociada a las líneas de campo magnético que se extienden entre los dos brazos del electroimán.



**Figura 4.20** Crecimiento de la intensidad de las señal PA procedente de las CTC capturadas con el tiempo en los sistemas A (negro), B (azul) y C (rojo).

Para realizar un estudio comparativo del incremento de la señal PA, se llevó a cabo una integración de la señal contenida en las áreas correspondientes al interior del capilar según la imagen de US del sistema. En la [Figura 4.20](#) se muestra cómo la señal PA va aumentando con el tiempo a un ritmo diferente para cada uno de los sistemas

estudiados. Puede resultar sorprendente que aunque la intensidad de campo magnético predicha para el sistema C sea superior a la de los otros dos sistemas, sea en el sistema B en el que mayor incremento de señal se observa.

Para entender esta aparente contradicción, debe tenerse en cuenta que aunque el sistema C es capaz de producir un campo magnético de mayor intensidad, el sistema B genera un máximo de campo en la región de detección más sensible del transductor, lo que hace que el número de células detectadas sea mayor. Es decir, el sistema B, aunque genere un campo magnético menor es capaz de situar un mayor número de células en el campo de visión del sistema de detección y producir de esta manera una señal PA 2,5 veces superior.

El pequeño aumento de señal PA registrada en el sistema A debe ser atribuido al tamaño de la región de alto campo magnético. La localidad del campo generado limita el número de células que pueden quedar atrapadas, lo que hace que la señal detectada resulte significativamente menor a la de los otros dos sistemas propuestos.

## 4.4 CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO

En este capítulo se ha demostrado que las NPMPH diseñadas pueden ser empleadas como agentes de contraste en imagen mmPA, alcanzando resoluciones de  $\sim 1$  mm en profundidades un orden de magnitud superior.

Estudiando diferentes aspectos de esta técnica se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- El estudio del desplazamiento inducido en NPM con diferentes composiciones y tamaños mostró la relevancia del momento magnético de la NP a la hora de maximizar su respuesta magneto-motriz de los agentes de contraste.
- En el estudio del post-tratamiento de la imagen mmPA se concluyó que el uso de la fase como parámetro diferencial entre regiones marcadas con agentes de contraste y su entorno, permite reducir la subjetividad de la detección PA de regiones localizadas.
- Sistemas de generación de campo basados en imanes permanentes pueden ofrecer ciertas ventajas tecnológicas frente a los electroimanes. Sin embargo, la penetración del campo y el tiempo de excitación deben ser aún optimizados para que este tipo de sistemas suponga una alternativa competitiva.

Además, el carácter magnético de las NPMPH permitió la concentración y detección de CTC en un sistema mimético de flujo sanguíneo.

Mediante simulaciones por FEM se puede analizar el campo magnético generado por los sistemas de inducción propuestos en este capítulo observando un máximo de intensidad de campo para el sistema mixto de dos imanes permanentes de NdFeB y un electroimán con núcleo de Fe.

En el estudio experimental de la eficiencia de captación magnética, la distribución de campo magnético del sistema compuesto por un electroimán resultó ser la más efectiva para la detección de CTC por imagen PA.

## 4.5 REFERENCIAS

1. Weissleder, R. & Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580–589 (2008).
2. Chapman, S. *et al.* Nanoparticles for cancer imaging: The good, the bad, and the promise. *Nano Today* **8**, 454–460 (2013).
3. Kim, C., Erpelding, T. N., Jankovic, L., Pashley, M. D. & Wang, L. V. Deeply penetrating in vivo photoacoustic imaging using a clinical ultrasound array system. *Biomed. Opt. Express* **1**, 278–284 (2010).
4. Nedosekin, D. A., Galanzha, E. I., Dervishi, E., Biris, A. S. & Zharov, V. P. Super-Resolution Nonlinear Photothermal Microscopy. *Small* **10**, 135–142 (2014).
5. Maslov, K., Zhang, H. F., Hu, S. & Wang, L. V. Optical-resolution photoacoustic microscopy for in vivo imaging of single capillaries. *Opt. Lett.* **33**, 929–31 (2008).
6. Yao, J. & Wang, L. V. Sensitivity of photoacoustic microscopy. *Photoacoustics* **2**, 87–101 (2014).
7. Wang, L., Maslov, K., Wang, L. V & Rakesh Jain, by K. Single-cell label-free photoacoustic flowoxigraphy in vivo. doi:10.1073/pnas.1215578110
8. Xu, M. & Wang, L. V. Photoacoustic imaging in biomedicine. doi:10.1063/1.2195024
9. Bayazitoglu, Y., Kheradmand, S. & Tullius, T. K. An overview of nanoparticle assisted laser therapy. *Int. J. Heat Mass Transf.* **67**, 469–486 (2013).
10. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* (2017). doi:10.1002/WNAN.1449
11. <http://photoacoustic.wikispaces.com>.
12. Caschera, L. *et al.* Contrast agents in diagnostic imaging: Present and future. *Pharmacol. Res.* **110**, 65–75 (2016).
13. Shin, T., Choi, Y., Kim, S. & Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4501–16 (2015).
14. Lee, N., Choi, S. H. & Hyeon, T. Nano-sized CT contrast agents. *Advanced Materials* **25**, 2641–2660 (2013).
15. Cai, W. Bin *et al.* The Optimized Fabrication of Nanobubbles as Ultrasound Contrast Agents for Tumor Imaging. *Sci. Rep.* **5**, 13725 (2015).
16. Wang, Y.-X. J. Current status of superparamagnetic iron oxide contrast agents for liver magnetic resonance imaging. *World J. Gastroenterol.* **21**, 13400–2 (2015).
17. El-Sayed, I. H., Huang, X. H. & El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett.* **5**, 829–834 (2005).

18. Kumar, A. *et al.* Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.058
19. Sperling, R. a & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
20. Cole, A. J., Yang, V. C. & David, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **29**, 323–332 (2011).
21. Weissleder, R. & Pittet, M. J. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature* **452**, 580–9 (2008).
22. Cai, W., Gao, T., Hong, H. & Sun, J. Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol. Sci. Appl.* **1**, 17–32 (2008).
23. Revia, R. A. & Zhang, M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: Recent advances. *Mater. Today* **19**, 157–168 (2015).
24. Perez, J. M., Josephson, L. & Weissleder, R. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *ChemBioChem* **5**, 261–264 (2004).
25. Hillen, F. & Griffioen, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev.* **26**, 489–502 (2007).
26. Frangioni, J. V. New technologies for human cancer imaging. *J. Clin. Oncol.* **26**, 4012–21 (2008).
27. Grootendorst, D. J. *et al.* Evaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (Endorem®) as a photoacoustic contrast agent for intra-operative nodal staging.
28. Bost, W., Lemor, R. & Fournelle, M. Comparison of the optoacoustic signal generation efficiency of different nanoparticulate contrast agents. *Appl. Opt.* **51**, 8041–6 (2012).
29. Wu, D., Huang, L., Jiang, M. S. & Jiang, H. Contrast agents for photoacoustic and thermoacoustic imaging: A review. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 23616–23639 (2014).
30. Link, S., Burda, C., Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. A. Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6152–6163 (2000).
31. Taylor, A. B., Siddiquee, A. M. & Chon, J. W. M. Below melting point photothermal reshaping of single gold nanorods driven by surface diffusion. *ACS Nano* **8**, 12071–12079 (2014).
32. Chang, S.-S., Shih, C.-W., Chen, C.-D., Lai, W.-C. & Wang, C. R. C. The Shape Transition of Gold Nanorods. *Langmuir* **15**, 701–709 (1998).
33. Albrecht, W. *et al.* Single Particle Deformation and Analysis of Silica-Coated Gold Nanorods before and after Femtosecond Laser Pulse Excitation. *Nano Lett.* **16**, 1818–1825 (2016).
34. Chen, Y.-S. *et al.* Enhanced thermal stability of silica-coated gold nanorods for

- photoacoustic imaging and image-guided therapy. *Opt. Express* **18**, 8867 (2010).
35. Chen, L.-C. *et al.* Enhanced photoacoustic stability of gold nanorods by silica matrix confinement. *J. Biomed. Opt.* **15**, 16010 (2012).
  36. Weitz, E. A., Lewandowski, C., Smolensky, E. D., Marjańska, M. & Pierre, V. C. A magnetoplasmonic imaging agent for copper(I) with dual response by MRI and dark field microscopy. *ACS Nano* **7**, 5842–9 (2013).
  37. Nebelung, S. *et al.* Quantitative OCT and MRI biomarkers for the differentiation of cartilage degeneration. *Skeletal Radiol.* **45**, 505–516 (2016).
  38. Jiang, J. *et al.* Bifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Ag heterodimer nanoparticles for two-photon fluorescence imaging and magnetic manipulation. *Adv. Mater.* **20**, 4403–4407 (2008).
  39. Wei, C. *et al.* Magnetomotive photoacoustic imaging: in vitro studies of magnetic trapping with simultaneous photoacoustic detection of rare circulating tumor cells. **522**, 513–522 (2013).
  40. Li, J. *et al.* Magneto-optical nanoparticles for cyclic magnetomotive photoacoustic imaging. *ACS Nano* **9**, 1964–1976 (2015).
  41. John, R. & Boppart, S. A. Magnetomotive molecular nanoprobe. *Curr. Med. Chem.* **18**, 2103–14 (2011).
  42. Shin, T., Choi, Y., Kim, S. & Cheon, J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4501–4516 (2015).
  43. Wei, Q. *et al.* Gyromagnetic Imaging: Dynamic Optical Contrast Using Gold Nanostars with Magnetic Cores Gyromagnetic Imaging: Dynamic Optical Contrast Using Gold Nanostars with Magnetic Cores. 9728–9734 (2009).
  44. Song, H. M., Wei, Q., Ong, Q. K. & Wei, A. Plasmon-resonant nanoparticles and nanostars with magnetic cores: Synthesis and magnetomotive imaging. *ACS Nano* **4**, 5163–5173 (2010).
  45. Oldenburg, A. L., Gunther, J. R. & Boppart, S. a. Imaging magnetically labeled cells with magnetomotive optical coherence tomography. *Opt. Lett.* **30**, 747–749 (2005).
  46. Oh, J. *et al.* Detection of magnetic nanoparticles in tissue using magneto-motive ultrasound. *Nanotechnology* **17**, 4183–4190 (2006).
  47. Mehrmohammadi, M. *et al.* Imaging of iron oxide nanoparticles using magneto-motive ultrasound. in *Proceedings - IEEE Ultrasonics Symposium* 652–655 (2007). doi:10.1109/ULTSYM.2007.169
  48. Galanzha, E. I. & Zharov, V. P. Circulating Tumor Cell Detection and Capture by Photoacoustic Flow Cytometry in Vivo and ex Vivo. *Cancers (Basel)*. **5**, 1691–738 (2013).
  49. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *n engl j med* **3518351**, 781–91 (2004).
  50. Karakousis, G., Yang, R. & Xu, X. Circulating Melanoma Cells as a Predictive

- Biomarker. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1460–1462 (2013).
51. Choon, T. A. Hematology & Medical Oncology Clinical Utility of Circulating Tumor Cells – A Clinician’s Current View. *Hematol Med Oncol* **2**, 1–9 (2017).
  52. Weight, R. M., Dale, P. S. & Viator, J. A. Detection of circulating melanoma cells in human blood using photoacoustic flowmetry. in *2009 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* 106–109 (IEEE, 2009). doi:10.1109/IEMBS.2009.5335145
  53. Zharov, V. P., Galanzha, E. I., Shashkov, E. V., Khlebtsov, N. G. & Tuchin, V. V. In vivo photoacoustic flow cytometry for monitoring of circulating single cancer cells and contrast agents. *Opt. Lett.* **31**, 3623 (2006).
  54. Nima, Z. A. *et al.* Circulating tumor cell identification by functionalized silver-gold nanorods with multicolor, super-enhanced SERS and photothermal resonances. *Sci. Rep.* **4**, 4752 (2015).
  55. Oraevsky, A. A., Karabutov, A. A. & Savateeva, E. V. Enhancement of photoacoustic tissue contrast with absorbing nanoparticles. in *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering* **4434**, 60–69 (2001).
  56. O’Brien, C. M. *et al.* Capture of circulating tumor cells using photoacoustic flowmetry and two phase flow. *J. Biomed. Opt.* **17**, 61221 (2012).
  57. Galanzha, E. I. *et al.* In vivo acoustic and photoacoustic focusing of circulating cells. *Sci. Rep.* **6**, 21531 (2016).
  58. Galanzha, E. I. *et al.* In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 855–860 (2009).
  59. Hu, X. *et al.* Trapping and photoacoustic detection of CTCs at the single cell per milliliter level with magneto-optical coupled nanoparticles. *Small* **9**, 2046–2052 (2013).
  60. O’Donnell, M., Skovoroda, A. R., Shapo, B. M. & Emelianov, S. Y. Internal displacement and strain imaging using ultrasonic speckle tracking. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **41**, 314–325 (1994).
  61. Wei, C. wei *et al.* Magnetomotive photoacoustic imaging: In vitro studies of magnetic trapping with simultaneous photoacoustic detection of rare circulating tumor cells. *J. Biophotonics* **6**, 513–522 (2013).



# Capítulo V

**Tratamiento  
Magneto-Plasmónico  
de Células Tumoraes**



## 5.1 INTRODUCCIÓN

### 5.1.1 Procesos de disipación de calor en nanopartículas magnéticas

#### 5.1.1.a Modelos de respuesta magnética dinámica

Como se indicó en el capítulo de introducción, las NPM que presentan un comportamiento superparamagnético en régimen cuasiestático pueden pasar a tener un comportamiento ferromagnético si la frecuencia del campo de excitación ( $\omega$ ) supera su tiempo de relajación. Por este motivo, las NPM pueden ser utilizadas como nanoagentes para la generación de calor en la nanoescala si son sometidas a un campo magnético alterno de alta frecuencia ( $H_{AC}$ ).

Para cuantificar de manera empírica la potencia de calor transmitida al medio por las NPM, se utiliza comúnmente un parámetro conocido como ritmo de absorción específica (SAR). Este factor viene definido por la [Ecuación 5.1](#), en la que se multiplica el aumento de temperatura registrado en un tiempo determinado por la capacidad calorífica del medio ( $C_{V,H_2O}=4,19 \text{ J g}^{-1}\text{°C}^{-1}$ ) y se divide por la masa de las NPM ( $m_{NPM}$ ).

$$SAR = \frac{C_V \Delta T}{m_{NPM} \Delta t} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

La energía absorbida por el medio coincidirá con la cantidad de potencia disipada por las NPM en los procesos de histéresis a alta frecuencia, siempre que el sistema sea adiabático y la transferencia de calor al medio en que se encuentran dispersas sea total. Por tanto, conociendo el área de los ciclos de histéresis M-H dinámicos ( $A_{M-H}$ ) es posible conocer el poder de calentamiento de las NPM para diferentes condiciones de campo y frecuencia. El valor del SAR y el de  $A_{M-H}$  pueden ser relacionados a partir de la frecuencia, según la [Ecuación 1.2](#) que se dedujo en el capítulo 1.

No obstante, a la hora de estudiar las ecuaciones teóricas que determinan la respuesta dinámica de la magnetización, solamente se ha conseguido obtener una solución analítica de las ecuaciones en los casos en los que el  $H_{AC}$  es pequeño ( $\mu_0 H_{AC} < K_B T / M_S V$ ) y la magnetización presenta una respuesta lineal con el campo (modelo de respuesta lineal); así como en los que  $T = 0 \text{ K}$  (lo que es equivalente a  $\omega = \infty$ ), en cuyo caso las NPM se encuentran completamente bloqueadas (modelo de Stoner-Wolfram). En el resto de condiciones, el comportamiento dinámico de los momentos magnéticos debe ser simulado mediante métodos de cálculo numérico<sup>1</sup>.

### 5.1.1.b Modelo de respuesta lineal

El trabajo seminal de Rosensweig<sup>2</sup> asienta las bases de los posteriores modelos de respuesta lineal<sup>3,4</sup>. En este trabajo, se calcula la relación entre la imanación y el campo aplicado a partir de una función compleja de la susceptibilidad ( $\chi$ ) que depende de  $\omega$  según se expresa en la [Ecuación 5.2b](#).

$$M = \chi(\omega)H \quad \text{Ecuación 5.2a}$$

$$\chi(\omega) = \chi_0 \frac{1}{1+i\omega\tau} \quad \text{Ecuación 5.2b}$$

La susceptibilidad compleja del modelo se define a partir del valor real de la susceptibilidad en régimen cuasiestático ( $\chi_0 = \mu_0 M_S^2 V / K_B T$ ) y el tiempo de relajación Néel-Brown del sistema ( $\tau$ ) ([Ecuación 1.7](#)).

Partiendo de esta expresión, la [Ecuación 5.3b](#) muestra el valor de magnetización de un sistema de NPM cuando se las somete a un  $H_{AC}$  cosenoidal con un valor máximo de campo  $H_{MÁX}$ .

$$H(\omega) = H_{MÁX} \cos(\omega t) \quad \text{Ecuación 5.3a}$$

$$M(\omega) = |\chi| H_{MÁX} \cos(\omega t + \varphi) \quad \text{Ecuación 5.3b}$$

Donde  $\varphi$  es el desfase que se produce entre el campo aplicado y la magnetización del sistema; y  $|\chi|$  es un prefactor que depende de  $\omega$ . Los valores de estos dos parámetros aparecen recogidos en las [Ecuaciones 5.4a y b](#) respectivamente.

$$\text{sen}(\varphi(\omega)) = \frac{\omega\tau}{\sqrt{1+(\omega\tau)^2}} \quad \text{Ecuación 5.4a}$$

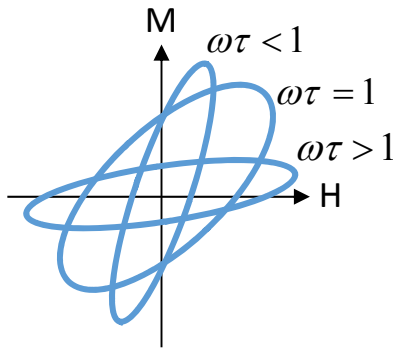
$$|\chi(\omega)| = \frac{\chi_0}{\sqrt{1+(\omega\tau)^2}} \quad \text{Ecuación 5.4b}$$

De las expresiones deducidas para M y H se desprende que los ciclos M-H predichos por el modelo de respuesta lineal adquieren una forma elipsoidal como la que se muestra en la [Figura 5.1a](#). El área de estos ciclos se puede calcular a partir del tamaño de sus ejes (módulos de M y H), lo que da como resultado el área expresada por la [Ecuación 5.5](#).

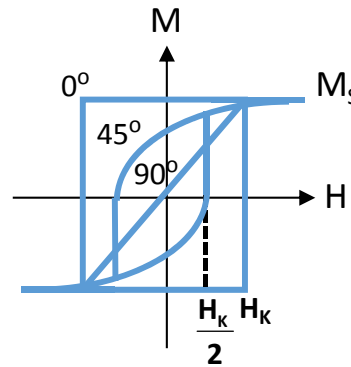
$$A_{M-H} = \pi|\chi|H_{MAX}^2 \text{sen}(\varphi) = \pi H_{MAX}^2 \chi_0 \frac{\omega\tau}{1+(\omega\tau)^2} \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Podemos observar que el cálculo del área según el modelo lineal presenta una expresión similar a la de un oscilador armónico. Según esta expresión, el máximo de absorción de energía se produce cuando los momentos magnéticos se invierten en su frecuencia de resonancia ( $\omega_R$ ). Es decir, según este modelo, el calor disipado en cada ciclo será máximo cuando la frecuencia del campo aplicado coincida con la inversa del tiempo de relajación ( $\omega_R\tau=1$ ). En la resonancia, el desfase entre H y M es  $\varphi=\pi/2$ , valor en el que maximiza  $A_{M-H}$  de los ciclos.

**Modelo de respuesta lineal**



**Modelo de Stoner-Wohlfarth**



**Figura 5.1** Esquema de los ciclos de histéresis M-H de alta frecuencia predichos por los modelos de respuesta lineal y de Stoner-Wohlfarth.

**5.1.1.c Modelo de Stoner-Wohlfarth**

La segunda familia de modelos utilizados para explicar la dinámica de los momentos magnéticos en alta frecuencia son los basados en el modelo de Stoner-Wohlfarth. Estos modelos consideran que el momento magnético de las NPM se encuentra completamente bloqueado, y por tanto la inversión de la magnetización solamente tiene lugar cuando el campo aplicado supera el campo de anisotropía ( $H_K$ ) de la NPM. Esto da lugar a ciclos como los que muestra la [Figura 5.1b](#): cuadrados si el campo se aplica paralelo al eje de fácil imanación ( $\phi=0^\circ$ ) y lineales el campo es aplicado en perpendicular ( $\phi=90^\circ$ ). Cuando se considera un ordenamiento aleatorio de los ejes – como suele ocurrir en los coloides de NPM– la coercitividad del sistema es  $H_C= 0,48 H_K$ , lo que resulta muy similar a suponer que todos los ejes están orientados a  $\phi=45^\circ$  ( $H_C=H_K/2$ )<sup>1</sup>. El área de los ciclos de histéresis de cada uno de estos casos aparece expresada en las [Ecuaciones 5.6 a, b y c](#)<sup>1</sup>.

$$A_{M-H}(\phi = 0) = 4\mu_0 H_K M_S = 8K_{eff} \quad \text{Ecuación 5.6a}$$

$$A_{M-H}(\phi = \text{aleatorio}) = 1,92 K_{eff} \quad \text{Ecuación 5.6b}$$

$$A_{M-H}(\phi = 90) = 0 \quad \text{Ecuación 5.6c}$$

Para extender esta idea a sistemas con cierta agitación térmica y frecuencias reales, se parte de un sistema biestable cuyos estados se encuentran separados por una barrera de anisotropía variable. De esta manera, los procesos de relajación térmica son introducidos como: una reducción de la barrera de anisotropía<sup>5</sup>, un proceso de resonancia con el tiempo de medida<sup>6</sup> o una reducción progresiva del valor de la coercitividad de los ciclos de histéresis en función de la temperatura y la frecuencia de medida<sup>7,8</sup>, entre otros. La validez de los métodos numéricos utilizados para implementar la excitación térmica en las ecuaciones, queda restringida a los procesos de inversión de la imanación cercanos a las condiciones de saturación. En un sistema de ejes desordenados, este criterio se cumple cuando  $H_{MAX} > H_C/0,48$ .

#### **5.1.1.d Cancelación de calentamiento Browniano**

Tanto los modelos de respuesta lineal como los basados en el modelo de Stoner-Wolhfarth, parten de la suposición de que los ejes de anisotropía de las NPM permanecen inmóviles durante los procesos de magnetización. Sin embargo, en el caso de NPM en medio líquido, los procesos de inversión de la imanación no se reducen a la relajación Néel, sino que la energía magnética puede relajarse mediante la rotación de los ejes de anisotropía (rotación Browniana).

En este segundo mecanismo de relajación de la energía magnética, el desfase entre el campo aplicado y la imanación de las NPM se produce como consecuencia de la viscosidad del medio. De este modo, los procesos de disipación de calor están relacionados con la fricción mecánica entre la superficie de las NPM y el medio que lo rodea. Incluir este método de relajación en los modelos de magnetización dinámica incrementa significativamente la complejidad de las ecuaciones<sup>9,10</sup> y en muchas ocasiones restringe su campo de validez a valores de  $H_{MAX}$  pequeños<sup>11</sup>. Una de las principales diferencias con los modelos de respuesta lineal, es que en este tipo de aproximaciones aparecen dos frecuencias en las que la disipación se maximiza, una asociada a la rotación Néel y otra al alineamiento de los ejes de anisotropía con la dirección de campo aplicado<sup>12</sup>.

En el medio celular, la alta viscosidad del medio y los enlaces que forman las NPM con las biomoléculas hacen que las NPM vean bloqueada su rotación Browniana en la mayoría de los casos<sup>13,14</sup>. Por tanto, a la hora de analizar el comportamiento dinámico de las nanoestructuras magnéticas, debe tenerse en cuenta que este mecanismo de calentamiento puede verse condicionado en entornos biológicos.

### 5.1.1.e Efectos de las interacciones dipolares en la disipación de calor

Otro factor obviado por los modelos expuestos hasta el momento, es el efecto que tienen las interacciones dipolares en la respuesta dinámica de las NPM. El carácter superparamagnético de las NPM y la distancia que introducen los surfactantes que las recubren, permiten obviar estos efectos en los casos en que la concentración de NPM sea baja o la separación entre ellas se garantice mediante espaciadores no magnéticos.

Sin embargo, la proximidad entre NPM puede aumentar significativamente cuando son dispersadas en un medio en el que su estabilidad se ve comprometida, como es el caso de la internalización celular a través de endosomas. En este caso, las interacciones dipolares deben ser tenidas en cuenta a la hora de evaluar las NPM como agentes biológicos.

Como se observó en el **Capítulo 3**, estas interacciones juegan un papel especialmente relevante en el comportamiento de las NPMPH. Experimentalmente, se ha observado que estas interacciones dipolares pueden favorecer<sup>15-18</sup> o perjudicar<sup>19-22</sup> los procesos de disipación de calor de las NPM. Un caso paradigmático es el de los magnetosomas producidos por las bacterias magnetotácticas (magnetotactic bacteria)<sup>23</sup>. Estas bacterias poseen una cadena de nanopartículas cúbicas de óxido de Fe ensambladas por ligandos orgánicos que les sirven como “brújula” de orientación con el campo magnético terrestre. La alta anisotropía magnetocristalina de las NPM cúbicas junto con el alineamiento de los ejes en la cadena de NPM consigue que estos sistemas hayan ocupado el pódium de los nanocalentadores magnéticos durante mucho tiempo<sup>24</sup>.

Por el contrario, las interacciones dipolares parecen ser también uno de los factores responsables de la reducción del SAR en una amplia variedad de sistemas coloidales magnéticos cuando estos son forzados a agregarse de manera desordenada<sup>25</sup>. Esta aparente contradicción queda explicada al considerar la naturaleza anisotrópica de las interacciones dipolares.

Como se explicó en el [Capítulo 1](#), según las simulaciones micromagnéticas un alineamiento de las NPM magnéticas en forma de cadena conlleva un aumento del carácter ferromagnético de los coloides aumentando la coercitividad y la remanencia de su ciclo de histéresis<sup>26</sup>. Una mayor dureza magnética del sistema se traduce en un aumento del  $A_{M-H}$  y consecuentemente una mayor disipación de calor. En cambio, en redes de NPM más compactas, las interacciones dipolares provocan que la coercitividad decaiga a medida que se aumenta la compactibilidad del ensamblado y el  $A_{M-H}$  se vea disminuido<sup>8,26</sup>.

La relevancia de la forma de los agregados de NPM en los procesos de disipación de calor ha sido corroborada también a nivel experimental. En 2015, Natividad y col. aplicaron el efecto magnetizador de las cadenas de NPM para mejorar su poder calefactor, atrapando un grupo de NPM cúbicas de magnetita en una matriz de sílice que aseguraba una disposición lineal de las mismas<sup>27</sup>. Los autores observaron que gracias a este tipo de ensamblados, el calor disipado por las NPM era aproximadamente el doble que el registrado para las NPM recubiertas individualmente. En cambio, Pelegrino y col., usando NPM de características similares, registraron que el SAR se reducía a la mitad en los ensamblados compactos de NPM<sup>20</sup>. Los efectos que tiene el tipo de agregación sobre la forma de los ciclos de histéresis dinámicos fueron estudiados en detalle por Terán y col. a fin de señalar la influencia de estas disposiciones en la respuesta dinámica de las NPM<sup>28</sup>.

Conforme a lo descrito en la bibliografía citada, podemos inferir que las interacciones dipolares pueden potenciar o atenuar el calor disipado mediante hipertermia magnética dependiendo de la disposición relativa de las NPM en los ensamblados.

### 5.1.2 Procesos de disipación de calor en nanopartículas plasmónicas

Un segundo método para la producción de calor mediante NP consiste en excitar los plasmones de superficie de NP metálicas mediante radiación láser de alta intensidad.

En este caso, la energía absorbida por la nube electrónica en la excitación plasmónica es disipada al medio de dispersión en tres etapas. En primer lugar, la aceleración producida por el campo incidente en los electrones de la red genera colisiones electrón-electrón que elevan la temperatura de estos hasta los 1000K. Utilizando espectroscopía de absorción ultrarrápida se ha observado que este proceso ocurre en unos pocos femtosegundos<sup>29</sup>. En una segunda etapa, la interacción electrón-fonón hace que la nube electrónica relaje su energía cinética transmitiéndosela a los iones de la red cristalina. Los procesos de relajación de energía de la nube electrónica se producen en tiempos del orden de los picosegundos<sup>29</sup>. Por último, los fonones generados en la red de las NP son transmitidos al medio que las rodea por contacto. Este proceso puede depender del recubrimiento superficial y la geometría de las NP, pero en términos generales, el tiempo de disipación del calor está en el orden de los cientos de picosegundos<sup>30</sup>. Se ha observado que cuando la energía de los pulsos es alta y la transmisión de fonones al medio no es lo suficientemente rápida como para enfriar la NP, pueden tener lugar procesos de fusión de la red metálica, lo que explicaría parcialmente la pérdida de forma observada en AuNR expuestos a pulsos de luz de alta intensidad<sup>31</sup>. El uso de recubrimientos inorgánicos como la sílice ralentiza los procesos de disipación de calor<sup>32</sup>, lo que evita la formación de burbujas de vapor en el entorno cercano y puede resultar una gran ventaja a la hora de llevar a cabo una transferencia efectiva de la energía térmica al medio.

Como se mencionó en el capítulo anterior, estos procesos de absorción de luz se producen de manera mucho más eficiente en NP con propiedades plasmónicas que en tejidos biológicos, especialmente en la región IR del espectro ([Figura 4.1](#)). Por este motivo, el uso de NP metálicas con alta absorción en el IR cercano permite llevar a cabo el calentamiento selectivo de células cancerígenas incluso en tejidos pertenecientes a órganos internos.

### **5.1.3 Calentamiento local con nanopartículas como tratamiento contra el cáncer**

Los tratamientos terapéuticos basados en la inducción de fiebre (alta temperatura corporal) aparecen ya descritos en papiros egipcios del 3000 a.C.<sup>33</sup>. También Hipócrates describía el factor beneficioso de la fiebre con la siguiente sentencia:

“Quae medicamenta non sanant, ferum sanat. Quae ferum non sanat, ignis sanat. Quae vero ignis non sanat, insanabilia repotari oportet”<sup>34</sup>

“Lo que no curan las medicinas lo cura el hierro (bisturí). Lo que no cura el hierro, lo cura el fuego(calor). Lo que no cura el fuego se debe considerar incurable.”

Sin embargo, fue en 1866 cuando Carl D. W. Busch relacionó por primera vez la elevada temperatura corporal con el tratamiento de tejidos tumorales<sup>35,36</sup>. Busch observó la regresión de un sarcoma facial en una mujer de 43 años a causa de la fiebre inducida por una infección con erisipela. Más tarde, los trabajos de William B. Coley en 1891<sup>37</sup> en los que se estudiaba el efecto de bacterias inyectadas en tumores permitieron aislar la toxina que inducía la fiebre (toxina Coley) y sirvieron de catalizador en el posterior desarrollo del campo durante el siglo XX<sup>38</sup>. En la actualidad, los tratamientos con hipertermia son ampliamente utilizados en los hospitales como complemento a técnicas de quimioterapia y para la estimulación del sistema inmune<sup>39</sup>.

#### **5.1.3.a Calentamiento local mediado por nanopartículas**

La aparición de nuevas tecnologías ha permitido focalizar la generación de calor en los órganos que se desea tratar, reduciendo así los efectos secundarios y aumentando la efectividad del tratamiento. Técnicas como la inyección de agujas, la aplicación de ultrasonidos, las microondas o la radiación infrarroja han sido exitosamente incorporadas a las prácticas clínicas<sup>40,41</sup>. En la actualidad, el desarrollo de la nanotecnología ha permitido que esta administración de calor sea aplicada directamente sobre células tumorales, bien sea en la región extracelular o en el interior de las células<sup>42,43</sup>. El calentamiento local de los tumores con NP supone una mejora en la eficacia del tratamiento<sup>44</sup> y permite aumentar la selectividad del tratamiento reduciendo sus posibles efectos secundarios<sup>45-47</sup>.

En el caso de las NP metálicas, la mejora de las propiedades plasmónicas y las diferentes biofuncionalizaciones han permitido llevar a cabo procesos de calentamiento realmente efectivos<sup>48,49</sup>. Los buenos resultados de los estudios *in vitro* e *in vivo* han conseguido que estas partículas sean empleadas en ensayos clínicos. Desde la aprobación por parte de la FDA del tratamiento piloto AuroLase® basado en nanopartículas núcleo-corteza SiO<sub>2</sub>@Au de 150 nm (NCT00848042, NCT01679470), diferentes modalidades de fototerapia han sido desarrolladas. Un ejemplo de ello es el estudio NANOM FIM, el cual completó con éxito las etapas preclínicas I y II (NCT01270139), mostrando una clara regresión de la arterioesclerosis coronaria en pacientes humanos<sup>50</sup>. El tratamiento de tejidos tumorales con este tipo de NP se restringe actualmente a ensayos preclínicos<sup>51</sup>. Sin embargo, la elevada capacidad calefactora de los mismos augura una pronta implementación al ámbito médico, bien sea como terapia anticancerígena, bien como técnica auxiliar de otras terapias.

Por otra parte, el calentamiento local mediado por NPM también ha sido capaz de obtener importantes resultados en el tratamiento del cáncer. Desde los trabajos pioneros de Gilchrist y col. en 1957<sup>52</sup>, la hipertermia magnética (HTM) ha venido cosechando importantes avances en su camino hacia la terapia clínica. La reciente aprobación de tratamientos de hipertermia en el Charité Hospital de Berlín (Nanotherm<sup>TM</sup> therapy)<sup>53</sup> demuestra la fuerte apuesta de Europa por este tipo de tratamientos. Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos basados en hipertermia magnética para el tratamiento de glioblastomas, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de esófago<sup>54</sup>.

### 5.1.3.b Hipertermia, ablación y daño mecánico

En los tratamientos anticancerígenos basados en calentamiento local con NP, existen dos regímenes de temperatura que pueden producir daño celular<sup>55</sup>. Por un lado, se ha observado que una exposición prolongada a temperaturas en el rango de los 42-45°C puede inducir procesos de muerte celular por apoptosis de las células cancerígenas sin afectar a las células sanas. Esta aproximación, conocida como hipertermia, ha demostrado su eficiencia en la destrucción de células cancerígenas en pruebas *in vitro* e *in vivo*<sup>56</sup>. Sin embargo, existen estudios que sugieren que las células son capaces de revertir los daños celulares tras el tratamiento<sup>57</sup>.

Una modalidad más agresiva es la termo-ablación, esta técnica consiste en el calentamiento extremo de las células cancerígenas hasta temperaturas superiores a los 47 °C. Esta aproximación produce un daño celular de mayor gravedad que se traduce en una desactivación irreversible de las células, sin embargo, en este rango de temperaturas la muerte necrótica de las células libera sustancias citotóxicas en el entorno celular.

Una tercera vía para el tratamiento de células cancerígenas es el daño mecánico mediado por campos magnéticos. Aunque este mecanismo no involucra efectos de disipación de calor, se ha demostrado como una novedosa aproximación al tratamiento del cáncer mediante nanopartículas. Los prometedores trabajos de Novosad y col.<sup>58</sup> con discos de permaloy han producido una intensiva investigación de los procesos de daño mecánico en la nanoescala. Nanopartículas magnéticas con diferentes geometrías (nanoesferas<sup>59</sup>, nanocubos, nanohilos<sup>60</sup>, etc.) han sido analizadas como posibles agentes de actuación mecánica intracelular.

Los campos magnéticos utilizados para dañar mecánicamente a las células cancerígenas pueden clasificarse en dos familias: campos alternos de baja frecuencia y campos continuos rotatorios. Como se indicó anteriormente, cuando las NP son internalizadas en las células la relajación Browniana a alta frecuencia queda bloqueada<sup>61,62</sup>. Sin embargo, se ha observado que usando campos de baja frecuencia y mayor intensidad se puede forzar la rotación de las NPM en los lisosomas<sup>59</sup>. Esta rotación no se traduce en un proceso de disipación de calor sino en un proceso de daño mecánico en la célula<sup>63</sup>. Existe otra posibilidad que consiste en aplicar un campo magnético rotatorio cuyo módulo permanece constante mientras que su dirección se varía a lo largo del tiempo<sup>64,65</sup>. La ventaja de esta segunda modalidad, es que la intensidad el campo no decrece en ningún momento, de modo que las NPM no se desalinean durante el proceso y el campo aplicado genera un torque constante.

Los mecanismos bioquímicos detrás del daño celular producido por la actuación mecánica son aún objeto de discusión. El ataque a la integridad de la membrana celular, la descomposición lisosomal o los daños en el ADN, son algunas de las hipótesis que se contemplan en la actualidad<sup>66,67</sup>. En cualquier caso, el daño mecánico con actuadores nanomagnéticos es considerado actualmente como una estrategia complementaria capaz de contrarrestar los efectos de termorresistencia que se generan en los tratamientos de hipertermia y termoablación<sup>68,69</sup>.

### 5.1.3.c Tratamientos magneto-plasmónicos

La optimización de los nanoagentes calefactores sigue siendo un campo de desarrollo en la actualidad. Estructuras magnéticas como las nanopartículas multinúcleo, los nanocubos o las nanocadenas han demostrado su eficacia en la generación de calor por inducción magnética<sup>70</sup>; mientras que geometrías metálicas tales como nanocilindros, nanoestrellas o nanocortezas han permitido desarrollar en paralelo los procesos de calentamiento mediante radiación infraroja<sup>55</sup>. Sin embargo, la HTM se encuentra limitada por el tamaño máximo permitido para las partículas y la dificultad de generar campos magnéticos lo suficientemente intensos en el interior del cuerpo humano. Por otro lado, la PT, aunque produce un calentamiento mayor, necesita de dosis de radiación laser que puede llegar a dañar los tejidos sanos.

En los últimos años, la combinación de estos dos tipos de estructuras se postula como una nueva modalidad de hipertermia, la hipertermia magneto-plasmónica. Cabe destacar los trabajos del grupo de Wilhelm cuyas experiencias con NPM<sup>71</sup>, liposomas magneto-plasmonicos<sup>72</sup> y NPMPH<sup>73</sup> han supuesto un enorme avance en este campo. La combinación de propiedades magnéticas y respuesta óptica de estos sistemas ha permitido alcanzar valores de SAR superiores a 5000W/g, lo que significa un aumento considerable respecto a los valores obtenidos en sistemas individuales. Sin embargo, el uso de nanoestructuras magnetoplasmonicas todavía requiere un mayor desarrollo para su completa aplicación en ensayos médicos.

### 5.1.4 Suministro dirigido de fármacos: Vectorización de nanoagentes y efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR)

Aunque el control preciso de la temperatura en el entorno de los 42-45°C permite una destrucción selectiva de las células cancerígenas, la eficacia y la selectividad de los tratamientos pueden ser potenciadas aumentando la cantidad de NP en la región tumoral.

Las técnicas utilizadas generalmente para la acumulación de NP en regiones tumorales pueden ser divididas en técnicas activas y pasivas<sup>74</sup>. Las técnicas de acumulación activa consisten en funcionalizar la superficie de las NP con biomoléculas que favorezcan su adhesión e internalización en células tumorales<sup>75</sup>. Para conseguir una acumulación selectiva de las NP en una determinada línea tumoral, deben conocerse los receptores

sobreexpresados en la membrana celular de esta línea e incorporar a la superficie de las NP ligandos que resulten afines a estos receptores. Péptidos, nucleótidos o anticuerpos son algunas de las moléculas empleadas para este propósito<sup>46,47,76,77</sup>.

La aproximación pasiva en cambio, se fundamenta en el efecto de permeabilidad y retención aumentada (EPR)<sup>45,78</sup>. Ha sido ampliamente corroborado a nivel experimental que cuando se inyectan NP con tamaños entorno a 100 nm por vía intravenosa, las NP inyectadas penetran con mayor facilidad en tejidos tumorales, donde tienden a quedar atrapadas. Por este motivo, un ajuste en el tamaño de las NP permite su acumulación pasiva en los tejidos tumorales. Drogas anticancerígenas como los liposomas de doxorubicina (Doxil®/Caelyx®) o el nab-paclitaxel (Abraxane®) son ejemplos comerciales del uso del EPR en tratamientos de tumores por quimioterapia avanzada<sup>79</sup>.

Aunque este efecto presenta aún cierta controversia<sup>80</sup>, su origen es comúnmente atribuido al tamaño de los poros generados en el endotelio de los tejidos tumorales a consecuencia de su rápido crecimiento<sup>81,82</sup>. El endotelio de los tejidos tumorales presenta tamaños entre 100 nm y 780 nm<sup>81</sup> que justifican la mayor permeabilidad de estos tejidos a agentes terapéuticos en el entorno de los 100 nm.

El EPR es uno de los motivos que ha impulsado a múltiples organizaciones<sup>83</sup> a reclamar la revisión de la definición del término nanopartículas propuesta por la Organización internacional de estandarización (ISO)<sup>84</sup>. Autores como Klaessig y col. sugieren que:

*“the term nanoscale [should] have an upper boundary of 1,000 nm for the purpose of food regulations, rather than the ISO and ASTM International determinations that scientific usage is 100 nm.”*<sup>85</sup>

Al igual que Klaessig y col., otros autores consideran las NP con tamaños superiores a 100 nm como agentes válidos para aplicaciones biomédicas<sup>86,87</sup>.

A pesar de que la acumulación pasiva es utilizada actualmente como un método de localización efectivo para la de fármacos, esta aproximación presenta también algunas limitaciones. Por una parte la inhomogeneidad de la vasculatura de los tumores no permite garantizar que las acumulaciones pasivas se lleven a cabo de forma uniforme<sup>88</sup>. Por otra parte, algunos autores señalan que el aumento de la presión intersticial en el tumor frena el acceso de fármacos y reduce la eficiencia de los tratamientos<sup>89,90</sup>.

### 5.1.5 Biofuncionalización de nanopartículas con glicopolímeros

Una reciente revisión bibliográfica llevada a cabo por Kobayashi y col.<sup>91</sup> enumera las condiciones que deben satisfacer las NP inyectadas vía intravenosa para evitar la detección y eliminación por parte del hígado y el sistema retículoendotelial, y de este modo conseguir una correcta acumulación pasiva por EPR en la región tumoral:

- Según los autores, debe controlarse en primer lugar el tamaño de las NP para que estas no aparezcan ante los macrófagos como agentes externos que deban ser fagocitados y eliminados.
- Por otra parte, ha de tenerse en cuenta el tipo de recubrimiento de las NP inyectadas. Debe evitarse la funcionalización con moléculas hidrófobas, ya que cuando este tipo de recubrimiento inducen un proceso de asociación con las proteínas séricas conocido como opsonización que conlleva una rápida detección y metabolización por parte del hígado.
- Por último, los autores señalan que una elevada carga negativa en la superficie de las NP activa la detección de los fagocitos y su eliminación hepática<sup>92</sup>, mientras que una carga superficial positiva puede conllevar la adhesión no específica de las NP hacia tejidos no tumorales<sup>93</sup>.

Teniendo en cuenta todos estos factores, los autores recomiendan el uso de NP con tamaños inferiores a 300 nm, con un recubrimiento hidrosoluble y con carga superficial neutra. Los autores proponen el PEG o las moléculas polisacáridas como ejemplos de recubrimientos que pueden cubrir todos estos requisitos ya que confieren a las NP una estabilidad coloidal basada en la repulsión estérica y no en su carga electrostática; y además presentan un alto grado de solubilidad en dispersiones acuosas. Actualmente, el recubrimiento con PEG es una de las aproximaciones más comunes para la optimización de los procesos de acumulación por EPR<sup>94</sup>.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que aunque parece ampliamente demostrado que el recubrimiento con PEG consigue aumentar significativamente el tiempo medio en circulación en la sangre<sup>95,96</sup>, la baja interacción de los polímeros neutros con las membranas celulares se traduce también en una baja internalización de estas por parte de las células tumorales<sup>97,98</sup>.

Los recubrimientos basados en azúcares, y más concretamente en glicopolímeros, se presenta como una alternativa interesante de recubrimientos neutros e hidrófilos capaces de favorecer la internalización celular. Se denominan como glicopolímeros, las cadenas poliméricas en las que se insertan carbohidratos de diferente naturaleza. A diferencia de los carbohidratos de origen natural (dextrano, goma arábica, etc.), los glicopolímeros sintéticos permiten modificar la longitud de su cadena polimérica y son fácilmente modificados con grupos funcionales que permiten su adhesión a la superficie de las NP<sup>99</sup>. Estas ventajas resultan de gran importancia en su estabilización coloidal, especialmente si se trabaja con NPM. Además, algunos transportadores de azúcares como el GLUT1 o el GLUT3 aparecen sobreexpresados en líneas celulares tumorales<sup>100,101</sup>, lo que favorece la internalización de este tipo de NP en células tumorales y añade un efecto selectivo a estos recubrimientos<sup>102</sup>.

Por tanto, los recubrimientos con glicopolímeros no solamente atribuye a las NPMPH una buena estabilidad coloidal, sino que favorecen los procesos de internalización celular y permiten combinar técnicas de la acumulación pasiva como el EPR con procesos de vectorización activa basados en los receptores de glucosa sobreexpresados en ciertas células tumorales<sup>103,104</sup>.

### 5.1.6 Objetivos del capítulo

En este capítulo se emplearán las NPMPH sintetizadas, en el tratamiento *in vitro* de células de la línea tumoral HeLa. Para ello, se estudiará en primer lugar el poder calefactor de las NPMPH cuando son sometidas a campos magnéticos alternos y cuando son irradiadas con luz IR, comparándolo con el poder calefactor de sus componentes individuales. En segundo lugar, se realizará una funcionalización de las NPMPH con glicopolímeros, estudiando su estabilidad coloidal en medios biológicos y su afinidad hacia receptores de glucosa. Una vez funcionalizadas, se estudiará la interacción de las NPMPH con células cancerígenas del tipo HeLa analizando su internalización y citotoxicidad. Por último, se analizará la eficacia del tratamiento magneto-plasmónico combinado mediante un estudio *in vitro* de viabilidad celular.

## 5.2 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.2.1 Recubrimiento de nanopartículas híbridas con PMAG

Las NPMPH fueron funcionalizadas con un glicopolímero no comercial denominado poli-2-(methacrilamido)glucopiranososa (PMAG) que se ancló en la superficie de las NP a través de una molécula intermedia denominada dopamina metracrilamida (DMA).

#### 5.2.1.a Síntesis del DMA

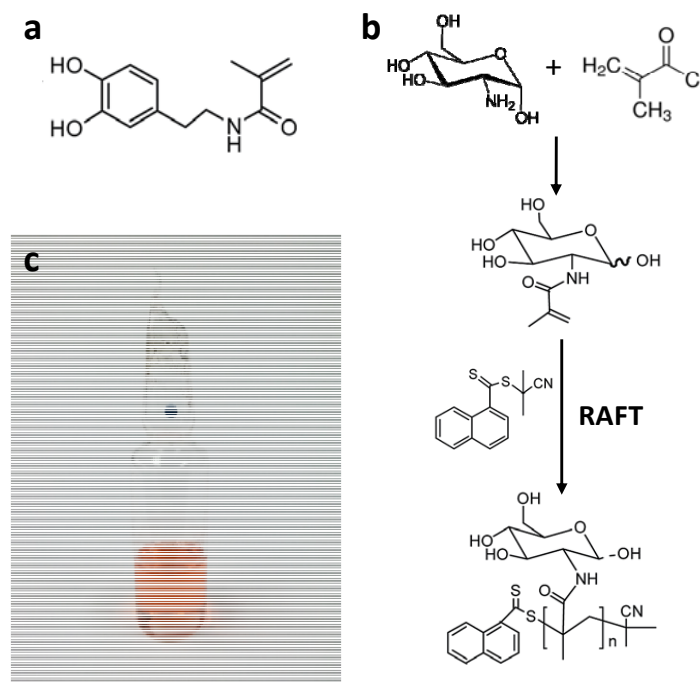
La molécula de DMA fue sintetizada en un volumen de 100 mL de agua destilada sobresaturada con 19 g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_4$  y 4 g de  $\text{NaHCO}_3$  para proteger el grupo dihidroxibenceno. Tras desoxigenar el medio con un burbujeo de  $\text{N}_2$  durante 20 min, se añadieron 3,4 g de dopamina (3,4-dihroxifenilmetilamina) hidrocloreto. Por otra parte, 4,7 mL de metracrilato anhídrido fueron preparados en 25 mL de tetrahidrofurano (THF). Una vez disueltos, la solución de metracrilato fue añadida gota a gota a la solución de dopamina.

Tras ajustar el pH a 8 con NaOH diluido, la disolución fue agitada durante 14 horas con burbujeo permanente de  $\text{N}_2$ . Trascurrido este tiempo, el volumen fue filtrado a vacío y el pH se llevó a 2 mediante una solución de HCl 6M. Se realizó una triple extracción de la fase acuosa mediante una bureta, lavando la fase orgánica con etil acetato. El volumen resultante fue reducido a 25 mL mediante un rotavapor y mezclado con 250 mL de hexano para inducir la formación de los cristales de DMA. Tras 5 horas de crecimiento en un entorno refrigerado, se desechó el medio, se redisolvió los cristales en 25 mL de etil acetato y se volvieron a precipitar con 275 mL de hexano. Finalmente, se realizó una purificación mediante una columna de separación de sílice gel. La pureza del compuesto fue comprobada mediante espectros de resonancia magnética.

#### 5.2.1.b Síntesis del PMAG

La primera etapa de la formación del PMAG fue la síntesis de los monómeros que lo forman, los 2-(methacrilamido)glucopiranososa (MAG). Para sintetizarlos, se mezclaron 10 g de clorhidrato de glucosamina con 6,41 g de carbonato potásico en 250 mL de metanol en un matraz de fondo esférico, agitando vigorosamente. El matraz fue enfriado hasta  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  con un baño de acetona y hielo. Alcanzada esta temperatura, se añadieron

en la disolución 4,36 g de cloruro de metacrililo gota a gota y se mantuvo la agitación durante 30 min. La mezcla se mantuvo agitando durante 3 horas más a temperatura ambiente. Se extrajo la sal precipitada de la mezcla mediante un filtrado por succión y el resto se lavó con metanol. La disolución fue concentrada con un rotavapor y purificada en una columna de cromatografía con un disolvente mezcla de diclorometano y metanol en proporción 4:1.



**Figura 5.2** (a) Esquema de polimerización del PMAG. (b) Ampolla de vidrio sellada para empleada en la síntesis de PMAG. (c) Estructura de la molécula de DMA.

A partir de estos monómeros se formó el PMAG mediante una polimerización por adición fragmentación y transferencia reversible (RAFT), [Figura 5.2b](#). El proceso de polimerización se llevó a cabo mezclando 0,5g de MAG con 10,8 mg de 2-Cianoprop-2-il-a-ditionaftalato (CPDN) en 2 mL de N,N-dimetil formamida (DMF) y usando 0,8 mg de 2,2'-azobis(isobutironitrilo) (AIBN) como iniciador. Para evitar la oxidación del polímero, la mezcla fue purgada burbujando con  $Ar_2$  y sellada en una cápsula de vidrio incluyendo un agitador magnético, como la que se muestra en la [Figura 5.2c](#). Tras 24 horas en un baño térmico a  $70^{\circ}C$ , la reacción fue detenida con agua enfriada con hielo y el soluto fue precipitado en exceso de etanol por adición gota a gota. El PMAG apareció entonces como un precipitado rosa que fue finalmente dializado y liofilizado.

### **5.2.1.c Recubrimiento de las NPMPH en dos etapas**

Para llevar a cabo la primera etapa de recubrimiento, las NPMPH fueron transferidas de etanol a DMF mediante triple centrifugación a 7000 rpm durante 15 min y reemplazando el sobrenadante. Una vez dispersados en medio orgánico, se añadieron 41,6 mg de DMA a 4 mL de NPMPH con una concentración de Au 1nM (concentración al final de la síntesis de las NPMPH). La mezcla fue disuelta mediante un baño de ultrasonidos de 2 horas y la reacción se mantuvo rotando en noria durante 24 horas. Las NPMPH recubiertas con DMA (NPMPH@DMA) se limpiaron de nuevo por triple centrifugación a 7000 rpm durante 15 min descartando el sobrenadante y añadiendo DMF limpio.

Antes de comenzar la segunda etapa del recubrimiento, fue necesario activar la molécula de PMAG con un grupo tiol. Para ello, se disolvieron 17 mg de PMAG en 10 mL de DMF purgado mediante burbujeo de Ar<sub>2</sub>. Entonces, se añadieron 31 µL de hexilamina y se mantuvieron agitando a 50°C en un baño de silicona durante 24 h. Una vez activado, la solución de PMAG-SH fue añadida a la dispersión de NPMPH y tras 2 horas en baño de ultrasonidos, los tubos de reacción se pusieron en rotación en una noria durante 24 horas. El producto final fue limpiado por centrifugación a 7000 rpm durante 15 min sustituyendo el sobrenadante por etanol y agua destilada, progresivamente.

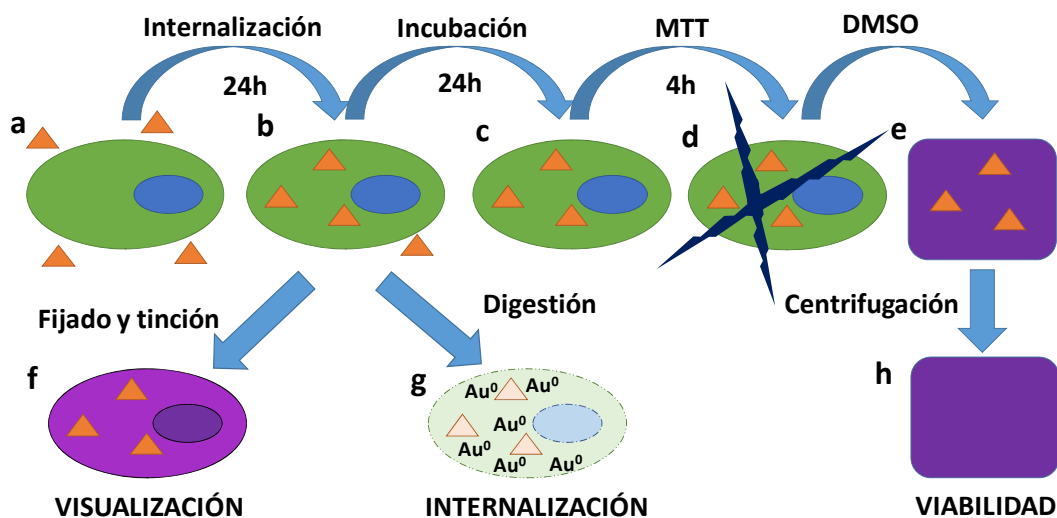
## **5.2.2 Internalización y toxicidad de nanopartículas en células HeLa**

### **5.2.2.a Estimación del número de nanopartículas internalizadas**

Para conocer la concentración de NPMPH internalizadas en el cultivo celular, se preparó una placa de 12 pozillos (Costar,3X4) con una densidad celular del 70% de la superficie. La primera fila (1X4) fue utilizada como control, de manera que fue incubada sin NP. Tras incubar las células HeLa con diferentes concentraciones de NP durante 24 horas, los cultivos fueron lavados por triplicado con PBS con filtrado (0,2 µm). Posteriormente, las células fueron dispersadas en medio de cultivo mediante un proceso de tripsinización (ver capítulo 2). Para estimar el número de células incubadas, se utilizó el ensayo de proliferación celular por tinción de azul de tripán.

La suspensión de células fue entonces centrifugada (2000 rpm durante 20 min) y el sobrenadante desechado. El residuo de células HeLa con NPMPH se digirió en un

volumen conocido de agua regia para determinar la concentración de iones de Au en el interior de las células mediante una triple medición por ICP-OES ([Figura 5.3](#)).



**Figura 5.3** Etapas del estudio de internalización y citotoxicidad de NP en células cancerígenas de la línea HeLa.

### 5.2.2.b Visualización de nanopartículas internalizadas y ensayo de viabilidad MTT

Los estudios de microscopía y viabilidad se llevaron a cabo en células sembradas en placas de 24 pocillos (Costar, 6X4) con una densidad celular en la superficie del 70%. En la primera columna de estas placas (1X4) se depositaron cubreobjetos de vidrio esterilizados para su posterior visualización por microscopía óptica. La primera fila de estas placas (6X1) fue utilizada como control, de manera que fue incubada sin NP.

Al igual que en el ensayo de internalización, las células fueron incubadas durante 24 horas con diferentes concentraciones de NP ([Figura 5.3b](#)). Tras la internalización, se realizó un lavado triple con PBS filtrado y se añadió medio de cultivo nuevo.

En este momento, las células de la primera columna (cultivadas encima de los cubreobjetos) fueron fijadas en etanol frío con 70% de pureza y tintadas con azul de metileno ([Figura 5.3f](#)). El resto de columnas fueron incubadas durante 24 h más, para evaluar la toxicidad de las NP una vez internalizadas ([Figura 5.3c](#)). En ese momento, el medio de cultivo fue sustituido por medio de cultivo mezclado con MTT con una concentración final de 0,05 mg/mL e incubado de nuevo durante 4 h más ([Figura 5.3d](#)). Transcurridas estas 4 h el medio fue sustituido por DMSO para disolver los cristales de

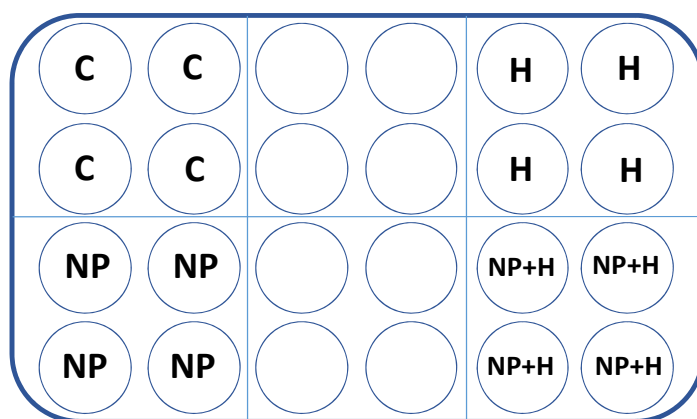
formazán ([Figura 5.3e](#)). Para eliminar la contribución de las NP en las medidas de absorción, el DMSO de cada pocillo fue centrifugado a 9000 rpm durante 15 min y el sobrenadante fue transferido a una placa nueva ([Figura 5.3h](#)). Finalmente se registraron las medidas de absorción de cada uno de los pocillos y se promediaron los valores de los 5 pocillos correspondientes a cada concentración, considerando como error la desviación estadística de cada conjunto de pocillos.

### 5.2.3 Tratamientos con nanopartículas magneto-plasmónicas

#### 5.2.3.a Daño mecánico mediante campos magnético rotatorios

Los estudios de daño mecánico mediante campos magnéticos rotatorios fueron realizados en placas de 24 pocillos (Costar, 6X4) en los que se definieron 4 poblaciones, tal y como aparecen representados en la [Figura 5.4](#).

Los 4 pocillos de la esquina superior izquierda se utilizaron como control; en la esquina superior derecha se aplicó un campo magnético rotatorio de 290 Oe a células incubadas sin NPMPH; en la esquina inferior izquierda se incubaron células con NPMPH en una concentración de 10 µg/mL; y en la esquina inferior derecha se aplicó un campo magnético de rotatorio de 290 Oe a células incubadas con una concentración de 10 µg/mL de NPMPH. El campo rotatorio de 290 Oe fue generado mediante un agitador magnético comercial (MicroMagMix, OVAN) con velocidad regulable dentro de una campana estéril y radiada con luz ultravioleta antes del tratamiento.



**Figura 5.4** Esquema de las poblaciones estudiadas en el tratamiento de células HeLa mediante campos magnéticos rotatorios: control (C); células sometidas a un campo rotatorio de 290 Oe (H); células incubadas con una concentración de NPMPH de 10

*μg/mL (NP) y células incubadas con una concentración de NPMPH de 10 μg/mL sometidas a un campo rotatorio de 290 Oe (NP+H).*

### **5.2.3.b Daño térmico mediante radiación láser infrarroja y tratamiento combinado**

Los efectos de la radiación IR en las células HeLa incubadas con NPMPH fueron estudiados en cultivos de celulares sembrados en placas con 4 pocillos (2X2) de 0,5 mL. En este caso, se prepararon placas con una densidad celular del 80% para poder identificar el perfil del haz laser en las imágenes de microscopía.

Para inducir la muerte celular se utilizó un montaje óptico similar al de los estudios de calorimetría plasmónica pero dentro de una campana estéril y radiada con luz ultravioleta antes del tratamiento. En este caso, se enfocó el haz láser sobre los cubreobjetos con células. Para identificar la región de radiación en las imágenes de microscopía, los soportes de vidrio fueron marcados con rotulación indeleble antes de su esterilización.

Los tratamientos fueron realizados por duplicado. Una de las muestras fue fijada en etanol y teñida con azul de metileno para su observación en campo claro. La otra muestra fue observada mediante microscopía de contraste de fase tras 45 segundos de tinción con azul de tripán, inmediatamente después del tratamiento.

El tratamiento combinado de radiación laser y daño mecánico mediante campos magnéticos se realizó enfocando el haz láser sobre la superficie del agitador magnético. En ambos casos, las muestras control fueron sacadas de la incubadora y expuestas al mismo ambiente que las células tratadas durante todos los experimentos.

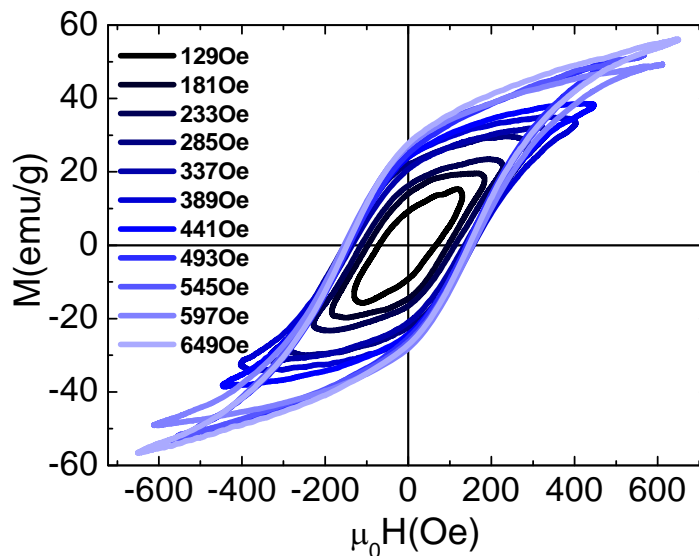
## 5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1 Estudios de disipación de calor en nanopartículas

#### 5.3.1a Comparativa de la potencia de calentamiento magnético

Antes de llevar a cabo los estudios calorimétricos de las NPM en presencia de campos magnéticos alternos de alta frecuencia ( $H_{AC}$ ), se estudió su respuesta magnética en régimen dinámico a partir de sus ciclos M-H de alta frecuencia.

La [Figura 5.5](#) muestra los ciclos de histéresis M-H obtenidos a 50 kHz para campos magnéticos máximos ( $H_{MAX}$ ) de distintas intensidades. Podemos apreciar que, a diferencia de los ciclos en régimen cuasiestático, los ciclos M-H de alta frecuencia muestran una coercitividad y una remanencia significativas. A esta frecuencia, las NPM dejan de presentar un comportamiento superparamagnético y empiezan a disipar energía en forma de calor.



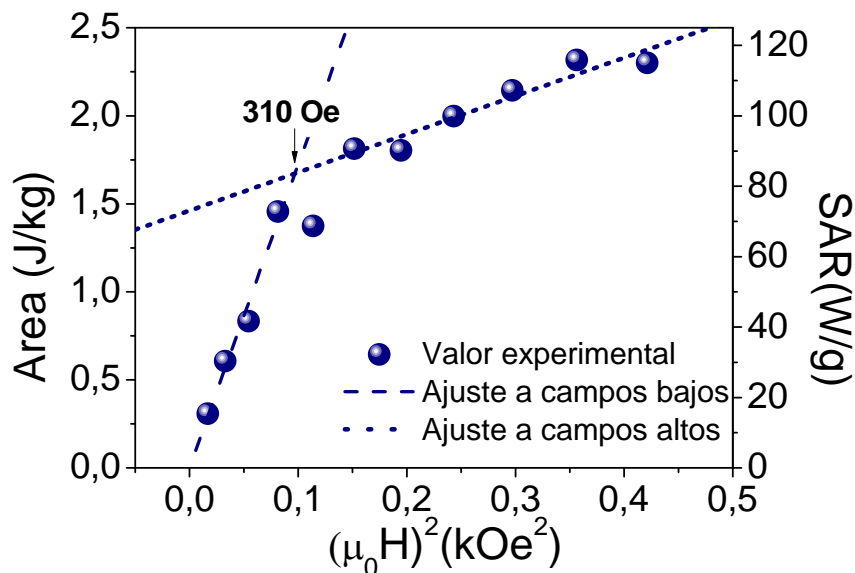
**Figura 5.5** Ciclos de histéresis M-H de las NPM de  $Fe_3O_4$  obtenidos a 50 kHz con campos aplicados máximos ( $H_{MAX}$ ) de: 120 Oe, 160 Oe, 200 Oe, 230 Oe, 270 Oe, 310 Oe, 360 Oe, 400 Oe, 510 Oe, 560 Oe y 590 Oe.

Además, a medida que se aumenta  $H_{MAX}$ , la forma de los ciclos registrados se va modificando. Mientras que a campos bajos, observamos ciclos elipsoidales como los que describe la teoría de respuesta lineal, cuando el  $H_{MAX}$  supera el valor de la coercitividad de las NPM a alta frecuencia ( $H_C=155$  Oe), la elipticidad de los ciclos se

pierde y la magnetización de las muestras empieza a saturar en los extremos del ciclo. Cabe destacar que para  $H_{MAX}$  superiores a 545 Oe, el  $A_{M-H}$  encerrada por los ciclos parece no aumentar significativamente.

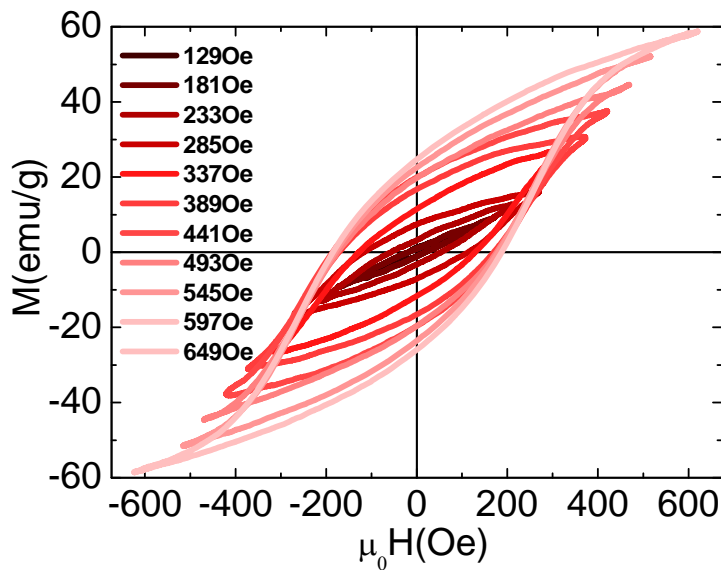
La [Figura 5.6](#) permite analizar la dependencia del calor disipado en función de  $H_{MAX}$  a través de las áreas encerradas por el ciclo. Al representar  $A_{M-H}$  respecto al cuadrado de  $H_{MAX}$  encontramos pendientes claramente diferenciadas, a campos bajos y a campos altos. Mientras que para campos por debajo de 285 Oe ( $H_{MAX}^2 = 0,084 \text{ kOe}^2$ ) el área del ciclo crece a un ritmo de  $17,20 \text{ J kg}^{-1} \text{ kOe}^{-2}$ , cuando  $H_{MAX}$  superan los 389 Oe ( $H_{MAX}^2 = 0,15 \text{ kOe}^2$ ) la tasa de crecimiento cae hasta los  $2,17 \text{ J Kg}^{-1} \text{ KOe}^{-2}$ .

El valor de  $A_{M-H}$  representado, puede relacionarse con la potencia calorífica de las NPM multiplicando este valor por la frecuencia del  $H_{AC}$ , según se indica en la **Ecuación 1.2**. En el eje derecho de la gráfica se muestran los valores de SAR correspondientes a cada área. Observamos que para los campos más altos, el SAR alcanza valores que llegan hasta los 115 W/g.



**Figura 5.6** Evolución del área encerrada por los ciclos de histéresis AC ( $A_{M-H}$ ) mostrados en la [Figura 5.5](#) respecto a  $H_{MAX}^2$ . Las líneas discontinuas muestra el ajuste lineal de los valores experimentales a campos bajos y a campos altos. El eje derecho muestra los valores de SAR obtenidos a partir de la [Ecuación 1.2](#).

Por otra parte, en la [Figura 5.7](#) se muestran los ciclos de alta frecuencia de las NPMPH. En este caso, observamos que para los campos más bajos el área del ciclo de histéresis resulta despreciable. A partir de los 233 Oe, tanto la  $H_C$  como la  $M_R$  del sistema aumentan progresivamente ensanchando el área del ciclo de histéresis. Una vez alcanzados los 389 Oe de  $H_{MAX}$ , el valor del campo coercitivo se mantiene en torno a los  $178 \pm 9$  Oe. Sin embargo, no se puede descartar que este valor pudiera seguir creciendo si se aumentase aún más el  $H_{MAX}$  hasta alcanzar los valores registrados en los ciclos quasiestáticos tomados a 10K.

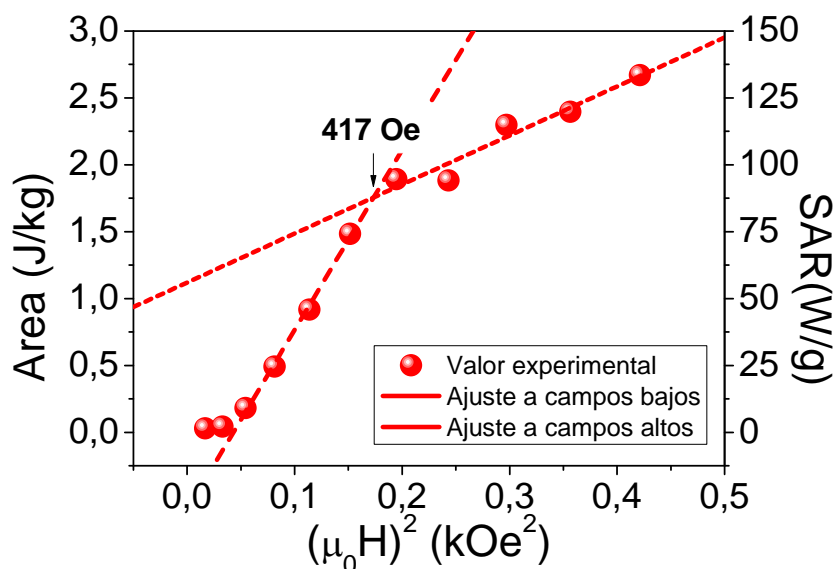


**Figura 5.7** Ciclos de histéresis  $M-H$  de las NPMPH de  $Fe_3O_4$  obtenidos a 50 kHz con  $H_{MAX}$  de: 120 Oe, 160 Oe, 200 Oe, 260 Oe, 300 Oe, 360 Oe, 400 Oe, 450 Oe, 500 Oe y 590 Oe.

En la [Figura 5.8](#), aparece una evolución de  $A_{M-H}$  con  $H_{MAX}^2$ , diferente a la observada anteriormente en las NPM. En este caso, el cambio en la tasa de crecimiento de  $13,4 \text{ J kg}^{-1} \text{ kOe}^{-2}$  a  $3,7 \text{ J kg}^{-1} \text{ kOe}^{-2}$ , no se produce hasta a los 412 Oe ( $H_{MAX}^2 = 0,17 \text{ KOe}^2$ ), lo que nos indica un cambio drástico en las propiedades magnéticas de las NPM tras su internalización en la matriz de sílice de las NPMPH.

Según el modelo de Stoner-Wohlfarth, para un sistema de NPM monodominio uniaxiales cuyos ejes de anisotropía están desordenados, la coercitividad de las NPM bloqueadas es 0,48 veces el campo de anisotropía. Bajo esta hipótesis, es posible estimar el valor del  $H_K$  de las NPM y las NPMPH mediante el  $H_C$  de los ciclos obtenidos para los  $H_{MAX}$  más altos. Realizando este cálculo, encontramos que los

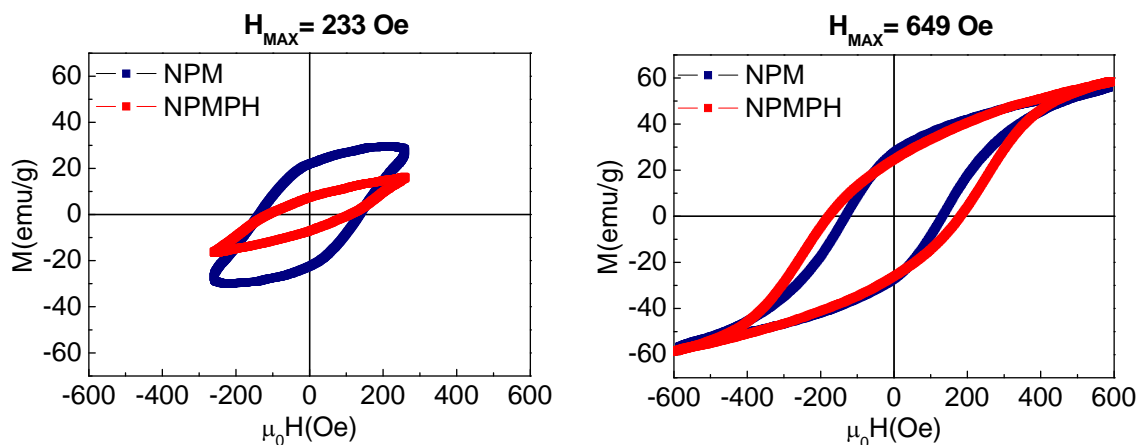
valores obtenidos para el campo de anisotropía son  $H_K \approx 290$  Oe y  $H_K \approx 377$  Oe para las NPM y las NPMPH, respectivamente. Estos valores resultan ligeramente inferiores a los campos en que se observa el cambio en la tendencia de las gráficas del  $A_{M-H}$  respecto a  $H_{MÁX}^2$  (Figuras 5.6 y 5.8).



**Figura 5.8** Evolución del área encerrada por los ciclos de histéresis AC mostrados en la Figura 5.7 para las NPMPH respecto al cuadrado de  $H_{MÁX}$ . Las líneas discontinuas muestra el ajuste lineal de los valores experimentales a campos bajos y a campos altos. El eje derecho muestra los valores de SAR correspondientes según la ecuación Ecuación 1.5.

Para realizar un análisis comparativo de ambos sistemas, en la Figura 5.9 aparecen representados los ciclos de histéresis de alta frecuencia de las NPM y las NPMPH cuando los  $H_{MÁX}$  aplicados son pequeños (233 Oe) y cuando son altos (649 Oe). Encontramos que, aunque en el primer caso la coercitividad de ambos sistemas es similar, la magnetización alcanzada por las NPM es el doble que la de las NPMPH, lo que supone un área 3 veces mayor.

En este rango de campos magnéticos, el comportamiento dinámico debe ser explicado mediante modelos de respuesta lineal. De acuerdo con lo explicado en la introducción, el área del ciclo de histéresis dependerá de la proximidad entre la frecuencia de campo aplicada y la resonancia del sistema. Por tanto, para una frecuencia de campo fija por debajo de la resonancia, una reducción del tiempo de relajación del sistema implica una reducción del área del ciclo y consecuentemente una menor cantidad de calor disipado.



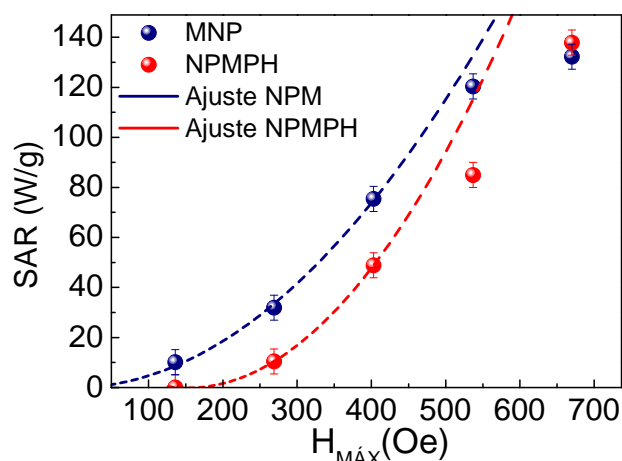
**Figura 5.9** Comparativa de los ciclos de histéresis  $M$ - $H$  de alta frecuencia obtenidos en NPM (azul) y NPMPH (rojo) de  $Fe_3O_4$  con: (a)  $H_{MAX}= 233$  Oe y (b) (a)  $H_{MAX}= 649$  Oe.

Este escenario se modifica cuando el  $H_{MAX}$  está por encima de  $H_K$ . Los ciclos de histéresis muestran que, a campos altos, tanto la  $M_S$  como el  $H_C$  de las NPMPH son superiores al de las NPM. Este cambio de  $H_C$  hace que aunque la cuadratura del ciclo ( $M_R/M_S$ ) baje de 0,5 a 0,43, su  $A_{M-H}$  sea 1,15 veces superior en el caso de las NPMPH.

En términos generales, un aumento en la coercitividad del ciclo supone una mayor cantidad de energía disipada siempre que el campo aplicado sea capaz de vencer el  $H_K$  del sistema. De esta manera, un aumento de coercitividad como el que se observa en las NPM cuando pasan a formar parte de las NPMPH permite generar un ciclo de mayor  $A_{M-H}$  y de esta manera disipar una mayor cantidad de calor por ciclo.

Los datos obtenidos sobre la respuesta dinámica de ambos sistemas están en concordancia con las medidas de calorimetría de las NPM y las NPMPH que se muestran en la [Figura 5.10](#). En esta gráfica observamos que el SAR -al igual que  $A_{M-H}$ - crece de manera cuadrática a campos bajos ( $H_{MAX} \leq 400$  Oe), con unos factores de correlación de  $r_{NPM}=0.99$  y  $r_{NPMPH}=0.98$  para los ajustes de las NPM y las NPMPH, respectivamente. A campos más altos, el calor disipado por ambos sistemas sigue aumentando pero muy lejos del ajuste cuadrático realizado a campos bajos.

Las medidas calorimétricas muestran que aunque el valor del SAR de las NPMPH resulte despreciable a campos bajos, el calor disipado puede llegar a superar el de las NPM si el campo aplicado es suficiente para maximizar el  $A_{M-H}$  de los ciclos de alta frecuencia.



**Figura 5.10** Medidas calorimétricas de los valores de SAR obtenidos para las NPM (azul) y NPMPH (rojo) de  $Fe_3O_4$  para diferentes campos aplicados.

Por tanto, el estudio de la respuesta magnética a altas frecuencias nos indica que la idoneidad de cada sistema magnético en la producción de calor depende significativamente de las condiciones de campo aplicado. Como se indicó en la introducción, la disposición de las NPM en forma de cadenas en el interior de las NPMPH supone un aumento del calor disipado siempre que el  $H_{MÁX}$  aplicado sea superior al valor de  $H_K$  del sistema. De esta manera, la incorporación de las NPM en las estructuras magneto-plasmónicas propuestas, no solo no supone un detrimento de sus propiedades calefactoras, sino que puede llegar a producir efectos de interacción constructivos en la disipación de calor.

Debe señalarse que de acuerdo con los datos de calorimetría obtenidos, los campos necesarios para que esta mejora en el calentamiento sea efectiva superan los 550 Oe. Este valor está por encima del conocido como criterio de Brezovich, según el cual, el producto de la frecuencia y  $H_{MÁX}$  debe ser inferior a  $4,5 \text{ Am}^{-1}\text{s}$  ( $5,63 \cdot 10^3 \text{ Oe KHz}$ )<sup>105</sup>.

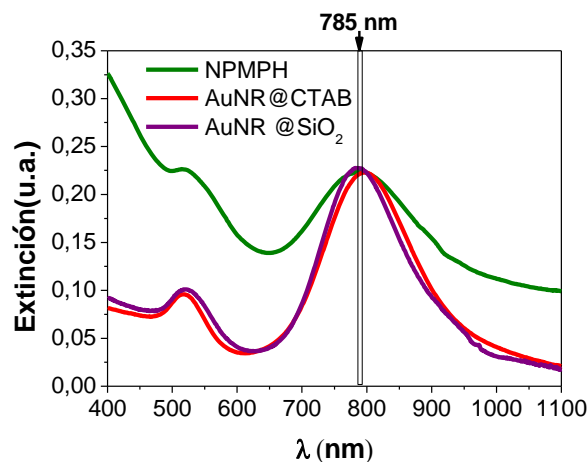
No obstante, debe tenerse en cuenta que este criterio fue propuesto en 1984, aplicando un campo magnético de frecuencia 13.56 MHz sobre el tórax completo del paciente. En la actualidad los generadores de campo para hipertermia han sido optimizados para focalizar los campos magnéticos reduciendo el efecto de las corrientes de Eddy en el cuerpo humano y de esta manera aumentar el valor de  $H_{MÁX}$  tolerable<sup>12</sup>. Esto ha llevado a algunos autores a extender el criterio de Brezovich hasta los  $6,25 \cdot 10^4 \text{ Oe KHz}$ <sup>3,106</sup>. Según el criterio revisado, para una frecuencia de 100kHz, el máximo campo permitido

serían 625 Oe, valor que se encuentra en el rango de mejora observado en las NPMPH sintetizadas.

### 5.3.1.b Comparativa de la potencia de calentamiento plasmónico

Los procesos de excitación plasmónica y de disipación de calor en las NP metálicas dependen fuertemente de su entorno dieléctrico. Por este motivo, se realizó un estudio comparativo de calorimetría entre coloides compuestos por AuNR@CTAB, AuNR@SiO<sub>2</sub> y NPMPH de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> cuya resonancia plasmónica longitudinal está próxima a la longitud de onda del láser utilizado.

La [Figura 5.11](#) muestra los espectros de absorción obtenidos para los coloides mencionados. Todas las muestras fueron sintetizadas de manera que su máximo de absorción se encontrase próximo a 785 nm aunque la anchura a media altura sea de 154 nm, 143 nm y 190 nm para AuNR@CTAB, AuNR@SiO<sub>2</sub> y NPMPH respectivamente.

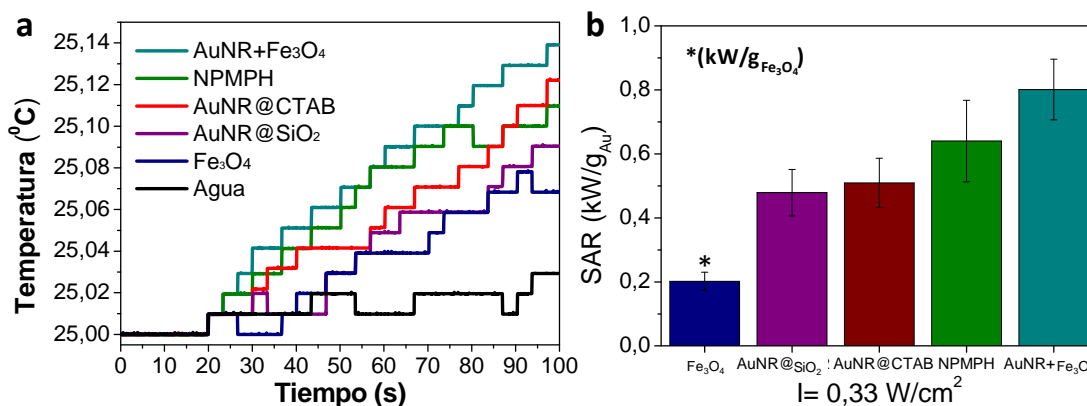


**Figura 5.11** Espectros de extinción de las muestras empleadas en el estudio comparativo de calentamiento plasmónico: AuNR@CTAB, AuNR@SiO<sub>2</sub> y NPMPH de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. La línea roja indica la longitud de onda del haz láser utilizado.

Para poder realizar un análisis comparativo entre las muestras, la concentración de Au en todas ellas fue ajustada a 2 mg/mL de Au (OD<sub>400</sub>=25). Además, a modo de control, se estudió el calor generado por las NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con una concentración 4,5 mg/mL y por un coloide mezcla de AuNR@CTAB y NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con concentraciones similares a las utilizadas en los coloides individuales. Siguiendo las indicaciones del American National Standards Institute (ANSI Z136.1-2007) respecto al uso de luz IR continua en tejidos humanos, las muestras fueron irradiadas con un láser de 785 nm de

intensidad  $I=0,33 \text{ W/cm}^2$ .

La [Figura 5.12](#) muestra las curvas de calentamiento registradas para cada coloide y los valores de SAR asociados a estas curvas, calculados a partir de la [Ecuación 5.1](#). Podemos observar que el calentamiento generado por los AuNR recubiertos de sílice resulta ligeramente inferior al de los AuNR sin recubrir. La menor difusividad de la sílice en espesores nanométricos ( $0,2-0,3 \text{ W m}^{-1}\text{K}^{-1}$ )<sup>107</sup> hace que los procesos de disipación de calor de las NP se ralenticen<sup>108</sup>. Esto resulta una ventaja cuando se utilizan pulsos de alta intensidad, ya que alargando el tiempo de difusión del calor se evitan la formación de una interfase gaseosa entre los AuNR y el medio, y se favorece la transmisión efectiva de calor al medio<sup>109</sup>. Sin embargo, en el caso de la irradiación continua, los AuNR@SiO<sub>2</sub> muestran un ritmo de calentamiento menor que el de los AuNR@CTAB, lo que se traduce en un valor del SAR ( $479 \text{ W/cm}^2$ ) inferior al de estos ( $509 \text{ W/cm}^2$ ). Al trabajar con un calorímetro no adiabático y considerar únicamente los primeros 30 segundos, no podemos descartar que aunque la transferencia de calor sea más lenta para los AuNR@SiO<sub>2</sub>, la cantidad total del calor generado por ambos sistemas sea similar.



**Figura 5.12** (a) Curvas de calentamiento y (b) valores de SAR registrados en agua (negro) y los coloides de NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (azul, AuNR@CTAB (morado), AuNR@ SiO<sub>2</sub> (rojo), , NPMPH (verde), (turquesa) y AuNR@CTAB con NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, cuando son irradiados con luz laser de 785 nm de intensidad  $0,33\text{W/cm}^2$ .

Al medir el valor del SAR en las NPMPH, observamos que la cantidad de calor generado ( $640 \text{ W/cm}^2$ ) resulta significativamente superior a la de los AuNR. Una de las causas más evidente de este aumento de temperatura es el calor producido por la fase magnética al ser iluminada con luz IR. El origen de este calentamiento en NPM de

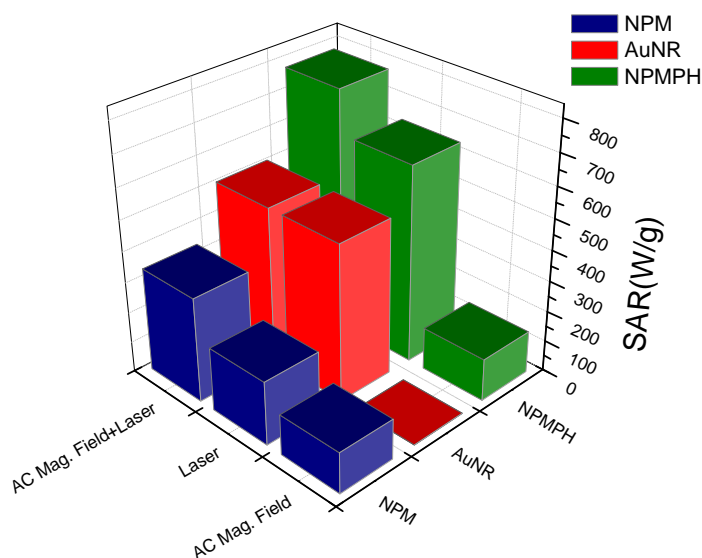
óxido de Fe es aún desconocido, pues el patrón de extinción de las mismas presenta un mínimo en esta región del espectro<sup>110</sup>. Sin embargo, publicaciones recientes han identificado este proceso de disipación de calor como una nueva vía para la combinación de tratamientos de hipertermia magneto-plasmónica<sup>71</sup>. Los controles realizados con NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y el coloide mezcla de NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y AuNR, permitieron conocer el peso que tienen los procesos de absorción óptica de la Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en la cantidad total de calor disipado.

La [Figura 5.12 b](#) muestra que el valor de SAR obtenido en el coloide mezcla (801 W/cm<sup>2</sup>) resulta muy superior al de las NPMPH, lo que indica que entre las fases magnética y plasmónica se produce un efecto de interacción negativa en los procesos de disipación de calor. Como se observó en la [Figura 3.22](#), la polarizabilidad eléctrica de las NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> genera acumulaciones de campo en la superficie de los AuNR que perturban la oscilación plasmónica de estos. Aunque estas acumulaciones de campo, conocidas como puntos calientes, pueden llegar a potenciar los procesos de disipación de calor<sup>111</sup>, en el caso de las NPMPH sintetizadas no se consiguió ajustar la resonancia de los componentes de manera que las oscilaciones plasmónicas se vieran intensificadas<sup>112</sup>, lo que se traduce en un detrimento de la capacidad calorífica de los componentes. No obstante, la versatilidad del proceso de hibridación desarrollado en esta tesis, abre la puerta a futuras optimizaciones que permitan la resonancia plasmónica de los componentes. Un mecanismo que se propone para mejorar el acoplamiento plasmónico en las NPMPH consiste en la utilización de cadenas de PEG de diferentes longitudes que modifiquen la distancia entre los AuNR y las NPM.

Por último, es importante mencionar que las medidas de calorimetría fueron realizadas en coloides con bajas concentraciones de NP, en los que la interacción plasmónica entre ellas es baja. Al trasladar estos coloides a entornos biológicos donde las partículas se encuentran confinadas (endosomas), cabe esperar que la distorsión de la resonancia plasmónica producida por la agregación genere un descenso del calor producido similar o superior al registrado en las NPMPH. En el caso de las NPMPH núcleo-satélite desarrolladas, el recubrimiento de sílice garantiza una separación entre NP suficiente para suponer un comportamiento calefactor en el interior de las células similar al registrado en los experimentos *ex vivo*.

### 5.1.3.c Calentamiento magneto-plasmónico de nanopartículas híbridas

Aunque no resultó posible llevar a cabo estudios de calentamiento magneto-plasmónico simultáneos por no disponer de un sistema de excitación combinado, los resultados obtenidos en ambas modalidades de hipertermia arrojan resultados muy prometedores para este tipo de nanoestructuras. La [Figura 5.13](#) muestra una visión general de los valores de SAR obtenidos las NPM, los AuNR y las NPMPH cuando se les aplican campos magnéticos de alta frecuencia y radiación láser en el IR.



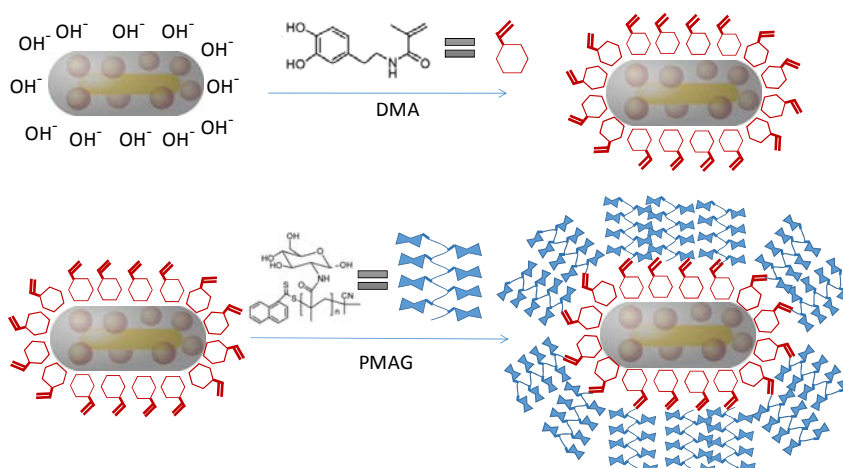
**Figura 5.13** Valores de SAR obtenidos en MNP de  $Fe_3O_4$  (azul), AuNR (rojo) y NPMPH de  $Fe_3O_4$  (verde) cuando son irradiados con: campos magnéticos de 670 Oe con una frecuencia de 100kHz; un láser de 785 nm con potencia  $0,33W/cm^2$ ; la suma de ambos resultados.

Los valores de SAR que se muestran en la grafica indican que el calor generado por las NPMPH al iluminarlas con luz láser quintuplica el valor obtenido mediante campos magnéticos de alta frecuencia. Por este motivo, el tratamiento magneto-plasmónico diseñado en esta tesis ([Sección 5.3.4](#)), se centró en combinar el efecto calefactor producido por la excitación plasmónica con el daño mecánico inducido por campos magnéticos rotatorios. No obstante, para que este tratamiento fuese efectivo, antes de realizar ningún tratamiento resultó necesario funcionalizar previamente las NPMPH con un recubrimiento biocompatible que garantizase su penetración a través de la membrana plasmática.

### 5.3.2 Biofuncionalización con glicopolímeros

La biofuncionalización de las NPMPH desarrolladas en esta tesis fue realizada con un glicopolímero denominado PMAG, desarrollado en el laboratorio de Chen y col. de la Universidad de Soochow<sup>113,114</sup>. Esta molécula consiste en una cadena polimérica de tamaño variable, en la que se insertan periódicamente moléculas de glucosa enlazadas covalentemente.

Como se esquematiza en la [Figura 5.14](#), el recubrimiento se realizó mediante un proceso de dos etapas. En la primera etapa, una pequeña molécula de DMA es unida a la superficie de las NPMPH de manera que el grupo metacrilato de la molécula pueda ser utilizado como anclaje de la molécula de PMAG durante la segunda etapa del recubrimiento. Esta ruta de funcionalización, ya había sido validada previamente en NPM de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>113</sup> observando una mejora significativa en la estabilidad coloidal y los procesos en internalización en células cancerígenas.

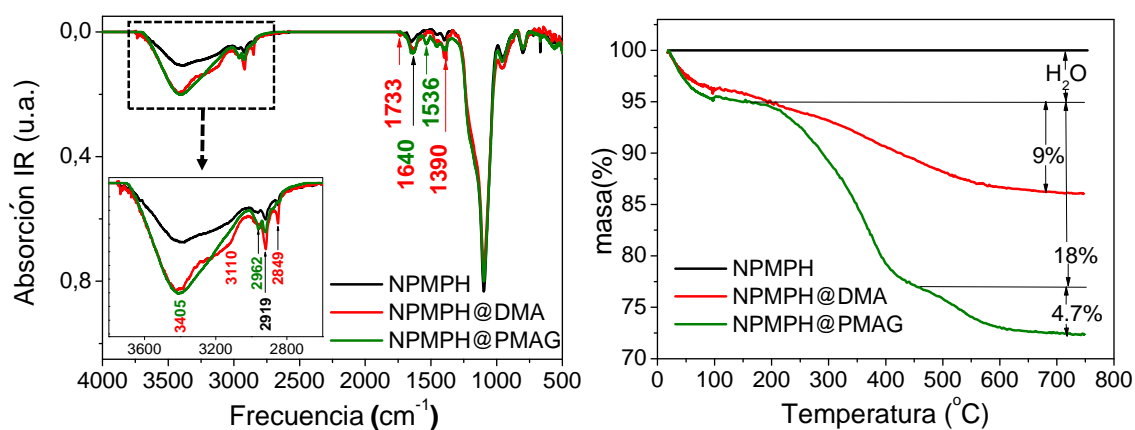


**Figura 5.14** *Funcionalización en dos etapas de las NPMPH con PMAG. En una primera etapa se incorporan moléculas de DMA que actúan como anclaje de las cadenas de PMAG durante la segunda etapa de funcionalización.*

La [Figura 5.15](#) muestra los espectros de absorción FT-IR y de las curva de TGA de las NPMPH en cada etapa de funcionalización. En los espectros de absorción FT-IR que se muestran en la [Figura 5.15a](#) aparece una banda de absorción en 950-1250 cm<sup>-1</sup> que es comúnmente observada en compuestos de sílice como consecuencia del solapamiento de las cuatro bandas de vibración asimétricas del enlace Si-O<sup>115</sup>. Para poder realizar un análisis comparativo, los espectros de absorción FT-IR de cada etapa fueron normalizados a partir de la intensidad de este pico.

Tras la primera funcionalización con DMA, observamos que aparecen: dos pequeños picos en  $1733\text{ cm}^{-1}$  y  $2849\text{ cm}^{-1}$  asociados al grupo metacrilato<sup>116</sup>; un aumento de los picos en  $1640\text{ cm}^{-1}$  y  $1390\text{ cm}^{-1}$  característicos de los grupos hidroxilos del DOPA<sup>117</sup> y un incremento de la banda centrada en  $3405\text{ cm}^{-1}$  asociada a la amina<sup>118</sup>. La banda asociada a las aminas entre  $3000\text{ cm}^{-1}$  y  $3700\text{ cm}^{-1}$  resulta difícil de analizar ya que aunque las muestras fueron liofilizadas, el agua residual introduce vibraciones en esta región del espectro. No obstante, la evolución de la banda es semejante a la observada en el recubrimiento de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mencionado anteriormente<sup>113</sup>. Al incorporar el DMA en la superficie, aparece un aumento significativo del pico en  $3405\text{ cm}^{-1}$  con un codo en torno a  $3110\text{ cm}^{-1}$  que puede ser debido al grupo metacrilato del DMA<sup>116</sup>.

Este codo, junto con los picos propios del doble enlace del metacrilato, se atenúa cuando se ancla la molécula de PMAG a la superficie de las NPMPH. Además aparecen nuevos picos en  $1536\text{ cm}^{-1}$  y  $2962\text{ cm}^{-1}$  atribuibles a la cadena polimérica del PMAG y a la vibración simétrica del grupo CH de la glucosa respectivamente. No obstante, la multitud de grupos orgánicos presentes en los espectros, hace que el análisis de estos resulte complicado y poco determinante.



**Figura 5.15** (a) Espectros de absorción FT-IR y (b) curvas de TGA de: NPMPH sin recubrir (negro), NPMPH recubiertos de DMA (NPMPH@DMA, rojo) y NPMPH recubiertos de PMAG (NPMPH@PMAG, verde).

Las curvas de TGA que se muestran en la [Figura 5.15b](#), muestran con mayor claridad la eficacia de esta ruta de funcionalización. En primer lugar, observamos que antes de la funcionalización con las moléculas orgánicas (línea negra), las NPMPH no sufren una pérdida de peso con la temperatura apreciable. Tras la adhesión del DMA, se observa

una primera pérdida de peso asociada a la evaporación del agua atrapada por el recubrimiento y una segunda caída progresiva que llega hasta los 700°C<sup>119</sup> similar a la reportada para la dopamina<sup>120</sup>. La pérdida total de peso, una vez evaporada todo el agua, es del 9%. En cambio, al añadir la molécula de PMAG, además de la caída suave del DMA, aparece un importante escalón en torno a los 300°C atribuible a la cadena de PMAG<sup>121</sup>.

Puede resultar sorprendente que para NP con tamaños de ~80 nm (según la imágenes de TEM), cuya relación superficie volumen es menor del 2%, se consigan recubrimientos que supongan en torno al 20% de la masa total de la partícula. Sin embargo, analizando la química que hay detrás de este recubrimiento es posible explicar la gran cantidad de moléculas adheridas a la superficie de las NPMPH.

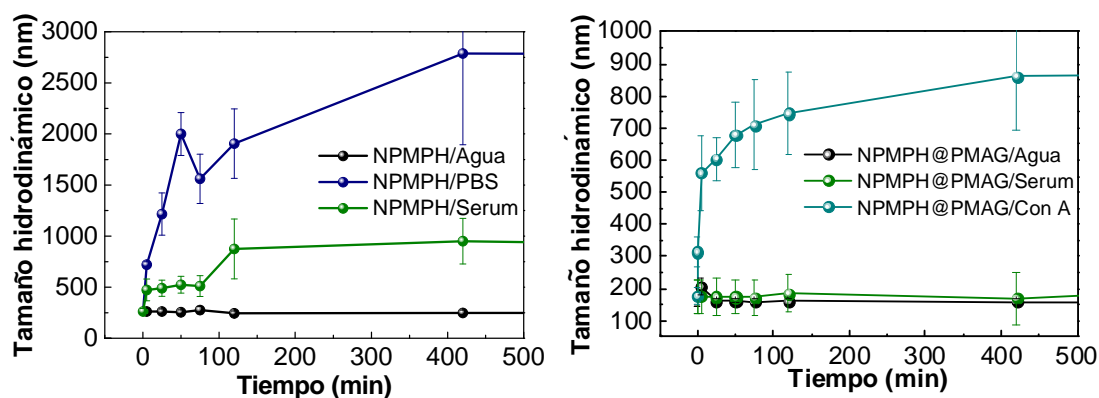
En una primera etapa, la alta adhesión del DMA con la superficie de las partículas se fundamenta en la conocida como química “cathecol”. A raíz del estudio de la química de adhesión de los moluscos<sup>122</sup>, se descubrió que la estructura de sus aminoácidos, rica en grupos 3,4-dihidroxi-l-fenilalanina (DOPA) y en lisina<sup>123</sup>, generaba un enlace de enorme dureza con superficies inorgánicas de distintas composiciones. Este tipo de enlace, ha sido ampliamente empleado en el recubrimiento de superficies inorgánicas como el Au<sup>124</sup>, el TiO<sub>2</sub><sup>125</sup> o el Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>126</sup> a través de grupos DOPA.

El pequeño tamaño de la molécula de DMA, la afinidad química del grupo DOPA con la superficie de SiO<sub>2</sub><sup>127,128</sup> y su disposición preferentemente ortogonal a la superficie<sup>129</sup> hacen que la funcionalización de las NPMPH con DMA introduzca una gran cantidad de puntos de anclaje para la molécula de PMAG.

Por otra parte, el doble enlace del grupo metacrilato del DMA, permite que el PMAG se pueda enlazar fuertemente a través de su grupo tiol (reacción tiol-en)<sup>130</sup>. Este proceso se encuentra dentro de la conocida como química “click”<sup>131,132</sup>, basada en interacciones entre moléculas principalmente orgánicas que por su alta afinidad median procesos de ensamblado. El uso conjunto de la química cathecol y la química click en sendas etapas del recubrimiento, generó un proceso de adhesión del PMAG de muy alta eficiencia.

Para comprobar la estabilidad coloidal de las NPMPH tras el recubrimiento con PMAG (NPMPH@PMAG), se estudió la evolución de su radio hidrodinámico con el tiempo cuando fueron dispersadas en distintos medios ([Figura 5.16](#)). Observamos que en el

caso de las NPMPH sin recubrir [Figura 5.16a](#), la dispersión en medios con una alta fuerza iónica (PBS) o con proteínas propias del medio celular (Sérum) induce una pérdida de estabilidad coloidal y una rápida agregación de las mismas. Esto se debe a que en las NP sin recubrir, la estabilidad coloidal se fundamenta en la carga superficial negativa que le confieren los grupos hidroxilos de la sílice en su superficie. Por tanto, el aumento en la ionicidad del medio o la adhesión electrostática de las proteínas del serum a su superficie suponen un drástico aumento en el  $D_H$  de las NPMPH.



**Figura 5.16** Evolución temporal del tamaño hidrodinámico de las NPMPH (a) sin recubrir y (b) recubiertas con PMAG, cuando son dispersadas en PBS (negro), Serum 10% (verde) y conA en PBS (rojo).

Sorprendentemente, el aumento de  $D_H$  observado en las NPMPH dispersadas en medio celular, resultó significativamente menor que la observada para PBS. Ciertos estudios demuestran que la formación de la corona proteica, a pesar de aumentar inicialmente el radio hidrodinámico de las NP, ayuda a su estabilización coloidal<sup>133</sup>. Por este motivo, el tamaño del conjunto NP/corona alcanza una primera etapa de estabilidad en los ~500 nm que crece posteriormente hasta los ~800 nm. En cambio, cuando las NPMPH son dispersadas en PBS, la fuerte ionicidad del medio produce un apantallamiento de la carga superficial, que conlleva un proceso de agregación descontrolado de las NP hasta tamaños por encima de la micra y finalmente a su precipitación.

La [Figura 5.16b](#) muestra que tras recubrir las NPMPH con PMAG, la evolución temporal del tamaño hidrodinámico se modifica completamente. En primer lugar se observa la funcionalización y filtrado de las NPMPH, consigue reducir el  $\langle D_H \rangle$  del sistema hasta los 170 nm con un PDI de 0,29. La evolución de este tamaño con el tiempo muestra que este tamaño se mantuvo constante durante 6 horas tanto en agua

como en medio celular. Tras 4 días en medio acuoso, el  $D_H$  de las NPMPH@PMAG se mantuvo constante (no mostrado en la gráfica). En el caso del suero se formaron agregados de proteínas que impidieron conocer el tamaño real de las NPMPH@PMAG.

Como se indicó anteriormente, el PMAG es un polímero neutro y su estabilidad coloidal se fundamenta en la repulsión estérica de las NP, este tipo de funcionalizaciones atenúa los procesos de formación de la corona proteica cuando son dispersadas en suero y permite mantener un tamaño hidrodinámico controlado, lo que resulta de enorme importancia a la hora de potenciar la acumulación de fármacos mediante el efecto EPR. Sin embargo, la formación de la corona proteica no significa únicamente un aumento en el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas, sino que supone un enmascaramiento de las propiedades funcionales de los recubrimientos, que pueden llegar a anular los efectos de vectorización de las biomoléculas de la superficie<sup>134</sup>.

Para comprobar la actividad de las moléculas de glucosa del PMAG, se estudió la evolución del  $D_H$  de las NPMPH en suero al incluir un receptor de glucosa conocido como concanavalina A (conA). Esta lectina, utilizada comúnmente en la detección de polisacáridos o glicopolímeros, enlaza de manera específica con carbohidratos como la glucosa a través de cuatro posiciones activas<sup>135</sup>. Como muestra la curva turquesa de la [Figura 5.16b](#), al añadir el conA al suero se induce una agregación de las NPMPH que supone que estas cuadruplican su tamaño hidrodinámico. Este aumento de  $D_H$ , nos indica que las moléculas de glucosa del PMAG siguen activas tras la funcionalización y son capaces de asociarse a receptores específicos de glucosa.

De acuerdo con lo expuesto en este apartado, podemos concluir que el recubrimiento de las NPMPH con PMAG inhibe la formación de la corona proteica en medios biológicos mejorando su estabilidad coloidal y manteniendo un tamaño hidrodinámico por debajo de los 200 nm. Además, este tipo de recubrimientos, no solamente permiten satisfacer las condiciones expuestas al principio del capítulo para una correcta acumulación pasiva por EPR sino que preserva la actividad de las moléculas de glucosa en el medio celular, lo que supone una estrategia adicional de la acumulación activa en células tumorales como las HeLa.

### 5.3.3 Internalización y toxicidad en células HeLa

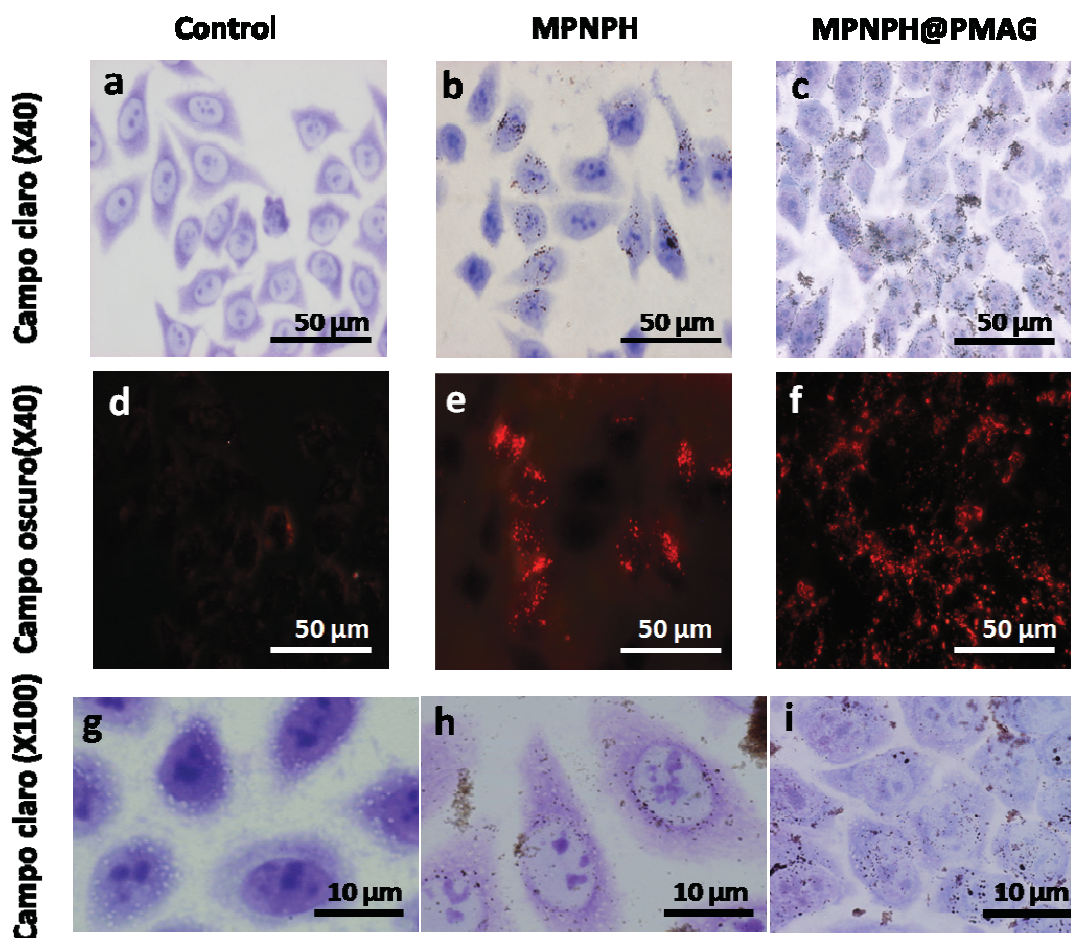
#### 5.3.3.a Internalización en células HeLa

Una de las grandes limitaciones para el uso de NPMPH en aplicaciones biomédicas es que, al tratarse de nanoestructuras con múltiples fases, suelen alcanzar tamaños por encima de los 100 nm, especialmente cuando se busca una alta absorción óptica en el espectro IR con estructuras tipo nanocorteza, nanotriángulo o nanoestrella<sup>136-138</sup>. Este rango de tamaños supone un reto a la hora de conseguir una internalización efectiva en las células tumorales. En esta sección estudiaremos cómo el recubrimiento de PMAG ayuda a la internalización de las NPMPH en células tumorales de la línea HeLa.

La [Figura 5.17](#) muestra las imágenes de microscopía óptica de las células HeLa tras ser incubadas durante 24 horas con una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPMPH y NPMPH@PMAG. Las NPMPH se distinguen en estas imágenes como puntos de color negro o marrón según el grado de agregación de las mismas. En las imágenes de campo oscuro correspondientes, la luz dispersada por los núcleos de Au hace que las NPMPH aparezcan como puntos rojos brillantes sobre un fondo oscuro, lo que facilita su identificación en la imagen.

Observamos que tanto las NPMPH como las NPMPH@PMAG son internalizadas en las células a través de pequeñas vesículas de aproximadamente 270 nm. Considerando el tamaño hidrodinámico medido en las NPMPH@PMAG, la internalización de las NPMPH a través de vesículas endocíticas se produce de manera casi individual. No obstante, para comprobar esta hipótesis sería necesario un análisis mediante microscopía electrónica, o equivalentes.

Comparando la densidad de NP internalizadas observada en las [Figura 5.17h](#) y [Figura 5.17i](#), resulta claro que el recubrimiento con PMAG parece favorecer los procesos de internalización de las NPMPH en las células HeLa. Sin embargo, la microscopía óptica resulta poco concluyente en este aspecto ya que es difícil distinguir si las NP se encuentran en el interior de la célula o sobre ella, lo que puede inducir a error a la hora de comparar los procesos de internalización.

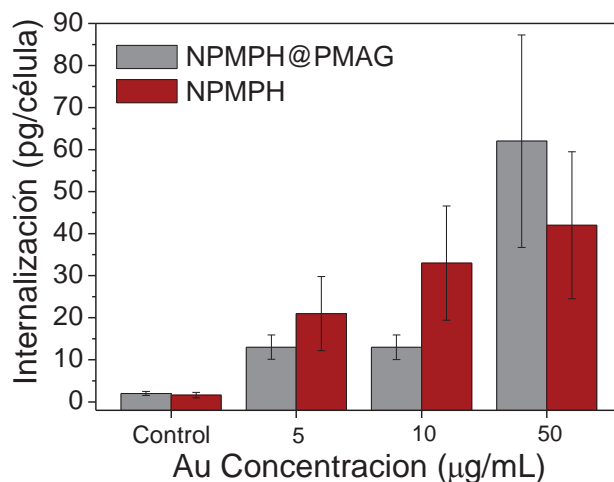


**Figura 5.17** Imágenes de microscopía óptica de campo claro (a-c y g-i) y campo oscuro (d-f) de células HeLa teñidas con azul de metileno tras ser incubadas durante 24: sin NP (primera columna), con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPMPH sin recubrir (segunda columna) y con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  NPMPH@PMAG (tercera columna).

Para poder realizar un análisis cuantitativo de la cantidad de material inorgánico internalizado por las células, se realizó un ensayo de cuantificación por ICP-OES. Para ello, tras las 24 h de incubación, se resuspendieron en PBS, las células crecidas en placas de (3X4) incubadas con NP mediante tripsinación y se centrifugación lenta (2000 rpm durante 30 min) para descartar las NP no internalizadas que no hubieran sido eliminadas en los lavados con PBS.

Por una parte, el número de células de esta población fue cuantificado mediante un hemocitómetro, a partir de una alícuota de células previamente teñidas con azul de tripán. Por otra, la cantidad de Au internalizada por las células, fue cuantificada digiriendo el residuo de la centrifugación en agua regia y analizado el contenido de Au por ICP-OES.

La [Figura 5.18](#) muestra los resultados obtenidos para la cantidad de Au por célula en poblaciones de células HeLa incubadas con distintas concentraciones de NPMPH y NPMPH@PMAG.



**Figura 5.18** Concentración de Au por célula medidas por ICP-OES en células HeLa incubadas con distintas concentraciones de NPMPH (rojo) y NPMPH@PMAG (gris).

El histograma muestra que la cantidad de Au internalizado crece con la concentración de NPMPH utilizadas en la incubación. Para las concentraciones más altas, resulta claro que el recubrimiento con PMAG favorece la internalización de las NPMPH. Observamos que la cantidad de Au detectada en el interior de las células es 1,5 veces superior que en el caso de NPMPH sin recubrir, alcanzando valores de 64 pg de Au por célula.

Aunque las NPMPH desarrolladas en esta tesis presentan una composición de fases compleja ( $\text{Au}+\text{Fe}_3\text{O}_4+\text{SiO}_2$ ), a la hora de analizar los procesos de internalización, podemos asumir que la interacción con la membrana plasmática de las células viene determinada principalmente por la composición de su superficie. Gracias al diseño escogido para las NPMPH, las fases de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y Au se encuentran completamente rodeadas por una matriz de sílice ([Figura 3.18](#)) y por tanto, en el análisis de los estudios de internalización, las NPMPH pueden ser asumidas como NP de sílice con un  $D_H$  en torno a 170nm.

Existen múltiples revisiones bibliográficas que analizan cómo la composición, el tamaño y el recubrimiento de las NP influyen en el mecanismo de internalización

escogido por la célula<sup>139,140</sup>. En la mayoría de los casos, los mecanismos de internalización se dividen en dos grandes familias: la fagocitosis, llevada a cabo por células como los macrófagos, especializadas en atrapar elementos de gran tamaño (> 500nm); y la pinocitosis, presente en la gran mayoría de células, y dentro de la cual se engloban los procesos de macrocitosis, endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina y endocitosis independiente de clatrina y caveolina<sup>141</sup>.

Los estudios de Liu y col.<sup>142</sup> señalaron que en el caso de las NP de sílice, el mecanismo de pinocitosis seleccionado por la línea celular HeLa varía significativamente en función del tamaño de las NP. En concreto, para NP de 308 nm, se encontró una endocitosis mediada por clatrina, mientras que para internalizar NP de 168 nm, en la membrana plasmática se activan además procesos de internalización mediados por caveolina. Para las NP más pequeñas, se observaron también procesos independientes de clatrina y caveolina. De acuerdo con estos resultados, el tamaño hidrodinámico registrado en las NPMPH se encuentra en el límite entre la endocitosis mediada por clatrina y la mediada por caveolina.

Por otra parte, como ya ha sido indicado, los recubrimientos de las NP pueden favorecer o atenuar los procesos de internalización en la célula, e incluso modificar los mecanismos por los que esta tiene lugar<sup>143</sup>. Según los trabajos llevados a cabo por de la Fuente y col.<sup>144</sup>, entre otros<sup>145</sup>, los recubrimientos con glucosa estimulan la interacción con las balsas lipídicas de la membrana asociadas a las caveolinas, activando este mecanismo de endocitosis. Los autores observaron que la activación de la caveolina, consigue mejorar la eficiencia de internalización de las NP recubiertas con glucosa respecto a las recubiertas con polímeros neutros como el PEG. Además, como se indicó en la introducción, en las células tumorales como las HeLa aparece una sobreexpresión de receptores de glucosa tipo GLUT1 y GLUT3 que les confiere una gran afinidad hacia recubrimientos basados en glicopolímeros o moléculas polisacáridas<sup>146</sup>.

El pequeño tamaño observado en los endosomas de la [Figura 5.17](#) sugiere un encapsulamiento caveosomal<sup>147</sup>, por lo que en nuestro caso, la mejora observada en la internalización de las NPMPH@PMAG podría ser atribuible a la activación de las rutas de endocitosis mediadas por caveolina. No obstante, el análisis del mecanismo de internalización escogido por las células HeLa para la captación de las NPMPH requiere

estudios más detallados con moléculas inhibidoras de cada mecanismo de endocitosis, que escapen a los objetivos de esta tesis.

Los resultados obtenidos permiten corroborar que el recubrimiento con PMAG no solamente confiere una mayor estabilidad coloidal a las NPMPH en medios biológicos, sino que favorece su internalización en células HeLa y de este modo realizar estudios comparativos de la eficacia de los tratamientos magneto-plasmónicos.

### 5.3.3.b Estudios de viabilidad en células HeLa

Antes de analizar la efectividad de los tratamientos magneto-plasmónicos propuestos, se analizó el efecto citotóxico que las NPMPH@PMAG tienen sobre las células HeLa y se comparó con la toxicidad de cada uno de sus componentes utilizando muestras de AuNR@SiO<sub>2</sub>@PMAG y NPM@CA de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

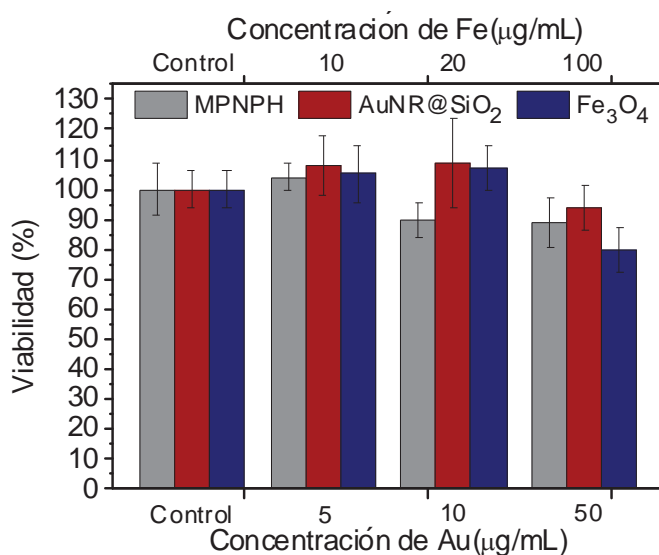
La [Figura 5.19](#) muestra los resultados de los ensayos de viabilidad MTT obtenidos para los distintos coloides y concentraciones estudiadas. En el eje inferior, se indica la concentración de Au correspondiente a las NPMPH y los AuNR@SiO<sub>2</sub>; mientras que en el eje superior se indica la concentración de Fe de las NPMPH y de las NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Tal como se deduce de los ejes, para las NPMPH utilizadas, la proporción Fe: Au es 2:1.

Observamos que, para todas las concentraciones estudiadas, la viabilidad celular está por encima del 80%. En concentraciones de 10 µg/mL de Au (20 µg/mL de Fe) se observa una mayor toxicidad de las NPMPH respecto a la del resto de muestras. Debe tenerse en cuenta que para una misma concentración de Au/Fe, las NPMPH introducen una mayor cantidad de material en la célula, puesto que cargan con ambos materiales simultáneamente.

A pesar de ello, en el caso de las concentraciones más altas observamos que las NPMPH presentan una viabilidad (89%) superior a la de las NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> solas (80%). Estos resultados parecen estar en consonancia con los trabajos de Hilger y col.<sup>148</sup> en los que se estudian los efectos citotóxicos de NP tipo Jano de Au/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> sobre células endoteliales y macrófagos. Estos estudios analizaron la viabilidad mediante ensayos MTT, pero también el consumo del trifosfato de adenosina (ATP) como indicador de

estrés metabólico, la producción de especies oxidativas (ROS) y el daño sufrido en el contenido genético.

De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores, se concluyó que en concentraciones elevadas, las NPM de  $Fe_3O_4$  pueden producir un cierto estrés oxidativo en las células. Sin embargo, al utilizar NP híbridas en las que el óxido de Fe va acompañado de una fase de Au, los efectos citotóxicos de la  $Fe_3O_4$  se vieron atenuados. Las razones detrás de esta inhibición de la toxicidad aún requieren análisis más detallados sobre la posible catalización de los ROS por parte del Au. No obstante, las observaciones realizadas en esta tesis parecen confirmar las observaciones de Hilger y col. sobre los efectos sinérgicos de las fases de Au y  $Fe_3O_4$  en la toxicidad de las NP.



**Figura 5.19** Estudio de viabilidad celular por MTT de células HeLa incubadas con diferentes concentraciones de NPM de  $Fe_3O_4$  (azul), Au (granate) y NPMPH (gris).

Por último, merece la pena destacar que aunque las moléculas de glucosa del PMAG y el ácido cítrico que recubre las NPM son consideradas como biocompatibles, los experimentos de viabilidad celular pueden verse influidos por estos recubrimientos. Para confirmar el efecto positivo de la fase de Au, sería necesario analizar pormenorizadamente el efecto de los recubrimientos sobre la viabilidad celular de los cultivos y normalizar los diferentes grados de internalización en la célula de las NP analizadas.

### 5.3.4 Tratamiento magneto-plasmónico *in vitro* de células HeLa

En el desarrollo de la tesis no se dispuso de un sistema experimental que permitiera combinar los tratamientos de HTM y PT en un ambiente estéril para los cultivos celulares. No obstante, en el [Apartado 5.3.1](#) se observó que el calor generado mediante luz IR resultaba muy superior a la disipación de calor mediante campos magnético AC. Por este motivo, en el diseño de un posible tratamiento magneto-plasmónico se optó por combinar la PT con el daño mecánico ejercido mediante campos magnéticos rotatorios.

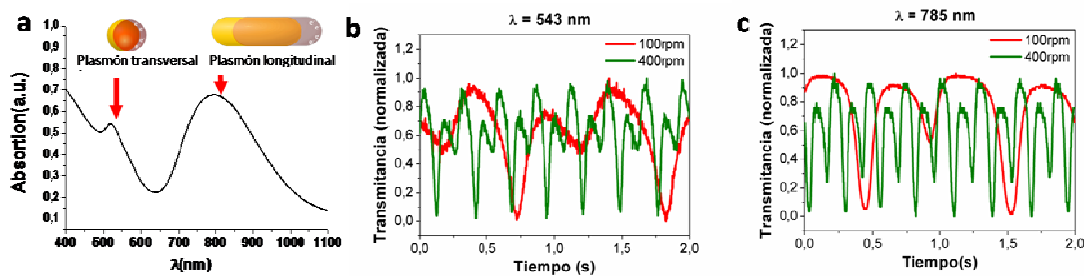
#### 5.3.4.a Daño mecánico en células HeLa mediante campos magnéticos rotatorios

Como se indicó en la introducción, existen tratamientos anticancerígenos basados en NP alternativos al daño térmico. Uno de los más recientemente explorados consiste en utilizar NPM y campos magnéticos rotatorios (o alternos) de baja frecuencia para inducir un daño mecánico en las células tumorales. La mayor limitación de este tipo de terapias es conocer la frecuencia e intensidad de campo en las que se produce una rotación efectiva de las NPM en el interior celular. Una ventaja diferencial de las NPMPH en este aspecto, es que la respuesta plasmónica de los núcleos de Au permite conocer la orientación relativa de las NP en suspensión y saber si las NP rotan.

Esto es debido a que la geometría anisótropa de los AuNR hace que la absorción de luz dependa de la orientación de sus ejes respecto al haz de luz incidente. Cuando la luz atraviesa su eje longitudinal, la oscilación electrónica inducida se produce en sus ejes transversales, lo que conlleva una fuerte absorción de luz en la región visible del espectro ([Figura 5.20a](#)). En cambio, cuando la luz atraviesa un eje transversal, la oscilación electrónica asociada al plasmón se produce tanto en el eje longitudinal como en el otro eje transversal, de modo que se genera un pico de absorción en el IR y otro en el visible, esta vez de menor intensidad.

Las [Figuras 5.20b](#) y [c](#) muestran las mediciones experimentales de intensidad de luz transmitida respecto al tiempo, cuando se hace atravesar un haz de luz laser de  $\lambda=543$  nm y  $\lambda=785$  nm a través del coloide y se les aplica un campo magnético rotatorio de 120 Oe en un plano que contiene al rayo laser. Observamos que la luz transmitida presenta mínimos periódicos cuya frecuencia resulta igual a la frecuencia del campo rotatorio. Esto nos indica que existe una relación directa entre la respuesta magnética de las NPMPH y su absorción óptica en las longitudes de onda analizadas.

Los resultados obtenidos, pueden ser explicados considerando que la disposición lineal de las NPM alrededor de los AuNR hace que a las NPMPH les resulte más favorable energéticamente alinear su eje longitudinal con las líneas de campo. Por este motivo, el campo rotatorio hace que los núcleos de Au giren con él de manera que la incidencia de la luz se produzca sobre sus ejes transversal y longitudinal alternativamente, lo que genera mínimos periódicos en la luz transmitida correspondiente a las longitudes de onda de sus plasmones longitudinal y transversal. El **Vídeo 2** del documento electrónico suplementario muestra el cambio de opacidad que se observa a simple vista al someter las NPMPH a un campo magnético rotatorio.

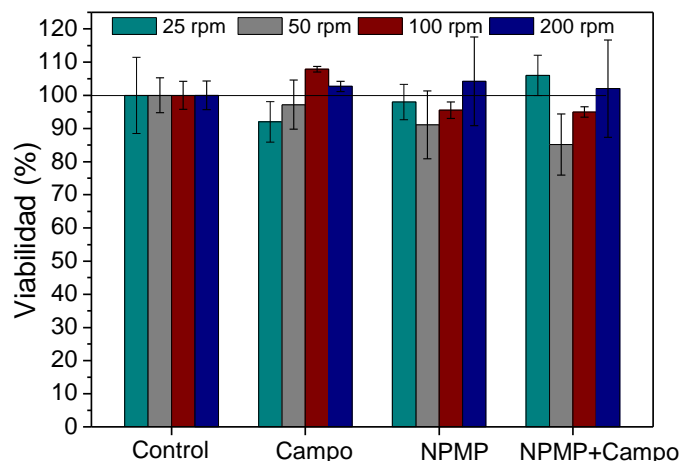


**Figura 5.20** (a) Espectro de extinción de las NPMPH con la posición del plasmón transversal y longitudinal. Transmitancia de las NPMPH en un campo rotatorio de 100 rpm y 400 rpm al iluminarlas con un laser de: (b)  $\lambda=543$  nm y (c)  $\lambda=543$  nm.

Por tanto, la respuesta magneto-plasmónica de las NPMPH nos permite comprobar mediante un simple experimento de absorción, la capacidad que tienen estas NP en estado coloidal de seguir al campo magnético aplicado. Esto abre la puerta a la realización de experimentos magnetorreológicos con un registro óptico de la rotación en entornos biológicos así como en otro tipo de medios.

### 5.3.4.b Daño mecánico en células HeLa mediante campos magnéticos rotatorios

Para conocer las condiciones óptimas de frecuencia de rotación a la hora de ejercer un daño celular efectivo, se realizó un ensayo de viabilidad MTT en poblaciones celulares incubadas con una concentración NPMPH de 10  $\mu\text{g/mL}$  y sometidas a campos rotatorios de diferentes velocidades de rotación durante 30 min. En la [Figura 5.21](#) se muestran los resultados de viabilidad obtenidos para las diferentes frecuencias aplicadas, así como la de sus controles.

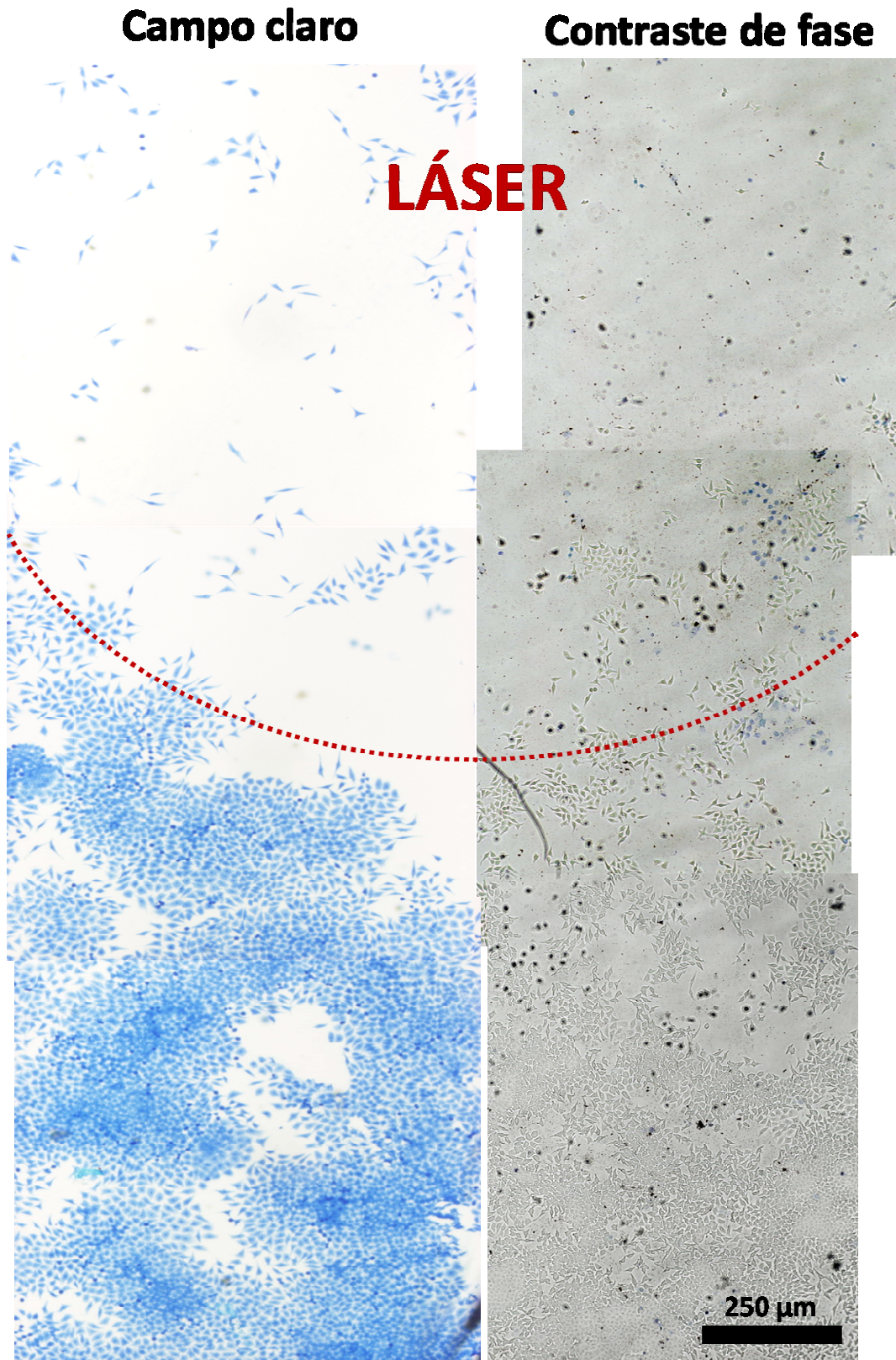


**Figura 5.21** Estudios de viabilidad MTT de células HeLa incubadas con para campos magnéticos rotatorios aplicados durante 30 min con velocidades a: 25 rpm (turquesa), 50 rpm (gris), 100 rpm (rojo), 200 rpm (azul).

De acuerdo con los histogramas, la velocidad de rotación óptima para conseguir el máximo daño celular es de 50 rpm, lo que corresponde a una frecuencia de 1 Hz aproximadamente. Cualquier efecto de calentamiento como consecuencia de la rotación puede ser descartado en este rango de frecuencias<sup>63</sup>. Por tanto, observamos que es posible ejercer un daño en los cultivos in vitro de manera remota sin elevar la temperatura celular. Aunque existe aún cierta controversia, los daños producidos por la actuación con campos rotatorios sobre NPM internalizadas son generalmente atribuidos a disrupción de la membrana de los lisosomas en los que están encapsuladas y la liberación del contenido lisosomal (ácido) en el entorno citoplasmático<sup>59</sup>.

#### 5.3.4.c Tratamiento fototérmico en células HeLa

Por otra parte, se analizó la eficacia del tratamiento PT en células HeLa incubadas con NPMPH y con AuNR@SiO<sub>2</sub>. En la [Figura 5.22](#) aparece una composición de imágenes de microscopía de campo claro de una población de células fijadas con etanol y teñidas con azul de metileno (izquierda) junto a una composición de imágenes de microscopía por contraste de fase de una población de células teñidas con azul de tripán y observadas inmediatamente después de la tinción (derecha). En ambos casos se trata de células HeLa incubadas con 10 µg/mL de NPMPH e irradiadas con un laser de  $\lambda=785$  nm de potencia 0,33 W/cm<sup>2</sup> durante 15 min y observadas inmediatamente después del tratamiento. El límite del haz láser aparece representado como una línea roja discontinua.



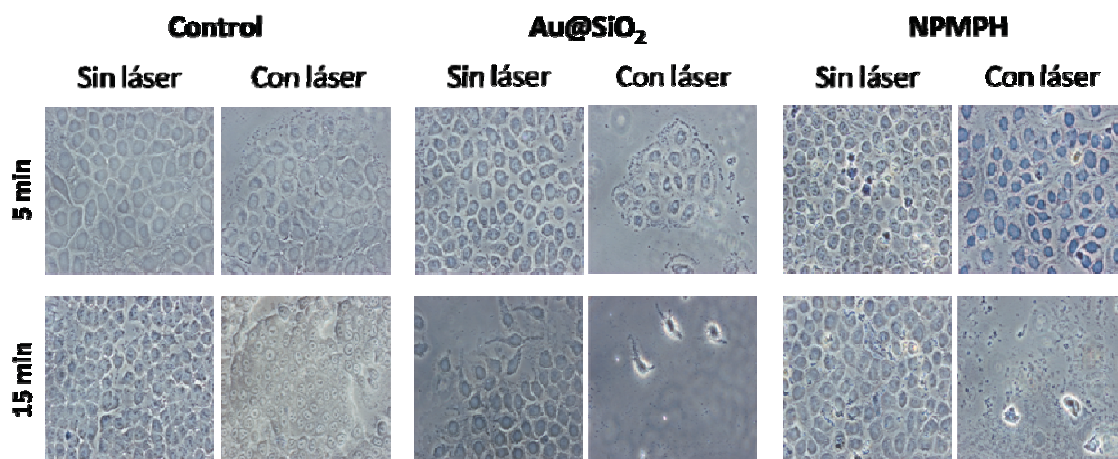
**Figura 5.22** Imágenes de células HeLa incubadas con 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NPMPH irradiadas localmente con un laser de  $\lambda = 785 \text{ nm}$  de potencia  $0,33 \text{ W}/\text{cm}^2$ . Microscopía de campo claro de células fijadas y teñidas con azul de metileno (izquierda) y microscopía de contraste de fase de células teñidas con azul de tripán (derecha).

En la parte inferior de las imágenes se encuentra la región control, en la que las células no han sido irradiadas con láser. Observamos que la densidad celular es alta en ambos casos y que en la imagen de contraste de fase solamente una pequeña porción de ellas aparecen teñidas con azul de tripán (~ 2%). A medida que nos acercamos a la región irradiada observamos que la densidad celular disminuye y la proporción de células teñidas con azul de tripán crece hasta el 10 % aproximadamente. Por último, en la región donde el láser ha incidido con su máxima intensidad, la presencia de células es testimonial y estas aparecen en su mayoría teñidas con azul de tripán.

Para hacer una correcta interpretación de las imágenes debe tenerse en cuenta que, durante el proceso de muerte, las células atraviesan una primera fase en la que la membrana pierde su integridad, lo que permite al azul de tripán penetrar hasta el citoplasma y teñir la célula con una coloración azul fácilmente identificable en las imágenes de contraste de fase. Cuando el proceso de muerte celular se completa, las proteínas que unen la célula sustrato empiezan a degradarse y la célula pierde adhesión. Durante los procesos de tinción y lavado con PBS, las células con menor adhesión se desprenden de la placa, lo que hace que la placa aparezca en esta región con una menor densidad celular.

De acuerdo con esto, se puede considerar que la diferencia de densidad celular observada entre la región control y la tratada con láser es consecuencia de la desaparición de las células muertas durante los procesos de tinción y lavado. Además, la tinción con azul de tripán observada en las imágenes de contraste de fase, nos indica que existe una zona de transición en la que la intensidad del láser decrece y las células no han completado el proceso de muerte celular en el momento de la observación. Mediante un ensayo de tinción con azul de tripán similar al descrito, se realizó un estudio comparativo de eficacia del tratamiento PT mediado por AuNR@SiO<sub>2</sub> y NPMPH, para tiempos de tratamiento de 5 y 15 min.

En la [Figura 5.23](#) podemos observar cómo las muestras control, incubadas sin NP, presentan una alta densidad celular para los dos tiempos de tratamiento estudiados tanto en las regiones irradiadas como en las regiones no tratadas. En cambio, cuando las células son incubadas con AuNR@SiO<sub>2</sub> o NPMPH, la irradiación láser supone un claro descenso del número de células en la región irradiada. La pérdida de estructura morfológica en las células restantes y los restos celulares observados en estas regiones son los propios una muerte apoptótica de las células.



**Figura 5.23** Imágenes por contraste de fase del ensayo de viabilidad celular por tinción azul de tripán para los tratamientos de 5 y 15 min de las muestras incubadas: sin NP (control), con  $Au@SiO_2$  y con NPMPH.

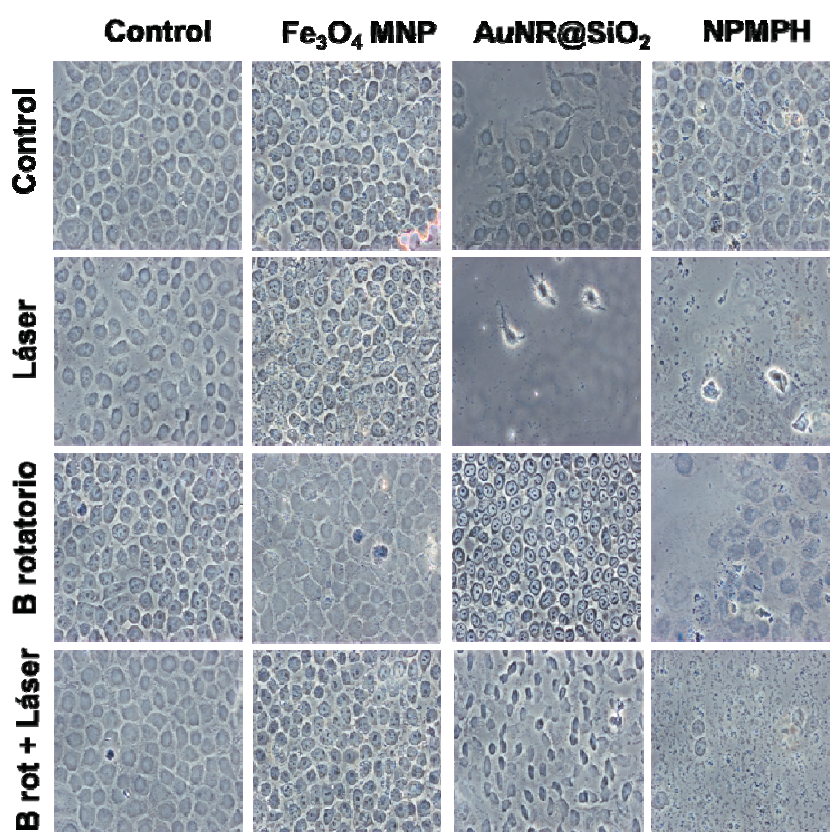
En el caso de los  $AuNR@SiO_2$ , aunque las células presentan una pared celular alterada, no se observa una tinción del citoplasma en los 5 primeros minutos de tratamiento. Es a los 15 min de tratamiento PT, cuando se observó una clara reducción de la densidad de población celular y una morfología celular dañada.

Resultados análogos fueron observados en el caso de las NPMPH. A los 5 min de radiación, las células aparecen en su mayoría teñidas en azul pero mantiene una morfología similar a la de las células sin tratar. A los 15 min, la región irradiada aparece cubierta de restos celulares y en las células restantes aparece una pérdida significativa de su integridad estructural. El tamaño del haz láser utilizado (2mm X 3mm), no permitió realizar el tratamiento sobre una población completa para corroborar estos resultados mediante ensayos MTT.

### 5.3.4.d Calienta y agita: terapia magneto-plasmónica combinada

La terapia magneto-plasmónica desarrollada en esta tesis se realizó combinando el daño fototérmico inducido con la radiación IR y el daño mecánico producido por campos magnéticos rotatorios de 120 Oe y 50 rpm. Para comparar estos tratamientos se utilizaron poblaciones celulares con una densidad similar, incubadas con NPM (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Fe), AuNR@SiO<sub>2</sub> (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Au) y NPMPH (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Au), respectivamente, y se analizó su viabilidad mediante ensayos con tinción por azul de tripán.

La [Figura 5.24](#) es un compendio de los resultados obtenidos mediante imagen por contraste de fase para los distintos nanoagentes en las terapias magnética, plasmónica y magneto-plasmónica. En todos los casos las poblaciones fueron estudiadas inmediatamente después de los tratamientos.



**Figura 5.24** Imágenes por contraste de fase de los ensayo de viabilidad celular para los tratamientos con láser, campos magnéticos rotatorios y tratamiento combinados de láser y campos magnéticos rotatorios en células HeLa: sin NP (control), con Au@SiO<sub>2</sub>, con NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y con NPMPH.

Observamos que ninguno de los tratamientos analizados produce un daño celular aparente en las células incubadas sin NP (control). En el caso de las NPM, ni los campos magnéticos rotatorios ni tampoco el calentamiento producido por la irradiación láser suponen un daño perceptible en las células tratadas.

Los tratamientos realizados en células incubadas con AuNR@SiO<sub>2</sub> muestran que mientras que los tratamientos con radiación láser suponen una pérdida de estructura y una tinción de las células, los campos magnéticos rotatorios no producen cambios apreciables respecto a las muestras control. Lo que parece predecible dado el carácter no ferromagnético de estos materiales.

En cambio los tratamientos realizados con NPMPH parecen indicar un efecto citotóxico en las terapias magnética y plasmónica llevadas a cabo. En el apartado anterior, los ensayos de viabilidad mostraron que el tratamiento con radiación láser supone una clara reducción de la viabilidad celular al utilizar este tipo de NP. En la [Figura 5.24](#) se observa además que las células tratadas con campos magnéticos rotatorios aparecen en su mayoría teñidas con azul de tripán. Este nivel de tinción contrasta con la efectividad del tratamiento medida en los ensayos de MTT. No obstante, debe tenerse en cuenta que el protocolo de los ensayos de MTT estudia los efectos sobre la viabilidad 24 h después del tratamiento, lo que permite a las células recuperarse de los daños reversibles.

La combinación de estos dos tratamientos permite realizar un daño combinado y de esta manera superar limitaciones de los tratamientos individuales como los de la termorresistencia o el bajo daño observado en los tratamientos de actuación mecánica<sup>69</sup>.

## 5.4 CONCLUSIONES

En el capítulo 5 se ha utilizado las NPMPH sintetizadas para el desarrollo de terapias magneto-plasmónicas contra el cáncer. A partir de los experimentos expuestos a lo largo del capítulo se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- La hibridación llevada a cabo entre los AuNR y las NPM permite combinar el poder calefactor de ambos componentes en una única entidad. Además, gracias a la estructura diseñada, aparecen efectos sinérgicos que favorecen la generación local de calor por hipertermia magnética elevando los valores de SAR hasta 138 W/g respecto a los 132 W/g obtenidos en las NPM que los componen.
- El recubrimiento de las NPMPH con glicopolímeros como el PMAG inhibe la formación de la corona proteica cuando las NPMPH se dispersan en medio de cultivo celular, confiere a las NP una afinidad hacia receptores de glucosa como el conA y favorece la internalización de las NPMPH en células tumorales de la línea HeLa.
- Al ser incubadas con células HeLa, las NPMPH diseñadas mostraron una viabilidad superior al 85% en todas las concentraciones analizadas.
- La componente plasmónica de las NPMPH sintetizadas permite conocer mediante medidas de absorción óptica su orientación respecto a la luz incidente al ser sometidas a un campo magnético rotatorio.
- Las NPMPH sintetizadas permiten combinar tratamientos anticancerígenos magnéticos y plasmónicos. Un ejemplo de ello es la combinación del daño mecánico producido mediante campos magnéticos rotatorios y el tratamiento PT. La combinación de estos tratamientos demostró una gran eficacia en el tratamiento in vitro de células HeLa.

## 5.5 REFERENCIAS

1. Carrey, J., Mehdaoui, B. & Respaud, M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. *J. Appl. Phys.* **109**, 83921 (2011).
2. Rosensweig, R. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.* **252**, 370–374 (2002).
3. Hergt, R. & Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J. Magn. Magn. Mater.* **311**, 187–192 (2007).
4. Raikher, Y. L., Stepanov, V. I. & Perzynski, R. Dynamic hysteresis of a superparamagnetic nanoparticle. in *Physica B: Condensed Matter* **343**, 262–266 (2004).
5. García-Otero, J., García-Bastida, A. . & Rivas, J. Influence of temperature on the coercive field of non-interacting fine magnetic particles. *J. Magn. Magn. Mater.* **189**, 377–383 (1998).
6. Pfeiffer, H. Determination of anisotropy field distribution in particle assemblies taking into account thermal fluctuations. *Phys. status solidi* **118**, 295–306 (1990).
7. Usov, N. A. Low frequency hysteresis loops of superparamagnetic nanoparticles with uniaxial anisotropy. *J. Appl. Phys.* **107**, 123909 (2010).
8. Tan, R. P., Carrey, J. & Respaud, M. Magnetic hyperthermia properties of nanoparticles inside lysosomes using kinetic Monte Carlo simulations : Influence of key parameters and dipolar interactions , and evidence for strong spatial variation of heating power. *Phys. Rev. B* **90**, 214421 (2014).
9. Mamiya, H. *et al.* Hyperthermic effects of dissipative structures of magnetic nanoparticles in large alternating magnetic fields. *Sci. Rep.* **1**, 157 (2011).
10. Mamiya, H. & Hiroaki. Recent Advances in Understanding Magnetic Nanoparticles in AC Magnetic Fields and Optimal Design for Targeted Hyperthermia. *J. Nanomater.* **2013**, 1–17 (2013).
11. Raikher, Y. L. & Stepanov, V. I. Absorption of AC field energy in a suspension of magnetic dipoles. *J. Magn. Magn. Mater.* **320**, 2692–2695 (2008).
12. Obaidat, I., Issa, B. & Haik, Y. Magnetic Properties of Magnetic Nanoparticles for Efficient Hyperthermia. *Nanomaterials* **5**, 63–89 (2015).
13. Ludwig, R. *et al.* Structural properties of magnetic nanoparticles determine their heating behavior - an estimation of the in vivo heating potential. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 602 (2014).
14. Dobson, J. & Telling, N. D. In Situ Measurement of Magnetization Relaxation of Internalized Nanoparticles in Live Cells. 231–240 (2015).
15. Dennis, C. L. *et al.* The influence of collective behavior on the magnetic and heating properties of iron oxide nanoparticles The influence of collective behavior on the magnetic and heating properties of iron oxide nanoparticles. **319**, 7–10 (2014).
16. Martinez-Boubeta, C. *et al.* Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Sci Rep* **3**,

- 1652 (2013).
17. Dennis, C. L. *et al.* Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. *Nanotechnology* **20**, 395103 (2009).
  18. Mehdaoui, B. *et al.* Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **87**, (2013).
  19. Serantes, D. *et al.* Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles. *J. Appl. Phys.* **108**, 73918 (2010).
  20. Materia, M. E. *et al.* Mesoscale assemblies of iron oxide nanocubes as heat mediators and image contrast agents. *Langmuir* **31**, 808–816 (2015).
  21. Skumiel, A., Hornowski, T. & Józefczak, A. Heating characteristics of transformer oil-based magnetic fluids of different magnetic particle concentrations. in *International Journal of Thermophysics* **32**, 876–885 (2011).
  22. Urtizberea, A., Natividad, E., Arizaga, A., Castro, M. & Mediano, A. Specific Absorption Rates and Magnetic Properties of Ferrofluids with Interaction Effects at Low Concentrations. *J. Phys. Chem. C* **114**, 4916–4922 (2010).
  23. Mathuriya, A. S. Magnetotactic bacteria: nanodrivars of the future. *Crit. Rev. Biotechnol.* **8551**, 1–15 (2015).
  24. Alphandéry, E., Chebbi, I., Guyot, F. & Durand-Dubief, M. Use of bacterial magnetosomes in the magnetic hyperthermia treatment of tumours: a review. *Int. J. Hyperth.* **29**, 801–9 (2013).
  25. Etheridge, M. L. *et al.* Accounting for biological aggregation in heating and imaging of magnetic nanoparticles. *Technology* **2**, 214–228 (2014).
  26. Serantes, D. *et al.* Multiplying magnetic hyperthermia response by nanoparticle assembling. *J. Phys. Chem. C* **118**, 5927–5934 (2014).
  27. Andreu, I., Natividad, E., Solozábal, L. & Roubeau, O. Nano-objects for addressing the control of nanoparticle arrangement and performance in magnetic hyperthermia. *ACS Nano* **9**, 1408–1419 (2015).
  28. Ovejero, J. G. *et al.* Effects of inter- and intra-aggregate magnetic dipolar interactions on the magnetic heating efficiency of iron oxide nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 10954–10963 (2016).
  29. Link, S. & El-sayed, M. A. M. ~A. M. a. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals. *Int. Rev. Phys. Chem.* **19**, 409–453 (2000).
  30. Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in Medical Science* **23**, 217–228 (2008).
  31. Link, S., Burda, C., Nikoobakht, B. & El-Sayed, M. A. Laser-Induced Shape Changes of Colloidal Gold Nanorods Using Femtosecond and Nanosecond Laser Pulses. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6152–6163 (2000).
  32. Nguyen, S. C. *et al.* Study of Heat Transfer Dynamics from Gold Nanorods to the Environment via Time-Resolved Infrared Spectroscopy. *ACS Nano* **10**, 2144–2151 (2016).

33. Overgaard, J. History and heritage. *Hyperthermic Oncol.* **2**, 3–8 (1985).
34. Gray, R. T. *Stations of the divided subject: contestation and ideological legitimation in German bourgeois literature, 1770-1914*. (Stanford University Press, 1995).
35. Busch, W. Uber den Eingluss, welchen heftigere Erysepeln zuweilen auf organisierte Neubel-dungers ausüben. *Verhanal d Naturh Verd Pruess (Rheinl u Westphal,Bonn)* **23**, 28–30 (1866).
36. Streffer, C. *Hyperthermia and the Therapy of Malignant Tumors*. (Springer Berlin Heidelberg, 1987).
37. Coley, W. B. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann. Surg.* **14**, 199–200 (1891).
38. Gas, P. Essential Facts on the History of Hyperthermia and their Connections with Electromedicine. *Prz. Elektrotechniczny* **87**, 37–40 (2011).
39. Sulyok, I. *et al.* Effect of preoperative fever-range whole-body hyperthermia on immunological markers in patients undergoing colorectal cancer surgery. doi:10.1093/bja/aes248
40. Moros, E. *Physics of thermal therapy: fundamentals and clinical applications*. (CRC/Taylor & Francis, 2013).
41. Hager, E. D. in *Hyperthermia in Cancer Treatment: A Primer* 167–182 (Springer US, 2006). doi:10.1007/978-0-387-33441-7\_12
42. Zhou, W., Liu, X. & Ji, J. More efficient NIR photothermal therapeutic effect from intracellular heating modality than extracellular heating modality: an in vitro study. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 1128 (2012).
43. Nakanishi, T., Matsuda, S., Kaneko, K., Zhang, H. & Osaka, T. *In Vitro* Investigation of the Effect of Intracellular and Extracellular Magnetite Nanoparticles Subjected to Alternating Magnetic Field on MCF-7 Human Breast Cancer Cells. *ChemistrySelect* **1**, 6092–6102 (2016).
44. Sanz, B. *et al.* Magnetic hyperthermia enhances cell toxicity with respect to exogenous heating. (2017). doi:10.1016/j.biomaterials.2016.11.008
45. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. & Hori, K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release* **65**, 271–284 (2000).
46. El-Sayed, I. H., Huang, X. H. & El-Sayed, M. A. Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: Applications in oral cancer. *Nano Lett.* **5**, 829–834 (2005).
47. Kumar, A. *et al.* Gold nanoparticles functionalized with therapeutic and targeted peptides for cancer treatment. (2012). doi:10.1016/j.biomaterials.2011.10.058
48. Vankayala, R., Huang, Y. K., Kalluru, P., Chiang, C. S. & Hwang, K. C. First demonstration of gold nanorods-mediated photodynamic therapeutic destruction of tumors via near infra-red light activation. *Small* **10**, 1612–1622 (2014).
49. Bayazitoglu, Y., Kheradmand, S. & Tullius, T. K. An overview of nanoparticle assisted laser therapy. *Int. J. Heat Mass Transf.* **67**, 469–486 (2013).
50. Pedrosa, P., Vinhas, R., Fernandes, A. & Baptista, P. Gold Nanotheranostics:

- Proof-of-Concept or Clinical Tool? *Nanomaterials* **5**, 1853–1879 (2015).
51. Riley, R. S. & Day, E. S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* (2017). doi:10.1002/WNAN.1449
  52. Gilchrist, R. K. *et al.* Selective Inductive Heating of Lymph Nodes \*. *Ann. Surg.* **146**, 596–606 (1957).
  53. Maier-Hauff, K. *et al.* Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.* **103**, 317–324 (2011).
  54. MagForce. <http://www.magforce.de>. (2017).
  55. Jaque, D. *et al.* Nanoparticles for photothermal therapies. *Nanoscale* **6**, 9494–530 (2014).
  56. Salunkhe, A. B., Khot, V. M. & Pawar, S. H. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles : A Status Review. doi:10.2174/1568026614666140118203550
  57. Rampersaud, E. N., Vujaskovic, Z. & Inman, B. a. Hyperthermia as a treatment for bladder cancer. *Oncology (Williston Park)*. **24**, 1149–55 (2010).
  58. Kim, D.-H. *et al.* Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction. doi:10.1038/nmat2591
  59. Zhang, E. *et al.* Dynamic Magnetic Fields Remote- Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation. **8**, 3192–3201 (2014).
  60. Contreras, M. F., Sougrat, R., Zaher, A., Ravasi, T. & Kosel, J. Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 2141–2153 (2015).
  61. Soukup, D., Moise, S., C?spedes, E., Dobson, J. & Telling, N. D. *In Situ* Measurement of Magnetization Relaxation of Internalized Nanoparticles in Live Cells. *ACS Nano* **9**, 231–240 (2015).
  62. Ludwig, R. *et al.* Structural properties of magnetic nanoparticles determine their heating behavior - an estimation of the in vivo heating potential. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 602 (2014).
  63. Golovin, Y. I., Klyachko, N. L., Majouga, A. G., Sokolsky, M. & Kabanov, A. V. Theranostic multimodal potential of magnetic nanoparticles actuated by non-heating low frequency magnetic field in the new-generation nanomedicine. *J. Nanoparticle Res.* **19**, 63 (2017).
  64. Cheng, Y. *et al.* Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma. *J. Control. Release* **223**, 75–84 (2016).
  65. Shen, Y. *et al.* Elongated Nanoparticle Aggregates in Cancer Cells for Mechanical Destruction with Low Frequency Rotating Magnetic Field. *Theranostics* **7**, 1735–1748 (2017).
  66. Domenech, M., Marrero-Berrios, I., Torres-Lugo, M. & Rinaldi, C. Lysosomal

- Membrane Permeabilization by Targeted Magnetic Nanoparticles in Alternating Magnetic Fields. *ACS Nano* **7**, 5091–5101 (2013).
67. Vegerhof, A. *et al.* Targeted Magnetic Nanoparticles for Mechanical Lysis of Tumor Cells by Low-Amplitude Alternating Magnetic Field. *Materials (Basel)*. **9**, 943 (2016).
  68. Lepock, J. R., Frey, H. E., Rodahl, A. M. & Kruuv, J. Thermal analysis of CHL V79 cells using differential scanning calorimetry: Implications for hyperthermic cell killing and the heat shock response. *J. Cell. Physiol.* **137**, 14–24 (1988).
  69. Iovino, N., Bohorquez, A. C. & Rinaldi, C. Magnetic nanoparticle targeting of lysosomes: a viable method of overcoming tumor resistance? *Nanomedicine* **9**, 937–939 (2014).
  70. Andreu, I., Natividad, E., Solozábal, L. & Roubeau, O. Nano-objects for addressing the control of nanoparticle arrangement and performance in magnetic hyperthermia. *ACS Nano* **9**, 1408–1419 (2015).
  71. Espinosa, A. *et al.* Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano* **10**, 2436–2446 (2016).
  72. Di Corato, R. *et al.* Combining Magnetic Hyperthermia and Photodynamic Therapy for Tumor Ablation with Photoresponsive Magnetic Liposomes. **9**, 2904–2916 (2015).
  73. Espinosa, A. *et al.* Can magneto-plasmonic nanohybrids efficiently combine photothermia with magnetic hyperthermia? *Nanoscale* **7**, 18872–18877 (2015).
  74. Torchilin, V. P. Passive and active drug targeting: Drug delivery to tumors as an example. *Handbook of Experimental Pharmacology* **197**, 3–53 (2010).
  75. Markman, J. L., Rekechenetskiy, A., Holler, E. & Ljubimova, J. Y. Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 1866–1879 (2013).
  76. Sperling, R. a & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–1383 (2010).
  77. Cole, A. J., Yang, V. C. & David, A. E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles. *Trends Biotechnol.* **29**, 323–332 (2011).
  78. Yin, H., Liao, L. & Fang, J. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect Based Tumor Targeting: The Concept, Application and Prospect. *JSM Clin Oncol Res* **2**, 1–5 (2014).
  79. Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V. & Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. *Journal of Controlled Release* **200**, 138–157 (2015).
  80. Bae, Y. H. & Park, K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J. Control. Release* **153**, 198–205 (2011).
  81. Hobbs, S. K. *et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4607–12 (1998).

82. Palmer, T. N., Caride, V. J., Caldecourt, M. A., Twickler, J. & Abdullah, V. The mechanism of liposome accumulation in infarction. *BBA - Gen. Subj.* **797**, 363–368 (1984).
83. Naahidi, S. *et al.* Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J. Control. Release* **166**, 182–94 (2013).
84. ISO. TC 229: Nanotechnologies. [http://www.iso.org/iso/standards\\_development/technical\\_committees/list\\_of\\_iso\\_technical\\_committees/iso\\_technical\\_committee.htm?commid=381983](http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983)
85. Murashov, V. & Howard, J. *Nanotechnology standards*. (Springer, 2011).
86. Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M. & Chaudhry, Q. A complementary definition of nanomaterial. *Nano Today* **5**, 165–168 (2010).
87. Horikoshi, S. & Serpone, N. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis. Introduction to Nanoparticles* (2013). doi:10.1002/9783527648122.ch1
88. Maeda, H. Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **88**, 53–71 (2012).
89. Prabhakar, U. *et al.* Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res.* **73**, 2412–7 (2013).
90. Stohrer, M., Boucher, Y., Stangassinger, M. & Jain, R. K. Oncotic pressure in solid tumors is elevated. *Cancer Res.* **60**, 4251–5 (2000).
91. Kobayashi, H., Watanabe, R. & Choyke, P. L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? *Theranostics* **4**, 81–89 (2014).
92. Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J. J. & Jallet, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *J. Microencapsul.* **13**, 245–255 (1996).
93. Fujita, T. *et al.* Control of *In Vivo* Fate of Albumin Derivatives Utilizing Combined Chemical Modification. *J. Drug Target.* **2**, 157–165 (1994).
94. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N. & Gambhir, S. S. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine (Lond)*. **6**, 715–28 (2011).
95. Gabizon, A. *et al.* Prolonged Circulation Time and Enhanced Accumulation in Malignant Exudates of Doxorubicin Encapsulated in Polyethylene-glycol Coated Liposomes. *Cancer Res.* **54**, 987–992 (1994).
96. Yoo, J.-W., Chambers, E. & Mitragotri, S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects.
97. Zhu, X. *et al.* Cellular uptake behaviour, photothermal therapy performance, and cytotoxicity of gold nanorods with various coatings. *Nanoscale* **6**, 11462–11472 (2014).
98. Hatakeyama, H., Akita, H. & Harashima, H. A multifunctional envelope type nano device (MEND) for gene delivery to tumours based on the EPR effect: A strategy for overcoming the PEG dilemma. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 152–160

- (2011).
99. Li, X. & Chen, G. Polymer Chemistry Glycopolymer-based nanoparticles: synthesis and application. *Polym. Chem.* **6**, 1407–1650 (2015).
  100. Younes, M., Lechago, L. V., Somoano, J. R., Mosharaf, M. & Lechago, J. Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.* **56**, 1164–7 (1996).
  101. Suganuma, N., Segade, F., Matsuzu, K. & Bowden, D. W. Differential expression of facilitative glucose transporters in normal and tumour kidney tissues. *BJU Int.* **99**, 1143–1149 (2007).
  102. Chen, K., Bao, M., Muñoz Bonilla, A., Zhang, W. & Chen, G. A biomimicking and electrostatic self-assembly strategy for the preparation of glycopolymer decorated photoactive nanoparticles. *Polym. Chem.* **7**, 2565–2572 (2016).
  103. Shan, X. H. *et al.* Targeting Glut1-overexpressing MDA-MB-231 cells with 2-deoxy-d-glucose modified SPIOs. *Eur. J. Radiol.* **81**, 95–99 (2012).
  104. Xiong, F. *et al.* Preparation, Characterization of 2-Deoxy-D -Glucose Functionalized Dimercaptosuccinic Acid-Coated Maghemite Nanoparticles for Targeting Tumor Cells. *Pharm Res* **29**, 1087–1097 (2012).
  105. Atkinson, W. J., Brezovich, I. A. & Chakraborty, D. P. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **BME-31**, 70–75 (1984).
  106. Kita, E. *et al.* Ferromagnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia and thermoablation therapy. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **43**, 474011 (2010).
  107. Coquil, T., Richman, E. K., Hutchinson, N. J., Tolbert, S. H. & Pilon, L. Thermal conductivity of cubic and hexagonal mesoporous silica thin films. *J. Appl. Phys.* **106**, (2009).
  108. Hu, M., Wang, X., Hartland, G. V., Salgueiri??o-Maceira, V. & Liz-Marz??n, L. M. Heat dissipation in gold-silica core-shell nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.* **372**, 767–772 (2003).
  109. Nguyen, S. C. *et al.* Study of Heat Transfer Dynamics from Gold Nanorods to the Environment via Time- Resolved Infrared Spectroscopy. doi:10.1021/acsnano.5b06623
  110. Tang, J., Myers, M., Bosnick, K. A. & Brus, L. E. Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics †. *J. Phys. Chem. B* **107**, 7501–7506 (2003).
  111. Sotiriou, G. a. *et al.* Photothermal killing of cancer cells by the controlled plasmonic coupling of silica-coated Au/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoaggregates. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 2818–2827 (2014).
  112. Ahijado-Guzmán, R. *et al.* Intracellular pH-Induced Tip-to-Tip Assembly of Gold Nanorods for Enhanced Plasmonic Photothermal Therapy. *ACS Omega* **1**, 388–395 (2016).
  113. Li, X. *et al.* Glycopolymer-coated iron oxide nanoparticles: shape-controlled synthesis and cellular uptake. *J. Mater. Chem. B* **2**, 5569–5575 (2014).
  114. Li, X. *et al.* Glycopolymer-based nanoparticles: synthesis and application. *Polym.*

- Chem.* **6**, 1417–1430 (2015).
115. Manna, J., Roy, B. & Sharma, P. Efficient hydrogen generation from sodium borohydride hydrolysis using silica sulfuric acid catalyst. *J. Power Sources* **275**, 727–733 (2015).
  116. Duan, G. *et al.* Preparation and characterization of mesoporous zirconia made by using a poly (methyl methacrylate) template. *Nanoscale Res. Lett.* **3**, 118–122 (2008).
  117. López, T. *et al.* Treatment of parkinson’s disease: Nanostructured sol-gel silica-dopamine reservoirs for controlled drug release in the central nervous system. *Int. J. Nanomedicine* **6**, 19–31 (2011).
  118. White, L. D. & Tripp, C. P. Reaction of (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **232**, 400–407 (2000).
  119. Alvarez-Paino, M., Marcelo, G., Muñoz-Bonilla, A. & Fernández-García, M. Catecholic chemistry to obtain recyclable and reusable hybrid polymeric particles as catalytic systems. *Macromolecules* **46**, 2951–2962 (2013).
  120. Liu, G. *et al.* Enhanced desulfurization performance of PDMS membranes by incorporating silver decorated dopamine nanoparticles. *J. Mater. Chem. A* **2**, 12907–12917 (2014).
  121. Lu, J. *et al.* One-pot synthesis of glycopolymer-porphyrin conjugate as photosensitizer for targeted cancer imaging and photodynamic therapy. *Macromol. Biosci.* **14**, 340–346 (2014).
  122. Lee, H., Lee, B. P. & Messersmith, P. B. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* **448**, 338–341 (2007).
  123. Waite, J. H. & Qin, X. Polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*. *Biochemistry* **40**, 2887–2893 (2001).
  124. Dalsin, J. L., Hu, B. H., Lee, B. P. & Messersmith, P. B. Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 4253–4258 (2003).
  125. Paunescu, T. *et al.* Biology of TiO<sub>2</sub>-oligonucleotide nanocomposites. *Nat. Mater.* **2**, 343–346 (2003).
  126. Xu, C. *et al.* Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9938–9939 (2004).
  127. Malisova, B., Tosatti, S., Textor, M., Gademann, K. & Zürcher, S. Poly(ethylene glycol) adlayers immobilized to metal oxide substrates through catechol derivatives: Influence of assembly conditions on formation and stability. *Langmuir* **26**, 4018–4026 (2010).
  128. Wang, C. X. *et al.* Catechol-based layer-by-layer assembly of composite coatings: a versatile platform to hierarchical nano-materials. *Soft Matter* **11**, 6173–6178 (2015).
  129. Mian, S. A. *et al.* A fundamental understanding of catechol and water adsorption on a hydrophilic silica surface: Exploring the underwater adhesion mechanism of

- mussels on an atomic scale. *Langmuir* **30**, 6906–6914 (2014).
130. Hoyle, C. E. & Bowman, C. N. Thiol-ene click chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition* **49**, 1540–1573 (2010).
  131. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie - International Edition* **40**, 2004–2021 (2001).
  132. Binder, W. H. & Sachsenhofer, R. ‘Click’ chemistry in polymer and materials science. *Macromolecular Rapid Communications* **28**, 15–54 (2007).
  133. Gebauer, J. S. *et al.* Impact of the nanoparticle-protein corona on colloidal stability and protein structure. *Langmuir* **28**, 9673–9679 (2012).
  134. Salvati, A. *et al.* Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 137–43 (2013).
  135. Mandal, D. K. *et al.* Studies of the Binding-Specificity of Concanavalin-a - Nature of the Extended Binding-Site for Asparagine-Linked Carbohydrates. *Biochemistry* **33**, 1157–1162 (1994).
  136. Song, H. M., Wei, Q., Ong, Q. K. & Wei, A. Plasmon-resonant nanoparticles and nanostars with magnetic cores: Synthesis and magnetomotive imaging. *ACS Nano* **4**, 5163–5173 (2010).
  137. Yu, S. *et al.* Magnetic gold nanotriangles by microwave-assisted polyol synthesis. *Nanoscale* **7**, 14039–46 (2015).
  138. Zhou, H., Kim, J. P., Bahng, J. H., Kotov, N. A. & Lee, J. Self-assembly mechanism of spiky magnetoplasmonic supraparticles. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 1439–1448 (2014).
  139. Sun, T. *et al.* Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chemie Int. Ed.* **53**, n/a-n/a (2014).
  140. Beddoes, C. M., Case, C. P. & Briscoe, W. H. Understanding nanoparticle cellular entry: A physicochemical perspective. *Adv. Colloid Interface Sci.* **218**, 48–68 (2015).
  141. Kou, L., Sun, J., Zhai, Y. & He, Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian J. Pharm. Sci.* **8**, 1–10 (2013).
  142. Zhu, J. *et al.* Size-dependent cellular uptake efficiency, mechanism, and cytotoxicity of silica nanoparticles toward HeLa cells. *Talanta* **107**, 408–415 (2013).
  143. Slowing, I., Trewyn, B. G. & Lin, V. S.-Y. Effect of Surface Functionalization of MCM-41-Type Mesoporous Silica Nanoparticles on the Endocytosis by Human Cancer Cells. doi:10.1021/ja0645943
  144. Moros, M. *et al.* Monosaccharides versus PEG-functionalized NPs: Influence in the cellular uptake. *ACS Nano* **6**, 1565–1577 (2012).
  145. McLendon, P. M., Fichter, K. M. & Reineke, T. M. Poly(glycoamidoamine) vehicles promote pDNA uptake through multiple routes and efficient gene expression via caveolae-mediated endocytosis. *Mol. Pharm.* **7**, 738–750 (2010).

146. Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C. & Moreno-Sánchez, R. Kinetics of transport and phosphorylation of glucose in cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **221**, 552–559 (2009).
147. Norkin, L. C., Anderson, H. A., Wolfrom, S. A. & Oppenheim, A. Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Is Followed by Brefeldin A-Sensitive Transport to the Endoplasmic Reticulum, Where the Virus Disassembles. *J. Virol.* **76**, 5156–5166 (2002).
148. Landgraf, L. *et al.* Anti-oxidative effects and harmlessness of asymmetric Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Janus particles on human blood cells. *Biomaterials* **35**, 6986–6997 (2014).

# Chapter VI

**Final Conclusions and  
Future Work**



## 6.1 FINAL CONCLUSIONS

The most significant remarks obtained from the experiments undertaken in this thesis work can be summarized in the following conclusions:

1. The cross-linking between citric acid and polyethilenglycol during sol-gel reactions of tetraethyl ortosilicate can be employed as a self-assembly mechanism of Au and Fe oxide nanoparticles in silica matrix to create hybrid magneto-plasmonic nanoparticles (HMPNP).
2. The core-satellite-shell arrangement of Au nanorods / Fe oxide nanospheres / silica phases obtained for HMPNP presents a strong extinction peak in the infrared part of the spectrum as a consequence of the longitudinal plasmonic resonance of Au core. The numerical model employed in this study to simulate the plasmonic response of these nanostructures predicts that incident light generates a strong confinement of the electric field between the Au nanorod and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. Such confinements, known as hot-spot, explain the shifting and widening of the longitudinal extinction peak of Au nanorods when inserted in hybrid nanostructures.
3. The magnetic response of the Fe oxide nanoparticles changes when they are introduced in the HMPNP structure. The blocking of the individual Brownian rotation and the stronger dipolar interaction associated to the close proximity between them modify their magnetic parameters. Besides, the longitudinal arrangements of the Fe oxide nanoparticles around Au NR enhance the susceptibility and the coercivity of the magnetic system measured for powder at room temperature.
4. Decorating the surface of HMPNP with a glycopolymer it was possible to obtain a hydrodynamic size bellow 200 nm and avoid the formation of protein corona on their surface when dispersed in a bovine serum media for at least 6 hours. Besides it was observed that after coating process, the glucose moieties result still reactive to glucose receptors such as concanavalin A.
5. In vitro experiments showed that the glycopolymer coating help to internalize a higher amount of HMPNP inside tumor cells of HeLa line respect to non-coated ones.

6. The cytotoxicity of HMPNP was evaluated with MTT viability assays observing viabilities over 85% respect to the control for populations incubated with increasing concentrations of Au up to 50  $\mu\text{g/mL}$ . Furthermore, it was observed that at high concentrations the viability is higher than the one registered for Fe oxide nanoparticles coated with citric acid, suggesting a synergetic effect between the chemical phases.
7. The HMPNP developed in this thesis were studied as a potential magneto-plasmonic contrast agent for the detection of cancer cells using two modalities of photoacoustic imaging:
  - a. On one hand they were observed to increase the detection size limit of localized tumors by including a magneto-motive enhancing technique. This evidence was proved using mimetic systems of gelatin.
  - b. On the other hand, it was also possible to take advantage of the strong magnetic response of the HMPNP to concentrate circulating tumor cells inside the detection area of a photoacoustic system coupled to a flowing capillary. According to the numerical calculations and empirical evidences, the geometry of the magnetic gradient must be carefully designed in order to place the highest amount of cells inside the field of view of the photoacoustic system in order to maximize the detection power of this kind of systems.
8. The HMPNP were evaluated also as magneto-plasmonic nanoheaters:
  - a. Applying magnetic field of 670 Oe at 100 kHz it was possible to enhance the amount of heat produce by HMPNP respect to heat produced by their magnetic component individually. Such improvement was resulted as a consequence of an increment of coercivity at high frequencies attributed to dipolar magnetic interactions between Fe oxide nanoparticles.
  - b. It was also observed that the heat produced by HMPNP when they are exposed to a continuous infrared laser is lower than the heat produced by the sum of their components dispersed separately. Such reduction in the heating power was attributed to the plasmonic interaction between the Au nanorods and Fe oxide nanoparticles inside the HMPNP.
9. Thanks to the plasmonic component of the HMPNP it was observed that this kind of nanostructures can be force to stir in a rotating magnetic field of 290 Oe.

10. The heating power and the mechanical response of these HMPNP could be employed to combine the thermal and mechanical injuring of cancer cells in an *in vitro* magneto-plasmonic treatment. According to trypan blue viability assays performed immediately after the treatment, both damage mechanisms induced a reduction of the viability of cancer cells.

## 6.2 FUTURE WORK

In spite of the goals achieved in this thesis, there are still some point that can be analyzed in future works:

1. An interesting parameter to be studied about the synthesis of MPNPH is the length of PEG chains used in the coating of Au nanorods. It is logical to expect that longer polymeric chains will generate nanostructures with larger separation between the Au core and the magnetic nanoparticles. In this way, it would be possible to control the intensity of the interactions between them.
2. It was observed in chapter 4 that the magnetic induction system based on a rotating wheel of permanent magnets presents limitations such as a short penetration length of the magnetic field and a short time of maximum field. Here, we propose the use of cubic and cylindrical magnets to overcome such drawbacks.
3. Internalization studies of magneto-plasmonic nanoparticles in HeLa cells showed that the coating with glycopolymers increases the amount of inorganic materials inside the cells. However, the cause of this enhanced internalization is still unclear.
4. A proper study of the efficiency of magneto-plasmonic treatments requires a mathematical analysis that evaluates the significance of the reduction in viability observed.
5. Using microplates (64 wells) with small volumes (0.2  $\mu\text{L}$ ), it would be possible to irradiate the whole population of cells with a laser of high intensity. In this way, it would be possible to carry out quantitative viability assays such as MTT assays.



# Apéndice A: Teoría de Mie-Gans

## Permitividad en nanopartículas metálicas

Antes de abordar la teoría de Mie-Gans, debemos calcular la dependencia que posee la permitividad asociada a una NP metálica ( $\epsilon$ ) con la frecuencia ( $\omega$ ). Para ello debemos tener en cuenta dos contribuciones: por un lado la permitividad asociada a las transiciones intrabanda ( $\epsilon_{intra}$ ), en la que entran en juego los electrones de la banda de conducción; y por otro lado las transiciones que sufren los electrones desde la banda de valencia a la banda de conducción ( $\epsilon_{inter}$ ).

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_{intra}(\omega) + \epsilon_{inter}(\omega) \quad \text{Ecuación A.1}$$

Si se considera que los electrones de la banda de conducción no perciben el potencial de la red más que en los límites del cristal se puede llevar a cabo la aproximación de electrones libres del modelo de Drude-Sommerfeld<sup>1</sup>. De acuerdo con este modelo, la permitividad de una nube de electrones libres posee una componente real y otra imaginaria que dependen de la frecuencia según la [Ecuación A.2](#).

$$\epsilon_{intra}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma\omega} = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + \gamma^2} + i \frac{\omega_p^2 \gamma}{\omega^3 + \gamma^2 \omega} \quad \text{Ecuación A.2}$$

Donde  $\omega_p^2 = (ne^2/\epsilon_0 m_e)$  es la frecuencia de plasmón, siendo  $n$  la densidad electrónica del metal, y  $\gamma$  es un factor de atenuamiento fenomenológico. En los materiales masivos, el factor de atenuamiento ( $\gamma_{bulk}$ ) depende únicamente del recorrido libre medio de los electrones en la red. En el caso del oro masivo éste es de unos  $50 \text{ nm}^2$ .

Sin embargo, cuando consideramos materiales nanométricos, las dimensiones de las nanopartículas pueden ser inferiores al recorrido libre medio. Lo que significa que los límites del material también suponen una restricción al movimiento de los electrones. Por tanto, en el caso de las NP metálicas, el factor de atenuamiento debe incluir tanto las contribuciones de la red como la de las fronteras del material:

$$\gamma_{NP} = \gamma_{bulk} + C \frac{v_F}{D} \quad \text{Ecuación A.3}$$

Donde  $v_F$  es la velocidad de Fermi,  $D$  es la distancia característica de la NP y  $C$  es un factor empírico que recoge principalmente los efectos de dispersión de los electrones en la superficie del material<sup>3</sup>. Otros términos que podrían contribuir al factor  $C$ , como el atenuamiento asociado a la radiación descrito por Sönnichsen, pueden ser obviados en nanopartículas que no excedan los 60 nm<sup>4</sup>.

En el caso concreto de las NP esferoidales proladas, los tamaños característicos de la NP son diferentes para su eje longitudinal ( $L$ ) y su eje transversal ( $2R$ ). Esta anisotropía obliga a considerar las componentes de la permitividad por separado:

$$\epsilon_{intra,x}(\omega) = \epsilon_{intra,y}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\left(\gamma_{bulk} + \frac{v_F}{2R}\omega\right)} \quad \text{Ecuación A.4a}$$

$$\epsilon_{intra,z}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\left(\gamma_{bulk} + \frac{v_F}{L}\omega\right)} \quad \text{Ecuación A.4b}$$

Una vez conocida la contribución de las transiciones intrabanda de las NP, queda por calcular el término correspondiente a las interbanda. Aunque este término puede determinarse mediante la matriz de transiciones cuánticas entre los dos estados en presencia de un campo irradiante<sup>5</sup>, en nuestro caso realizaremos una aproximación empírica más sencilla.

Para partículas mayores de 5 Å puede considerarse que estas transiciones no son dependientes del tamaño<sup>6</sup>. Gracias a ello, podemos utilizar los datos empíricos de la permitividad del Au masivo de Johnson and Christy<sup>7</sup> para despejar el término  $\epsilon_{inter}(\omega)$  de la [Ecuación A.1](#).

Empezaremos calculando la expresión que adquiere la permitividad cuando se eliminan las restricciones de tamaño ( $R \rightarrow \infty$ ,  $L \rightarrow \infty$ ) como ocurre en el caso de material masivo:

$$\epsilon_{bulk}(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_{bulk}\omega} + \epsilon_{inter}(\omega) \quad \text{Ecuación A.6}$$

La expresión obtenida permite escribir la contribución de las transiciones interbanda en función de los datos empíricos  $\epsilon_{bulk}(\omega)$ :

$$\epsilon_{inter}(\omega) = \epsilon_{bulk}(\omega) + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_{Bulk}\omega} - 1 \quad \text{Ecuación A.7}$$

Sumando esta contribución a las contribuciones calculadas en las [Ecuaciones A.4a y A.4b](#), se obtiene de forma semiempírica la permitividad de los proloides metálicos en función de la frecuencia para sus ejes transversal y longitudinal respectivamente.

$$\epsilon_x(\omega) = \epsilon_y(\omega) = \epsilon_{bulk}(\omega) + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_{Bulk}\omega} - \frac{\omega_p}{\omega^2 + i(\gamma_{bulk} + \frac{v_F}{2R}\omega)} \quad \text{Ecuación A.7a}$$

$$\epsilon_z(\omega) = \epsilon_{bulk}(\omega) + \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\gamma_{Bulk}\omega} - \frac{\omega_p}{\omega^2 + i(\gamma_{bulk} + \frac{v_F}{L}\omega)} \quad \text{Ecuación A.7b}$$

### Teoría de Mie-Gans para nanopartículas metálicas esféricas

La teoría de Mie, desarrollada en 1908<sup>8</sup>, fue capaz de calcular la extinción producida por un conjunto de NP metálicas esféricas de permitividad  $(\epsilon_1 + i\epsilon_2)$  dispersas en un medio homogéneo con permitividad  $(\epsilon_m)$ . Esta teoría, ignora cualquier efecto de interacción, y asume que la extinción producida por el sistema es igual a la suma de la extinción de cada NP.

El procedimiento consiste en describir los campos eléctricos y magnéticos absorbidos por una NP esférica en función de los campos incidente. Para ello, realizó un desarrollo multipolar de los campos y los introdujo en las ecuaciones de Maxwell imponiendo condiciones de contorno esféricas. Mediante este desarrollo se obtienen las secciones eficaces de extinción, dispersión y absorción.

$$\sigma_{ext} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1) \text{Re}\{a_L + b_L\} \quad \text{Ecuación A.8a}$$

$$\sigma_{dis} = \frac{2\pi}{|k|^2} \sum_{L=1}^{\infty} (2L + 1) (|a_L|^2 + |b_L|^2) \quad \text{Ecuación A.8b}$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{dis} \quad \text{Ecuación A.8c}$$

Donde  $k$  es el número de onda de la radiación incidente; y  $a_L$  y  $b_L$  son parámetros conocidos como los coeficientes de Mie, definidos por las siguientes expresiones:

$$a_L = \frac{m\psi_L(mD|k)\psi_L'(D|k) - \psi_L'(mD|k)\psi_L(D|k)}{m\psi_L(mD|k)\eta_L'(D|k) - \psi_L'(mD|k)\eta_L(D|k)} \quad \text{Ecuación A.9a}$$

$$b_L = \frac{\psi_L(mD|k)\psi_L'(D|k) - m\psi_L'(mD|k)\psi_L(D|k)}{\psi_L(mD|k)\eta_L'(D|k) - m\psi_L'(mD|k)\eta_L(D|k)} \quad \text{Ecuación A.9b}$$

Estos coeficientes vienen determinados por:  $m$ , que la relación entre el índice de refracción de la NP ( $n_{NP}$ ) y el medio que la rodea ( $n_m$ ); la distancia característica de la NP ( $D$ ); el vector de onda ( $k$ ); y las funciones las funciones de Ricatti-Bessel de orden  $L$  ( $\phi_L$  y  $\eta_L$ ). El subíndice  $L$  define el orden de los diferentes modos de oscilación de la resonancia plasmónica.

La *aproximación dipolar o cuasiestática* permite cortar este desarrollo en el primer orden suponiendo que el campo irradiado solamente excita los modos dipolares en la NP. Esta hipótesis será correcta siempre que longitud de onda sea mayor que el tamaño de la NP ( $x \ll 1$ ), es decir siempre que se pueda considerar que toda la NP experimenta un mismo campo en toda ella. Cumpliéndose esta condición, la sección eficaz de extinción de las NP queda simplificada a la siguiente ecuación:

$$\sigma_{ext} = 9 \frac{\omega}{c} \epsilon_m^{\frac{3}{2}} V \frac{\epsilon_2(\omega)}{[\epsilon_1(\omega) + 2\epsilon_m(\omega)]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad \text{Ecuación A.10}$$

Donde  $V$  es el volumen de la NP y  $\omega$  la frecuencia del campo incidente.

Fue Gans quien en 1912<sup>9</sup> extendió la teoría de Mie para partículas esféricas a elipsoides en los que el tamaño de los ejes difiere entre sí. En su trabajo, Gans considera la interacción de la radiación incidente sobre una superficie infinitesimal de la NP para luego integrar a toda la superficie y obtener la sección eficaz de la NP elipsoidal.

Resolviendo la ecuación de Laplace para elipsoides prolados con un único eje desigual ( $a = b \neq c$ ), Gans pudo deducir la expresión vectorial de su sección eficaz de absorción:

$$\sigma_{ext} = \frac{\omega}{3c} \epsilon_m^{3/2} V \sum_{j=a}^c \frac{\left(\frac{1}{P_j^2}\right) \epsilon_2(\omega)}{\left[\epsilon_1(\omega) + \left(\frac{1-P_j}{P_j^2}\right) \epsilon_m(\omega)\right]^2 + \epsilon_2(\omega)^2} \quad \text{Ecuación A.11}$$

Donde  $P$  son los *factores de despolarización* de cada uno de los ejes

$$P_c = \frac{1-e^2}{e^2} \left[ \frac{1}{2e} \ln \left( \frac{1+e}{1-e} \right) - 1 \right]; P_a = P_b = \frac{1-P_c}{2} \quad \text{Ecuación A.12a}$$

$$e = \left[ 1 - \left( \frac{a}{c} \right)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Ecuación A.12b}$$

Donde  $a$  y  $c$  son el eje menor y mayor de las NP metálicas, respectivamente; y  $P_a$ ,  $P_b$  y  $P_c$ , son los factores de despolarización de cada uno de los ejes, que dependerán de la elipticidad  $e$  de los proloides.

## Referencias

- 1 N. W. Ashcroft and N. D. Mermin, *Solid State Phys.*, 1976, 2, 848.
- 2 H. Horvath, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.*, 2009, **110**, 787–799.
- 3 U. Kreibig and L. Genzel, *Surf. Sci.*, 1985, **156**, 678–700.
- 4 C. Sönnichsen, *Dissertation*, 2001, **27**, 134.
- 5 F. Bassani and G. P. Parravicini, *Nuovo Cim. B Ser. 10*, 1967, **50**, 95–128.
- 6 H. Hövel, S. Fritz, A. Hilger, U. Kreibig and M. Vollmer, *Phys. Rev. B*, 1993, **48**, 18178–18188.
- 7 P. B. Johnson and R. W. Christy, *Phys. Rev. B*, 1972, 6, 4370–4379.
- 8 G. Mie, *Ann. Phys.*, 1908, **330**, 377–445.
- 9 R. Gans, *R. Ann. Phys.*, 1912, **342**, 881.



## Apéndice B: Método de Elementos Finitos

---

Las simulaciones mediante FEM se utilizaron en dos estudios de esta tesis: La simulación de la respuesta plasmónica de las NPMPH y el cálculo del gradiente campo magnético generado por los sistemas de inducción de campo en la detección de CTC por imagen PA. Estas simulaciones fueron llevadas a cabo en el programa de FEM comercial COMSOL Multiphysics®.

Los pasos fundamentales para llevar a cabo estas simulaciones son<sup>1</sup>:

- **Construcción de la geometría:** En este paso se define el dominio de estudio donde se incluyen las geometrías que se desean analizar y de su entorno. En el caso de las NPMPH se definieron unos límites de estudio esféricos, mientras que en las simulaciones de gradientes magnéticos se escogió una geometría cúbica.
- **Mayado:** La etapa de mayado divide las geometrías definidas en volúmenes discretos no intersectantes que cubran todo el espacio de estudio. El tamaño de estos elementos puede ser adaptado libremente para conseguir una mayor resolución en regiones de mayor interés. El programa COMSOL Multiphysics® ofrece la posibilidad de realizar un mayado automático que modifica el tamaño de los elementos discretos en función de la inhomogeneidad de su entorno.

En los estudios de respuesta plasmónica se utilizó un mayado fino en el que la densidad de elementos en las zonas intersticiales entre los AuNR y las NPM fueron aumentadas para poder reproducir con mayor resolución las inhomogeneidades del campo cercano en estas regiones.

De manera análoga, para los estudios de gradiente magnético inducido se escogió un mayado normal, pero se aumentó la densidad de elementos en el interior del capilar sobre el que se analizaron los resultados.

- **Parámetros físicos:** En esta etapa se definen los parámetros físicos que determinan el comportamiento de cada región. En el caso de las simulaciones de campos electromagnéticos estos parámetros se reducen a la permitividad dieléctrica real, la permeabilidad magnética y la conductividad (o permitividad dieléctrica compleja), de los materiales presentes en el problema.

En el caso de las NPMPH, fue necesaria una definición *ad hoc* de las componentes real e imaginaria de la permitividad de materiales como el Au la  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y el  $\text{SiO}_2$ , ya que su respuesta electromagnética varía con la frecuencia del campo incidente.

- **Resolución del problema:** El comportamiento electromagnético de los materiales viene definido por las Ecuaciones de Maxwell. A partir de unas condiciones iniciales donde se definen las fuentes de campo y las condiciones de contorno del sistema, el programa calcula de manera iterativa la solución de estas ecuaciones. Una vez alcanzado un criterio de convergencia, los cálculos se detiene y el programa devuelve el escenario final de campos electromagnéticos, polarizaciones y magnetizaciones de los materiales presentes en la simulación.

Para las simulaciones de respuesta plasmónica se impuso como condición inicial el campo generado por la onda incidente variando la frecuencia de la onda. Para que no se produjese un campo reflejado en los límites del material, se definió una corteza esférica entorno al volumen de estudio sobre la que se impusieron condiciones de *perfect matching layer*<sup>2</sup>, de manera que las ondas que incidieran en estas superficies se atenuaran hasta cancelarse.

Para las simulaciones de generación de gradiente, se definió la magnetización de los imanes permanentes y la corriente de la bobina como condiciones iniciales y se cancelaron los campos en los contornos de volumen de estudio.

- **Análisis de los resultados:** Una etapa importante y que supone un gran esfuerzo en los estudios de simulación es la presentación de los resultados obtenidos. El programa COMSOL Multiphysics® permite representar de manera gráfica diferentes variables del sistema como el campo eléctrico final, la polarización inducida en los materiales o su magnetización.

En el estudio de las NPMPH, las simulaciones por FEM permitieron además, cuantificar la cantidad de energía absorbida y dispersada por cada tipo de nanoestructura a partir de los campos obtenidos y de este modo calcular los espectros de extinción en función de la longitud de onda incidente.

Por una parte, la sección eficaz de absorción fue calculada integrando la componente real del vector de Pointing a lo largo de todo el volumen de las NP.

En la [Ecuación B.1](#), se indica la integral de volumen utilizada:

$$\sigma_{abs} = \frac{2}{c_0 \epsilon_0 n E_{inc}^2} \int_V \text{Real}(\sigma E \cdot E^* - i\omega E \cdot D^*) dV$$

**Ecuación B.1**

Donde  $c_0$  es la velocidad de la luz en el vacío,  $\epsilon_0$  es la permitividad dieléctrica del vacío,  $n$  es el índice de refracción del medio exterior,  $E_{inc}$  es el módulo del campo incidente.

Por otra parte, la contribución al espectro de extinción es la cantidad de luz dispersada. La sección eficaz, en el caso de la luz dispersada se calcula integrando la componente normal del vector de Pointing a lo largo de la superficie exterior de la nanoestructura ([Ecuación B.2](#)).

$$\sigma_{sca} = \frac{2}{c_0 \epsilon_0 n E_{inc}^2} \int_S \text{Real}(E_{sca} \times H_{sca}^*) dS$$

**Ecuación B.2**

La suma de estas dos contribuciones nos permitió calcular el espectro de extinción asociado a las simulaciones obtenidas mediante FEM.

## Referencias

- 1 D. Martin-Cano, 2013.
- 2 M. Cheema and A. Kirk, *COMSOL Conf. Bost.*, 2010, 1–3.



## Apéndice C: Rastreo de puntos referenciales

---

La técnica conocida como rastreo de puntos referenciales o *speckle tracking* en inglés, fue descrita por primera vez 2004<sup>1</sup> y desde entonces ha venido siendo implementada en diferentes ámbitos de la imagen medica por ultrasonidos. Actualmente es utilizada para estudiar la dinámica de órganos internos para el diagnóstico de problemas cardiacos, respiratorios o circulatorios<sup>2</sup>.

El rastreo de puntos en imágenes de ultrasonidos se basa en autocorrelacionar las imágenes de ultrasonidos de una misma región a lo largo del tiempo y detectar el desplazamiento que se produce en regiones patrón que se escogen como guía (kernel o puntos referenciales). Esta técnica viene siendo empleada desde hace años por las instituciones médicas para analizar el movimiento de tejidos biológicos *in situ*. Gracias a ella se puede analizar el correcto funcionamiento biológico de procesos como la expansión de una arteria o de la contracción de un músculo.

Un ejemplo análogo que puede servir como primera aproximación a la técnica, es el proceso de detección que llevan a cabo los radares<sup>3</sup>. En estos sistemas, la señal emitida,  $e(t)$ , se autocorrelaciona con la señal reflejada por el objeto que se busca detectar,  $r(t)$ . Mediante esta correlación se busca encontrar el retraso de una señal con respecto a la otra ( $d$ ), y de este modo estimar la distancia a la que se encuentra el objetivo. Si suponemos que la señal sufre cierta atenuación y procesos que pueden distorsionarla, la expresión matemática que relaciona las dos señales sería la siguiente:

$$r(t) = \alpha \cdot e(t - d) + w(t) \quad \text{Ecuación C.1}$$

Donde  $\alpha$  es el factor de atenuación de la señal ( $0 < \alpha < 1$ ) y  $w(t)$  es el ruido que se introduce en la señal durante el proceso. La función de correlación que se utiliza para estimar el retraso entre las dos señales es a siguiente:

$$C(\tau) = E[r(t)e(t + \tau)] = E[(\alpha e(t - d) + w(t))(e(t + \tau))] \quad \text{Ecuación C.2a}$$

$$C(\tau) = E[\alpha e(t - d)e(t + \tau) + w(t)e(t + \tau)] \quad \text{Ecuación C.2b}$$

Donde  $\tau$  es la variable independiente que determinara el desfase;  $C_{er}$  es el valor de correlación entre la señal  $e(t)$  y la señal  $r(t)$ ; y  $E$  es la *función expectativa* que en nuestro

caso puede ser entendida como una integral si la señal es continua o un sumatorio si la señal es discreta. En cualquiera de los dos casos cumple la propiedad distributiva, y por tanto podemos separar la expresión de la siguiente manera:

$$C(\tau) = \alpha C_{ee}(\tau - d) + C_{ew}(\tau) \quad \text{Ecuación C.3}$$

Al tratarse la señal  $w$  de un ruido no correlacionado temporalmente con la señal emitida, la correlación con esta resulta nula ( $C_{ew} = 0$ ). De este modo, si se representa el término restante en función de  $\tau$ , se observa un máximo de correlación cuando esta variable coincide con el término del desplazamiento de la señal. De esta manera, se puede estimar el retraso de las dos señales a partir del valor de  $\tau$ .

En el caso del rastreo de puntos referenciales, lo que se está buscando no es un retraso temporal en la señal sino un desplazamiento espacial de ciertos patrones que se usaran como referencia. En la imagen por US estos dos conceptos están muy estrechamente relacionados, pues la posición de los puntos en una imagen se calculan a través del tiempo de vuelo de la onda, es decir,  $x = c \cdot t$ , donde  $c$  es la velocidad de la onda en el medio y  $t$  el tiempo de vuelo.

De forma que si consideramos un sistema unidimensional, la función que nos relaciona las señales antes y después de un desplazamiento  $D$  de un cierto órgano, la expresión de la intensidad detectada es la siguiente:

$$I(x(t)) = \beta I(x(t_1) - D(t)) + w(x(t)) \quad \text{Ecuación C.3}$$

Por un proceso análogo al descrito para los sistemas de radar, este desplazamiento  $D(t)$ , puede ser estimado a lo largo del tiempo correlacionando la imagen adquirida en un tiempo  $t_1$  con la sucesión de imágenes posteriores.

Sin embargo, hasta el momento solamente hemos considerado el caso en que toda la señal es desplazada coherentemente. Para estudiar un desplazamiento desigual de los puntos que componen esta imagen de US unidimensional (e.g. un proceso de contracción muscular), debemos ir un paso más allá. Volviendo al ejemplo de radar, si el objetivo que queremos detectar se encuentra en movimiento, el retraso temporal que se produce en la señal será dependiente del tiempo. Es decir:

$$r(t) = \alpha e(t - d(t)) + w(t) \quad \text{Ecuación C.4}$$

Encontramos que las periodicidades de las señales  $r(t)$  y  $e(t)$  se ven modificadas, y por tanto, no basta con un simple proceso de maximización. Una estrategia comúnmente utilizada para abordar este tipo de problemas es trabajar en el espacio de fases aplicando una transformada de Fourier a las señales analizadas. En este espacio, un desplazamiento espacial de un patrón de US que preserva parcialmente sus periodicidades se traduce en un cambio de su fase.

## Referencias

- 1 S. A. Reisner, P. Lysyansky, Y. Agmon, D. Mutlak, J. Lessick and Z. Friedman, *J. Am. Soc. Echocardiogr.*, 2004, **17**, 630–633.
- 2 M. Bansal and R. R. Kasliwal, *Indian Heart J.*, 2013, 65, 117–123.
- 3 M. A. Lubinski, S. Y. Emelianov and M. O'Donneil, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, 1999, **46**, 82–96.



# Índice de acrónimos

---

<b>RA:</b> Relación de aspecto	<b>TIRF:</b> Microscopía de fluorescencia por reflexión total interna
<b>R:</b> Radio	<b>AFM:</b> Microscopía de fuerza atómica
<b>L:</b> Longitud	<b>MRI:</b> Imagen de resonancia magnética
$\omega$ : Frecuencia angular	<b>OCT:</b> Tomografía óptica computerizada
<b>NP:</b> Nanopartícula	<b>mmOCT:</b> Tomografía óptica computerizada magneto-motriz
<b>NPM:</b> Nanopartícula magnética	<b>mmDF:</b> Campo oscuro magneto-motriz
<b>AuNR:</b> Nanocilindro de Au	<b>PA:</b> Imagen Fotoacústica
<b>NPMPH:</b> Nanopartícula magneto-plasmónica híbrida	<b>mmPA:</b> Imagen Fotoacústica magneto-motriz
<b>CTAB:</b> Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio	<b>US:</b> Ultrasonidos
<b>TBAB:</b> Bromuro de tetrabutil amonio	<b>mmUS:</b> Imagen de ultrasonidos magneto-motriz
<b>TEOS:</b> Tetraetil ortosilicato	<b>SERS:</b> Espectroscopia Ramman aumentada por superficies
<b>PEG:</b> Polietilenglicol	<b>PL:</b> Imagen de fotoluminiscencia
<b>PEG-SH:</b> Polietilenglicol tiolado	<b>PT:</b> Terapia fototérmica
<b>AC:</b> Ácido cítrico	<b>HTM:</b> Hipertermia magnética
<b>DMA:</b> Dopamina metracrilato	<b>TEM:</b> Microscopía electrónica de transmisión
<b>PMAG:</b> Poli-2-(methacrilamido) Glucopiranosas	<b>HRTEM:</b> Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución
<b>FBS:</b> Suero fetal bobino	<b>STEM:</b> Microscopía electrónica de transmisión por barrido
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido	<b>EDX:</b> Espectroscopia de emisión de rayos X
<b>DMF:</b> Dimetil formaldeida	<b>HAADF:</b> Campo oscuro anular de alto ángulo
<b>conA:</b> Concanavalina A	<b>EELS:</b> Espectroscopia electrónica de pérdida de energía
$E_A$ : Energía de anisotropía	<b>XRD:</b> Difracción de rayos X
$K_A$ : Constante de anisotropía	<b>Vis-IR:</b> Espectro visible e infrarrojo
$\nu_m$ : Frecuencia de medida	<b>FT-IR:</b> Absorción infrarroja por transformada de Fourier
$M_s$ : Imanación de saturación	<b>TGA:</b> Análisis termogravimétrico
$H_C$ : Campo coercitivo	<b>ICP-OES:</b> Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo
$E_v$ : Energía por unidad de volumen	<b>SQUID:</b> Superconducting Quantum Interference Device
$\tau$ : Tiempo de relajación magnética	
$\tau_N$ : Tiempo de relajación Néel	
$\tau_B$ : Tiempo de relajación Brown	
$\mu$ : Momento magnético	
$A_{M-H}$ : Área del ciclo M-H	
$H_{MÁX}$ : Campo máximo aplicado	
<b>CT:</b> Tomografía computerizada	
<b>PET:</b> Tomografía de emisión de positrones	
<b>MPM:</b> Microscopía multifotónica	