



**Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del Instituto
Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Programa de Nanociencias y Nanotecnología

*Síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido
de hierro funcionalizadas con Gd-DTPA para su
posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de
Cáncer*

T E S I S

que presenta

M. en C. SANDRA IRENE EGUÍA EGUÍA

Para obtener el grado de
DOCTORA EN NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA

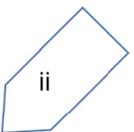
Director de Tesis
Dr. Jaime Santoyo Salazar

Ciudad de México

FEBRERO, 2021

A mis padres

Por su amor y apoyo incondicional e incommensurable



Agradecimientos

Quiero agradecer primero al Universo por permitirme vivir y concluir una etapa más en mi vida. A mis padres por la comprensión, amor y apoyo que me han brindado siempre, a lo largo de toda mi vida; y que en esta etapa en que los he necesitado más, han estado al pie del cañón como siempre. A mis amigos de antaño, a Daniel.

A mi asesor, Dr. Jaime Santoyo Salazar por el apoyo brindado, a mis compañeros del laboratorio, al Dr. Gerardo Cabañas por su tiempo y apoyo. A los miembros del comité por su asesoramiento, Dr. Arturo Martínez, Dr. Mauricio Ortega, Dr. Jesús Arenas, y Dr. Miguel García. A los técnicos por las caracterizaciones realizadas.

Agradezco al CONACYT por el apoyo recibido a través de la beca, y al Cinvestav por las instalaciones brindadas.

La realización de este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y apoyo de muchísimas personas, a todos les agradezco profundamente.

El estudio de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) ha crecido exponencialmente en los últimos años, debido a su biocompatibilidad, tamaño nanométrico, propiedades magnéticas y a los fáciles métodos de síntesis. Numerosas estrategias de diseño se han realizado para optimizar sus propiedades, tales como: conjugación, dopaje, injerto, recubrimiento con polímeros, biomoléculas, sílica, oro, tierras raras, etc.; originando nanomateriales multifuncionales. Muchas investigaciones han enfatizado en la preparación de nanoestructuras de SPIONs-Gd³⁺. Sus propiedades estructurales y magnéticas les permite ser consideradas como una gran potencia en el diagnóstico y tratamiento de diversos tipos de enfermedades, especialmente el Cáncer. Gracias a las propiedades magnéticas de las SPIONs pueden ser direccionadas bajo la aplicación de un campo magnético, y guiadas a través del organismo actuando como agentes terapéuticos encargados de transportar fármacos a zonas específicas del organismo; o en la destrucción de células cancerígenas por medio de hipertermia magnética, debido a que las SPIONs producen calor en respuesta a un campo magnético externo. Además, pueden ser utilizadas como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética (MRI).

Los agentes de contraste mejoran la interpretación de las imágenes obtenidas en la resonancia magnética. Existen dos tipos: T₁, iones metálicos paramagnéticos, el más utilizado es el complejo Gd-DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético); y T₂, nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (SPIONs). Los agentes T₁ aumenta el brillo de la imagen, mientras que los T₂ dan negativos en las imágenes; al modificar la velocidad de relajación magnética nuclear de los protones del agua de su entorno y cambiar el contraste de la señal entre el tejido sano y el enfermo. La combinación de estos dos tipos de agentes de contraste en una sola nanoestructura representa una gran innovación, permitiendo obtener una mejor calidad en MRI, y en consecuencia un diagnóstico más preciso de la enfermedad y/o tumor.

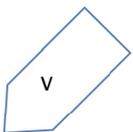
En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la síntesis de SPIONs (Fe₃O₄-γ-Fe₂O₃) por medio del método de coprecipitación, luego se funcionalizaron con el complejo Gd-DTPA a través de diversos procesos; formando así nanoestructuras SPIONs@Gd-DTPA, con el fin de definir los parámetros de control y propiedades para su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de cáncer.

La síntesis de los núcleos magnéticos se realizó por medio del método de co-precipitación de las sales ferrosa (Fe²⁺) y férrica (Fe³⁺), utilizando dos bases diferentes: (1) hidróxido de tetraetilamonio (N(C₂H₅)₄OH), y (2) una disolución de sodio metálico (Na⁰) en 3-amino-1-propanol (NH₂(CH₂)₃OH); obteniéndose SPIONs (no funcionalizadas), y SPIONs(-NH₂), respectivamente.

En el método 1, primero el Gd fue quelado al DTPA, formando el complejo Gd-DTPA. Después la SPIONs fueron funcionalizadas por dos rutas: (1) post-síntesis y (2) in situ con el complejo. En el método 2, las SPIONs (no funcionalizadas) se recubrieron con APTES, luego

se conjugaron al DTPA, y finalmente se acoplo el Gd. En el método 3 se emplearon las SPIONs(-NH₂) conjugandose directamente al DTPA, para luego ser acopladas al Gd.

En cada una de las metodologías realizadas se obtuvieron diversas muestras, variando los parámetros: concentración del compuesto a añadir y tiempo de la reacción. El análisis de las propiedades estructurales y magnéticas, y la morfología de las nanoestructuras obtenidas se realizó a través de las técnicas de difracción de rayos-X (XRD), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos-X (XPS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia de rayos x de energía dispersiva (EDS), mediciones magnéticas en un magnetometro (SQUID), microscopía de fuerza atómica (AFM) y magnética (MFM). Para analizar la actividad citotóxica de las nanoestructuras se utilizó el ensayo de Sulforrodamina B, las líneas celulares cancerígenas utilizadas fueron: PC-3 (próstata) y MCF-7 (mama). Las características presentadas les permite ser consideradas para una futura aplicación en el combate contra el cáncer.



Abstract

In the last years, the interest in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) has increased due to their biocompatibility, nanometric size, magnetic properties, and the ease methods for synthesizing them. Numerous design strategies have been performed to optimize their properties, including conjugation, doping, grafting, encapsulating with polymers, biomolecules, silica, gold, earth rare, and many others. Many investigations have been emphasized in the preparation of SPIONs-Gd³⁺ systems. Their structural and magnetic features enable them to be considered a tremendous potential nanomaterial for diagnosing and treating different types of diseases, particularly cancer. Owing to the magnetic properties of SPIONs can be addressed to an applied magnetic field and lead through the body as therapeutic agents or to be used for magnetic hyperthermia. SPIONs can produce heat as an answer to a magnetic field. Besides, they can be used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI).

The contrast agents improve the quality of the images in magnetic resonance. There are two types: T₁, paramagnetic metal ions, the most used clinically is Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), and T₂, SPIONs. T₁ agents increase the bright of the image, while T₂ agents obscure the images; by modifying the nuclear magnetic relaxation rate of the protons in the surrounding water and changing the signal contrast between healthy and diseased tissue. Combining these two types of contrast agents in just one nanostructure represents a considerable innovation for enhancing MRI, and consequently, a more accurate diagnosis.

In the present work, SPIONs (Fe₃O₄-γ-Fe₂O₃) were synthesized via the co-precipitation method, and they were functionalized with Gd-DTPA through the various process. SPIONs@Gd-DTPA nanostructure was obtained to define the appropriate parameters and properties to be used in the diagnosis and treatment of cancer.

The synthesis of the magnetic cores was realized through the co-precipitation method of ferrous (Fe²⁺) and ferric (Fe³⁺) salts, using two precursors: (1) tetraethylammonium hydroxide (TEA- N(C₂H₅)₄OH)), and (2) a solution of metallic sodium and 3-amino-1-propanol; forming SPIONs (naked), and SPIONs(-NH₂), respectively.

In method 1, gadolinium was chelated to DTPA and then added to SPIONs via two facile synthesis routes, (1) post-synthesis and (2) in-situ. In method 2, SPIONs (naked) were covered with APTES, then conjugated to DTPA, and finally functionalized to Gd. In method 3 the SPIONs(-NH₂) directly conjugated to DTPA and then functionalized to Gd.

In each process were as-synthesized several samples, changing the added component's concentration and the time of the synthesis. The structural and magnetic properties and the morphology of the as-synthesized nanostructure were analyzed through x-ray diffraction (XRD), Fourier transforms infrared spectroscopy (FTIR), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS), transmission electron microscopy (TEM), energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS), magnetometer (SQUID), and atomic force and magnetic microscopy (AFM-MFM).

The cytotoxicity was evaluated via Sulforhodamine B (SRB) in prostatic (PC-3) and human breast (MCF-7) cancer cell lines. These results indicate that the obtained nanostructure has a great potential to be used in biomedical applications.

Tabla de contenido

Agradecimientos	iii
RESUMEN	iv
Abstract	vi
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Nanotecnología	1
1.2 Nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro.....	2
1.2.1 Magnetita (Fe_3O_4)	4
1.2.2 Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).....	6
1.2.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro	6
1.3 Conceptos básicos de magnetismo y propiedades magnéticas de los materiales	8
1.3.1 Magnetismo y materiales magnéticos.....	8
1.3.2 Dominios magnéticos	11
1.3.3 Efecto nano	13
1.3.4 Superparamagnetismo	15
1.4 Mecanismo de relajación magnética	15
1.5 Nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro diseñadas para aplicaciones biomédicas	17
1.5.1 Hipertermia magnética	20
1.5.2 Nanopartículas magnéticas como agentes de contraste en MRI.....	20
1.5.3 Modificación superficial de las nanopartículas de óxido de hierro	25
2. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS	27
2.1 Motivación	27
2.2 Objetivo general	27
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	29
3.1 Reactivos	29
3.2 Método 1. Funcionalización de SPIONs en un solo paso	29
3.2.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs	29
3.2.2 Etapa 2: Preparación del complejo Gd-DTPA	30
3.2.3 Etapa 3-: ruta 1/ Post-síntesis	30
3.2.4 Etapa 3: ruta 2/ In situ	30
3.3 Método 2. Funcionalización de SPIONs(-NH ₂).....	31
3.3.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs(-NH ₂)	31
3.3.2 Etapa 2: Conjugación del DTPA a la superficie de las SPIONs(-NH ₂).....	32
3.3.3 Etapa 3: Acoplamiento del Gd a la nanoestructura SPIONs(-NH ₂)@DTPA	32

3.4 Método 3. Funcionalización SPIONs.....	33
3.4.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs	33
3.4.2 Etapa 2: Modificación superficial de las SPIONs con APTES	34
3.4.3 Etapa 3: Conjugación de la superficie de las SPIONs(-APTES) al DTPA.....	35
3.4.4 Etapa 4: Acoplamiento del Gd a la nanoestructura SPIONs(-APTES)@DTPA	35
3.5 Técnicas de caracterización	36
3.5.1 Difracción de rayos-X (XRD).....	36
3.5.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	36
3.5.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).....	37
3.5.4 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)	37
3.5.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	37
3.5.6 Microscopia de fuerza atómica y de fuerza magnética (AFM/MFM).....	37
3.5.7 Magnetómetro (SQUID).....	37
3.5.8 Ensayo de Sulforrodamina B [60].....	37
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.1 Propiedades físicas de las SPIONs (no funcionalizadas).....	40
4.2 Caracterización de SPIONs@Gd-DTPA (Método 1).....	43
4.2.1 Espectro FTIR del complejo Gd-DTPA sintetizado	43
4.2.2 Propiedades estructurales y morfología.....	44
4.2.3 Análisis espectroscópico	47
4.2.4 Propiedades magnéticas.....	48
4.3 Análisis y comparación de las nanoestructuras SPIONs(-NH ₂)@Gd-DTPA (Método 2) y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA (Método 3).....	51
4.3.1 Propiedades físicas de SPIONs(-NH ₂) y SPIONs(-APTES).....	52
4.3.2 Propiedades físicas de SPIONs(-NH ₂)@DTPA y SPIONs(-APTES)@DTPA	56
4.3.3 Propiedades físicas de SPIONs(-NH ₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA.....	60
4.4 Ensayos de citotoxicidad	63
4.5 Comparación y correlación de las propiedades físicas de las SPIONs funcionalizadas con Gd-DTPA con aplicaciones biomédicas	66
5. CONCLUSIONES	68
6. PERSPECTIVAS.....	69
Bibliografía	70
ANEXO A. Información adicional	79
ANEXO B. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	99

1. ANTECEDENTES

El *Cáncer* es una enfermedad que se caracteriza por un rápido e incontrolado crecimiento de células. Existen más de 100 diferentes tipos de cáncer. En la mayoría de los casos se trata de padecimientos crónico-degenerativos, por lo tanto, sus incidencias y tasas de mortalidad tienden a incrementarse con la edad. Esta enfermedad es una de las principales causas de muerte a nivel mundial; en 2015 provocó 8.8 millones de defunciones, y se identifican cinco tipos de cáncer responsables del mayor número de fallecimientos: cáncer pulmonar (1.69 millones de muertes), cáncer hepático (788,000 defunciones), cáncer colorrectal (774,000 muertes), cáncer gástrico (754,000 defunciones) y de mama (571,000 muertes) [1].

El impacto global del cáncer es mayor cada vez, debido al crecimiento y envejecimiento de la población, y al aumento en el uso y/o práctica de agentes carcinógenos, tales como: fumar, mala dieta alimenticia, falta de ejercicio, contaminación, etc. [2]. Actualmente, es posible tratar la enfermedad aplicando estrategias de base científica destinadas a la terapia, así como a la detección temprana. A pesar de que se conoce acerca de algunas causas del cáncer y las intervenciones para tratarlo, los tratamientos reducen la calidad de vida del paciente [3]. Los tratamientos más utilizados (radioterapia, quimioterapia) ocasionan efectos secundarios, como: anemia, cambios en la piel y en las uñas, caída del pelo (alopecia), falta de apetito, diarrea, dolor, fatiga, vómito, náuseas, problemas para dormir, moretones (trombocitopenia), etc. [4]. Por consiguiente, es relevante el empleo de terapias menos agresivas, al igual que mejores métodos de detención de cáncer. Por tal motivo, el interés en la síntesis de nanomateriales multifuncionales, basados en óxidos de hierro, ha crecido de manera explosiva en los últimos años, debido a las ventajas que ofrecen para ser utilizados en el diagnóstico y terapia contra esta enfermedad.

1.1 Nanotecnología

Durante el “Encuentro anual de la American Physical Society”, un 29 de diciembre de 1959, en el Instituto de Tecnología de California, en Pasadena, Richard Feynman estableció los pilares de lo que hoy en día se conoce como nanotecnología, en una conferencia titulada "There is plenty of room at the bottom" ("Hay mucho espacio al fondo"). Feynman habló de cómo fabricar, manipular y controlar objetos de muy pequeñas dimensiones, abordando el problema desde una perspectiva absolutamente distinta a como se había hecho hasta el momento. Lo que en aquel momento pareció sólo un sueño surgido de la mente de un científico, en la actualidad es casi una realidad. Él afirmó en esa conferencia: “No me asusta considerar la pregunta final de si en el futuro podremos colocar los átomos como queramos: ¡los verdaderos átomos, aquellos que están al fondo!, y ¿cuáles serían las propiedades de los materiales si pudiéramos verdaderamente colocarlos como quisiéramos? No puedo saber exactamente qué pasaría, pero no tengo la menor duda de que si controlásemos la colocación de objetos a una pequeña escala, tendríamos acceso a un amplio

rango de propiedades que los materiales pueden presentar y podríamos hacer una gran cantidad de cosas. En el mundo de lo muy, muy pequeño, muchas cosas nuevas podrán suceder, porque los átomos se comportan de manera distinta a como lo hacen los objetos a mayor escala, pues deben satisfacer las leyes de la mecánica cuántica. Si nos reducimos y comenzamos a jugar con los átomos allá abajo, estaremos sometidos a unas leyes diferentes, y podremos hacer cosas diferentes. A nivel atómico, aparecen nuevos tipos de fuerzas, nuevas posibilidades, nuevos efectos”. Esta idea que, en principio, podría parecer ciencia-ficción, hoy en día supone una realidad, abriendo paso al concepto que actualmente conocemos como *nanotecnología* [4].

La nanotecnología es un área interdisciplinaria dedicada a la manipulación de átomos y moléculas, y ha tenido un emergente crecimiento desde la década de los 90's. Se basa en el diseño de materiales de tamaño nanométrico, como: clusters, nanopartículas, nanovarillas, nanocables, nanotubos y películas delgadas. Este tipo de estructuras reciben el nombre de *nanomateriales*, y aportan propiedades físicas y químicas muy distintas a las del material masivo [5, 6]. Al reducir el tamaño de cualquier material por debajo de un tamaño crítico, aparecen variaciones en sus propiedades (magnéticas, ópticas, térmicas, conductoras, mecánicas o catalíticas), debido a los efectos de confinamiento cuántico y de superficie [7]. El uso de los nanomateriales abarca distintas áreas, que van desde la física, la ingeniería o ciencia de los materiales hasta la biomedicina, biología y química. En la biomedicina, los nanomateriales poseen múltiples aplicaciones relacionadas tanto con el diagnóstico como la terapia de diversos tipos de enfermedades [5].

Actualmente, la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos ha aprobado varios fármacos que están constituidos por diversos tipos de nanomateriales. El Caelyx® y el Doxil® (liposomas que contienen el fármaco doxorubicina) fueron aprobados en 1995; el Abraxane® (nanopartículas con el fármaco paclitaxel) fue aprobado en 2005 para la terapia contra el cáncer; Ambisome® se utiliza para combatir enfermedades infecciosas, entre ellas el VIH, la malaria y las infecciones nosocomiales; y el Cimzia® fue aprobado en 2008 para la enfermedad de Crohn y en 2009 para la artritis [8].

En el diagnóstico y la terapia contra el cáncer, de los diversos tipos de nanomateriales que existen, se muestra un interés particular por las nanopartículas magnéticas debido a las características físicas, químicas y magnéticas que poseen [5].

1.2 Nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro

Desde principios del siglo XX las partículas magnéticas se han utilizado como material en grabación magnética, en altavoces y tintas magnéticas. A partir de la década de los 90's surgieron nuevas aplicaciones dentro del campo de la biomedicina, debido principalmente a las propiedades magnéticas que presentan. Gracias a estas propiedades, las nanopartículas pueden ser manipuladas por un gradiente de campo magnético externo; permitiendo así, controlar su movimiento a distancia, ya que, las líneas de campo magnético pueden atravesar tejidos humanos [6]. Esto les ha permitido ser muy prometedoras en el área biomédica, en aplicaciones como: hipertermia magnética, separación de células y proteínas, y liberación de fármacos [9]. También, pueden utilizarse como agentes de contraste en

resonancia magnética, debido a que pueden crear un campo magnético alrededor de ellas, que afecta a la relajación de los protones del agua, y por lo tanto, el contraste en las imágenes de resonancia magnética (MRI, siglas en inglés), Fig. 1.1. Además de sus propiedades magnéticas, las nanopartículas magnéticas cuentan con un tamaño comparable al de las proteínas, células, virus y ADN, Fig. 1.2, [6].

Figura 1.1 Diferentes aplicaciones en biomedicina de las nanopartículas magnéticas; mecanismos de acción y

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

requisitos de las partículas [7].

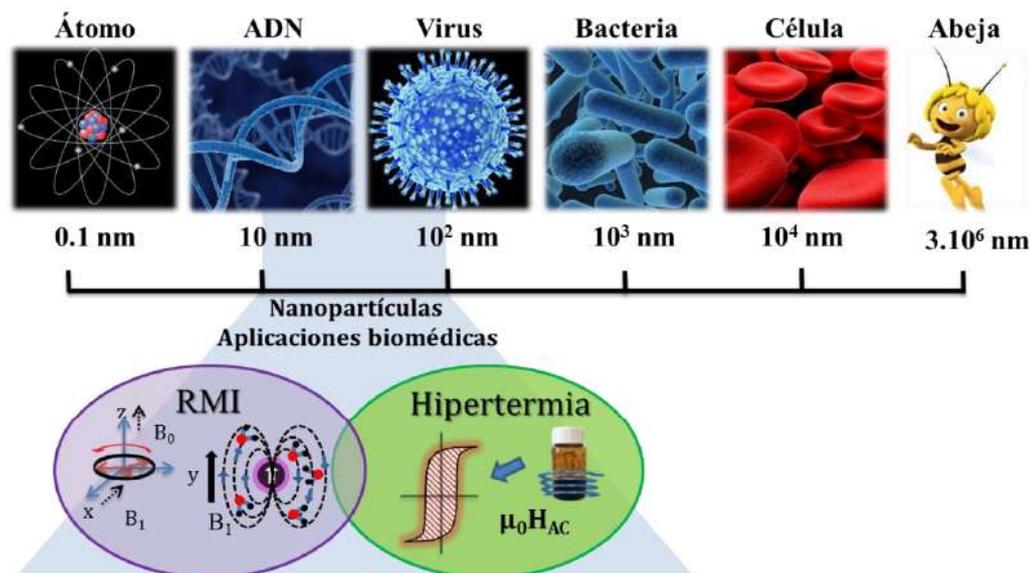


Figura 1.2 Escala comparativa del tamaño de diversos agentes biológicos y las nanopartículas [10].

Las nanopartículas magnéticas (NPMs) están formadas principalmente por elementos metálicos, tales como hierro, níquel, cobalto y sus óxidos [11]. De los diversos tipos de NPMs

que existen, la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son las más atractivas para aplicaciones del área biomédica, debido a su baja toxicidad, a que son fácilmente metabolizadas dentro del organismo, y poseen un elevado momento magnético [7, 12].

1.2.1 Magnetita (Fe_3O_4)

La magnetita (Fe_3O_4) es un material cristalino ferrimagnético con estructura cúbica de espinela inversa, con un parámetro de red de $a_0 = 8.396 \text{ \AA}$, y grupo espacial $\text{Fd}\bar{3}\text{m}$ (227) [13]. Los átomos de oxígeno forman un arreglo cúbico centrado en las caras (FCC), con iones de hierro distribuidos en sitios octaédricos (O_h) y tetraédricos (T_d) [14]. Los átomos de hierro (Fe) poseen dos estados de oxidación, Fe^{2+} y Fe^{3+} , de los cuales Fe^{3+} ocupan los sitios tetraédricos; y los sitios octaédricos están ocupados equitativamente por Fe^{2+} y Fe^{3+} [6], Fig. 1.3. La magnetización en la estructura de la magnetita se define por las interacciones de Fe^{2+} que resultan en un momento magnético neto $4.1 \mu_B$ [13].

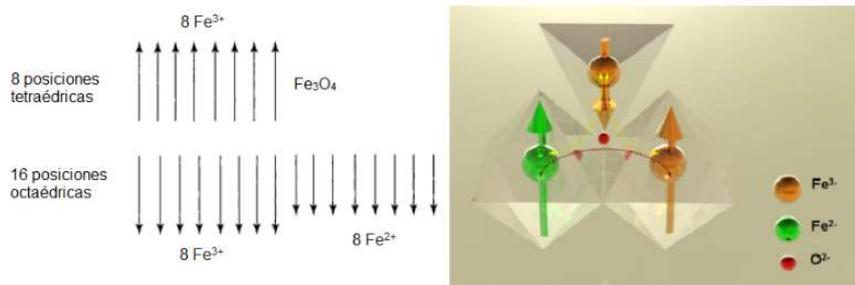


Figura 1.3 Esquema de las direcciones de los espines y posiciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} [13].

En cada celda unitaria la mitad de los cationes Fe^{3+} que se encuentran en los sitios tetraédricos están relacionados con 4 iones de oxígeno, mientras que la otra mitad y todos los iones Fe^{2+} que están localizados en los sitios octaédricos se enlazan con 8 iones de oxígeno; formando así la base de dos subredes cúbicas interpenetradas con contribuciones de momento magnético desiguales y antiparalelas, Fig. 1.4, [13]. La magnetización de saturación para la magnetita en su estado másico-volumétrico se estima en 92.5 emu/g [9]. Su fórmula de la celda unidad es [6]:



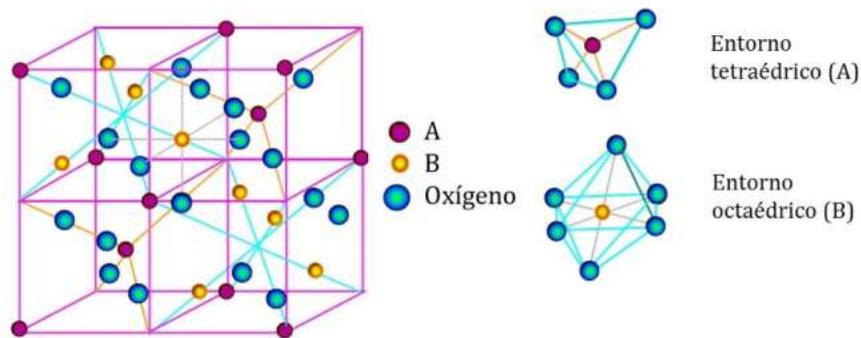


Figura 1.4 Esquema de la celda unitaria de la magnetita [10].

El mecanismo de interacción/acoplamiento de intercambio entre las dos subredes es indirecto debido a que los iones de Fe se encuentran muy lejos para interactuar directamente entre ellos, por lo tanto, ocurre a través de los aniones de oxígeno, a tal mecanismo se le conoce como *superintercambio* [6, 15]. Esta interacción se da entre los electrones 3d desapareados de los iones metálicos y los 2p de los aniones O^{2-} cuando están cercanos entre sí y forman un ángulo cercano a los 120° , Fig. 1.5, [6].

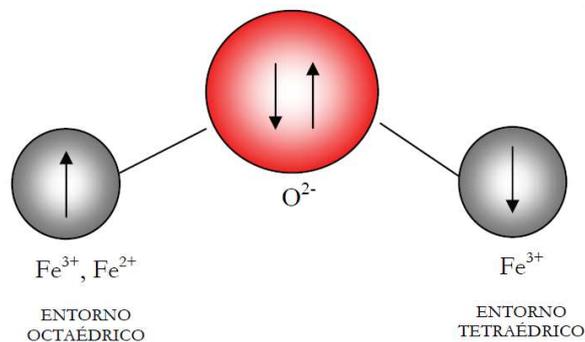


Figura 1.5 Mecanismo de superintercambio en la magnetita [6].

La magnetita (Fe_3O_4) estequiométrica, sólo es posible sintetizarla en un medio no-oxidante. Su pureza sólo se verifica cuando existe una relación 2:1 (Fe^{3+}/Fe^{2+}). Sin embargo, este material, es termodinámicamente inestable en el medio ambiente, por lo que se transforma espontáneamente a maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$), en un proceso de oxidación a temperatura ambiente o en un medio de pH ácido y posteriormente a hematita ($\alpha-Fe_2O_3$), en un proceso de oxidación a temperaturas elevadas [14].

1.2.2 Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

La maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) posee una estructura cristalina cúbica tipo espinela inversa, en la cual los aniones O^{2-} se encuentran formando un empaquetamiento cúbico compacto centrado en las caras (FCC) a lo largo de la dirección [111]. Cada celda unidad está formada por 8 celdillas, es decir que posee 32 O^{2-} , Fig. 1.6, [6].

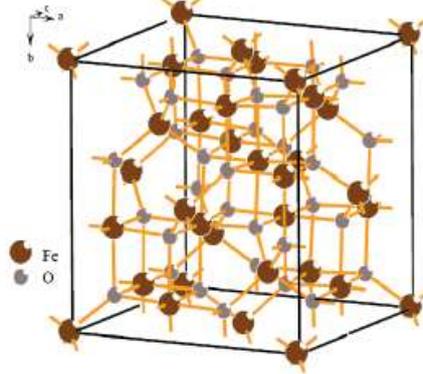
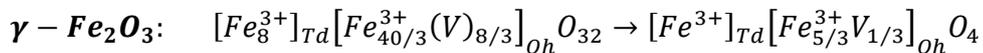


Figura 1.6 Estructura cristalina de la maghemita [6].

Todos los átomos poseen el mismo estado de oxidación de Fe^{3+} . Para compensar este exceso de carga positiva se crean vacantes catiónicas al azar en los huecos octaédricos. Por lo tanto, 1/8 de los huecos tetraédricos (8 de 64) están ocupados por cationes Fe^{3+} , el 41.6 % de los huecos octaédricos (40/3 de 32) por cationes Fe^{3+} y las vacantes ocupan como máximo el 8.3% de los huecos octaédricos. La fórmula de la celda unidad es:



El parámetro de red es 0,834 nm, ligeramente inferior al de la magnetita debido a la ausencia de cationes Fe^{2+} que poseen mayor tamaño [6].

1.2.3 Métodos de síntesis de nanopartículas de óxido de hierro

Existen diversos métodos para sintetizar las nanopartículas de óxido de hierro, como: coprecipitación, descomposición térmica, pirolisis láser, síntesis hidrotermal, microemulsión y la síntesis sonoquímica [4].

El método de coprecipitación es el método químico más sencillo y eficiente para la síntesis de NPMs y fue descrito por Massart [10, 16]. El proceso está basado en la precipitación de precursores de sales de los metales que constituyen las NPs en un medio básico ($\text{pH} \sim 11$) a una temperatura ambiente o a temperatura elevada, y requiere de una atmósfera inerte para prevenir la oxidación de las NPMs [10, 16]. Las principales ventajas de este método es que las muestras obtenidas son directamente hidrofílicas y, por lo tanto, estables en medios acuosos, no requiere una alta temperatura o presión, y se obtiene una gran cantidad de material [4, 10, 16]. Como desventaja se tiene un bajo control del tamaño de partícula [10].

Este método consiste en la mezcla de iones férrico y ferroso en una proporción molar 1:2 en disoluciones. El tamaño y forma de las nanopartículas (NPs) obtenidas dependen del tipo de sal empleada (cloruros, sulfato, nitratos, percloratos, etc), la proporción de iones férrico y ferroso, la temperatura de reacción, los valores de pH, la fuerza iónica del medio y de otros parámetros de reacción como la velocidad de agitación y velocidad de adicción de la disolución básica. Pequeñas modificaciones de estos parámetros, fundamentalmente en la temperatura de reacción, afectan críticamente a las propiedades físicas y químicas de las NPs [4].

La síntesis se basa en el modelo de LaMer, en el cual ocurren dos etapas: (1) una rápida nucleación cuando la concentración de las especies alcanza la sobresaturación, y (2) los núcleos formados comienzan el proceso de crecimiento, Fig. 1.7, [10, 16].

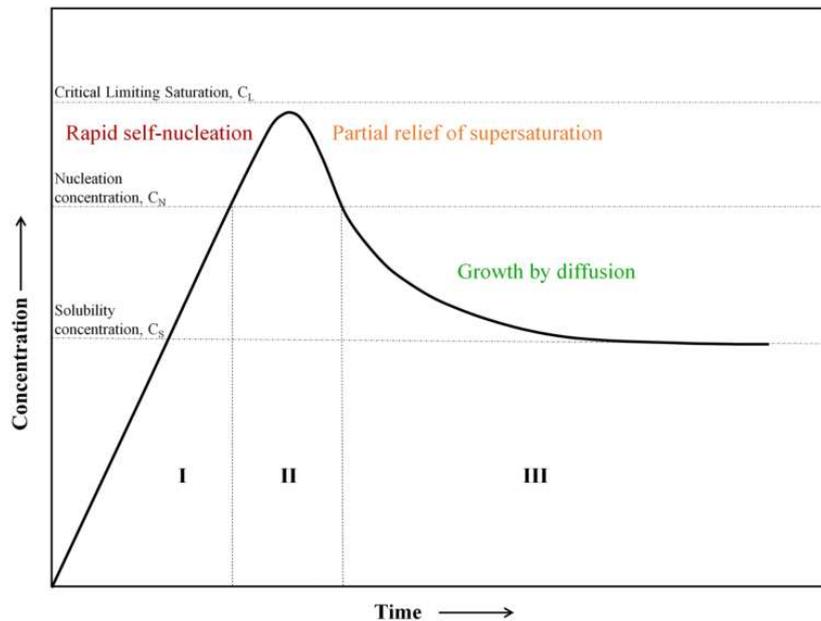


Figura 1.7 Modelo de LaMer que describe los procesos de nucleación y crecimiento de las NPs [16].

Los óxidos de hierro (Fe_3O_4 o $\gamma-Fe_2O_3$) se preparan usualmente mediante una mezcla estequiométrica de sales ferrosas y férricas en un medio acuoso. La reacción química de formación de Fe_3O_4 puede ser escrita de la siguiente manera [13]:



En la síntesis, las nanopartículas de Fe_3O_4 tienden a aglomerarse debido a sus grandes energías de superficie y magnetización (interacciones magnéticas dipolo-dipolo), lo cual puede representar un gran problema en las aplicaciones biomédicas. Para evitar la formación de grandes aglomeraciones se utilizan diversos estabilizadores, como surfactantes o polímeros que promueven la dispersión de las nanopartículas magnéticas [17].

1.3 Conceptos básicos de magnetismo y propiedades magnéticas de los materiales

1.3.1 Magnetismo y materiales magnéticos

Un campo magnético es producido por una carga eléctrica en movimiento. Esta puede ser inducida por una corriente eléctrica que fluye en un material conductor o por un imán permanente. En el caso del imán permanente, el campo magnético no se genera por una corriente eléctrica, pero lo hace por el movimiento de los orbitales y los espines de los electrones del material [18].

El magnetismo en los materiales proviene de los momentos magnéticos de los electrones. El movimiento de los electrones en los átomos posee un momento angular orbital (m_l), asociado a su momento angular (l), y a su momento de espín (m_s), proporcional a su espín (s):

$$m_l = g_l l$$

$$m_s = -g_s \mu_B s$$

Donde g_l y g_s son factores de orbital y de espín, respectivamente; s es el espín del electrón y μ_B es el magnetón de Bohr ($9.274 \times 10^{-24} \text{ A} \cdot \text{m}^2$). El acoplamiento de m_l y m_s , que es la interacción del espín del electrón con su movimiento, da lugar al acoplamiento espín-orbital. Dentro de un material existen interacciones entre los átomos, donde cada una está asociada con momentos del espín (S) [19].

La magnetización es una propiedad que presentan los materiales de responder con fuerzas de atracción o repulsión a nivel atómico o subatómico cuando está sujetos a un campo magnético generado por otros materiales magnéticos; como consecuencia de la superposición de momentos magnéticos atómicos más el magnetismo itinerante de la conducción de electrones. Los efectos magnéticos ocurren en todos los materiales gases, líquidos y sólidos en cierto grado, como consecuencia de que la materia se forma de partículas cargadas en movimiento (básicamente protones, neutrones y electrones); pero la mayor proximidad de los átomos en un sólido puede promover mayores efectos cooperativos, especialmente cuando los momentos magnéticos de los átomos están alineados [14].

El magnetismo de un sólido del número de electrones desapareados que posea cada átomo, así como del orbital en el que se encuentre. Al aplicar un campo magnético externo al sólido, los electrones dan lugar a dipolos magnéticos que se ordenan con el campo dando lugar a un momento magnético dentro de éste [6].

La magnitud de la magnetización (M) es definida como el total de momentos magnéticos por unidad de volumen [20]. Es una propiedad de cada material y depende tanto de los momentos dipolares magnéticos de los iones, átomos y/o moléculas constituyentes, así como de la interacción entre estos momentos. Sus unidades son emu/cm³ en cgs y amperes/metro (A/m) en SI [14].

$$M = \mu \frac{N}{V}$$

El comportamiento de un material resultante al aplicarle un campo magnético (\vec{H}) es llamado inducción magnética, (\vec{B}). La relación entre (\vec{B}) y (\vec{H}) es una propiedad característica de cada material. En el vacío se tiene una correlación lineal entre \vec{B} y \vec{H} :

$$B = \mu_0 H$$

Dentro de un material magnético \vec{B} y \vec{H} pueden diferir en magnitud y dirección debido a la magnetización [14, 20]:

$$B = \mu_0(H + M)$$

La relación entre \vec{M} y \vec{H} es llamada susceptibilidad (χ). Esta magnitud indica como es la respuesta de un material a un campo externo aplicado y está dada en unidades de emu/cm³ (Oe) en el sistema cgs y en el sistema SI es adimensional [14].

$$X = \frac{\vec{M}}{\vec{H}}$$

Los sólidos se pueden clasificar en función de la respuesta magnética al aplicarles un campo magnético externo [6]. A través de los gráficos \vec{M} o \vec{B} vs \vec{H} , llamadas *curvas de magnetización*, se estudia esta respuesta magnética [14].

La curva inicia en el origen en un estado desmagnetizado y la magnetización magnética \vec{M} aumenta poco a poco conforme se incrementa el campo en la dirección positiva; sin embargo, poco a poco la magnetización se vuelve constante. Al valor al cual la magnetización se hace constante, se le llama *saturación de magnetización* (\vec{M}_S), y la curva de \vec{M} del estado desmagnetizado al estado \vec{M}_S es llamada *curva normal de magnetización*. Cuando \vec{H} es reducida a cero, después de la saturación, la magnetización decrece a la *magnetización remanente*, \vec{M}_R . El campo magnético requerido para reducir la inducción a cero es llamado *campo magnético coercitivo ó coercitividad* (\vec{H}_C), Fig. 1.8, [14].

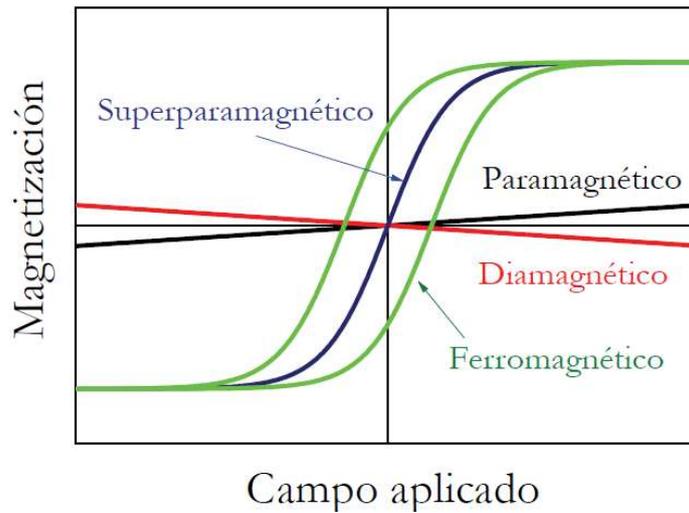


Figura 1.8 Estados magnéticos y su curva M-H característica [6].

En presencia de un campo magnético aplicado, la corriente creada por el movimiento orbital de los electrones se opone al campo aplicado. Todos los materiales muestran esta repulsión débil como respuesta a un campo magnético, a esta propiedad se le conoce como *diamagnetismo* [11]. Ejemplos de materiales diamagnéticos son: el agua, las proteínas dentro del cuerpo humano que contienen carbono, hidrógeno, nitrógeno, [6] cobre, plata, oro, bismuto y berilio. En términos de la configuración electrónica, el diamagnetismo se observa en los materiales que tienen completas las subcapas electrónicas, lo cual indica que los momentos magnéticos están apareados, y en conjunto unos se contrarrestan con otros. Los materiales diamagnéticos tienen una susceptibilidad magnética pequeña y negativa ($X \sim -10^{-5}$) y repelen débilmente a un campo magnético aplicado [21].

El resto de los comportamientos magnéticos se observa en materiales que tienen electrones desapareados en sus capas atómicas, generalmente en $3d$ o $4f$ [22].

En los *materiales paramagnéticos* los átomos tienen momentos magnéticos netos debido a los electrones desapareados, pero los dominios magnéticos están ausentes. Cuando el material paramagnético se coloca bajo un campo magnético, los dominios magnéticos de los átomos se orientan en la misma dirección del campo magnético aplicado, originando un momento magnético total débil, Fig. 1.9, [9]. Sin embargo, al eliminar el campo magnético, las fluctuaciones térmicas hacen que los momentos magnéticos se muevan al azar obteniéndose un momento magnético nulo [6]. Debido a esto, a bajas temperaturas no se observa paramagnetismo [11]. Algunos ejemplos de materiales paramagnéticos son: la hemoglobina, proteína que posee en su interior un ión Fe que tiene electrones desapareados pero que por encontrarse tan lejos de otros iones Fe no puede interactuar con ellos, aluminio, platino y manganeso [6, 18]. Los materiales paramagnéticos tienen una susceptibilidad magnética pequeña y positiva ($X \sim 10^{-3} - 10^{-5}$) [18].

En los *materiales ferromagnéticos*, como el hierro, níquel y cobalto, un átomo cuenta con un momento magnético total debido a sus electrones desapareados. El material está compuesto de dominios magnéticos, los cuales contienen una gran cantidad de átomos. Los momentos magnéticos de los diversos átomos dentro de cada dominio, están direccionados paralelamente, produciendo un momento magnético neto para cada dominio. Los momentos magnéticos de los dominios están distribuidos aleatoriamente ocasionando un momento magnético neto de cero en el material. Cuando a un material ferromagnético se le aplica un campo magnético, los momentos magnéticos de los dominios se alinean en la dirección del campo magnético aplicado, originando un gran momento magnético neto, Fig. 1.9. Una vez removido el campo magnético aplicado existe un momento magnético residual [9]. La susceptibilidad magnética de los sólidos ferromagnéticos es positiva y mayor a 1, $X \sim 50-10,000$ [18].

Los *materiales antiferromagnéticos* están compuestos de dos diferentes tipos de átomos, que ocupan distintas posiciones en la red. Los átomos tienen momentos magnéticos con igual magnitud, pero sus electrones se alinean antiparalelamente, por lo tanto, se tienen como resultado un momento magnético neto de cero, Fig. 1.9. Algunos materiales antiferromagnéticos son MnO, CoO, NiO y CuCl_2 [9].

Los *materiales ferrimagnéticos*, como la magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) están compuestos de diferentes átomos, que ocupan diferentes posiciones en la estructura cristalina, con sus momentos magnéticos alineados antiparalelamente. En estos materiales, los momentos magnéticos no se cancelan, debido a que estos no tienen la misma magnitud, fig. 1.9, [9].

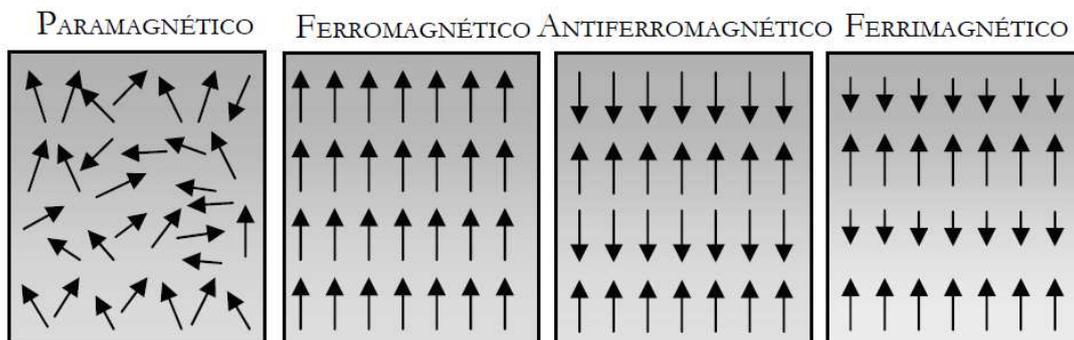


Figura 1.9 Respuesta magnética de los sólidos al aplicarles un campo magnético externo [6].

1.3.2 Dominios magnéticos

Los materiales ferromagnéticos están divididos en pequeñas regiones dentro de las cuales todos los momentos magnéticos están alineados paralelamente unos a otros; a estas regiones se les llama *dominios magnéticos* [14]. Estas regiones están separadas por zonas planas llamadas *paredes de dominio* donde la magnetización rota de un eje fácil a otro [13]. Cuando un material ferromagnético está en estado desmagnetizado, los vectores de

magnetización en los diferentes dominios tienen diferentes orientaciones, por lo que la magnetización promedio es la suma vectorial de todos ellos. El proceso de magnetización causa que todos los dominios se orienten en la misma dirección [14].

La formación de dominios es una consecuencia de la minimización de la energía magnética total de los materiales ferromagnéticos. Esta energía, se calcula como la suma vectorial de varias contribuciones [14]:

- a. *Energía de intercambio*: alinea todos los momentos magnéticos en la misma dirección [9].
- b. *Energía magnetostática*: es la principal fuerza motriz para la formación de dominios. Si un bloque magnetizado de material ferromagnético contiene sólo un monodominio, este se comporta como un imán y las líneas de magnetización actúan en dirección opuesta a su propia magnetización interna. Por esta razón, al campo formado también se le llama campo de desmagnetización (\vec{H}_d). La energía magnetostática es causada por este campo y le permite al material hacer trabajo, como mover o levantar otro ferromagneto. Esta energía puede reducirse, disminuyendo el \vec{H}_d externo. Una forma de hacer esto es la formación de dominios. Los momentos magnéticos en la zona de enlace entre los dos dominios no están alineados paralelamente, por lo que en esta zona la formación de dominios incrementa la energía de intercambio del material, Fig. 1.10. Para reducir la energía magnetostática a cero, se necesita un patrón de dominios que conduzca a la ausencia de polos magnéticos en la superficie del bloque [14]. En resumen, esta energía trata de eliminar la magnetización en el material [9].

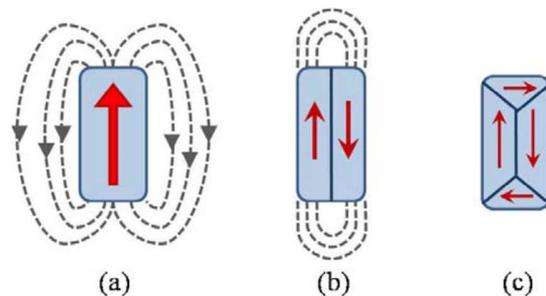


Figura 1.10 Formación de dominios magnéticos, como consecuencia de la reducción de energía magnetostática [14].

- c. *Energía magneto-cristalina o de anisotropía*: está relacionada con la dirección cristalográfica a la cual los materiales ferromagnéticos tienden a alinearse con mayor facilidad, estas direcciones, se les conoce como *ejes preferenciales* ó *ejes de fácil magnetización*. En consecuencia, es más sencillo magnetizarlos o desmagnetizar a los materiales, si el campo magnético externo es aplicado a lo largo de estas direcciones [14].
- d. *Energía magnetostrictiva*: Cuando un material es magnetizado, este sufre un cambio de longitud conocido como magnetostricción. El signo de esta energía es (+) si el material se expande con la magnetización y (-) si se contrae, en la dirección de la magnetización. Para la mayoría de los materiales estos cambios son muy pequeños

(10 partes por millón), no obstante, esta cantidad es suficiente para influenciar a la estructura de los dominios [14].

Las zonas de enlace entre dominios adyacentes en materiales ferromagnéticos en su estado masico-volumétrico, son llamados *paredes de dominio* ó *paredes de Bloch*. A lo largo de la dirección de magnetización pueden cambiar 90 ó 180°. El ancho de las paredes de dominio está determinado de nueva cuenta por un balance entre diferentes contribuciones energéticas. Las paredes de dominio que son energéticamente más favorables son aquellas que no producen polos magnéticos dentro del material y en consecuencia no introducen campos desmagnetizados. Ejemplos de este tipo de paredes de dominio son las de enlace de giro de 180°, pared de enlace inclinado de 90° y la pared de Néel de rotación de espín, Fig. 1.11, [14].

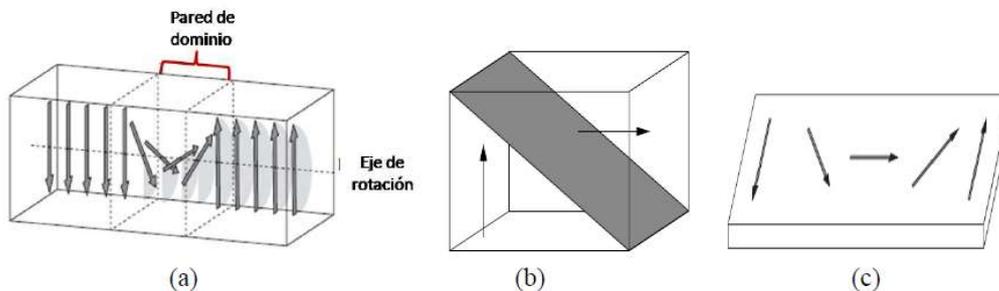


Figura 1.11 Cambio en la orientación de los dipolos magnéticos: (a) en un enlace de giro de 180°, (b) en un enlace inclinado de 90°, y (c) en la rotación de espín 180° [14].

1.3.3 Efecto nano

Uno de los parámetros importantes de las NPMs para sus aplicaciones es su tamaño. En el caso de los materiales magnéticos a gran escala, sus espines magnéticos se orientan en la misma dirección que el campo magnético externo. Sin embargo, a escala nanométrica los espines que se encuentran en la superficie de la nanopartícula tienden a inclinarse ligeramente, originando un desorden magnético superficial, Fig. 1.12. Este efecto superficial tiene una influencia significativa en los momentos magnéticos de las nanopartículas. Cuando se desciende por debajo de un diámetro crítico (D_c), los efectos de superficie influyen en el valor de la magnetización de un material, Fig. 1.13. Estos efectos superficiales se presentan debido a la presencia de defectos y vacantes en las capas externas de las nanopartículas, dando lugar a una falta de simetría y coordinación de los átomos que se encuentran en estas regiones. Como consecuencia se reduce el acoplamiento de superintercambio espín-espín en ferritas, disminuyendo la magnetización [6].

Por debajo del tamaño D_c , el material ferromagnético monodominio reduce su coercitividad con la reducción del tamaño de partícula, debido a que en partículas más pequeñas las fluctuaciones térmicas son más importantes que su momento magnético. El diámetro se reduce hasta anular la coercitividad, alcanzando un tamaño D_s , que delimita la región superparamagnética (SPM) de la ferromagnética (FM). Por debajo de D_s , la coercitividad es

cero ya que la agitación térmica es suficientemente fuerte como para desmagnetizar espontáneamente un grupo de partículas, previamente saturadas, [10] Fig. 1.14.

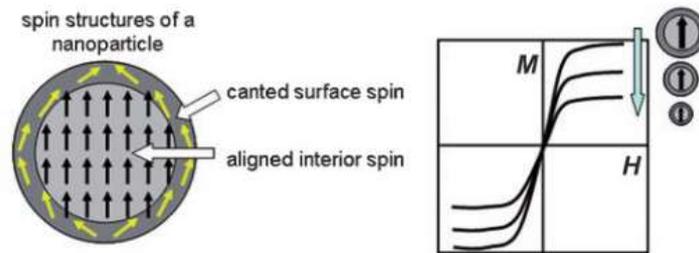


Figura 1.12 Efecto de la superficie en las nanopartículas magnéticas [23].

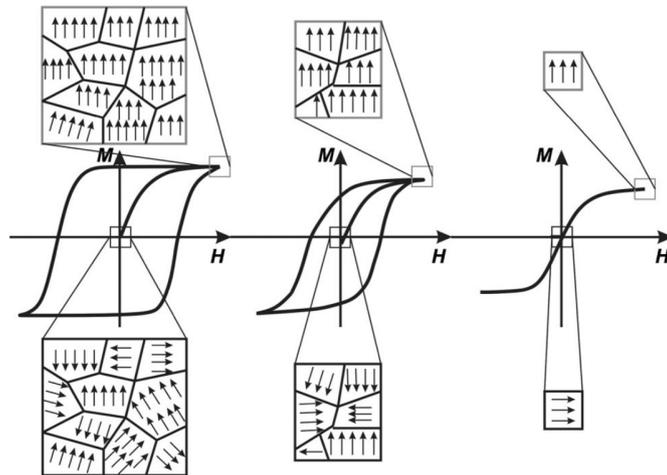


Figura 1.13 Variación de la forma de las curvas de magnetización en función del tamaño de partícula [24].

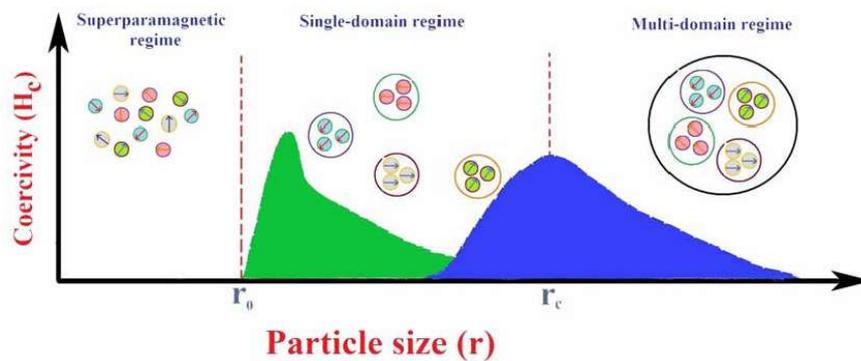


Figura 1.14 Variación de la coercitividad (H_c) en función del tamaño de partícula [22].

1.3.4 Superparamagnetismo

La energía de anisotropía (E_a) mantiene la magnetización a lo largo de una dirección preferencial, para partículas pequeñas está dada por el producto de la constante de anisotropía, K , y el volumen de la partícula, V . Conforme el volumen es reducido, KV se convierte comparable a la energía térmica, $k_B T$. Como resultado, la energía térmica puede superar la energía de anisotropía y espontáneamente girar el momento magnético de una partícula desde un eje de fácil magnetización a otro, incluso en ausencia de un campo magnético aplicado. Este fenómeno es llamado *superparamagnetismo*. En los materiales paramagnéticos y superparamagnéticos, cuando se aplica un campo magnético externo, este tiende a alinear los momentos magnéticos, pero la energía térmica tiende a desalinearlos; sin embargo, como el momento magnético en superparamagnéticos es mucho más grande que en los paramagnéticos, las partículas se alinean a valores más pequeños de campos magnéticos externos. El comportamiento superparamagnético, puede ser destruido, reduciendo la temperatura, aumentando el tamaño de partícula o incrementando la anisotropía, de tal manera que: $KV > k_B T$ [14].

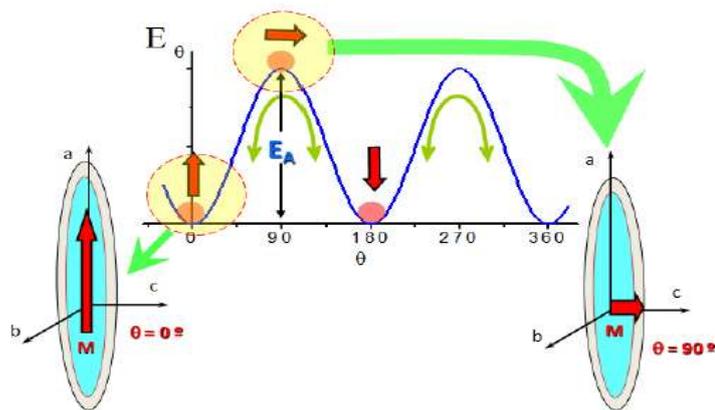


Figura 1.15 Variación de la energía de una partícula monodominio con anisotropía uniaxial en función del ángulo de magnetización [13].

El superparamagnetismo es una característica deseada de las nanopartículas magnéticas, porque los momentos magnéticos son detectados en presencia de un campo magnético externo, pero no existe un momento magnético remanente, cuando el campo magnético es removido. Esto provee a las partículas una estabilidad coloidal y una agregación mínima, reduciendo el riesgo de embolia [25].

1.4 Mecanismo de relajación magnética

El superparamagnetismo se alcanza cuando la energía térmica es mucho mayor a la energía de anisotropía, permitiendo a los espines de magnetización fluctuar fácilmente entre las direcciones de arriba-abajo. El tiempo requerido para cambiar el estado de los espines

(arriba-abajo) es llamado *tiempo de relajación* (τ), y la temperatura a la cual se pasa del estado libre de los espines a un estado bloqueado se conoce como *temperatura de bloqueo* (T_B) [12].

Al eliminar el campo magnético aplicado a un conjunto de nanopartículas superparamagnéticas, los momentos magnéticos se reorientan al azar mediante la acción de dos mecanismos principales: relajación de Néel y relajación de Brown, Fig. 1.16, [6]. La elección del mecanismo depende principalmente del tamaño de las partículas. Para partículas pequeñas, el mecanismo dominante se debe a la rotación del vector magnético dentro de la partícula, y está gobernado por la relajación de Néel. Para partículas grandes, la relajación de Brown se explica por la rotación de la partícula dentro del líquido transportador [26].

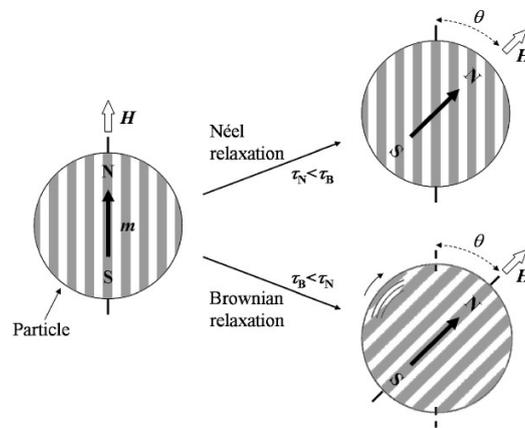


Figura 1.16 Mecanismos de relajación del momento magnético [13].

En el mecanismo de relajación browniano, el momento magnético se reorienta con la partícula dentro del solvente en el que se encuentra y se da solo cuando las partículas se encuentran en un medio líquido. El tiempo en el que se invierten los momentos mediante este mecanismo (τ_B) depende del volumen hidrodinámico (V_h), la viscosidad del disolvente donde se encuentran las partículas (η) y la temperatura absoluta (T), como se muestra en la expresión donde k_B es la constante de Boltzmann [6]:

$$\tau_B = \frac{3V_h\eta}{k_B T}$$

El mecanismo de relajación de Néel describe la relajación del momento magnético dentro de la partícula. Este mecanismo está presente siempre y es el único que interviene en la relajación de los momentos magnéticos cuando las partículas están en polvo o en un líquido congelado, ya que las partículas no pueden rotar físicamente. El tiempo de inversión de los momentos magnéticos mediante este mecanismo (τ_N) depende del volumen magnético de la partícula (V_{mag}), la constante de anisotropía del material (K_{eff}) que es la energía por unidad de volumen necesaria para invertir el momento magnético de orientación, la frecuencia de Larmor cuyo valor es el inverso de τ_0 (10^{-9} s), y la temperatura. La expresión para el tiempo de relajación de los momentos magnéticos es la siguiente [6]:

$$\tau_N = \tau_0 e^{K_{eff} V_{mag} / k_B T}$$

Cuando las partículas son superparamagnéticas se cumple que $\tau_N \ll \tau_B$ y la relajación del momento magnético tiene lugar por rotación del momento dentro de la partícula a través de los ejes magnéticos. En cambio, para partículas ferro o ferrimagnéticas donde el momento magnético está bloqueado en la dirección del eje fácil de imanación dentro de la partícula se cumple que $\tau_B \ll \tau_N$ [6].

1.5 Nanopartículas magnéticas de óxidos de hierro diseñadas para aplicaciones biomédicas

El interés en las nanopartículas superparamagnéticas de óxidos de hierro (SPIONs) se ha incrementado en los últimos años debido al gran potencial que presentan en un amplio espectro de aplicaciones, como; separación y purificación magnética de células, inmovilización de enzimas y proteínas, portadores de fármacos controlados magnéticamente, agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética (MRI), hipertermia magnética, catálisis, almacenamiento de datos y remediación ambiental [12, 27]. Como se mencionó anteriormente, las NPs de Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ son las más utilizadas en aplicaciones biomédicas, especialmente en cáncer. Estas NPs son biocompatibles y biodegradables en el organismo. Después de metabolizarse, los iones de hierro que las componen se añaden a los depósitos de hierro del organismo, siendo incorporadas por los eritrocitos como parte de la hemoglobina. Los efectos citotóxicos observados de estas nanopartículas debido a la ingesta, solo ocurre a altas concentraciones, superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ [11].

Un factor importante para las aplicaciones *in vivo* de las NPMs es su tamaño, ya que el tiempo de permanencia en el organismo depende del tamaño de la nanopartícula, Fig. 1.17. Cuando entra al organismo, una partícula es reconocida por un conjunto de proteínas llamadas opsoninas. Después de unirse a las partículas, las proteínas sirven de señuelo para la acción de las células de sistema macrófago-fagocítico (SMF). El SMF incluye macrófagos del hígado, del bazo y de los nódulos linfáticos, y es el encargado de reconocer y eliminar todas las partículas extrañas que entran en el organismo, por lo tanto, provocan la eliminación de las NPMs. El tamaño de las NPMs debe ser suficientemente pequeño para evitar su captura por el bazo (menor a 200 nm), pero suficientemente grande para evitar la filtración directa por los riñones (mayor a 5 nm). Por lo tanto, las nanopartículas que oscilan entre 10 y 100 nm poseen el tamaño más adecuado para ser utilizadas en aplicaciones *in vivo* [11].

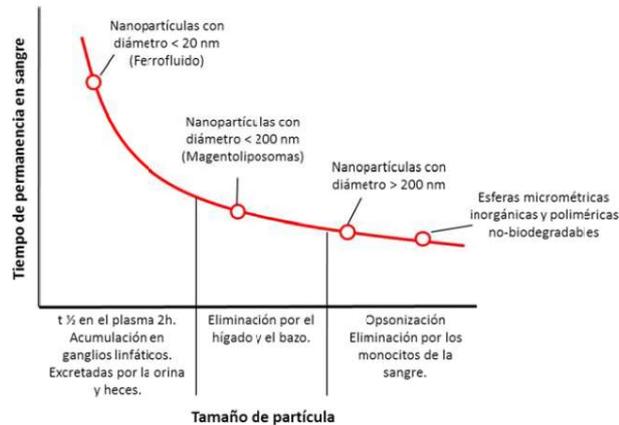


Figura 1.17 Tiempo de permanencia en sangre en función del tamaño de las NPMs [11].

Usualmente, los tumores tienen una vasculatura dañada y con fugas, y también, un pobre sistema de drenaje linfático. Esto les permite a las nanopartículas poder acumularse en los tumores, este fenómeno es conocido como *orientación pasiva*, y se logra mediante el efecto de permeabilidad y retención aumentada (*Enhanced Permeability and Retention, EPR*). Algunas SPIONs son funcionalizadas con moléculas específicas, como anticuerpos monoclonales, y pequeñas moléculas que sirven de enlace con otras moléculas, permitiendo así ser captadas por receptores celulares específicos. Este esquema recibe el nombre de *orientación activa*.³¹ Otra estrategia de orientación se basa en utilizar las propiedades magnéticas de las SPIONs, denominándose *orientación magnética*. En este proceso, un campo magnético externo es aplicado en la región deseada en el cuerpo, promoviendo la acumulación de las nanopartículas magnéticas inyectadas en el área [28], Fig. 1.18

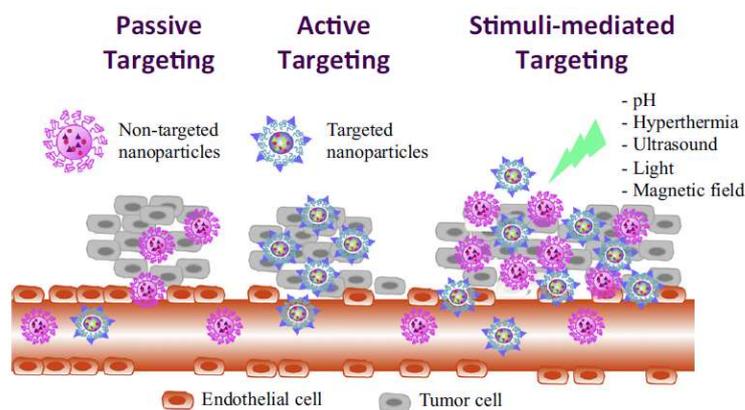


Figura 1.18 Representación esquemática de las diversas estrategias de focalización: pasiva, activa y estimulada [29].

Las propiedades magnéticas son otra característica esencial en aplicaciones biomédicas. El objetivo principal es mantener una coercitividad baja, cercana a un valor de cero; y una alta magnetización de saturación. En tratamientos contra el cáncer, las SPIONs con una alta M_S son más fácilmente orientadas en la dirección de un campo magnético externo aplicado (H), y así dirigidas a regiones específicas dentro del organismo [30]. Estas propiedades magnéticas dependen fuertemente del tamaño, la composición química, y la forma de las NPs. Conforme la partícula disminuye su tamaño, M_S decrece a causa de los efectos de la anisotropía superficial [30, 31].

Numerosas síntesis y diferentes estrategias de diseño se han llevado a cabo para optimizar las propiedades magnéticas de las SPIONs, incluyendo, recubrimiento, conjugación, injertos y dopado con surfactantes, polímeros, sílica, oro, tierras raras, etc. [32, 33, 34, 35]. Como resultado ha emergido el desarrollo de nanomateriales magnéticos multifuncionales, en los cuales se combinan materiales conocidos para formar una estructura más compleja; demostrando así un gran potencial como materiales teranóstico (terapia y diagnóstico) principalmente en cáncer, Fig. 1.19, [24, 36].

Muchas investigaciones han enfatizado en la preparación de sistemas SPIONs-RE³⁺ (iones de tierras raras), utilizando principalmente iones de Gd³⁺. Las estructuras y propiedades magnéticas que presentan estos nanomateriales los potencializa enormemente para el diagnóstico y tratamiento de cáncer, en aplicaciones como agentes de contraste en modalidad dual (T₁-T₂) en MRI e hipertermia magnética [33, 37, 38].

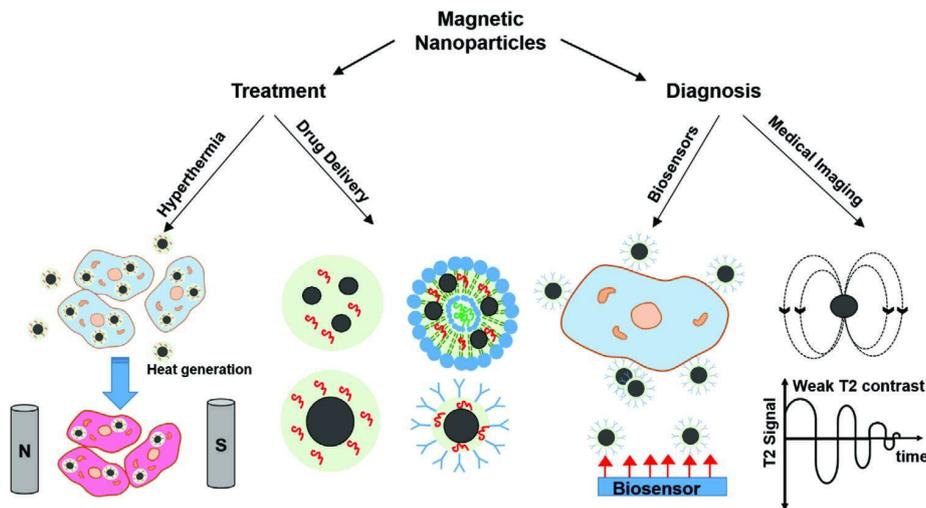


Figura 1.19 Diversas aplicaciones de las NPMs en el tratamiento y diagnóstico de cáncer [39].

1.5.1 Hipertermia magnética

Experimentalmente se ha observado que las células cancerígenas son más sensibles al calor que las células sanas. A una temperatura arriba de 42 °C las células cancerígenas sufren apoptosis; en cambio para las células sanas este daño ocurre arriba de 45 °C. A partir de estas observaciones se ha dirigida la mirada hacia el uso de la hipertermia como tratamiento contra los tumores. La hipertermia involucra elevar la temperatura entre 42- 46 °C de un tumor dentro del organismo, ocasionando la muerte de células tumorales. Existen diferentes procesos para la aplicación de la hipertermia. Uno es la hipertermia aplicada a todo el cuerpo, en la cual obviamente se eleva la temperatura de todo el organismo; y la hipertermia localizada, la cual consiste en calentar solamente la región del cuerpo en donde se encuentra el tumor [40].

Uno de los procesos interesantes de la hipertermia en las últimas décadas, es la *hipertermia magnética*. Esta técnica se basa en colocar partículas ferromagnéticas o superparamagnéticas dentro del organismo, en la zona tumoral y calentarlas por un campo electromagnético alterno. El campo utilizado está en un rango de radiofrecuencia de 10^4 to 10^7 Hz, usualmente se utiliza 1 MHz, el cual permite penetrar fácilmente hueso y tejido. Al interactuar las NPMs con el campo disipan energía a sus alrededores ocasionando un calentamiento, es decir transforman energía magnética en energía térmica [26, 40]. La energía es disipada a través de tres mecanismos: (1) corriente de Foucault (Eddy current) debido a los efectos de inducción por la aplicación de un campo magnético alterno pulsado, (2) por fricción, inducido por la interacción entre las NPs y su medio; y (3) relajación y pérdidas de histéresis de las NPMs [41].

La tasa de adsorción específica (specific adsorption rate, SAR) determina que tan efectiva es una NP al generar calor cuando es expuesta a un campo magnético alterno, y se mide en Watts por gramo de Fe ($W\ g^{-1}[Fe]$) [30, 40].

En 2004, abrió la primera clínica para el tratamiento de cáncer a través de hipertermia magnética en la Universidad Médica Charité de Berlín. Tiempo después Magforce® obtuvo su licencia en Europa para tratar pacientes con tumores cerebrales [31].

1.5.2 Nanopartículas magnéticas como agentes de contraste en MRI

A diferencia de la tomografía computarizada de rayos-X (computed tomography, CT) y la tomografía por emisión de positrones (positron emission tomography, PET), las imágenes por resonancia magnética (magnetic resonance imaging, MRI) no utilizan una radiación ionizante, la cual puede causar serias complicaciones por el escaneo repetitivo, especialmente en niños y jóvenes adultos [42]. La MRI es una técnica de diagnóstico no invasiva que se utiliza rutinariamente en clínica, se basa en la diferencia de las relajaciones magnéticas nucleares de los protones del agua entre los fluidos biológicos y los tejidos sólidos [4, 11]. Mediante esta técnica es posible el diagnóstico del cáncer de hígado, bazo o nódulos linfáticos [6].

Las señales de MRI se basan en el movimiento de precesión de los núcleos del hidrógeno del agua dentro de un campo magnético aplicado. Las imágenes se generan específicamente de los protones provenientes de los núcleos de los átomos de hidrógeno, provenientes del agua contenida en tejidos, proteínas, lípidos y otras macromoléculas. El cuerpo humano está compuesto de un 70 % de agua. La molécula del agua contiene dos protones de hidrógeno, por lo tanto, MRI es la técnica ideal para estudiar nuestro cuerpo. El protón cuenta con un campo magnético intrínseco que se origina de su giro nuclear y su carga, que le permite direccionarse en presencia de un campo magnético. De acuerdo con la mecánica cuántica, los átomos que contienen protones desapareados tienen espines de $\pm 1/2$, por lo tanto, tienen asociados un momento magnético y un momento angular [43]. Cuando un campo magnético se aplica a una muestra (usualmente se utilizan campos magnéticos de 1.5 o 3 T), los momentos magnéticos de los protones de la muestra tienden a alinearse en la misma dirección del campo magnético aplicado (B_0) [43, 44]. Como consecuencia de la alineación de los momentos magnéticos por el campo magnético inducido, los átomos son sometidos a un proceso conocido como *precesión*. La precesión se refiere a la rotación sobre un eje que está constantemente cambiando. Los protones bajo la acción de un campo magnético comienzan a rotar alrededor de sus ejes a una frecuencia determinada por una constante numérica y la fuerza del campo magnético aplicado, Fig. 1.20. Este movimiento rotacional es llamado *resonancia magnética* y está definida por la ecuación de Larmor:

$$\omega = \gamma B_0$$

Donde γ es la constante específica del protón, llamada constante giromagnética [43].

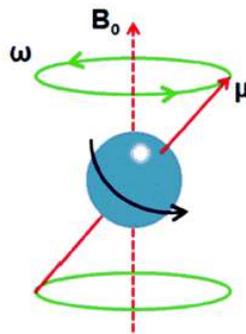


Figura 1.20 Movimiento de precesión. Bajo un campo magnético, los protones comienzan a rotar (resonar) con ω direccionada a contra-reloj [43].

Cuando los pulsos de radiofrecuencia (RF/ 5-100 MHz) entran en resonancia con la frecuencia de Larmor, los protones que originalmente están alineados con el campo magnético externo absorben la energía de RF, permitiéndoles rotar su momento magnético a un cierto ángulo (ángulo de rotación) con respecto al eje longitudinal (dirección de B_0). Después de esta excitación, los protones comienzan a relajarse, liberando la energía absorbida, lo cual se denomina *proceso de relajación*. El proceso en el cual los protones regresan a su estado de alineamiento original se utiliza para producir las imágenes, las cuales representan una localización espacial de señales intensas. El proceso de relación ocurre en

dos escalas diferentes de tiempo: la magnetización perpendicular al campo magnético (magnetización transversal) en ocasiones decrece rápidamente; mientras que la recuperación de la magnetización alineada con el campo magnético (magnetización longitudinal) es mayor, Fig. 1.21. Durante el proceso de relación T_1 , la magnetización neta regresa a su máximo valor inicial paralelo a B_0 , también se le conoce como relajación espín-red. Los protones que muestran una recuperación rápida (T_1 corto) producen altas intensidades de la señal; mientras los protones que tienen una relajación lenta (T_1 largo) originan una baja intensidad de la señal. En el proceso de relajación T_2 (relajación espín-espín) el componente transversal de la magnetización decae [43, 44].

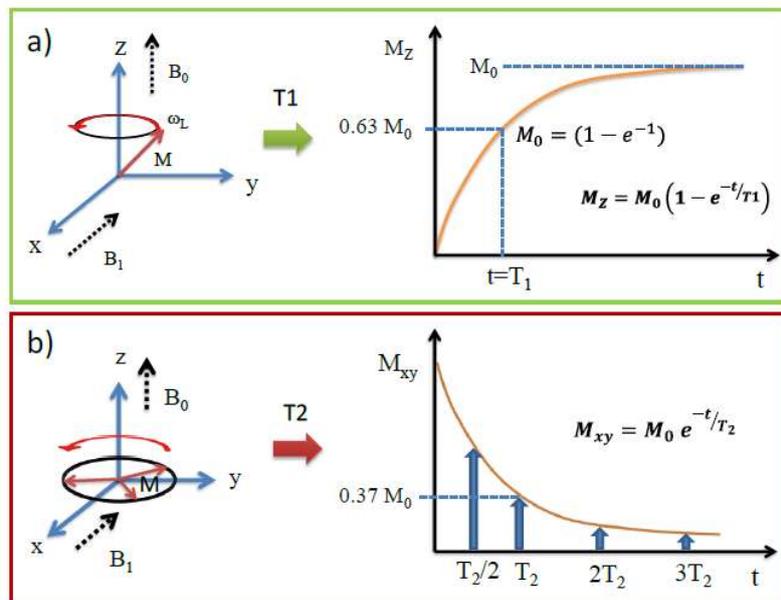


Figura 1.21 (a) Precesión del momento del protón del agua a lo largo del eje Z y relajación del momento del protón a su estado de equilibrio a través de la relajación longitudinal (T_1), (b) precesión del momento del protón del agua a lo largo del eje XY y relajación del momento del protón a su estado de equilibrio a través de la relajación transversal (T_2) [10].

El contraste en MRI se origina por la diferente intensidad de la señal del tejido debido a la magnetización de los espines nucleares detectados por el instrumento. Dicha magnetización nuclear está determinada por la secuencia de pulsos, aplicada en el protocolo de adquisición de la imagen, por la densidad de protones del tejido y por otras propiedades de los protones como los distintos tiempos de relajación longitudinal (T_1 , T_2), etc. Cuando la diferencia en estas propiedades no es suficiente, una forma de realzar las diferencias de intensidad de la señal es mediante el empleo de los llamados agentes de contraste, los cuales modifican el tiempo de relajación T_1 y T_2 en mayor o menor grado en función de su composición [4].

Los agentes de contraste permiten una mejor interpretación de las imágenes obtenidas por MRI, al aumentar las diferencias entre los tejidos normales y los tejidos patológicos [5]. Existen dos tipos de agentes de contraste: T_1 o agentes positivos y T_2 o agentes negativos.

Gd^{3+} es usado como un agente de contraste positivo, el cual tiene siete electrones desapareados y produce un momento magnético que es mucho más intenso que el producido por un protón (alrededor de 700 veces más). A pesar de las buenas propiedades magnéticas que presenta, los iones libres de Gd^{3+} son extremadamente tóxicos. Por lo tanto, para reducir su toxicidad debe ser conjugado a un fuerte quelante orgánico, como el dietilentriamino pentaacético (DTPA) [45]. La desventaja que presentan es su corto tiempo de vida en el sistema vascular [46]. En la Tabla 1.1 se muestran agentes de contraste T_1 aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y EMEA (European Medicines Agency).

Tabla 1.1 Complejos de Gd utilizados como agentes de contraste T_1 [12].

Nombre químico	Nombre comercial	Aprobación
Gd-EOB-DTPA	Eovist (Vasevist)	FDA
Gd(DTPA)	Magnetvist	FDA/EMEA
Gd-DTPA-BMA	Omniscan	FDA/EMEA
Gd-DTPA-BMEA	OptiMark	FDA/EMEA
Gd-DOTA	Dotarem	FDA/EMEA
Gd-DO3A-butrol	Gadovist	FDA/EMEA

Abreviaciones: EOB, etoxibencilo; BMA, bis-metilamida; BMEA, bis-metoxietilamida; DOTA, 1,4,7,10-ácido tetraazaciclododecano-tetraacético.

Por otro lado, las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro se utilizan como agentes T_2 [46], debido a que reducen considerablemente el tiempo de relajación transversal T_2 , lo cual implica, con las secuencias habituales de adquisición de datos, un contraste negativo o disminución de la intensidad de señal en la imagen de MRI [4]. Este acortamiento es debido a que las nanopartículas producen alteraciones en el campo local que sienten los protones de agua de su proximidad [6]. La FDA ha aprobado el uso de las nanopartículas de óxido de hierro cubiertas con dextrano, conocidas comercialmente como Feridex y Combindex, para su uso en clínico, Tabla 1.2. Sin embargo, su uso clínico es limitado por su efecto de contraste negativo y su susceptibilidad magnética [46].

Tabla 1.2 Propiedades de las nanopartículas de óxido de hierro utilizadas clínicamente como agentes de contraste T_2 [44].

Nombre	Núcleo	Superficie	Tamaño-núcleo (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	r_2 ($mM^{-1} s^{-1}$)	Campo magnético (T)
Ferumoxides (Feridex)	$Fe_3O_4-\gamma-Fe_2O_3$	Dextrano	4.96	~200	120	1.5
Ferucarbotran (Resovist)	Fe_3O_4	Carboxidextrano	4.2	>50	186	1.5
Ferumoxtran (Combindex)	Fe_3O_4	Dextrano	5.85	<50	65	1.5

La relaxividad define la eficiencia de un agente de contraste, y se basa en el tiempo de relajación y la concentración analítica del ión responsable del contraste ($mM^{-1} \cdot s^{-1}$) [44]. La relación r_2/r_1 también indica la eficiencia del agente de contraste, entre mayor sea esta relación (>10) será mayor la eficiencia del agente T_2 ; y si es menor (<5), será mayor la del agente T_1 , Fig. 1.22, [44, 47].

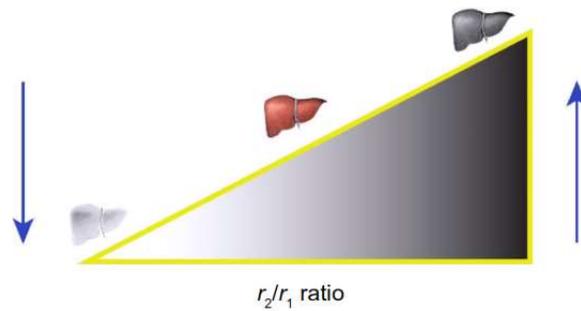


Figura 1.22 Eficiencia de los agentes de contraste debido a la relación r_2/r_1 [44].

Como cada agente de contraste tiene sus limitantes, ha surgido la investigación en la combinación de los agentes en una sola nanoestructura, con el objetivo de mejorar la reconstrucción y visualización de datos para ofrecer un mejor diagnóstico [46]. Una de las estrategias para alcanzar esta situación es la de preparar nanoestructuras que contengan un núcleo superparamagnético y una cubierta paramagnética separada por una capa de material no magnético, Fig. 1.23, [11].

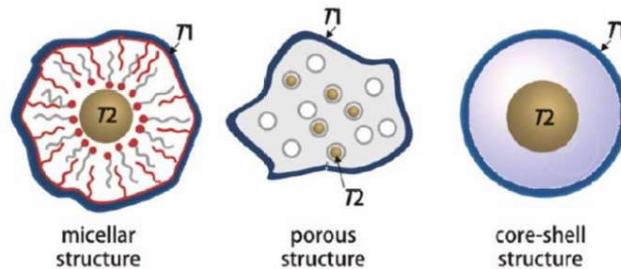


Figura 1.23 Nanoestructuras posibles para utilizar como agentes de contraste dual T_1/T_2 [11].

El primer ejemplo de un agente de contraste dual (T_1/T_2) para MRI fue llevado a cabo por Weissleder y su grupo de investigación, para captar imágenes de tumores en el hígado en ratas. Al administrarse en conjunto el Gd-DTPA y las nanopartículas de ferritas, se observó una mejora en la señal del tumor debido al Gd-DTPA, mientras que el hígado mostró una señal negativa por la acumulación de ferritas. Estos resultados mostraron un incremento en r_1 pero no hubo efecto en r_2 , cuando los dos agentes se administran al mismo tiempo. Se obtuvieron los mismos resultados al administrarlos en humanos, estudios que fueron realizados por los grupos de Semelka y Kubaska. Teóricamente, la integración de los agentes de contraste T_1 y T_2 en una sola entidad mostrara mejores resultados que utilizarlos por separados. Esto puede deberse a un alineamiento del espín del agente T_1 en la misma dirección que el campo magnético inducido por el agente T_2 . Esta teoría ha sido confirmada por algunos experimentos realizados por el grupo de investigación de Gao, en el cual nanopartículas de Gd_2O_3 se incrustaron en nanopartículas de Fe_3O_4 . Esta plataforma presenta

un mejoramiento de r_1 y r_2 [48]. Sin embargo, el campo magnético producido por las NPMs puede afectar la señal T_1 originada por los iones de Gd^{3+} . Para minimizar esto, se debe utilizar una capa intermedia de algún material, que separe el material paramagnético del núcleo superparamagnético [49].

1.5.3 Modificación superficial de las nanopartículas de óxido de hierro

La funcionalización es un proceso que provee al material de una mejora en sus propiedades o nuevas características, a través de la introducción de varios grupos funcionales; permitiéndole un mejor desempeño en una aplicación deseada. Existen dos rutas diferentes por las cuales se pueden funcionalizar las nanopartículas: *in-situ*, *post-síntesis*. La modificación *in-situ* consiste en introducir agentes estabilizantes (ligandos) en el medio, donde se lleva a cabo la síntesis de las nanopartículas. Los ligandos participan directamente en los procesos de nucleación y crecimiento de las partículas, por lo tanto, cumplen la función de estabilizadores, previniendo o disminuyendo la aglomeración de las partículas, y controlando su crecimiento. El proceso *post-síntesis* modifica la superficie de las nanopartículas después haber sido sintetizadas [50]. Existen diversos procedimientos para funcionalizar a las nanopartículas magnéticas; core-shell, matriz, and shell-core-shell, Fig. 1.24, [51].

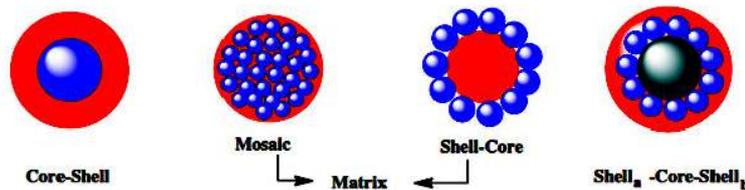


Figura 1.24 Tipos de funcionalización de las NPMs [51].

El proceso de silanización está basado en el enlace covalente de las moléculas de silano, como el 3-aminopropiltriétiloxisilano (APTES), a la superficie de las nanopartículas [19]. Este compuesto proporciona un alto número de grupos funcionales terminales, los cuales permiten enlazar a las nanopartículas con otros metales, polímeros o biomoléculas [52]. El agente de acoplamiento usualmente es un organosilano, que tiene la estructura: $F_xSiR_{(4-x)}$. El silicio se localiza en el centro de la molécula y contiene grupos funcionales (F), como: vinilo, amina, cloro, etc., y otros tipos de grupos funcionales (R), como metoxi, etoxi, etc. El grupo orgánico $R-Si$ de la molécula se hidroliza a silanol, para formar un enlace de hidróxido metálico o siloxano con el material inorgánico, Fig. 1.25. Las principales ventajas del silano son la biocompatibilidad y la alta densidad de grupos terminales funcionales en la superficie, como: alcohol, amina, tiol; los cuales son utilizados para futuras funcionalizaciones [19].

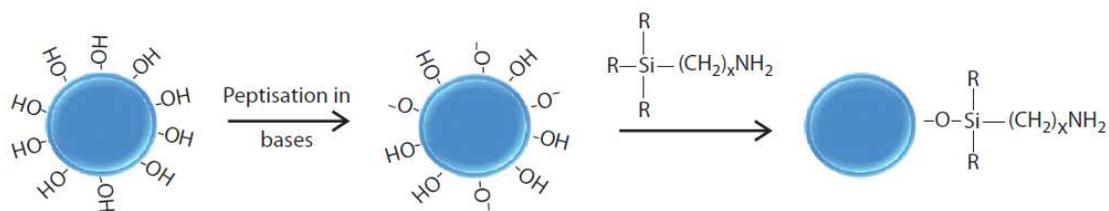


Figura 1.25 Esquema de la modificación superficial de las nanopartículas magnéticas por un proceso de silanización [19].

La conjugación entre los grupos aminos presentes en la superficie de las nanopartículas magnéticas y los grupos carboxilos, genera la formación del enlace covalente de amida. Esta conjugación se realiza a través del acoplamiento de carbodiimida, que recibe su nombre por el componente químico utilizado para realizar la formación del enlace covalente de amida. Existe una variedad de carbodiimidas, como: 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetilo) carbodiimida (CMC), dicitohexil carbodiimida (DCC) y diisopropil carbodiimida (DIC). La ventaja de este agente de acoplamiento es que no involucra ligandos de gran longitud, por lo tanto, no se afecta el tamaño hidrodinámico de las nanopartículas; además, la isourea que es el producto que se genera de este acoplamiento, es soluble en agua y puede ser removida fácilmente. Para mejorar el proceso de conjugación se utiliza N-hidroxisuccinimida (NHS), originando un agente intermedio, éster de succinimida (NHS-éster). Análogo a la isourea, NHS es susceptible a un ataque nucleofílico por las aminos, convirtiéndose fácilmente en el enlace de amida, Fig. 1.26, [19, 50].

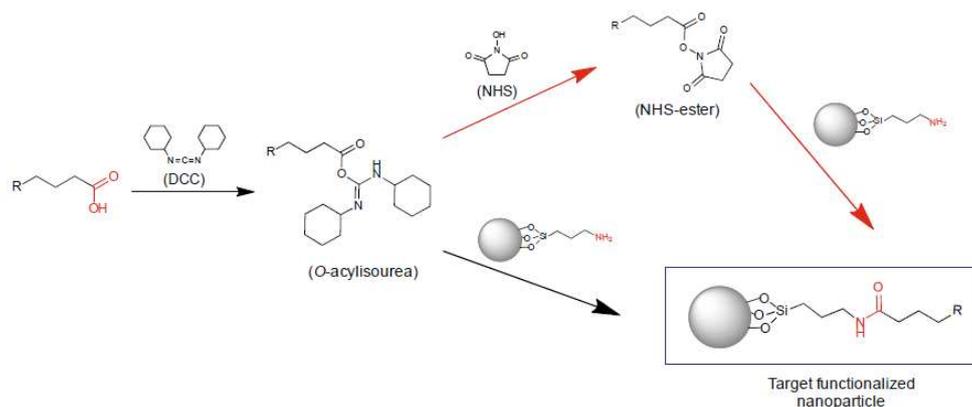


Figura 1.26 Esquema representativo del acoplamiento de carbodiimida, conjugando los grupos carboxilos y aminos, originando un enlace de amida. Se describen dos rutas, en una solo se utiliza DCC (flecha negra) y en la otra se adiciona NHS al proceso (flecha roja). En ambas rutas se obtienen el mismo resultado (recuadro azul) [50].

2. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Motivación

El cáncer representa una de las principales enfermedades con una alta tasa de mortalidad a nivel mundial. Cada año se registran altos índices de personas de diferentes edades, países, nivel socio-económico con algún tipo de cáncer. Desgraciadamente el panorama en cuanto a estos números no se visualiza favorable, debido al uso y/o práctica de algunos hábitos relacionados con esta enfermedad, al igual que al aumento de la contaminación a nivel mundial y al envejecimiento de la población. Los actuales tratamientos para combatir el cáncer (quimioterapia, radioterapia) son muy invasivos, presentando efectos secundarios significativos en la salud de los pacientes.

Durante las últimas décadas, se han realizado diversas investigaciones basadas en la nanotecnología enfocadas en el diagnóstico y tratamiento de cáncer. Particularmente se han orientado al desarrollo de nanomateriales multifuncionales, como la preparación de nanoestructuras SPIONs-Gd³⁺ ya que han demostrado tener un gran potencial como agentes de contraste en una modalidad dual (T₁-T₂) en MRI, y también en hipertermia magnética a causa de su núcleo magnético. Algunas investigaciones han correlacionado las propiedades magnéticas con una buena efectividad en MRI. La investigación que se presenta en este trabajo esta enfocada en funcionalizar SPIONs con el complejo Gd-DTPA, analizando sus parámetros de síntesis, para correlacionar sus propiedades con una futura aplicación biomédica.

2.2 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro funcionalizadas con el complejo de Gd-DTPA, con el fin de definir sus parámetros de control en la síntesis y correlacionar sus propiedades para su posible aplicación en el diagnóstico (agentes de contraste en una modalidad dual T₁-T₂ en MRI) y tratamiento (hipertermia magnética) de Cáncer.

2.2.1 Objetivos particulares

- ✓ Controlar los parámetros de síntesis química de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro por medio del método de coprecipitación, y caracterizar sus propiedades fisicoquímicas y magnéticas.
- ✓ Realizar y analizar la funcionalización de las SPIONs con Gd-DTPA, controlando los parámetros de síntesis.
- ✓ Estudiar las propiedades fisicoquímicas y magnéticas de las nanoestructuras (SPIONs@Gd-DTPA).

- ✓ Analizar la respuesta citotóxica de las nanoestructuras en dos líneas celulares: MCF-7 y PC-3.
- ✓ Correlacionar las propiedades fisicoquímicas, magnéticas y citotoxicidad de las nanoestructuras para su posible aplicación como agentes de contraste T_1 - T_2 en MRI e hipertermia magnética.

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe con detalle los diversos métodos realizados para funcionalizar las SPIONs con el complejo de Gd-DTPA.

La síntesis de las nanopartículas de óxidos de hierro se realizó por medio del método de co-precipitación de las sales ferrosa (Fe^{2+}) y férrica (Fe^{3+}), basado en el método de Massart [53]. Se obtuvieron dos tipos de NPs, debido a que se utilizaron dos bases diferentes: (1) hidróxido de tetraetilamonio ($\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{OH}$), y (2) una disolución de sodio metálico (Na^0) en 3-amino-1-propanol ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{OH}$); obteniéndose NPs no funcionalizadas (SPIONs) y NPs recubiertas (SPIONs- NH_2), respectivamente. Una vez recubiertas las NPMs se conjugaron al DTPA y luego se funcionalizaron con Gd.

El análisis de las propiedades estructurales, morfológicas y magnéticas de las nanoestructuras obtenidas se realizó a través de las técnicas de difracción de rayos-X (XRD), espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos-X (XPS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM-EDX), mediciones magnéticas en un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID), microscopía de fuerza atómica (AFM) y magnética (MFM). Para analizar la actividad citotóxica de las nanoestructuras se utilizó el ensayo de Sulforrodamina B, las líneas celulares cancerígenas utilizadas fueron: PC-3 (próstata) y MCF-7 (mama).

3.1 Reactivos

Cloruro de gadolinio (III) hexahidratado ($\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma-Aldrich), ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA, $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH , 97%, Sigma-Aldrich), alcohol etílico ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich), cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ACS reagent, 97%, Sigma-Aldrich), cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, reagent plus, 98%, Sigma-Aldrich), ácido clorhídrico (HCl , 36.5- 38.0%, BAKER ANALYZED ACS), argón (Ar , INFRA, 99.998%), hidróxido de tetraetilamonio (TEA, $[\text{C}_2\text{H}_5]_4\text{N}[\text{OH}]$, 20 wt. % in H_2O , Sigma-Aldrich), agua destilada, sodio metálico (en keroseno, $\geq 99.8\%$, BAKER ANALYZED ACS), 3-amino-1-propanol ($\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, 99%, Sigma-Aldrich), N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC, $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$, 99%, Sigma-Aldrich), N-hidroxisuccinimida (NHS, $\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$, 98%, Sigma-Aldrich), dimetil-sulfóxido (DMSO, $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, $\geq 99.7\%$, Sigma-Aldrich), óxido de gadolinio (III) (Gd_2O_3 , 99.9%, Sigma-Aldrich), 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES, $\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$, 99%, Sigma-Aldrich).

3.2 Método 1. Funcionalización de SPIONs en un solo paso

3.2.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs

La síntesis de las nanopartículas de óxido de hierro no funcionalizadas se llevó a cabo a partir de la disolución apropiada de las sales de hierro $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en HCl al

37%, 2M; obteniendo una relación estequiométrica $Fe^{2+}/Fe^{3+}=0.5$ (relación 2:1). Cada solución se agitó por separado durante 30 minutos. Después, en un matraz bola de tres bocas, se mezclaron las soluciones de Fe, agregando 5 mL de la solución Fe^{3+} y 1.25 mL de la solución Fe^{2+} . La temperatura de la reacción se elevó a 80 °C, bajo una atmósfera de argón. Para la formación de las nanopartículas magnéticas se utilizó como base el TEA, con una relación molar de $M(base)/M(Fe^{2+}+Fe^{3+})$ de aproximadamente 5.5; con el fin de obtener un pH de 14, y así disminuir el tamaño de partícula [54].

3.2.2 Etapa 2: Preparación del complejo Gd-DTPA

Se preparó el complejo Gd-DTPA, siguiendo la metodología descrita por Santra et al. [55]. El desarrollo experimental consiste en agregar por goteo una solución acuosa de 6 mM de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, en una solución acuosa de 6 mM de DTPA con 2M de NaOH. Después, se ajusta el pH a 7, agregando 2M de NaOH. La reacción se agita a 80 °C, hasta llegar a su solidificación. Los cristales blancos obtenidos son precipitados con etanol. El precipitado es filtrado y liofilizado, y como resultado se obtiene el complejo Gd-DTPA como un polvo blanco.

Para la modificación superficial de las SPIONs se realizó una solución acuosa de 200 mg del complejo Gd-DTA en 10 mL de agua destilada.

Se siguieron dos rutas diferentes al agregar la solución acuosa de Gd-DTPA en la síntesis de las SPIONs.

3.2.3 Etapa 3:- ruta 1/ Post-síntesis

Inmediatamente después de la precipitación de las NPMs, se agregó por goteo la solución acuosa de Gd-DTPA. La reacción se mantuvo en una agitación fuerte bajo una atmósfera de argón y a 80 °C. Después de una hora se enfrió a temperatura ambiente. Para recolectar las NPMs formadas se usó un magneto, y el exceso de Gd-DTPA y TEA fue removido. La solución se lavó varias veces con agua destilada y etanol, hasta obtener un pH neutro. Finalmente, la muestra fue liofilizada, almacenada en vacío y caracterizada. Esta muestra fue etiquetada como MG-1, y se ilustra su metodología en la Fig. 3.1(a).

3.2.4 Etapa 3: ruta 2/ In situ

La adición de la solución acuosa de Gd-DTPA se realizó antes de la formación de las NPMs. Esta solución del complejo se mezcló con las soluciones de Fe^{2+} y Fe^{3+} , en un matraz bola de tres bocas; manteniéndose con una fuerte agitación a 80 °C y en una atmósfera inerte. Después, se agregó por goteo el TEA, conservando las mismas condiciones en la reacción. Después de una hora, la solución fue enfriada a temperatura ambiente, y las nanopartículas magnéticas formadas se recolectaron con un magneto. La solución se lavó varias veces con agua destilada y etanol, para remover el Gd-DTPA y TEA que no reaccionó, hasta obtener un pH de 7. El producto obtenido fue secado al vacío, almacenado y analizado en las siguientes semanas. Esta muestra fue etiquetada como MG-2, y representa su ruta en la Fig. 3.1(b).

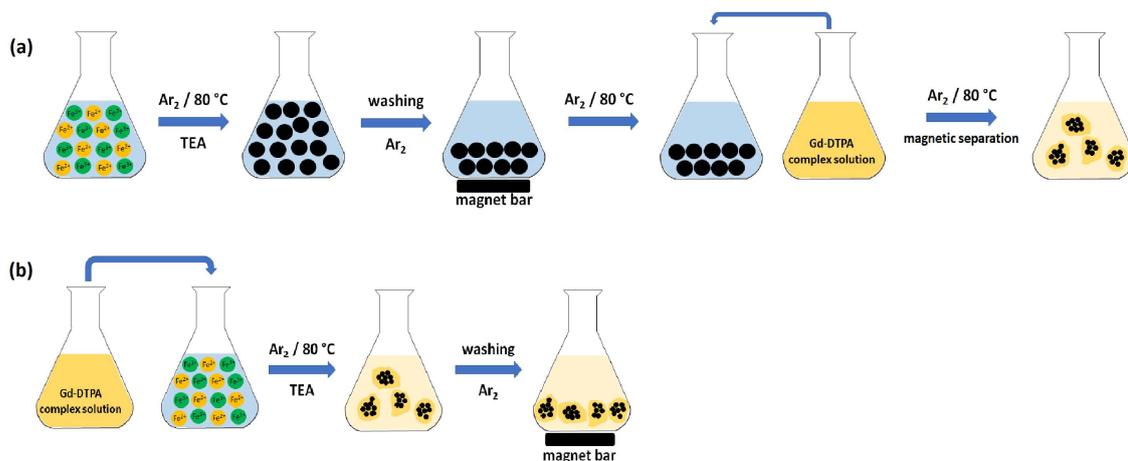


Figura 3.1 Ilustración de las diferentes rutas usadas para funcionaliza las SPIONs con el complejo de Gd: (a) MG-1 y (b) MG-2.

3.3 Método 2. Funcionalización de SPIONs(-NH₂)

En este proceso se obtuvieron las SPIONs recubiertas (SPIONs-NH₂) en un solo paso vía el método de co-precipitación, utilizando como agente precipitante y a la vez como surfactante, una solución de Na⁰/ HO(CH₂)₃NH₂. Después se conjugaron al DTPA, y finalmente se acoplo el Gd. El proceso consiste en tres etapas, y se ilustra la metodología en la Fig. 3.2.

3.3.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs(-NH₂)

Primero se preparó la solución usada como base y surfactante; añadiendo cuidadosamente el sodio metálico a 66 mM de 3-amino-1-propanol. El Na se agregó a la solución de HO(CH₂)₃NH₂ hasta llegar a la saturación de la mezcla, con el objetivo de obtener un pH de 14. Una vez disuelto totalmente, se aumentó la temperatura de la disolución a 80 °C en una atmósfera inerte formada por Ar. Por medio de esta atmósfera se evita que el sodio metálico reaccione con el agua y se diluya el gas de hidrógeno formado al interaccionar con el -OH del HO(CH₂)₃NH₂.

Aparte, se preparó una solución acuosa con 1M de FeCl₃·6H₂O y 2M de FeCl₂·4H₂O; es decir, una relación estequiométrica Fe³⁺/Fe²⁺ de 0.5. La solución de hierro se incorporó por goteo a la solución de Na⁰/ HO(CH₂)₃NH₂. La reacción se mantuvo en agitación a 80 °C, bajo una atmósfera de Ar por 30 minutos. Luego, se dejó enfriar a temperatura ambiente y precipito con la ayuda de un magneto. Se lavó con agua destilada y etanol hasta obtener un pH de 7, eliminando la base orgánica que no reacciono. Finalmente, la muestra fue liofilizada para obtener las NPs en polvo.

3.3.2 Etapa 2: Conjugación del DTPA a la superficie de las SPIONs(-NH₂)

Como la superficie de estas NPMs contiene un grupo funcional terminal de amina, se les puede conjugar el DTPA por medio de un enlace covalente; a través de la formación de una amida entre la amina de la superficie de las NPMs y los grupos carboxilos que integran al DTPA.

Para facilitar la conjugación del DTPA a la superficie de SPIONs(-NH₂) a través de un enlace covalente, es necesario que el DTPA sea activado. La activación se logra por medio de la reacción de carbodiimida y consiste en activar los grupos carboxilos con DCC, usando como catalizador NHS. La reacción de carbodiimida se llevó a cabo con una mezcla de NHS y DCC, con una relación estequiométrica de 1:1, en DMSO. Luego, se agregó por goteo 0.2 mM de DTPA, disuelto previamente en DMSO. La reacción se agito en oscuro por 24 hrs. Después se filtró para remover la dicitohexilurea (DCU) que se forma [56, 57, 58].

En el proceso de conjugación, las SPIONs(-NH₂) fueron dispersadas en agua destilada bajo una fuerte agitación y una atmósfera de argón a temperatura ambiente. Luego, se añadió por goteo el DTPA-activado; manteniendo las mismas condiciones en la reacción. De este procedimiento experimental se obtuvieron 9 muestras, variando la concentración del DTPA-activado y el tiempo empleado para llevar a cabo las reacciones, Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Parámetros para la conjugación del DTPA a la superficie de las SPIONs(-NH₂).

DTPA-activado (mL)	Tiempo de reacción (hrs.)	Muestra
0.5	24	0.5AD-24
	48	0.5AD-48
	72	0.5AD-72
2	24	2AD-24
	48	2AD-48
	72	2AD-72
4	24	4AD-24
	48	4AD-48
	72	4AD-72

Las nanopartículas obtenidas fueron precipitadas con un magneto, lavadas con agua destilada y liofilizadas. Posteriormente, se analizaron sus propiedades para seleccionar la mejor muestra y funcionalizarla con gadolinio.

3.3.3 Etapa 3: Acoplamiento del Gd a la nanoestructura SPIONs(-NH₂)@DTPA

En el acoplamiento del gadolinio a la superficie de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA, primero se utilizó como precursor el óxido de gadolinio (Gd₂O₃). Los resultados obtenidos con este reactivo no fueron los esperados, porque se observó que el óxido de gadolinio decora la superficie de la nanoestructura, en lugar de funcionalizarla. Por lo tanto, se recurrió a otro precursor; sin embargo, el desarrollo experimental y los resultados obtenidos con Gd₂O₃ se muestran en el anexo A.

Como siguiente precursor se seleccionó $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, preparando una solución acuosa con diferentes concentraciones, Tabla 3.2. Esta solución se añadió por goteo a las SPIONs(-NH₂)@DTPA, previamente dispersas en agua destilada. La reacción se mantuvo con una fuerte agitación, bajo una atmósfera inerte y a temperatura ambiente por 24 horas. Finalmente, las NPs precipitaron con ayuda de un magneto, fueron lavadas y liofilizadas.

Tabla 3.2 Variación de la concentración de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$.

mM($GdCl_3 \cdot 6H_2O$)	Muestra
10	50ADGC
5	25ADGC
3	15ADGC

Figura 3.2 Esquema del procedimiento experimental de la nanoestructura SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA.

3.4 Método 3. Funcionalización SPIONs

En este método se emplean SPIONs no funcionalizadas. El proceso se realiza en cuatro etapas, y representa en la Fig. 3.4.

3.4.1 Etapa 1: Síntesis de SPIONs

Como se mencionó anteriormente la síntesis de las SPIONs se realizó a través del método de co-precipitación; partiendo de la disolución de las sales ferrosa (Fe^{2+}) y férrica (Fe^{3+}) en HCl al 37%, 2M, con una relación estequiométrica $Fe^{2+}/Fe^{3+}=0.5$. Una vez disueltas las sales, en un matraz bola de tres bocas, se mezclaron, agregando 5 mL de la solución Fe^{3+} y 1.25 mL de la solución Fe^{2+} . La temperatura se elevó a 80 °C, bajo una atmósfera de argón. Para la precipitación de las nanopartículas de óxido de hierro, se adicionó por goteo la base de TEA, con una relación molar de $M(base)/M(Fe^{2+}+Fe^{3+}) \approx 5.5$; como consecuencia se obtuvo un pH de 14 en la solución [55]. Inmediatamente después de añadir la base, la solución se tornó de un color negro, lo cual es un indicativo de la formación de las NPMs. La reacción se mantuvo en una fuerte agitación bajo una atmósfera inerte y a 80 °C por 15 minutos. Luego, se enfrió a temperatura ambiente y con la ayuda de un imán se recolectaron las NPs formadas. Estas fueron lavadas varias veces con agua destilada y etanol, para remover la base orgánica que no reaccionó, hasta obtener un pH neutro. Finalmente, las NPs formadas se liofilizaron, almacenaron en vacío, para su análisis, Fig. 3.3.

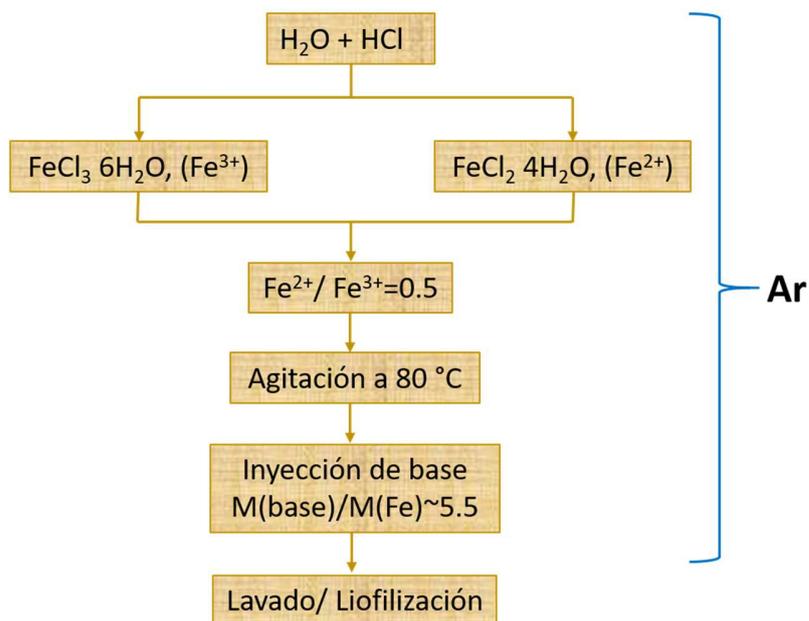


Figura 3.3 Esquema del procedimiento empleado al sintetizar las SPIONs.

3.4.2 Etapa 2: Modificación superficial de las SPIONs con APTES

Para funcionalizar a las SPIONs es necesario modificar su superficie; de manera que esta cuente con un grupo funcional terminal que nos permite primero conjugarlas al DTPA por medio de un enlace covalente, y luego acoplarles el Gd. Para llevar a cabo la modificación superficial se utilizó el APTES ($\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$). A través de la reacción de los grupos hidroxilos presentes en la superficie de las SPIONs con APTES se obtiene una superficie con un grupo funcional terminal amínico ($-\text{NH}_2$). Este grupo nos servirá posteriormente para enlazar a las NPMs covalentemente al DTPA.

La modificación superficial de las nanopartículas magnéticas consistió en dispersar 100 mg de SPIONs en 40 mL de agua destilada bajo una atmósfera de Ar. Después, se agregó por goteo el APTES; manteniendo la reacción con una agitación fuerte, a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de Ar.

Se realizaron ocho diversas reacciones, variando la concentración de APTES y el tiempo de reacción de cada concentración, ver Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Parámetros para la modificación superficial de las SPIONs con APTES.

M(APTES)	Tiempo de reacción (hrs.)	Muestra
0.05	24	0.5TA-24
	48	0.5TA-48
	72	0.5TA-72

0.2	24	2TA-24
	48	2TA-48
	72	2TA-72
0.4	24	4TA-24
	48	4TA-48

Las soluciones obtenidas precipitaron con la ayuda de un imán, se realizaron varios lavados con agua destilada y etanol, hasta obtener un pH neutro en cada solución; y se liofilizaron. Las nanopartículas obtenidas fueron caracterizadas. De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionaron las mejores muestras para ser conjugadas al DTPA.

3.4.3 Etapa 3: Conjugación de la superficie de las SPIONs(-APTES) al DTPA

Para enlazar la superficie de las SPIONs(-APTES), se aprovechó el DTPA-activado, sintetizado en la sección 3.3.2. De manera experimental, las SPIONs(-APTES) fueron dispersadas en DMSO, bajo una atmósfera inerte de Ar y una agitación vigorosa. Se agregó por goteo 2 mL DTPA-activado, manteniendo las mismas condiciones en la reacción por un período de 48 horas. Las nanopartículas obtenidas se precipitaron, lavaron y liofilizaron; y finalmente se analizaron. Del análisis se eligieron las nanoestructuras que presentan la propiedades físicoquímicas y magnéticas más adecuadas con fines biomédicos, para ser funcionalizadas al gadolinio.

3.4.4 Etapa 4: Acoplamiento del Gd a la nanoestructura SPIONs(-APTES)@DTPA

Para la funcionalización de la nanoestructura SPIONs(-APTES)@DTPA al gadolinio se preparó una solución acuosa de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, usando dos concentraciones distintas de este reactivo, Tabla 3.4. Después se agregó por goteo a las SPIONs(-APTES)@DTPA, previamente dispersadas en agua destilada. La reacción se mantuvo en una atmósfera inerte, bajo una fuerte agitación por 24 horas. Una vez precipitadas las NPs con ayuda de un magneto, se lavaron con etanol y liofilizaron. Posteriormente se analizaron en las siguientes semanas.

Tabla 3.4 Parámetros para la funcionalización de las SPIONs(-APTES)@DTPA con gadolinio.

mM($GdCl_3 \cdot 6H_2O$)	Muestra
5	25TADGC
3	15TADGC

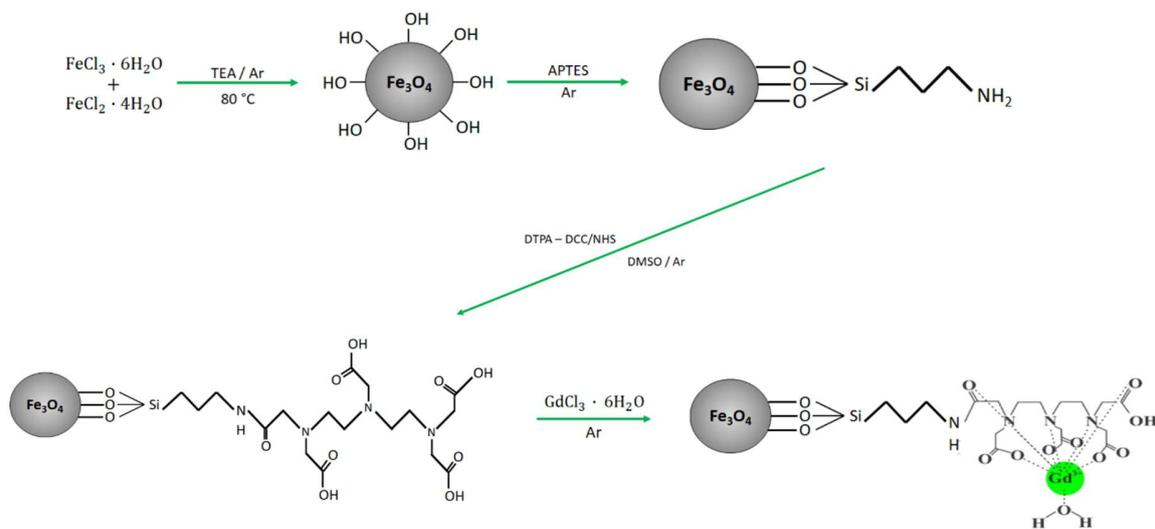


Figura 3.4 Esquema del procedimiento experimental de la nanoestructura SPIONs(-APTES) @Gd-DTPA.

3.5 Técnicas de caracterización

En esta sección se mencionan los equipos y procedimientos utilizados para caracterizar las nanoestructuras sintetizadas. En el anexo B se describe cada una de estas técnicas de caracterización.

3.5.1 Difracción de rayos-X (XRD)

La técnica de difracción de rayos-X permite determinar la estructura cristalina de las nanoestructuras, así como, el tamaño de partícula y fases presentes. Los patrones de difracción fueron registrados en un difractómetro modelo Rigaku-Smart Lab 25 kV con un tubo de cobre (Cu $K_{\lambda 1} = 1.5406 \text{ \AA}$) y un filtro de níquel. Las mediciones fueron realizadas a 9 kW (200 mA, 45 kV); y el intervalo fue de 25° a 70° con paso de 0.02°/s. El tamaño promedio de las partículas fue estimado por medio de la ecuación de Scherrer: $D = 0.9\lambda/\beta \cos \theta$, a partir del pico de difracción (311). Los parámetros de red fueron calculados con ayuda del programa *PowderCell for Windows, versión 2.4* [59]. El valor de FWHM se evaluó a través de una modificación en la ecuación de Scherrer, utilizando un ajuste a los patrones de difracción con la función pseudo-Voigt.

3.5.2 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las señales características de óxido de hierro, la oxidación superficial de las nanopartículas magnéticas y las interacciones de las fases de hierro formadas con los compuestos orgánicos anexados en la superficie de cada nanoestructura se identificaron por la espectroscopía FTIR. Los espectros se registraron en un equipo FTIR Nicolet 6700, entre 4000 y 400 cm^{-1} a partir de muestras en polvo para formar pastillas con KBr.

3.5.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

El análisis químico superficial de las muestras fue determinando en un equipo Thermo Scientific K-Alpha con un monocromador Al K_{α} con una fuente de rayos X. Todas las señales se calibraron usando el pico C 1s a 284.6 eV, como resultado del hidrocarburo presente en la superficie de las muestras. Para preparar las muestras, estas fueron sometidas a un bloqueo de carga y desgasificadas a una presión de ca 1×10^{-8} Torr por 48 horas. Después las muestras fueron insertadas dentro de la cámara de análisis donde se midieron con la presión residual de ca 1×10^{-8} Torr.

3.5.4 Espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS)

El análisis de la composición química de las nanoestructuras se examinó en un espectrómetro por dispersión de energía de rayos-X (Energy-dispersive X-ray Spectroscopy) acoplado a un microscopio electrónico de barrido modelo Auriga Zeiss FEG 25kv. La preparación de las muestras consistió en colocarlas a una cinta adhesiva doble cara de carbono, no se utilizó un recubrimiento.

3.5.5 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las nanoestructuras fue obtenida a través del microscopio electrónico de transmisión de marca Jeol JEM 2010, 200 keV, LaB6. Cada muestra fue dispersada en isopropanol y depositada en rejillas de cobre de 400 mesh con soporte formvar cubierto con carbón.

3.5.6 Microscopia de fuerza atómica y de fuerza magnética (AFM/MFM)

La topografía y el análisis de los dominios magnéticos se efectuaron en el modo contacto intermitente (tapping), y fuerza magnética (MFM), respectivamente, en un microscopio JEOL SPM-5200. La preparación de las muestras consistió en comprimir muestra en polvo con placas de vidrio de 1 cm x 1 cm. Las puntas NSC14, Co-Cr/15 fueron magnetizadas previamente por 1 minuto con un imán de neodimio. Los dominios magnéticos se midieron a 180 KHz con una interacción de elevación en Z entre 0.05- 0.86 nm, una salida de 0.011- 0.025 Amp/V y $H = 12$ KOe en condiciones de saturación. Las imágenes 3D, perfiles y mediciones de los dominios se procesaron con el programa WinSPM Process, versión 4.0 JEOL Ltd.

3.5.7 Magnetómetro (SQUID)

Las curvas de magnetización fueron medidas en un MPMS[®]3 (Magnetic Property Measurement System, siglas en inglés), diseño cuántico, 7T a temperatura ambiente, bajo un campo magnético aplicado de 3 T.

3.5.8 Ensayo de Sulforrodamina B [60]

El ensayo de Sulforrodamina B ($C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$) se utilizó para determinar la actividad citotóxica de las nanoestructuras por triplicado. Las líneas celulares utilizadas fueron: MCF-7 (línea celular cancerígena de mama) y PC-3 (línea celular cancerígena de próstata). Las líneas celulares fueron obtenidas del banco celular de la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad de Química, UNAM.

3.5.8.1 Descongelamiento de líneas celulares

Las células se descongelan dentro de un baño María a 37 °C. Después, la solución celular es lavada y centrifugada por 5 minutos. Una vez desechado el sobrante, cada línea celular es proliferada en un medio de águila modificado de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagles's Medium, DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 10,000 unidades/mL de penicilina G-sódica, 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de Anfotericina b en Solución salina al 0.85%. El medio de cultivo es suplementado con rojo de fenol, para asegurar que no estén contaminados al momento de su uso.

3.5.8.2 Cuantificación de células

En un tubo de 1.5 mL se colocan 50 µL de la suspensión de células y 50 µL de solución de azul tripano, se mezcla y se transfieren 9 µL a cada una de las dos secciones de la cámara de Neubauer. Se coloca la cámara en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se procede a contar el número de células teñidas (muertas) y no teñidas (vivas) por mm²; realizando los cálculos correspondientes.

- Número de células por mL de suspensión:

$$C = \tilde{N} * 10^4 * 2 * mL$$

Donde:

C = Células por mililitro

mL = mililitros de suspensión celular

\tilde{N} = Promedio de células contadas vivas

10^4 = Factor de conversión de la cámara

2 = Factor de dilución

- Porcentaje de viabilidad:

$$Viabilidad (\%) = \left(\frac{T_{oc} - T_{eñ}}{T_{oc}} \right) * 100$$

Donde:

T_{oc} = Total de células contadas (vivas y muertas)

$T_{eñ}$ = Células teñidas

Una vez obtenidos estos datos se procede a la siembra en las botellas de cultivo de 25 cm² ó 75 cm².

3.5.8.3 Proliferación celular

Después de haberse sembrado, las células son revisadas diariamente para estimar el porcentaje de confluencia, cambiando el medio de cultivo cada 48 hrs. Al tener el cultivo entre el 70 y 90% de confluencia se procede a la tripsinización.

3.5.8.4 Tripsinización

Cuando el cultivo Stock a confluencia se obtiene, se aspira el medio de cultivo de la caja; y se agregan de 1- 3 mL de tripsina-EDTA, agitándose a 37 °C. Estas condiciones se mantienen hasta que se observe en el microscopio las células desprendidas y disgregadas. La solución es lavada y centrifugada durante 5 minutos. Luego, el sobrenadante es removido y al paquete celular se le adiciona el medio de cultivo suplementado.

Para realizar la cuantificación, las células son sembradas en 96 pozos como una densidad de 1×10^6 células/mL de la cual se agrega un volumen de 20 μ l a cada pozo con 100 μ L de medio suplementado, para tener 20,000 células/pozo. Se incuba de 12 – 24 horas a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo es drenado, y se adicionan 90 μ L de medio de cultivo suplementado con SFB, y diversas concentraciones (0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 mg/mL) de los compuestos de prueba. Cada una de las soluciones se incuban a 37 °C por 24 horas, bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Al término de la incubación se aspira el medio y se fijan las células con 100 μ L al 10% de ácido tricloroacético durante una hora a 4° C. Posteriormente se lavan con agua destilada y se dejan secar a temperatura ambiente.

3.5.8.5 Tinción con Sulforrodamina-B

50 μ L al 0.4% de sulforrodamina B disuelta en 1% de ácido acético se agrega a cada uno de los pozos que contienen células, y se mantienen durante 30 minutos a temperatura ambiente. El exceso de colorante es removido a través de diversos lavados con ácido acético al 1%, dejándose secar a temperatura ambiente. El colorante celular es solubilizado con 100 μ L de Tris-Base. Los pozos son sometidos a una agitación mecánica suave hasta observar la solubilización y homogenización del colorante. La absorbancia de cada uno de los pozos es leída en un lector de microplacas a una longitud de 564 o 570 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se hace un análisis de las propiedades estructurales, magnéticas y morfología; además de la citotoxicidad de las diversas nanoestructuras sintetizadas. Se correlacionan sus efectos dependientes de su tamaño de partícula, estructura y recubrimiento orgánico sobre las respuestas de magnetización (M_s), coercitividad (H_c), y citotoxicidad en las líneas celulares cancerígenas: MCF-7 (mama) y PC-3 (próstata).

4.1 Propiedades físicas de las SPIONs (no funcionalizadas)

Los patrones de difracción de rayos-X de las SPIONs (no funcionalizadas) sintetizadas a través del método de coprecipitación se muestra en la Fig. 4.1. Los picos difractados corresponden a los planos cristalinos (hkl): (220), (311), (400), (422), (511) y (440). La estructura característica es Fe_3O_4 , FCC espinela inversa con grupo espacial $Fd\bar{3}m$ (227), JCPDS-PDF #00-019-0629. Se observa un desplazamiento hacia la derecha de las líneas de difracción, asociado a una oxidación en su superficie. Esto se debe a que la magnetita no es muy estable en una atmósfera ambiente, tiende a oxidarse fácilmente; y se forma $\gamma-Fe_2O_3$, lo cual genera una disminución del parámetro de red ($8.3460\text{\AA} < a_0 < 8.3960\text{\AA}$). La oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} establece vacantes catiónicas en la estructura, de acuerdo con la fórmula $[Fe^{3+}]_A [Fe^{3+}\square_{1/3}]_B O_4$; donde \square representa las vacancias [54].

La dispersión y el ensanchamiento de las líneas de difracción son contribuciones del tamaño nanométrico de las NPs. La reducción en tamaño también incrementa la oxidación de las NPs. El tamaño de promedio de partícula estimado por la ecuación de Debye-Scherrer es 13 nm.

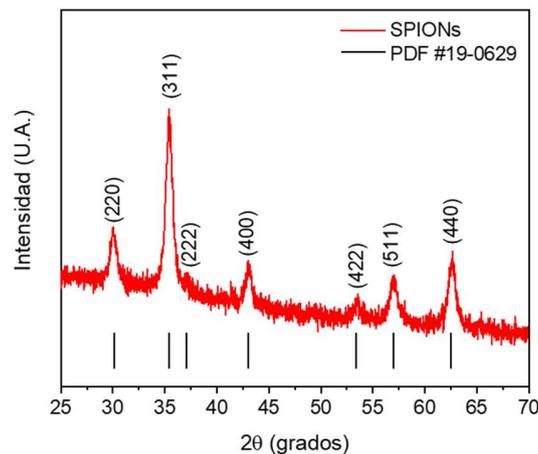


Figura 4.1 Patrón de XRD de las SPIONs (no funcionalizadas).

Las imágenes de TEM, Fig. 4.2(a, b), muestran a las SPIONs con morfología semi-esférica. El patrón de difracción de electrones de área selecta (SAED), Fig. 4.2(c) muestra los anillos concéntricos que corresponden a los planos difractados (hkl): (1) (220), (2) (311), (3) (400), (4) (422), (5) (511) y (6) (440), similares a la difracción de rayos-x. En la distribución de tamaños, Fig. 4.2(a-dentro), se obtuvo un tamaño de partícula promedio ~ 11 nm, muy similar al obtenido en XRD.

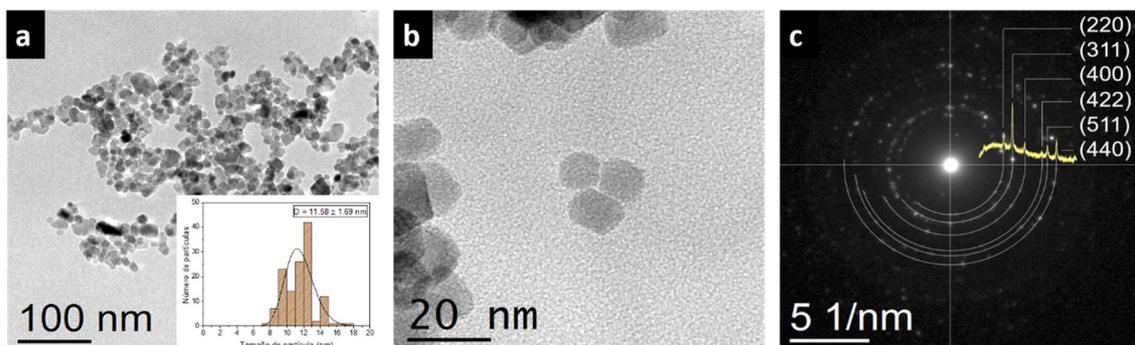


Figura 4.2 (a, b) Morfología en diversas escalas, (a-dentro) distribución de tamaños, y (c) SAED de las SPIONs (no funcionalizadas).

La oxidación superficial de las SPIONs se observó a través de la caracterización FTIR, Fig. 4.3(a). El espectro exhibe una banda principal de transmitancia a 563 cm^{-1} , característica del enlace Fe-O en los óxidos de hierro. Esta banda muestra un corrimiento, el cual corresponde a la oxidación superficial analizada por XRD. La banda a 3354 cm^{-1} indica la contribución de los grupos vibracionales O-H; debido a que la muestra se preparó en un medio acuoso. En el espectro XPS, Fig. 4.3(b), se observan las bandas de enlace de: Fe($3p_{3/2}$), O($1s$), Fe($2p_{3/2}$) y Fe($2p_{1/2}$) a 55.2, 530.2, 710.8 y 724.4 eV, respectivamente [61]. La presencia de C($1s$) a 284.8 eV se atribuye a los residuos del TEA, utilizado como base en la síntesis de las SPIONs (no funcionalizadas). A través del programa CasaXPS se obtuvieron los porcentajes atómicos de los elementos presentes en las superficies de las nanopartículas, Tabla 4.1.

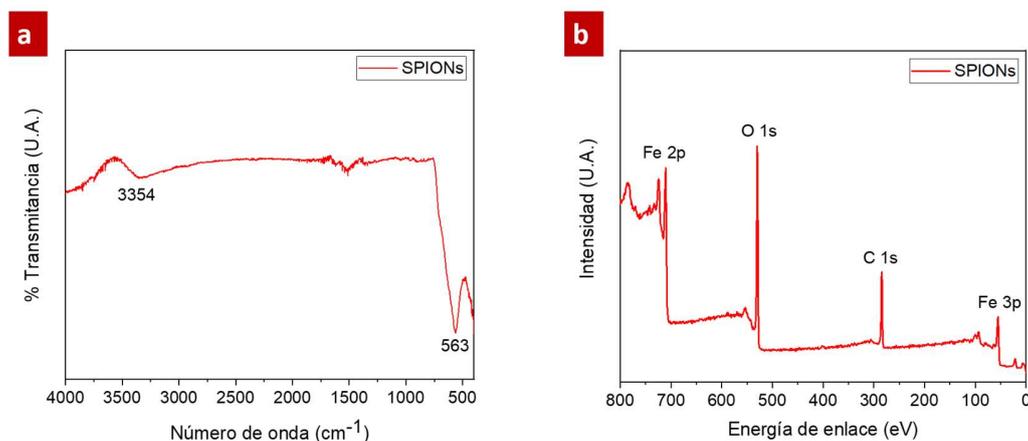


Figura 4.3 Espectros (a) FTIR y (b) XPS de las SPIONs sintetizadas a través del método de coprecipitación.

Tabla 4.1 Composición elemental de la superficie de las SPIONs (no funcionalizadas).

Muestra	%At		
	Fe	O	C
SPIONs	27.22	34.80	37.98

La deconvolución del pico Fe(2p) se analiza en la Fig. 4.4. La posición de los picos Fe(2p_{1/2}) y Fe(2p_{3/2}) depende del estado de oxidación del Fe [6]. En la región Fe(2p_{3/2}) aparecen picos relacionados con las contribuciones de iones de Fe²⁺ distribuido en los sitios octaédricos a 709.52 eV; y iones de Fe³⁺ situados en las posiciones octaédricas y tetraédricas a 710.57 y 712 eV, respectivamente [50, 62]. El pico satélite observado a 718.39 eV indica una oxidación en la superficie de las nanopartículas magnéticas, correspondiente a la fase γ -Fe₂O₃ [6, 31, 49].

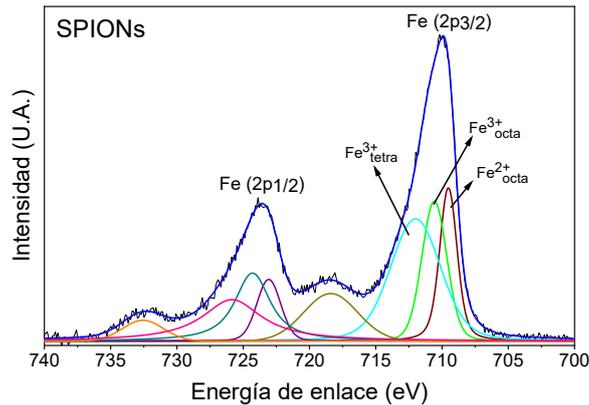


Figura 4.4 Deconvolución del pico Fe2p de SPIONs sintetizadas a través del método de coprecipitación.

Las propiedades magnéticas de las SPIONs (no funcionalizadas) se analizaron por el magnetómetro tipo SQUID a temperatura ambiente (300 K), Fig. 4.5. Su respuesta corresponde a un lazo de histéresis cerrado con una magnetización de saturación (M_s) de 70.58 emu/g, menor a 92 emu/g de la magnetita en su estado masico-volumétrico; con campo coercitivo de 19.66 Oe y de remanencia 2.75 emu/g. M_s en las SPIONs (no funcionalizadas) disminuye al disminuir el tamaño de la partícula [73]; y también debido a la oxidación superficial observada en XRD, FTIR y XPS. Estos resultados indican un comportamiento superparamagnético.

En la Tabla 4.1 se exhiben las propiedades estructurales y magnéticas de las SPIONs (no funcionalizadas).

Tabla 4.1 Propiedades estructurales y magnéticas de las SPIONs (no funcionalizadas).

Muestra	hkl	2 Θ	FWHM	a_0 (Å)	XRD ϕ (nm)	TEM ϕ (nm)	M_s (emu/g)	M_R (emu/g)	H_c (Oe)
SPIONs	311	35.526	0.876	8.374	13	11.58 ± 1.69	70.58	2.75	19.66

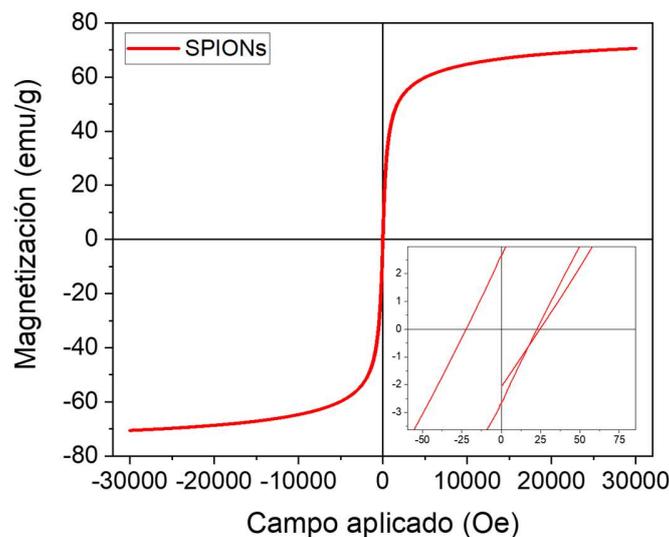


Figura 4.5 Curva de magnetización a temperatura ambiente de SPIONs (no funcionalizadas).

4.2 Caracterización de SPIONs@Gd-DTPA (Método 1)

4.2.1 Espectro FTIR del complejo Gd-DTPA sintetizado

El complejo Gd-DTPA sintetizado fue analizado por FTIR en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} , y comparado con $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y DTPA puros y en polvo Fig. 4.6. El reactivo $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se caracterizó por la presencia de sus bandas principales, asignadas como vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de H-O-H a 3372 cm^{-1} , y sus vibraciones de flexión a 1160 y 640 cm^{-1} . La interacción de Gd-Cl tiene una banda de transmitancia intensa a 1402 cm^{-1} [63, 64]. Esta banda puede cambiar a 1628 cm^{-1} (como se observa en el espectro), como resultado de la interacción química entre Gd^{3+} y H_2O [64]. En el caso del DTPA se exhiben las bandas características a 1736, 1696 y 1633 cm^{-1} , que corresponden a la flexión de C=O presente en $-\text{COOH}$ [65]. En el espectro de Gd-DTPA se aprecian contribuciones tanto de $\text{GdCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, como de DTPA. Específicamente, la región alrededor de 3372 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones de estiramiento de H-O-H del Gd^{3+} . Además, la banda de transmisión intensa contiene dos señales a 1626 y 1595 cm^{-1} , que se deben a los estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilos del DTPA al coordinarse con el Gd^{3+} [46]. Por lo tanto, la contribución de esta banda confirma la formación del complejo Gd-DTPA. En la Tabla 4.2 se muestra un resumen de las bandas de transmitancias presentes en los espectros.

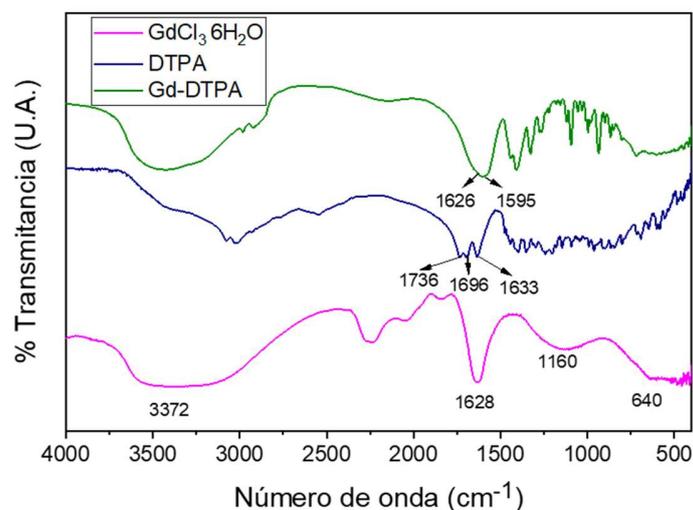


Figura 4.6 Comparación de los espectros FTIR de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, DTPA y Gd-DTPA sintetizado.

Tabla 4.2 Bandas de transmitancia de los espectros de espectros FTIR de $GdCl_3 \cdot 6H_2O$, DTPA y Gd-DTPA sintetizado.

Bandas de transmitancia FTIR (cm^{-1})	Respuesta
3372	Vibraciones de estiramiento asimétricos y simétricos del H-O-H
1160, 640	Vibraciones de flexión del H-O-H
1628	Gd-Cl (interacción química entre Gd^{3+} y H_2O)
1736, 1696, 1633	Flexión de C=O presente en -COOH
1626, 1595	Estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilos del DTPA al coordinarse con el Gd^{3+}

4.2.2 Propiedades estructurales y morfología

La Fig. 4.7(a) muestra una comparación de los patrones de difracción de rayos-X obtenidos de las nanoestructuras MG-1(post-síntesis), MG-2 (in-situ) y SPIONs (no funcionalizadas). Las líneas de difracción: (220), (311), (400), (422), (511) y (440) de las nanoestructuras corresponden con el patrón difractado de las SPIONs. Sin embargo, se aprecia un corrimiento hacia la derecha de las líneas de difracción de MG-1(post-síntesis), MG-2 (in-situ) con respecto al de las SPIONs. La disminución de intensidad y la dispersión bajo los picos difractados se asocia a la presencia del compuesto orgánico, DTPA. La disminución en a_0 es el resultado de una oxidación superficial, que se debe a las vacancias de Fe^{2+} generadas en las superficies de las NPMs, Tabla 4.3, [54]. La diferencia de los valores de a_0 en las nanoestructuras puede atribuirse a la adición de los iones de Gd^{3+} en la estructura de SPIONs principalmente en MG-2 (in-situ), es decir, el Gd presente en el complejo no solo funcionaliza a las NPMs, si no, también está dentro de su estructura.

La incorporación del Gd-DTPA a la solución de $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ puede resultar en la adición de los iones de Gd^{3+} dentro de la estructura de SPIONs. Este efecto puede deberse a la liberación de algunos iones de gadolinio después de su conjugación con DTPA. Estos iones pueden sustituir algunos iones de Fe dentro de la estructura de las NPMs. Aunque, el radio catiónico de los iones de Gd^{3+} (0.983 Å) es mayor al radio de los iones de Fe^{2+} (0.920 Å) y Fe^{3+} (0.630 Å); la estructura cúbica de espínela inversa formada por los oxígenos es bastante flexible, lo cual significa que puede expandirse o contraerse fácilmente. Por ejemplo, todos los iones de Fe^{2+} se encuentran en los sitios octaédricos en la estructura de la magnetita, a pesar de que su radio iónico es más grande que el radio de los sitios octaédricos (0.7357- 0.8285 Å) [66]. Por otro lado, en las propiedades estructurales también se exhibe el tamaño de partícula, estimado por la ecuación de Debye-Sherrer: $D = 0.9\lambda / \beta \cos(\Theta)$. Se destaca una leve reducción en el tamaño de partícula estimado al modificar las superficies de las SPIONs con Gd-DTPA. Esta consecuencia se debe a la presencia del complejo, porque este se añade antes o segundos después de la nucleación de las nanopartículas. La congestión con Gd-DTPA limita el crecimiento de NPs a un espacio confinado.

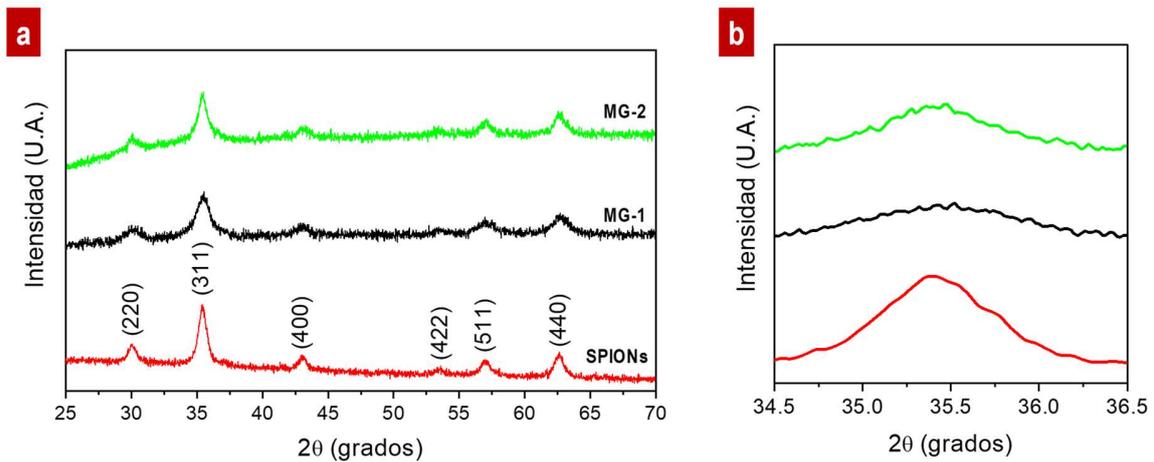


Figura 4.7 (a) Comparación de los patrones de XRD de las nanoestructuras MG-1 y MG-2 con las reflexiones de las SPIONs; (b) acercamiento a la línea de difracción (311), observándose el corrimiento hacia la derecha de MG-1 y MG-2.

Tabla 4.3 Comparación de las propiedades estructurales de las SPIONs (no funcionalizadas) con las nanoestructuras MG-1 y MG-2.

Muestra	2 Θ	FWHM	a_0 (Å)	DRX ϕ (nm)	TEM ϕ (nm)	Espesor Rec.(nm)	AFM ϕ (nm)
SPIONs	35.526	0.876	8.374	13	11.58 ± 1.69	*	**
MG-1	35.597	1.194	8.358	11	9.88 ± 1.89	2- 2.5	15***
MG-2	35.560	1.058	8.366	10	9.07 ± 1.53	6- 10.5	30***

*No hay recubrimiento

**La muestra no fue medida

***Medición de los aglomerados

En TEM (Fig. 4.8), ambas nanoestructuras MG-1 y MG-2 muestran aglomerados de NPs con un tamaño promedio menor a 20 nm y forma semi-esférica; envueltas en una matriz amorfa con un espesor de 2- 2.5 nm para MG-1, y entre 6- 10.5 nm para MG-2, atribuido al complejo Gd-DTPA, Tabla 4.3.

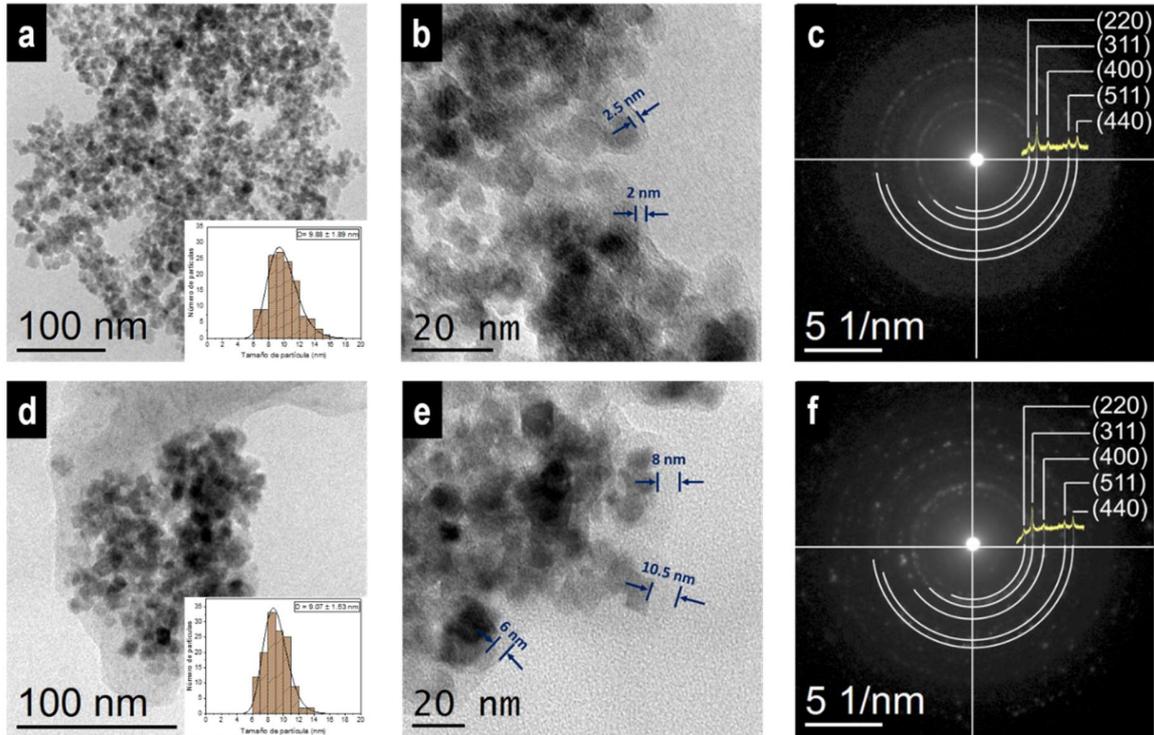


Figura 4.8 Imágenes de TEM, distribución de tamaños y SAED de las nanoestructuras (a, b, c) MG-1 y (d, e, f) MG-2.

Las topografías de AFM de MG-1 y MG-2, Fig. 4.19, se realizaron en modo “tapping”, escaneando un área de 300 x 300 nm con un a rugosidad media cuadrática de 45.15 y 62 nm para MG-1 y MG-2, respectivamente. El análisis del perfil de MG-1 nos muestra un tamaño promedio de partícula de 15 nm. Los aglomerados incrementan las interacciones entre NPs vecinas, superponiendo dos o más; en presencia del complejo Gd-DTPA envolviendo a las SPIONs. Una información similar se obtuvo para MG-2, con la adición de Gd-DTPA antes de la nucleación de SPIONs. Sin embargo, en la imagen y en el perfil de MG-2, se aprecian texturas que indican la contribución de NPs que forman aglomerados con un tamaño promedio de partícula de 30 nm.

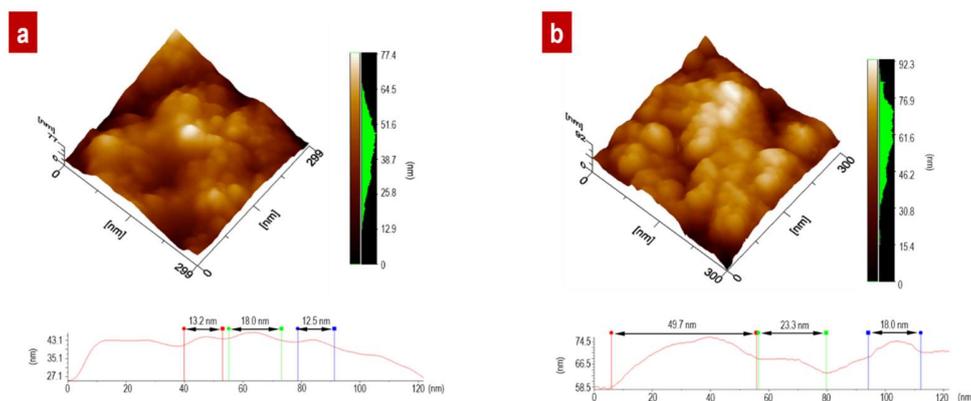


Figura 4.9 Imagen en 3D y perfil a lo largo de una dirección transversal de (a) MG-1 y (b) MG-2.

4.2.3 Análisis espectroscópico

Los espectros FTIR de MG-1 y MG-2, Fig. 4.10(a), presentan bandas alrededor de 570 cm^{-1} de la vibración del enlace de Fe-O [54]. La banda ancha centrada en 3354 cm^{-1} corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH absorbidos en la superficie de las nanopartículas de óxidos de hierro [67], se desplaza a 3408 cm^{-1} en MG-1 y MG-2. Este desplazamiento es atribuido a la vibración de estiramiento de N-H, una contribución de DTPA [68]. Las bandas de transmitancia que aparecen a 1626 cm^{-1} , en ambos espectros, confirman la presencia del complejo Gd-DTPA. Esto resultados indica que el complejo se adsorbe a la superficie de las nanopartículas de óxidos de hierro a través de los grupos carboxilos del DTPA [50].

Por XPS de MG-1 y MG-2, Fig. 4.10(b), se visualizan los picos característicos de la fase del óxido de hierro Fe ($3p_{3/2}$), O ($1s$), Fe ($2p_{3/2}$) y Fe ($2p_{1/2}$) a 55.2, 530.2, 710.8 y 724.4 eV [61]. La contribución del ion de Gd^{3+} genera señales en 143 eV para Gd 4d; 1186 y 1219 eV para Gd $3d_{5/2}$ y Gd $3d_{3/2}$, respectivamente [56]. En la Tabla 4.4, se presenta la composición elemental superficial de cada nanoestructura, calculada a través del programa CasaXPS. Existe una disminución de Fe y O, y un aumento en C; debido al recubrimiento de las nanopartículas con el complejo Gd-DTPA. El carbono incrementa la intensidad de la señal por grupos carboxilos del DTPA.

Tabla 4.4 Composición elemental de la superficie de las nanoestructuras MG-1 y MG-2.

Muestra	% At.				
	Fe	O	C	N	Gd
MG-1	26.60	27.79	45.53	0.02	0.06
MG-2	20.70	26.49	52.07	0.03	0.72

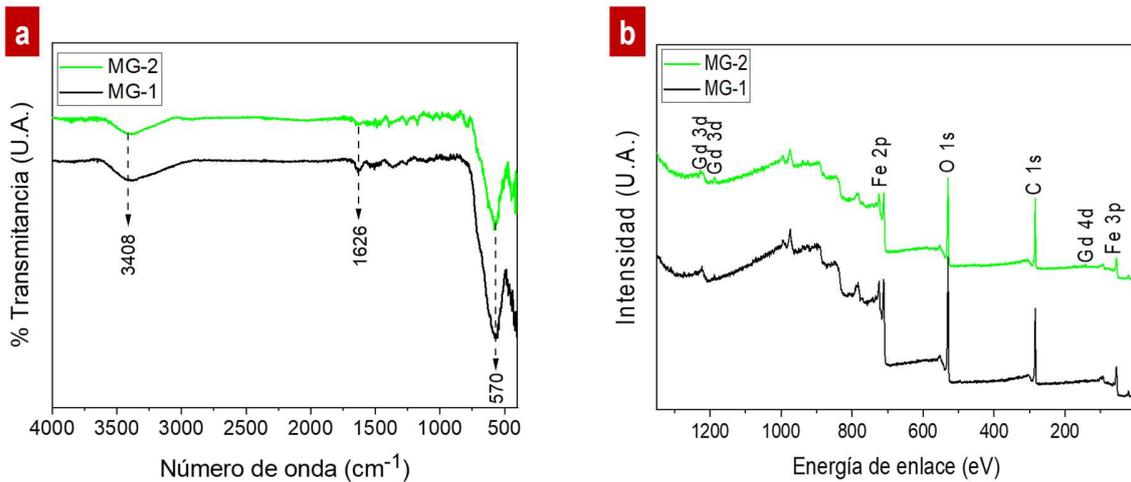


Figura 4.10 Espectros (a) FTIR y (b) XPS de las nanoestructuras MG-1 y MG-2.

El análisis cuantitativo de SEM-EDS muestra la presencia de átomos de C, O y Gd distribuidos en las nanoestructuras. El análisis de MG-1, Fig. 4.11(a), tiene una concentración de Gd por debajo límite de detección del 1% del elemental del equipo de SEM-EDS.

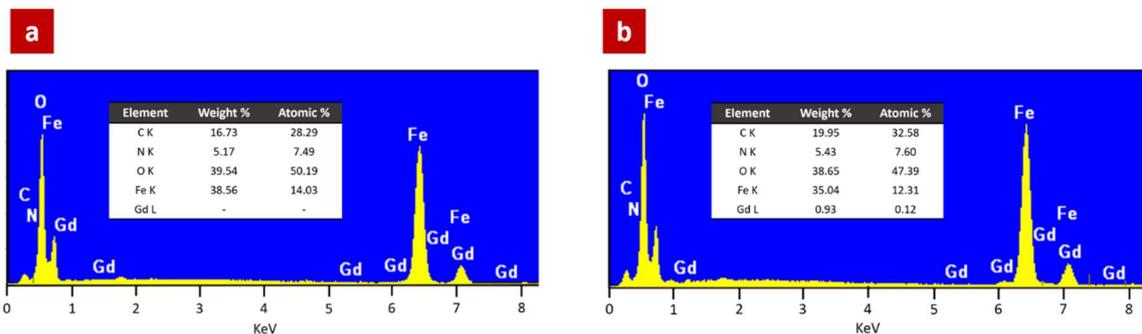


Figura 4.11 Análisis cuantitativo de SEM-EDS de (a) MG-1 y (b) MG-2.

4.2.4 Propiedades magnéticas

La Fig. 4.12 presenta una comparación de las curvas magnéticas de SPIONs, MG-1 y MG-2 a 300 K. Es notable que ambas nanoestructuras presentan bajos valores coercitivos de $H_c=27.82$ Oe para MG-1; y $H_c=18.94$ Oe para MG-2, Tabla 4.5. Tales resultados demuestran que las SPIONs mantienen su comportamiento superparamagnético después de ser funcionalizadas. La respuesta magnética de MG-1 disminuye con respecto a 70.58 emu/g de las SPIONs. La disminución de M_S se debe principalmente a la barrera amorfa diamagnética de Gd-DTPA, alrededor de las SPIONs. Esta barrera es magnéticamente inactiva y contiene espines que no están completamente alineados con el campo magnético aplicado [69]. Por otro lado, M_S en MG-2 se incrementa. Este efecto se atribuye a dos factores: (1) la contribución magnética del Gd al sustituir parcialmente las vacancias de Fe^{2+} generadas por la oxidación superficial de las SPIONs (Fig. 4.13), y (2) las aglomeraciones

de SPIONs formadas por el complejo Gd-DTPA. Como observamos en XPS se tiene una mayor concentración de Gd (0.72%) en MG-2, y a través de TEM se aprecian las formaciones de aglomeraciones de SPIONs. Kumar et al. [70], muestran que la respuesta magnética (M_s) en las ferritas puede mejorar, sustituyendo materiales diamagnéticos o paramagnéticos en sus sitios tetraédricos; o colocando impurezas ferromagnéticas en sus sitios octaédricos. Tahar et al. [71] reportaron que un incremento significativo en la magnetización de saturación puede deberse al dopaje de iones de Gd^{3+} en $CoFe_2O_4$. Este incremento esta principalmente asociado al alto momento magnético del Gd, pero principalmente a un reordenamiento estructural.

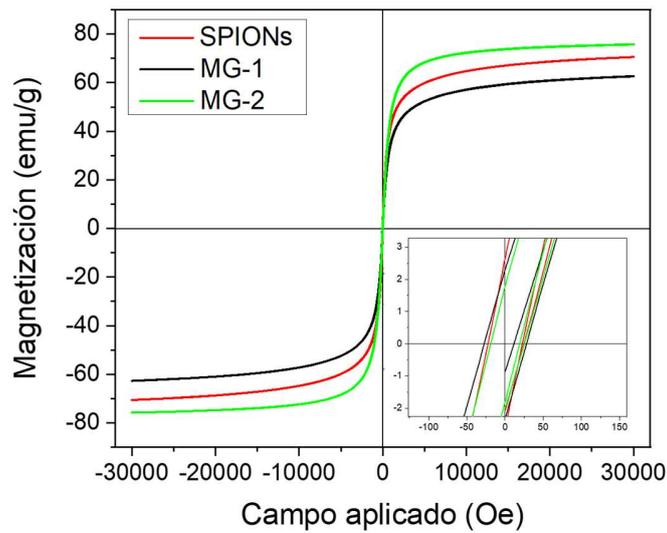


Figura 4.12 Curvas de magnetización de MG-1, MG-2 y SPIONs a 300K.

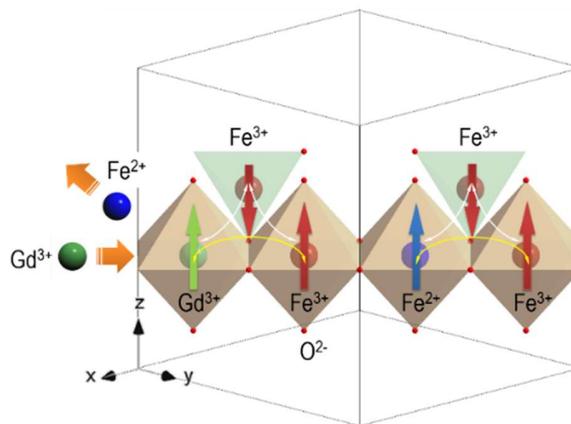


Figura 4.13 Representación esquemática de la sustitución de los iones de Gd por los iones de Fe en la nanoestructura de MG-2.

Las mediciones de MFM muestran dominios magnéticos orientados uniaxialmente 90° . Las regiones oscuras y brillantes en las imágenes en 3D representan las interacciones de repulsión

o atracción entre la superficie de la muestra y la punta magnética del equipo con una secuencia en su eje fácil [72]. El área escaneada fue de 300 x 300 nm con una altura de escaneo de 0-18.605 nm. El equipo se manejó en modo “lift” y se obtuvieron secuencias de magnetización ($H\uparrow$) y desmagnetización ($H\downarrow$) para MG-1 y MG-2; las flechas en color verde muestran la orientación de los dominios magnéticos. En condiciones iniciales ($H=0$), Fig. 4.14(a, d), aparecen monodominios magnéticos desordenados. Cuando se aplica el campo magnético ($-12 \text{ kOe} < H < 12 \text{ kOe}$), en ambas nanoestructuras se observan dominios orientados 90° con una anisotropía uniaxial en condiciones de saturación. En la desmagnetización ($H=0$), los dominios vuelven a desordenarse, al igual que en las condiciones iniciales (Fig. 4.14(c, f)). El efecto superparamagnético se presenta en dominios magnéticos por debajo de 20 nm, los cuales son capaces de regresar a su estado de desorden, como consecuencia de la baja coercitividad y remanencia. Estas características son condiciones favorables para oscilar a las SPIONs en precesión (T_2), y su fácil orientación en los ejes (90° o 180°), a través de un campo magnético aplicado; lo cual potencializa a las nanoestructuras como efectivos agentes de contraste en MRI.

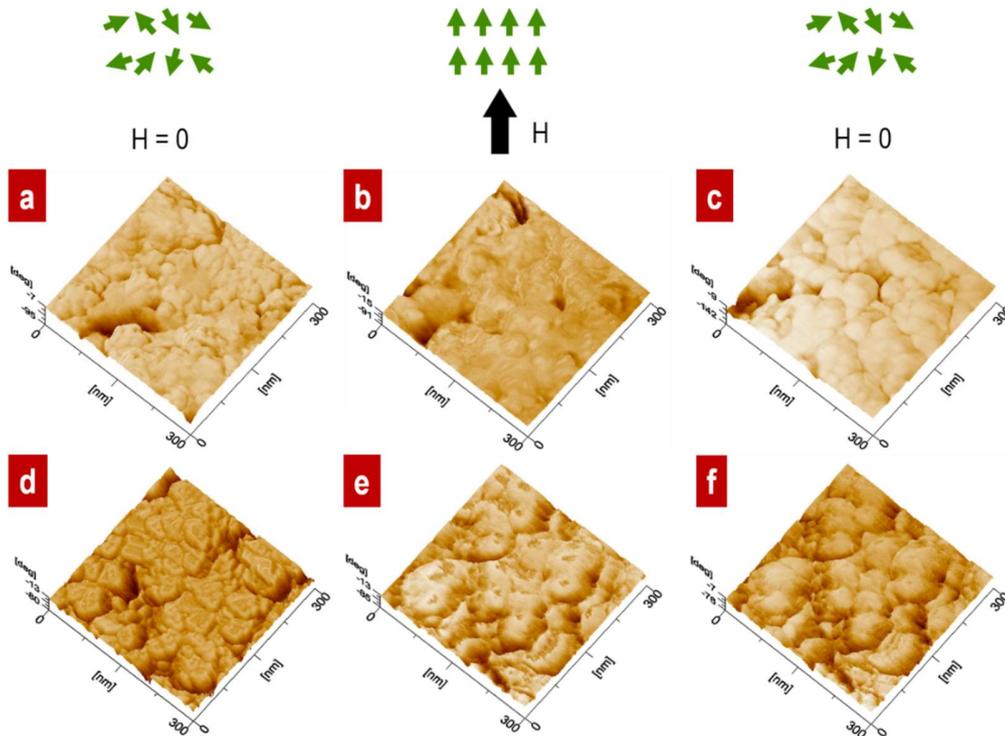


Figura 4.14 Interacciones de los dominios magnéticos de (a, b, c) MG-1 y (d, e, f) MG-2.

De las mediciones obtenidas anteriormente bajo condiciones de saturación, Fig. 4.15(c, f), se seleccionó un área de 40 x 40 nm. En las imágenes en 3D se observan dominios magnéticos alineados con el campo aplicado. Los perfiles exhiben las interacciones de atracción y repulsión con un promedio de 40 deg para MG-1 y 38.5 deg para MG-2. En MG-1, Fig. 4.15(a), en el eje fácil 90° con características direccionables, los dominios magnéticos con cubierta Gd-DTPA presentan una naturaleza uniaxial; estos dominios tienen un tamaño

promedio de 1.28 nm, mostrado en su perfil. En la Fig. 4.15(b), MG-2, los dominios miden 1.24 nm en promedio.

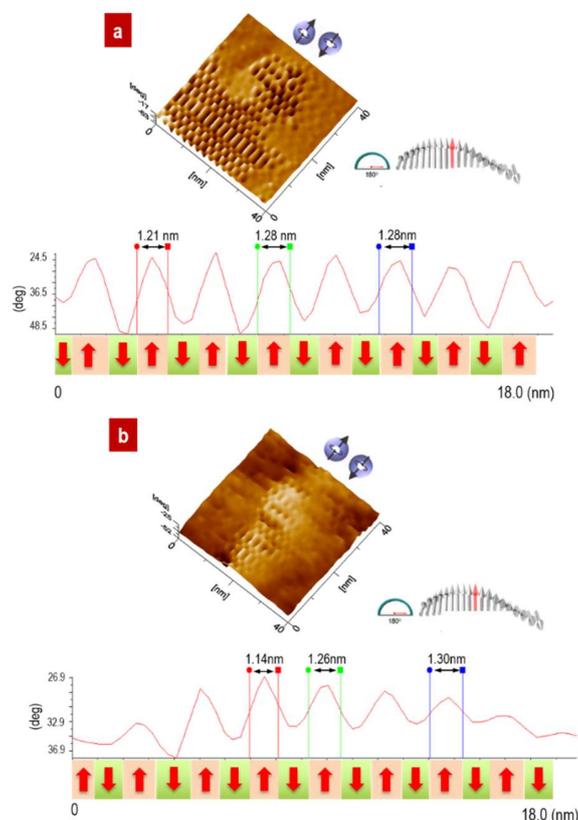


Figura 4.15 Dominios magnéticos en un área seleccionada y su perfil en sección dirección transversal de (a) MG-1 y (b) MG-2.

Tabla 4.5 Propiedades magnéticas de MG-1, MG-2, MG-22 y SPIONs.

Muestra	M_S (emu/g)	M_R (emu/g)	H_C (Oe)	Dominios magnéticos (nm)
SPIONs	70.58	2.75	19.66	*
MG-1	62.61	2.30	27.36	1.28
MG-2	75.82	1.81	18.66	1.24

*La muestra no fue medida

4.3 Análisis y comparación de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA (Método 2) y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA (Método 3)

En esta sección se analizan y comparan las propiedades estructurales, magnéticas y la morfología de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA obtenidas en el método 1 y método 2, respectivamente. El estudio nos permite analizar paso a paso las similitudes y diferencias de estas dos metodologías, con el fin de determinar

la nanoestructura obtenida con un proceso más viable, así como, las mejores características para su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de cáncer.

4.3.1 Propiedades físicas de SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-APTES)

De las 8 muestras sintetizadas de SPIONs(-APTES) se seleccionaron tres con los resultados estructurales, magnéticos y morfologías más sobresalientes; realizando su comparación con la nanoestructura SPIONs(-NH₂). Las caracterizaciones de las muestras restantes se observan en el anexo A.

El patrón de XRD de SPIONs(-NH₂) y de las SPIONs(-APTES) presentan los planos cristalinos de (220), (311), (400), (422), (511) y (440); de la estructura FCC de espinela inversa de la magnetita, JCPDS-PDF #00-019-0629, Fig. 4.16. Los parámetros de red calculados, Tabla 4.6, son menores a los reportados para la magnetita ($a_0 = 8.393 \text{ \AA}$). Este resultado indica una oxidación de la superficie de las NPs.

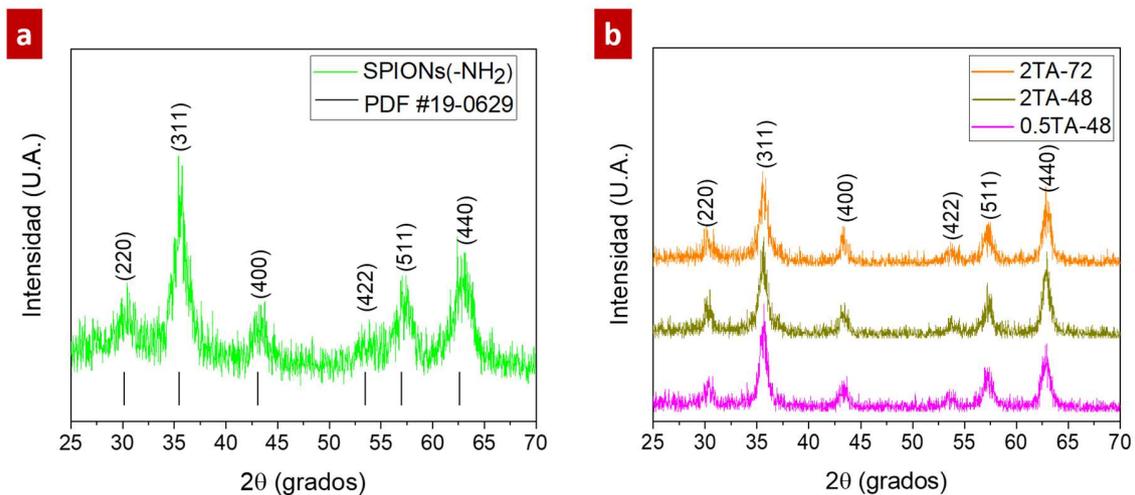


Figura 4.16 Patrón de XRD de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-APTES).

Tabla 4.6 Propiedades estructurales de SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-APTES).

Muestra	2 θ	FWHM	a_0 (Å)	XRD ϕ (nm)	TEM ϕ (nm)	Espesor Rec.(nm)
SPIONs(-NH ₂)	35.534	1.178	8.372	7.08	8.58 ± 1.72	**
0.5TA-48	35.553	0.794	8.368	8.84	10.44 ± 2.20	2.5
2TA-48	35.579	0.895	8.362	9.31	9.33 ± 1.74	1.5
2TA-72	35.670	0.779	8.341	10.70	*	4

*No se realizó la distribución de tamaños

**No se puede medir

En las micrografías TEM de SPIONs(-NH₂), Fig. 4.17(a, b) se observan NPs de forma esférica, no se observa un recubrimiento; sin embargo, la imagen se observa borrosa, esto puede atribuirse a la dispersión de electrones, como consecuencia de la existencia de una capa amorfa alrededor de las SPIONs, atribuido al surfactante utilizado en la síntesis. El SAED, Fig. 4.17(c) empata con el patrón de XRD. El tamaño de partícula promedio calculado es 8.5 nm, Tabla 4.6. En las micrografías de SPIONs(-APTES), Fig 4.17(d, e, g, h, j, k) se observan aglomerados de NPs envueltas en su totalidad por una capa amorfa; la cual se atribuye al APTES. El tamaño de partícula calculado se presenta en la Tabla 4.6. Los espesores del recubrimiento varían entre 1.5- 4 nm aproximadamente. Los SAED, Fig. 4.17 (f, i, l), empatan bien con los resultados de XRD.

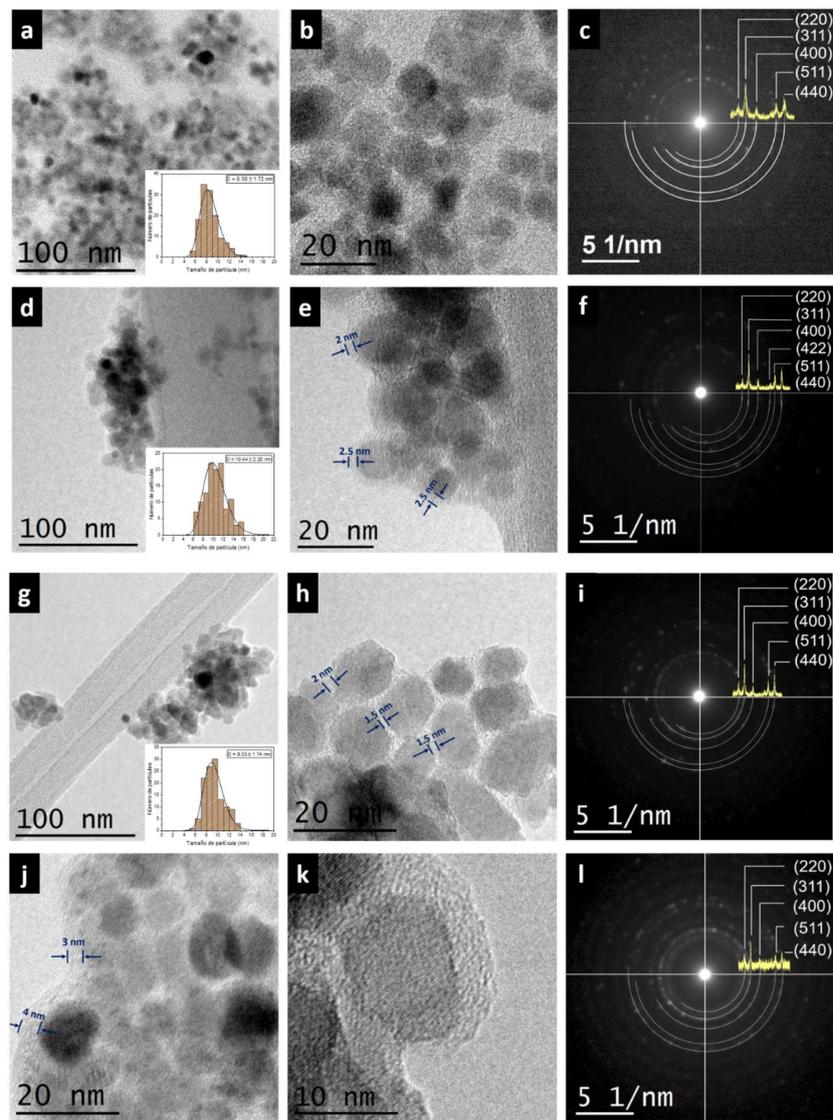


Figura 4.17 Imágenes de TEM, distribución de tamaños y SAED de las nanoestructuras (a, b, c) SPIONs(-NH₂), (d, e, f) 0.5TA-48, (g, h, i) 2TA-48 y (j, k, l) 2TA-72.

El enlace Fe-O se representa con una banda de transmitancia entre 620- 580 cm^{-1} en los espectros FTIR, Fig. 4.18. El corrimiento de esta banda se debe a la oxidación superficial de las NPs. En el espectro de SPIONs(-NH₂), Fig. 4.18(a), la banda a 3385 cm^{-1} se atribuye a la presencia de la vibración de estiramiento de N-H, que corresponde al recubrimiento con un grupo funcional amina. El recubrimiento muestra las vibraciones de torsión de N-H a 1605 cm^{-1} y la presencia de grupo libres de NH₂ a 1520 cm^{-1} . También, se tienen las bandas de estiramiento de los grupos metilenos a 1462 cm^{-1} y de C-N y C-O alrededor de 978 cm^{-1} . El enlace del APTES con los grupos hidroxilos presentes en la superficie de SPIONs, se exhiben a través de Fig. 4.18(b). La sílica absorbida en la superficie de SPIONs se expresa por medio del enlace Fe-O-Si. Esta banda usualmente no se percibe en los espectros debido a que aparece alrededor de 584 cm^{-1} ; en consecuencia, se traslapa con la banda de vibración Fe-O que corresponde a las NPMs [67]. Sin embargo, el ensanchamiento que sufre esta banda en las nanoestructuras analizadas puede atribuirse al enlace Fe-O-Si. Otro factor es la oxidación superficial que sufren las NPs, lo cual se observa mejor en las nanoestructuras 2TA-48 y 2TA-72; por la aparición de la banda a 630 cm^{-1} . Las bandas características del APTES corresponde a los grupos silanol (Si-OH) y siloxano (Si-O-Si), mismas que se observan alrededor de 1000 y 800 cm^{-1} . Específicamente, estas bandas se deben a las vibraciones de estiramiento del enlace Si-O y las de torsión de Si-OH, respectivamente. La banda de absorción del Si-O-Si aparece en 1117 cm^{-1} . Las vibraciones de estiramiento del enlace N-H se exhiben entre 1720 y 1500 cm^{-1} , las cuales indican grupos aminos libres [73]. La presencia de estas bandas es de gran importancia, ya que estos grupos permiten seguir funcionalizando a la nanopartícula con moléculas, proteínas o en nuestro caso, con el DTPA. El pico alrededor de 1260 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento de C-N.

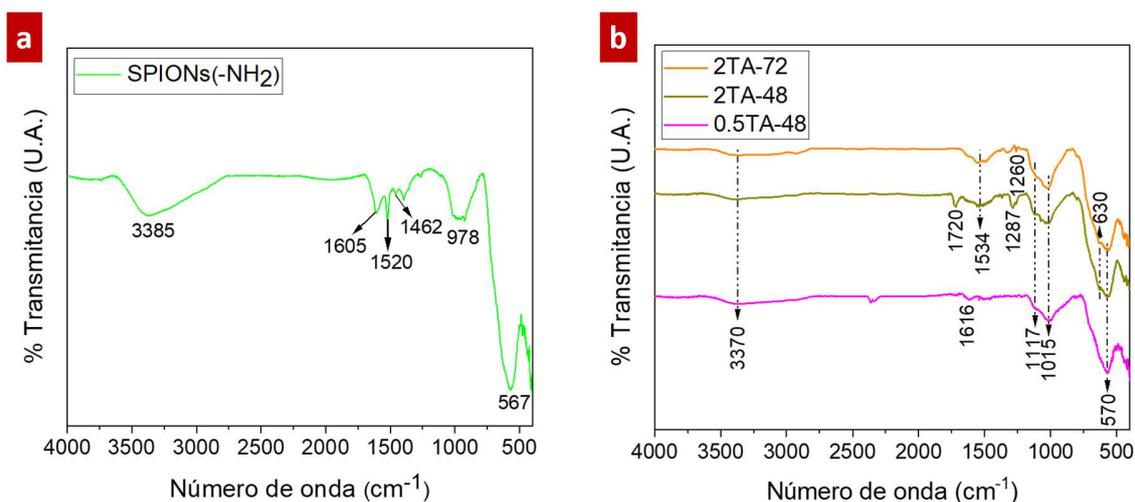


Figura 4.18 Espectros FTIR de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-APTES).

El análisis XPS de SPIONs(-NH₂), Fig. 4.19(a), presenta las energías características de las partículas de óxido de hierro; Fe(3p_{3/2}), O(1s), Fe(2p_{3/2}) y Fe(2p_{1/2}) a 55.2, 530.2, 710.8 y 724.4 eV, respectivamente [50]. Las bandas de energía correspondientes al Fe y O tienen una menor intensidad, comparadas con la señal desplegada para el carbono. Este resultado es un

indicativo de los enlaces de C-N, C-O y C-H, pertenecientes a 3-amino-1-propanol. El cálculo de los porcentajes atómicos de los elementos expone un % atómico de nitrógeno, el cual pertenece también a $\text{HO}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$. Los espectros de XPS de SPIONs(-APTES) se muestran en la Fig. 4.19(b). La presencia de C(1s), O(1s), Si(2s), Si(2p) y N(1s) confirman la adhesión del APTES en la superficie de las nanopartículas magnéticas; específicamente la aparición de los picos de Si(2p) a 102.4 eV, Si(2s) a 153.08 eV y N(1s) a 400.08 eV [56, 74]. En la Tabla 4.7 se presenta la información de la composición elemental de las nanoestructuras, en la cual se indica una disminución de hierro y un incremento en el oxígeno, en comparación con SPIONs (Tabla 4.1); esto se atribuye a la presencia del APTES en su superficie.

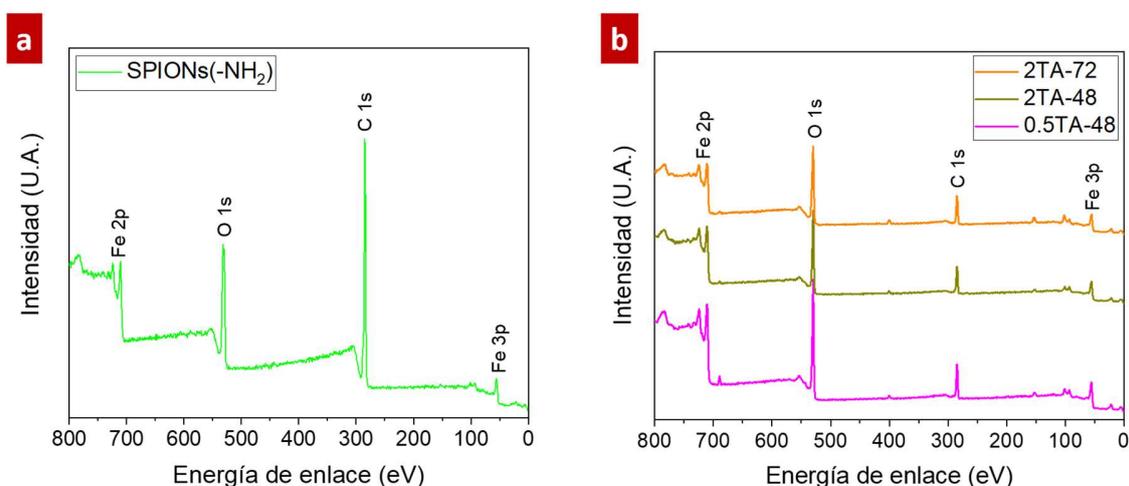


Figura 4.19 Espectros XPS de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-APTES).

Tabla 4.7 Composición elemental de la superficie de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-APTES).

Muestra	% At				
	Fe	O	C	N	Si
SPIONs(-NH ₂)	10.05	18.80	71.02	0.13	-
0.5TA-48	22.03	35.87	30.45	1.83	9.82
2TA-48	21.31	35.24	33.43	1.68	8.34
2TA-72	16.81	32.53	30.61	2.94	17.11

Las mediciones magnéticas a 300 K de las SPIONs(-NH₂) y de las muestras de SPIONs(-APTES) generan un lazo de histéresis cerrado, Fig. 4.20, indicativo de un comportamiento superparamagnético. Las nanoestructuras presentan bajos valores coercitivos y remanentes, Tabla 4.8. La disminución de las respuestas magnéticas, M_s , se debe al recubrimiento orgánico que forma una capa diamagnética alrededor de las SPIONs. Se puede observar que M_s de SPIONs(-NH₂) y 2TA-48 son valores muy similares. Esto puede atribuirse al espesor del recubrimiento de 2TA-48 calculado en TEM. Debido a que la barrera diamagnética es menor comparada con lo calculado en 0.5TA-48 y 2TA-72.

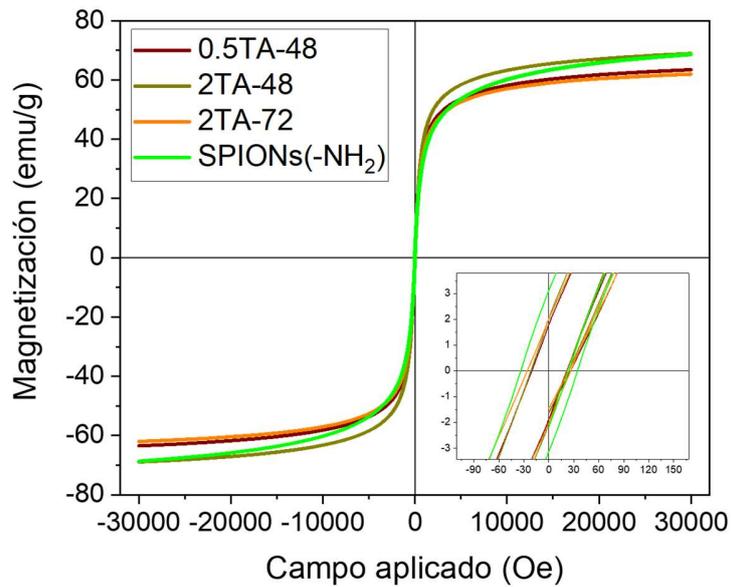


Figura 4.20 Curvas de magnetización y propiedades magnéticas de SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-APTES) a 300 K.

Tabla 4.8 Propiedades magnéticas de SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-APTES).

Muestra	M _S (emu/g)	M _R (emu/g)	H _C (Oe)
SPIONs(-NH ₂)	68.74	3.19	29.96
0.5TA-48	63.47	1.86	19.70
2TA-48	68.93	2.11	19.65
2TA-72	62.02	2.07	22.84

4.3.2 Propiedades físicas de SPIONs(-NH₂)@DTPA y SPIONs(-APTES)@DTPA

Los resultados anteriores de las muestras SPIONs(-APTES), nos permiten descartar la nanoestructura 2TA-72. Como se observó en las propiedades estructurales, $a_0 = 8.341 \text{ nm}$, el cual indica una mayor oxidación en la superficie de las NPMs. Como consecuencia de la oxidación superficial se tiene una mayor disminución en $M_s = 62.02 \text{ emu/g}$, comparado con las otras muestras. Por lo tanto, la conjugación del DTPA a las nanoestructuras de SPIONs(-APTES) se continuo con las muestras 0.5TA-48 y 2TA-48. Para el caso de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA se exhiben las muestras con las propiedades estructurales y magnéticas sobresalientes. Las caracterizaciones de las otras muestras se presentan en el anexo A.

El análisis y la comparación de resultados de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA, muestras 2AD-48 y 4AD-48; y SPIONs(-APTES)@DTPA, muestras 0.5TAD y 2TAD se presentan a continuación.

Las líneas de difracción de XRD, Fig. 4.21, de las diversas nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA y SPIONs(-APTES)@DTPA corresponden a la estructura de Fe₃O₄. En la Tabla 4.9 se presentan los parámetros de red, calculados a través del programa Powder Cell. En las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA se observa una disminución menor de a₀, comparándolo con los valores de SPIONs(-APTES)@DTPA; lo cual se atribuye a un mayor contacto con una atmósfera ambiente debido su proceso de funcionalización.

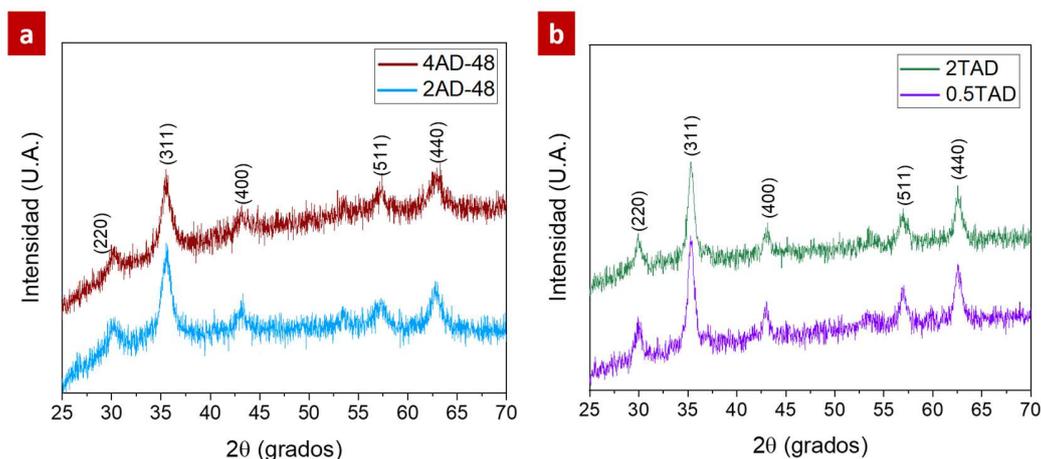


Figura 4.21 Patrón de XRD de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂)@DTPA, y (b) SPIONs(-APTES)@DTPA.

Tabla 4.9 Propiedades estructurales de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48/ 4AD-48), y SPIONs(-APTES)@DTPA (0.5TAD/ 2TAD).

Muestra	2θ	FWHM	a ₀ (Å)	XRD φ (nm)	TEM φ (nm)	Espesor Rec.(nm)
2AD-48	35.534	1.178	8.372	7.08	7.80 ± 1.25	1
4AD-48	35.501	0.968	8.380	8.61	*	*
0.5TAD	35.625	0.701	8.351	11.90	*	*
2TAD	35.691	0.689	8.336	12.11	11.31 ± 1.86	8.5

*No se realizó la medición.

El análisis FTIR de SPIONs(-NH₂)@DTPA se presenta en la Fig. 4.22(a). El DTPA genera bandas en 1720 y 1632 cm⁻¹, que se deben a la torsión del enlace C=O del COOH [75]. La banda a 1398 cm⁻¹ se atribuye a la vibración de los grupos carboxilos del DTPA [76]. A 1530 cm⁻¹ se presenta la banda de amida II, la presencia de esta banda sugiere que el DTPA está enlazado covalentemente a la superficie de las SPIONs(-NH₂), por medio de la formación de un enlace amida en la superficie de SPIONs y los grupos carboxilos del DTPA [65, 76]. Las bandas alrededor de 1288, 1240 y 1210 cm⁻¹, corresponden a las vibraciones de torsión de los grupos metilenos, y a las vibraciones de estiramiento de C-N y C-O, respectivamente, del DTPA [68]. Alrededor de 1000 cm⁻¹ se siguen observando las bandas de vibración de estiramiento de C-N y C-O; que aparecen en SPIONs(-NH₂), pertenecientes a 3-amino-1-propanol. Al conjugarse el DTPA en la superficie de las nanopartículas recubiertas, la banda de la formación de la magnetita sufre un corrimiento a 574 cm⁻¹; al igual que un

ensanchamiento, lo que permite observar la aparición de un pico en 628 cm^{-1} . Estos efectos se deben a la presencia de la oxidación de la superficie SPIONs, lo cual indica dos fases de óxido de hierro, Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. En la Fig. 4.22(b) se observa la conjugación del DTPA a SPIONs(-APTES), a través de la coordinación de los grupos carboxilos del DTPA, al grupo terminal funcional amina del APTES en 1617 cm^{-1} . La banda a 1385 cm^{-1} indica la presencia del DTPA por vibraciones de estiramiento de COO^- . Entre 1000 y 900 cm^{-1} se encuentran las bandas de estiramiento del enlace Si-O, pertenecientes al APTES. Al igual que la banda del enlace Fe-O a 573 cm^{-1} . La banda a 630 cm^{-1} corresponde a la fase de óxido de hierro $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La presencia de la banda a 3408 cm^{-1} en todos los espectros de las muestras es una contribución del DTPA, atribuida a la vibración de estiramiento de N-H [68].

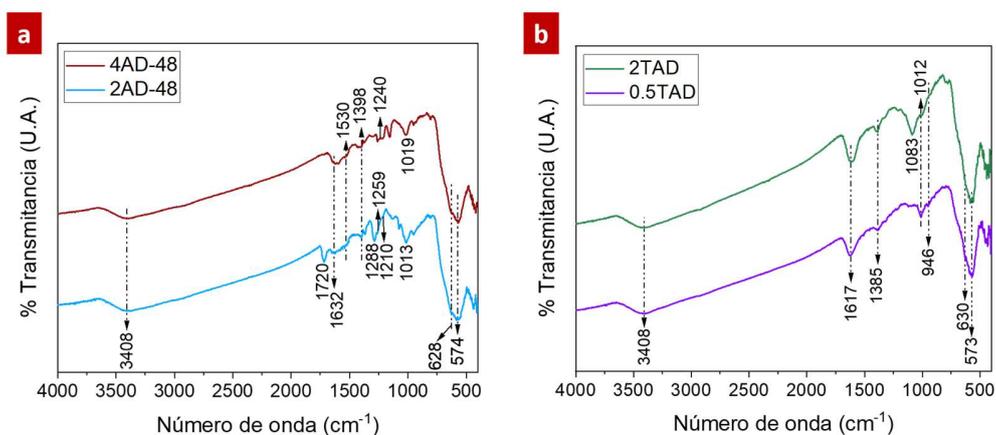


Figura 4.22 Espectros FTIR de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂)@DTPA, y (b) SPIONs(-APTES)@DTPA.

Las nanoestructuras presentan una disminución en su respuesta magnética en función de la concentración de DTPA adherido a las superficies de las SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-APTES), Fig. 4.23. El compuesto orgánico DTPA envuelve la superficie de las SPIONs formando una barrera diamagnética que disminuye su respuesta magnética, M_s . Sin embargo, esto no perturba la naturaleza superparamagnética de las nanoestructuras, conservando bajos valores coercitivos y remanentes, Tabla 4.10.

Tabla 4.10 Propiedades magnéticas de SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48/ 4AD-48) y SPIONs(-APTES)@DTPA (0.5TAD/ 2TAD).

Muestra	M_s (emu/g)	M_R (emu/g)	H_C (Oe)
2AD-48	61.73	2.78	29.64
4AD-48	56.06	2.33	29.36
0.5TAD	62.46	1.81	19.85
2TAD	66.88	2.23	19.70

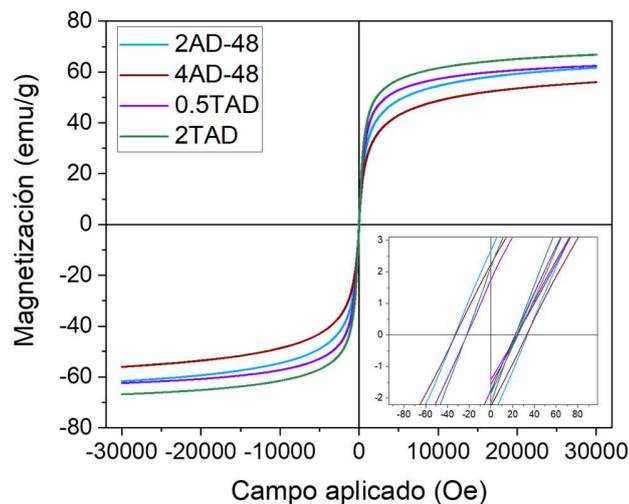


Figura 4.23 Curvas de magnetización de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA y SPIONs(-APTES)@DTPA.

Las mejores propiedades magnéticas se obtuvieron en las muestras 2AD-48/ SPIONs(-NH₂)@DTPA y 2TAD/ SPIONs(-APTES)@DTPA. Por lo tanto, se analizó la morfología de estas nanoestructuras.

En las imágenes TEM, Fig. 4.24 y Fig. 4.25, se observa la morfología de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48) y SPIONs(-APTES)@DTPA (2TAD). Para ambas muestras se exhiben NPMs de forma esférica envueltas por una capa amorfa, que se atribuye a las diversas capas orgánicas de 3-amino-1-propanol y APTES para 2AD-48 y 2TAD; así como del DTPA. El espesor del recubrimiento varía según la nanoestructura, para 2AD-48 es aproximadamente 1 nm; y para 2TAD es mayor, de 8.5 nm. A través de las micrografías se puede apreciar una mejor dispersión de las NPs para SPIONs(-APTES)@DTPA. La distribución de tamaños se encuentra dentro de las figuras y el tamaño promedio calculado aparece en la Tabla 4.9.

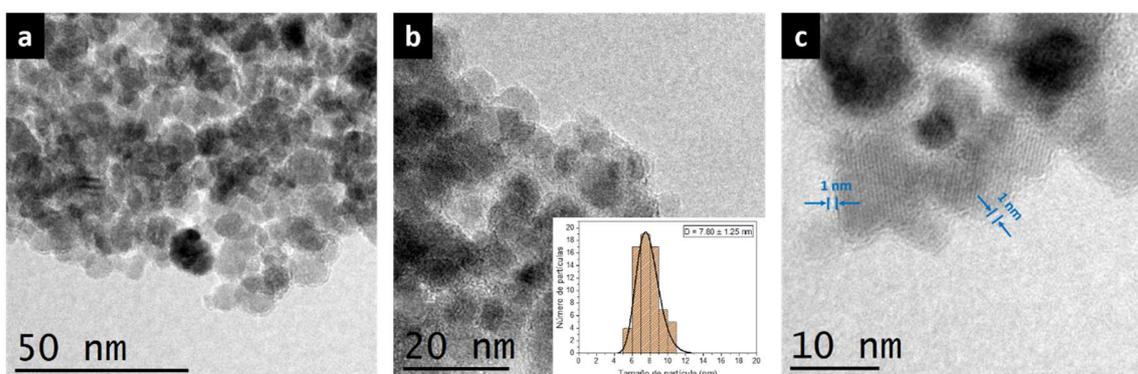


Figura 4.24 Imágenes de TEM, distribución de tamaños y SAED de SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48).

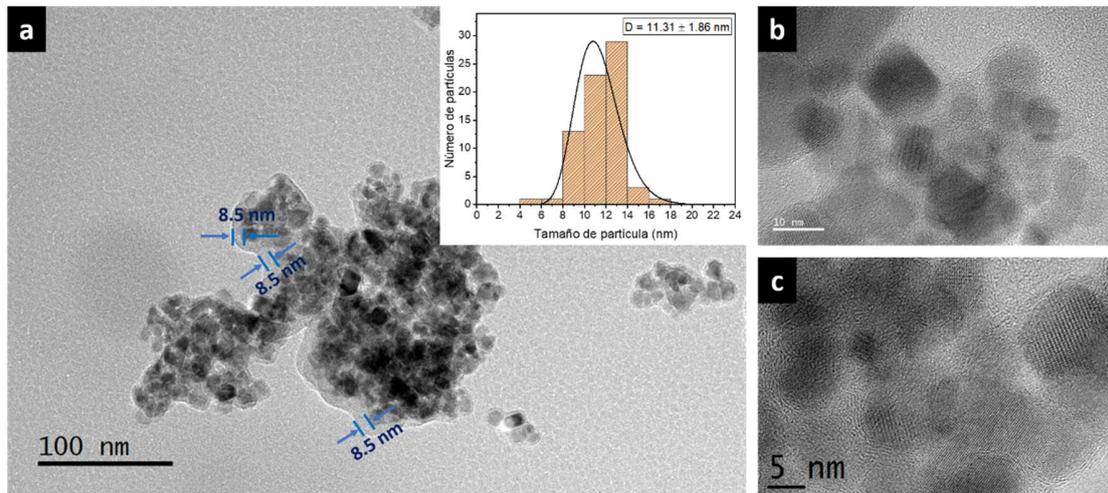


Figura 4.25 Imágenes de TEM y distribución de tamaños de SPIONs(-APTES)@DTPA (2TAD).

4.3.3 Propiedades físicas de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA

En la Fig. 4.26 se exhiben los patrones de XRD de muestras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA. Las líneas de difracción corresponden a la estructura Fe₃O₄, espinela inversa *fcc*. Las nanoestructuras 15TADGC y 25TADGC presentan una mayor dispersión, como consecuencia de las tres capas orgánicas que envuelven a las SPIONs. Sin embargo, estos resultados son un buen indicativo de la existencia del enlazamiento del gadolinio a la superficie envolvente. En la Tabla 4.11 se comparan las propiedades estructurales de las muestras.

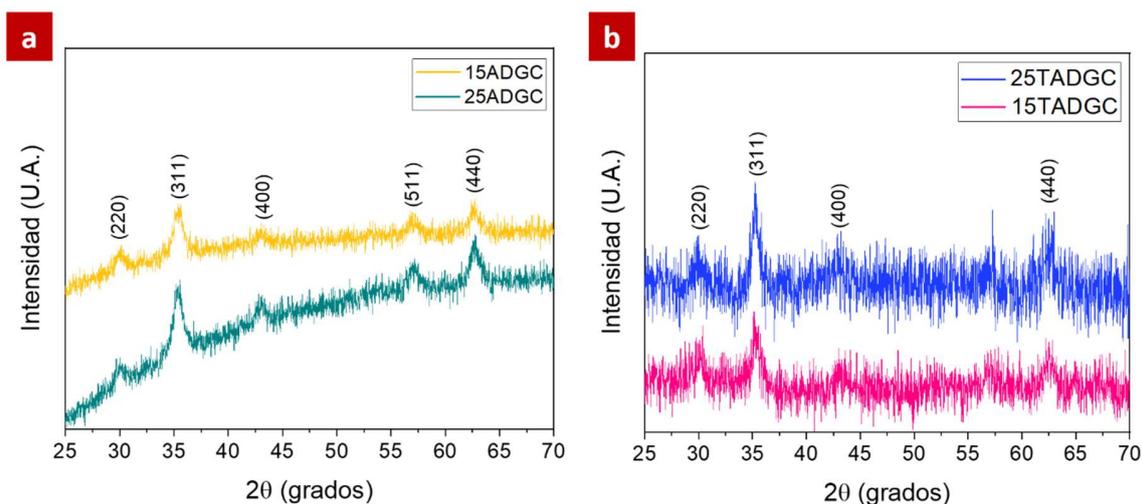


Figura 4.26 Patrón de XRD de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA, y (b) SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA.

Tabla 4.11 Propiedades estructurales de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA (15ADGC, 25ADGC), y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA (15TADGC, 25TADGC).

Muestra	2 θ	FWHM	a ₀ (Å)	DRX ϕ (nm)	TEM ϕ (nm)	Espesor Rec.(nm)
15ADGC	35.747	0.927	8.324	9.00	*	*
25ADGC	35.538	0.870	8.371	9.58	*	*
15TADGC	35.489	0.762	8.382	10.94	*	*
25TADGC	35.697	0.770	8.335	10.83	10.85 ± 1.86	6

*No se realizó la distribución de tamaños.

En los espectros de FTIR, Fig. 4.27(a), se obtuvo una banda de transmitancia intensa alrededor de 1600 cm⁻¹ que contiene dos señales, 1626 y 1595 cm⁻¹, correspondientes a los estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilos del DTPA al coordinarse con el Gd³⁺ [46]. Esta banda indica que el gadolinio se ha enlazado a la superficie de SPIONs-NH₂@DTPA. Las bandas a 1398 y 1230 cm⁻¹ se deben al DTPA, por las vibraciones de sus grupos carboxilos y de estiramiento de C-N, respectivamente [68, 76]. La presencia de GdCl₃·6H₂O, también se observa, a 1156 y 640 cm⁻¹ que son las vibraciones de flexión del enlace H-O-H [63]. Finalmente, se observan las bandas pertenecientes a las fases del óxido de hierro, 628 y 566 cm⁻¹. En los espectros FTIR de las muestras 25TADGC y 15TADGC, Fig. 4.27(b), se observan las bandas de transmitancia asociadas con la conjugación del Gd al DTPA, a 1626 cm⁻¹ y alrededor de 1595 cm⁻¹. Existe un corrimiento perteneciente a las vibraciones de los grupos carboxilos del DTPA, en 1423 cm⁻¹ por el enlace con el Gd. A 1151 cm⁻¹ y alrededor de 640 cm⁻¹, las vibraciones de flexión del enlace H-O-H, correspondientes al GdCl₃·6H₂O. Finalmente, aparecen las bandas pertenecientes al óxido de hierro, a 634 y 563 cm⁻¹.

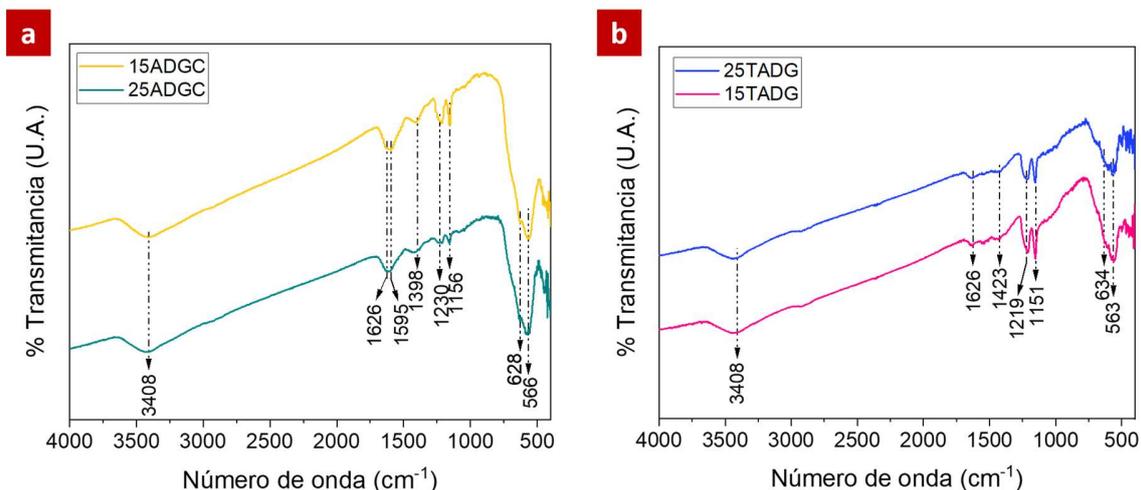


Figura 4.27 Espectros FTIR de las nanoestructuras (a) SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA, y (b) SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA.

Las mediciones magnéticas de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA se presentan en la Fig. 4.28. En las curvas se observan lazos de histéresis cerrados, con comportamiento superparamagnético proveniente del núcleo de SPIONs, Tabla 4.12. Los valores de magnetización de saturación disminuyen, como consecuencia de la envoltente orgánica acoplada con el Gd.

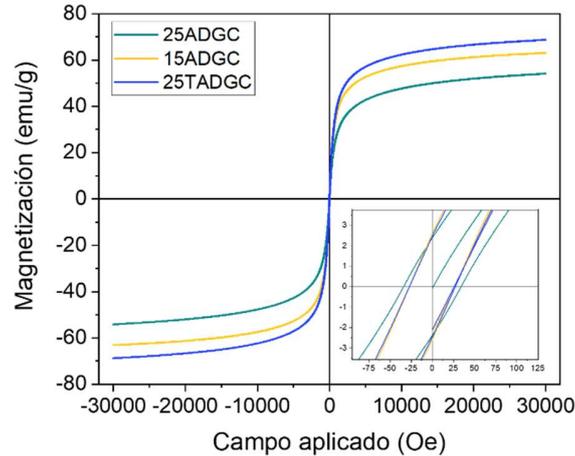


Figura 4.28 Comparación entre las curvas de magnetización de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA.

Tabla 4.12 Propiedades magnéticas de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA (15ADGC, 25ADGC) y SPIONs(-APTES)@DTPA (25TADGC).

Muestra	M _S (emu/g)	M _R (emu/g)	H _C (Oe)
15ADGC	63.11	2.59	27.55
25ADGC	54.17	2.38	36.52
25TADGC	66.02	2.36	27.64

Como se observa en las propiedades magnéticas, la muestra 25TADGC presenta una menor disminución de M_S = 66.02 emu/g, con respecto a la muestra precursora 25TAD (M_S = 66.88 emu/g). Por lo tanto, se estudió la morfología de la muestra a través de TEM. En las micrografías TEM de 25TADGC, Fig. 4.29, se observan NPMs envueltas por una capa orgánica. Las nanopartículas exhiben una menor aglomeración y una capa orgánica de espesor de 6 nm aproximadamente.

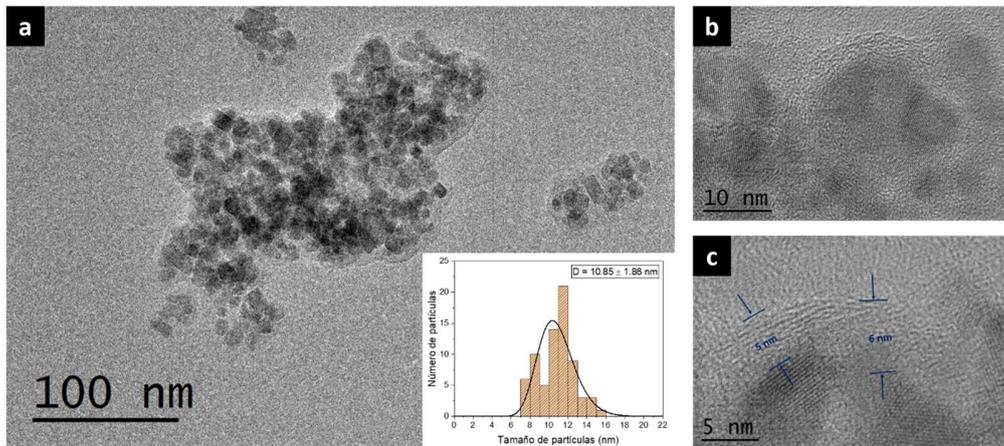


Figura 4.29 Imágenes de TEM y distribución de tamaños de SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA (25TADGC).

4.4 Ensayos de citotoxicidad

El ensayo de Sulforrodamina B se realizó para evidenciar la actividad citotóxica de las SPIONs@Gd-DTPA, SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(APTES)@Gd-DTPA en las líneas celulares de MCF-7 (mama) y PC-3 (próstata). La citotoxicidad de las muestras se comparó con el cisplatino (*cis*-diaminodicloroplatino II), uno de los más efectivos y potentes fármacos utilizado en quimioterapia en más del 50% de los tipos de cáncer que existen en la actualidad [77]. Se emplea en el tratamiento de tumores sólidos de cabeza y cuello, testículos, ovarios, vejiga, esófago, pulmones, mama, estómago y próstata [62].

En la Fig. 4.30 se muestra la actividad citotóxica de las muestras MG-1 y MG-2 (SPIONs@Gd-DTPA), y su comparación con el cisplatino en células MCF-7. En ninguna de las nanoestructuras se tiene una disminución de las células MCF-7, después de incubarse por 24 horas en las concentraciones de 0.01-100 mg/mL para cada muestra. Sin embargo, en la máxima concentración probada (1000 mg/mL), se presenta una reducción alrededor del 60% para MG-1 y del 40% para MG-2. En la mayor concentración analizada, la citotoxicidad del cisplatino es muy similar a MG-2. Tal efecto se corrobora con el análisis estadístico mostrado en la Tabla 4.13, a través de la medición de IC₅₀ (concentración inhibitoria media).

Los resultados de viabilidad celular de las muestras MG-1 y MG-2 y su comparación con la actividad citotóxica en el cisplatino, en células PC-3 se observan en la Fig. 4.31. Al igual que los resultados obtenidos para las células MCF-7, aquí tampoco se tiene una actividad citotóxica en las concentraciones de 0.01-100 mg/mL para ambas muestras. No obstante, en la máxima concentración (1000 mg/mL), se tienen una disminución alrededor del 70% en cada muestra. Para la máxima concentración analizada la citotoxicidad de las nanoestructuras difiere de lo observado en el cisplatino. En la Tabla 4.13 se corroboran los resultados numéricos a través de la medición de IC₅₀.

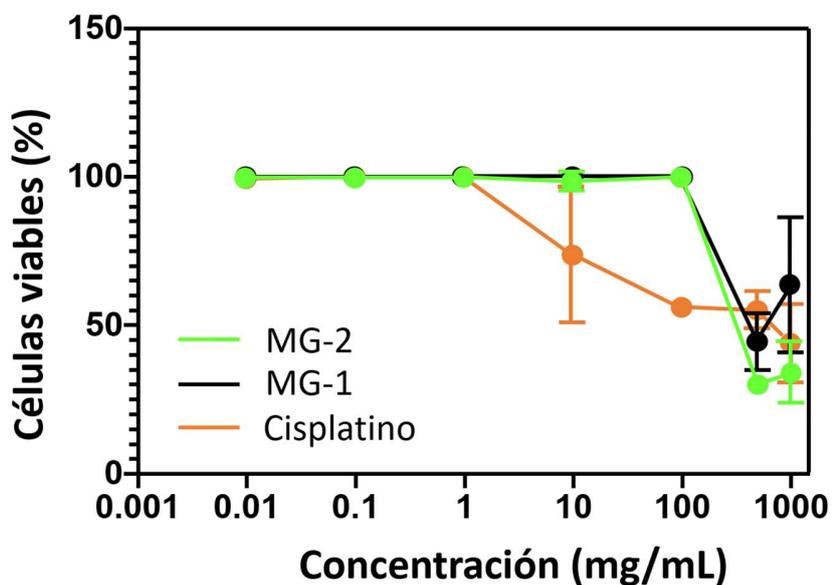


Figura 4.30 Actividad citotóxica de MG-1 y MG-2, y comparación con el cisplatino en células MCF-7.

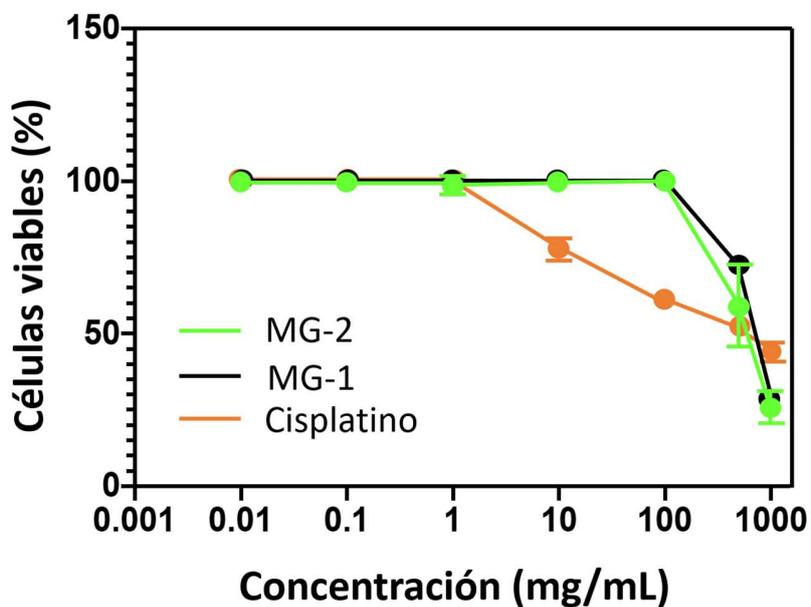


Figura 4.31 Actividad citotóxica de MG-1 y MG-2, y comparación con el cisplatino en células PC-3.

Los resultados de los ensayos de viabilidad por medio de SRB de las muestras 25ADGC y 25TADGC, correspondientes a SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(APTES)@Gd-DTPA se presentan en las Fig. 4.32 y Fig. 4.33, respectivamente. El porcentaje de viabilidad de las células tumorales MCF-7 y PC-3 es muy similar en ambas muestras; tanto en la

concentración más baja (0.01 mg/mL), como en la más alta (1000 mg/mL). Las dos líneas celulares cancerígenas mantienen su estabilidad hasta los 100 mg/mL de concentración. A partir de este punto, comienza a disminuir esta viabilidad celular, disminuyendo más notablemente en la línea PC-3, alrededor del 65%. Las gráficas también presentan una comparación de las diversas nanoestructuras sintetizadas con el cisplatino. Para el ensayo de viabilidad realizado en células de MCF-7, a una menor concentración de cisplatino se reduce considerablemente el porcentaje de las células cancerígenas. Mientras tanto, las SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA en concentraciones mayores, producen una mayor estabilidad en las células. A una mayor concentración, alrededor de 1000 mg/mL el porcentaje disminuido de las células para el cisplatino se compara con el observado para SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA. De forma similar, se demuestran los mismos resultados para el cisplatino en las células PC-3. Las diversas nanoestructuras sintetizadas exponen una estabilidad celular hasta una concentración de 100 mg/mL. SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA exhibe una disminución notable del porcentaje de células viables. El análisis estadístico a través de la medición de IC₅₀ está en la Tabla 4.13. En esta tabla podemos observar que en la línea PC-3, con una menor concentración de las diversas nanoestructuras, principalmente SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA se tiene una disminución del 50% de las células.

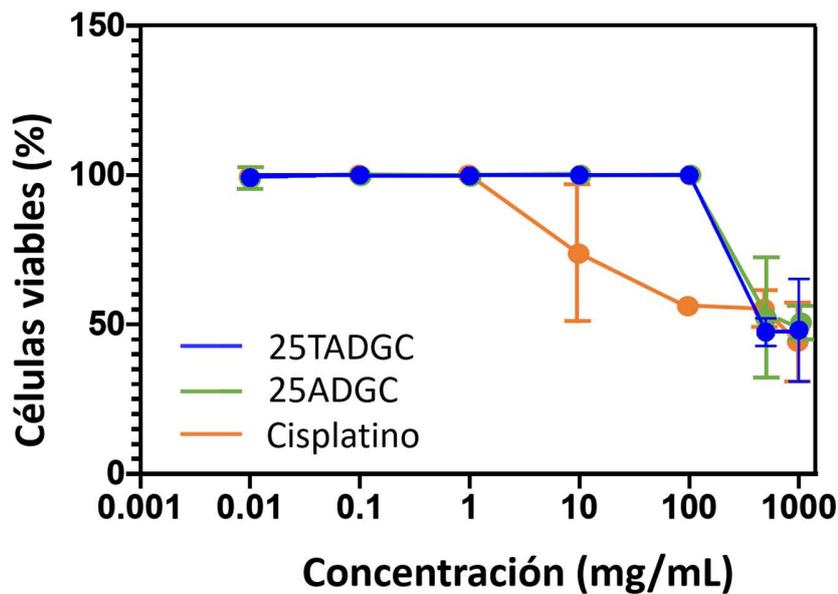


Figura 4.32 Actividad citotóxica de las SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA, SPIONs(APTES)@Gd-DTPA, y comparación con el cisplatino en células MCF-7.

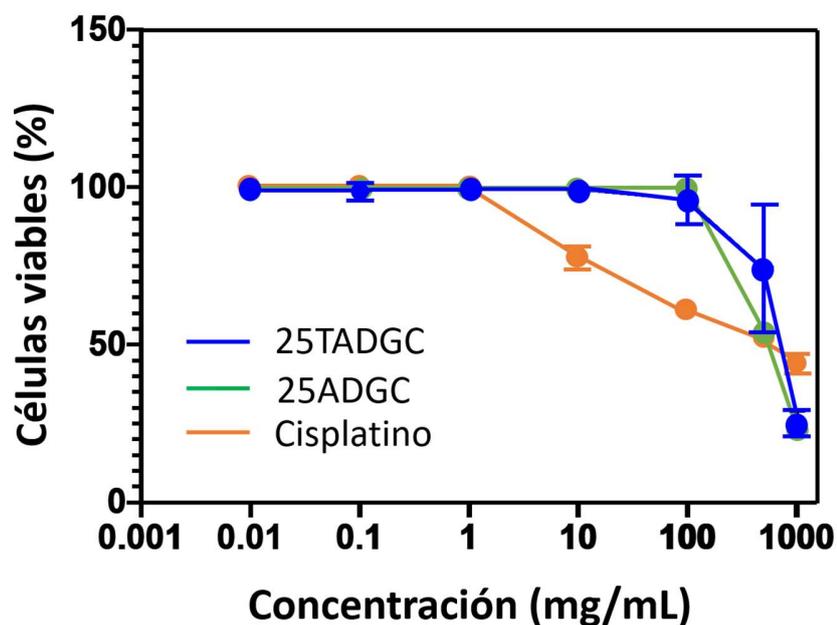


Figura 4.33 Actividad citotóxica de las SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA, SPIONs(APTES)@Gd-DTPA, y comparación con el cisplatino en células PC-3.

Tabla 4.13 Comparación de los efectos citotóxicos de las diversas nanoestructuras con el cisplatino en las líneas celulares MCF-7 y PC-3, a través de la medición de IC₅₀.

Compuestos	Líneas celulares	
	MCF-7 IC ₅₀ (mg/mL)	PC-3 IC ₅₀ (mg/mL)
Cis-Pt	486.84	473.60
MG-1	646.54	707.11
MG-2	484.81	683.00
SPIONs(-NH ₂)@Gd-DTPA (25ADGC)	1004.85	558.66
SPIONs(-NH ₂)@Gd-DTPA (25TADGC)	965.03	657.68

4.5 Comparación y correlación de las propiedades físicas de las SPIONs funcionalizadas con Gd-DTPA con aplicaciones biomédicas

La Tabla 4.14 sintetiza los resultados obtenidos de las propiedades estructurales y magnéticas de las diversas nanoestructuras preparadas. En los resultados se evidencia que M_s decrece a medida que aumenta el número de capas orgánicas alrededor de las SPIONs; a consecuencia de las barreras diamagnéticas que se forma alrededor del núcleo magnético [76], exceptuándose la nanoestructura MG-2. Como se mencionó anteriormente, el aumento de M_s en MG-2 se atribuye a la contribución magnética del Gd al sustituir parcialmente las

vacancias de Fe^{2+} generadas por la oxidación superficial de las SPIONs y las aglomeraciones de SPIONs formadas por el complejo Gd-DTPA.

Tabla 4.14 Propiedades estructurales, magnéticas y efectos citotóxicos de las diversas nanoestructuras sintetizadas.

Muestra	Nanoestructura	a_0 (Å)	XRD ϕ (nm)	M_s (emu/g)	H_c (Oe)
SPIONs		8.374	13	70.58	19.66
MG-1	SPIONs@Gd-DTPA (post-síntesis)	8.358	11	62.61	27.36
MG-2	SPIONs@Gd-DTPA (in situ)	8.366	10	75.82	18.66
25ADGC	SPIONs(-NH ₂)@Gd-DTPA	8.371	9.58	54.17	36.52
25TADGC	SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA	8.335	10.83	66.02	27.64

A pesar de la disminución de M_s de las diversas nanoestructuras, se tiene una buena respuesta magnética, con bajos valores coercitivos y remanentes. Estos parámetros magnéticos son importantes para las aplicaciones de diagnóstico y tratamiento de cáncer como agentes de contraste e hipertermia magnética.

En esta dirección, existen diversas investigaciones llevadas a cabo, combinando SPIONs con Gd para emplearse como agentes de contraste (T_1 - T_2) en MRI. Petran y sus colaboradores [31] han preparado aglomeraciones de núcleos de óxido de hierro dopados con Gd y Eu a través del método solvotermal. La respuesta magnética esta entre 55- 52 emu/g, con una alta estabilidad coloidal y biocompatibilidad. En otro estudio, Bae y su equipo [78] desarrollaron nanopartículas de magnetita etiquetadas con Gd utilizando 3,4 dihidroxi-L-fenilalanina (DOPA), la cual ayuda a enlazar a la superficie de las NPs el polientilenglicol (PEG) y dopamina. El nanocompuesto presenta 6.85 emu/g de M_s . A través del método de coprecipitación se sintetizaron nanocompuestos de $\text{Gd}_2\text{O}_3@Fe_3O_4$ cubiertos con dextrosa por Shabanzadeh-Kouyakhi et al., [37]. Como resultado se tienen aglomeraciones de óxido de hierro encapsulados en una capa de óxido de gadolinio, con una M_s de 1.93 emu/g. Para la aplicación de hipertermia magnética, Drake y su grupo de investigación [40] sintetizaron vía el método de coprecipitación nanopartículas de óxido de hierro dopadas con Gd, reportando una $M_s= 65.67$ emu/g y cuatro veces más alto el valor de SAR que lo reportado para la magnetita.

Se ha visto que el colocar el Gd afuera de una nanoestructura formada con un núcleo magnético, altera la relajación espín-red del Gd. Esta perturbación se origina por el campo magnético de las SPIONs debido a su fuerte acoplamiento magnético y alta susceptibilidad, afectando considerablemente el desempeño de T_1 . Sin embargo, si se coloca el Gd dentro de la estructura de SPIONs, este se alinea a la misma dirección del campo magnético inducido por las SPIONs; lo cual incrementa el campo magnético local, mejorando el desempeño de T_1 y T_2 . [79]

5. CONCLUSIONES

- Las nanoestructuras presentan oxidación superficial durante el procesamiento; lo cual significa que el núcleo magnético está formado por $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, disminuyendo la respuesta magnética comparada con los 90 emu/g reportados de Fe_3O_4 .
- FTIR y TEM confirman el recubrimiento de SPIONs con 3-amino-1-propanol y APTES; y también la funcionalización con el complejo Gd-DTPA. El acoplamiento del Gd-DTPA a las SPIONs permite estudiar las propiedades fisicoquímicas y magnéticas y analizar su posible aplicación como agentes de contraste en IRM.
- La citotoxicidad de las nanoestructuras en las líneas cancerígenas celulares de MFC-7 y PC-3 es casi nula para concentraciones ≤ 100 mg/mL. En la máxima concentración, 1000 mg/mL, la viabilidad celular disminuye notablemente. En MCF-7 se presenta 65% de MG-1, 40% de MG-2, 50% de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA. Para la línea celular PC-3 se muestra: 70 y 60% para MG-1 y MG-2, respectivamente; y alrededor del 25% en SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA. Estos valores son similares a la viabilidad celular de aproximadamente 45% que exhibe el cisplatino. Esta similitud puede deberse a la adhesión del gadolinio a las nanoestructuras, ya que el Gd es un material tóxico. La respuesta citotóxica de las diversas nanoestructuras sintetizadas puede representar un área de oportunidad en el ámbito de terapia contra el Cáncer.
- En las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA el núcleo magnético está recubierto por 2 – 3 capas orgánicas, las cuales tienen influencia en las propiedades magnéticas. Ambas nanoestructuras presentan un comportamiento superparamagnético con propiedades magnéticas de $M_s = 54.17$ emu/g, y $M_s = 66.02$ emu/g; y valores coercitivos de 36.52 y 27.64 Oe, respectivamente. Las respuestas magnéticas no están muy por debajo de los 90 emu/g reportados de Fe_3O_4 , haciendo atractivas a las nanoestructuras para su uso como diagnóstico y tratamiento de Cáncer.
- De las diversas nanoestructuras que se fabricaron y caracterizaron, las SPIONs@Gd-DTPA sintetizadas *in situ* (MG-2) presentan la mayor área de oportunidad para una posible aplicación biomédica. Gracias a su fácil síntesis, ya que en un solo paso se obtiene la nanoestructura completa y a su respuesta magnética, $M_s = 75.82$ emu/g, y $H_c = 18.66$ Oe. Además, la orientación uniaxial de los dominios magnéticos con respecto al campo aplicado les permite ser fácilmente direccionados. También, el Gd es introducido en la nanoestructura de las SPIONs, disminuyendo las probabilidades de perturbaciones en la MRI. Estas características potencializan a la nanoestructura como un efectivo agente de contraste en una modalidad dual (T_1 - T_2) en MRI e hipertermia magnética.

6. PERSPECTIVAS

En los resultados mostrados en este trabajo doctoral quedan establecidos diversos experimentos y/o análisis que pueden considerarse como un trabajo a futuro:

- ✚ En las nanoestructuras SPIONs@Gd-DTPA, realizar los experimentos modificando la cantidad del complejo Gd-DTPA y la temperatura durante la reacción; para observar la variación de las propiedades fisicoquímicas y magnéticas.
- ✚ Mediciones MFM para analizar la orientación y tamaño de los dominios magnéticos en SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA y SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA.
- ✚ Ensayos de citotoxicidad con líneas celulares no cancerígenas por definir.
- ✚ Hacer pruebas de imágenes de resonancia magnética in vitro, en líneas celulares por definir.

- [1] Instituto Nacional de Estadística y Geografía, «Estadísticas a propósito del día mundial contra el Cáncer (4 de febrero),» México, 2018.
- [2] J. B. Montes Frausto, «Nanomateriales con liminiscencia persistente usados como bioetiquetadores en células de cáncer,» de *Tesis doctoral*, Ensenada, Baja California: Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE), 2017.
- [3] M. Santana Vázquez, «Síntesis y funcionalización de nanopartículas superparamagnéticas de magnetita (Fe₃O₄) para la generación de hipertermia magnética,» de *Tesis de maestría*, México, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2014.
- [4] B. Salinas Rodríguez, «Síntesis y funcionalización covalente de nanopartículas superparamagnéticas para imagen biomédica,» de *Tesis doctoral*, Madrid, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, 2014.
- [5] T. Fernández Cabada, «Caracterización de nanopartículas magnéticas y de oro para posibles aplicaciones biomédicas en diagnóstico y terapia,» de *Tesis doctoral*, Madrid, Departamento de Ingeniería Fotónica y Bioingeniería, Universidad Politécnica de Madrid, 2014.
- [6] A. Gómez Roca, «Preparación de nanopartículas magnéticas uniformes y de alta cristalinidad para biomedicina,» de *Tesis doctoral*, Madrid, Instituto de Ciencias de Materiales de Madrid, Universidad Complutense de Madrid, 2009.
- [7] O. K. Arriortua Llarena, «Funcionalización y estudio de nanopartículas de magnetita para su aplicación en terapias de hipertermia magnética,» de *Tesis doctoral*, País Vasco, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad del País Vasco, 2015.
- [8] M. Calero Calero, «Caracterización de nanopartículas magnéticas en cultivos celulares para sus aplicaciones biomédicas,» de *Tesis doctoral*, Madrid, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 2015.
- [9] B. Issa, I. M. Obaidat, B. A. Albiss y Y. Haik, «Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, nº 11, pp. 21266- 21305, 2013.
- [10] E. Mazarío Masip, «Tesis doctoral,» de *Síntesis electroquímica de nanopartículas de ferrita de cobalto, caracterización y aplicaciones biomédicas*, Madrid, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 2015.

- [11] S. García Jimeno, «Tesis doctoral,» de *Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas*, Barcelona, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2012.
- [12] S. Villa, P. Riani, F. Locardi y F. Canepa, «Functionalization of Fe₃O₄ NPs by silanization: use of amine (APTES) and thiol (MPTMS) silanes and their physical characterization,» *Materials*, vol. 9, nº 10, p. 826, 2016.
- [13] D. A. De la Torre Robles, «Estudio de propiedades físicas en nanopartículas de óxido de hierro para la generación de hipertermia magnética,» de *Tesis de maestría*, Ciudad de México, Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), 2013.
- [14] S. Romero Vargas, «Efectos de diversos recubrimientos sobre las propiedades magnéticas de partículas superparamagnéticas de Fe₃O₄,» de *Tesis doctoral*, Ciudad de México, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, Instituto Politécnico Nacional (IPN), 2011.
- [15] G. Kandasamy y D. Maity, «Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics,» *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 496, nº 2, pp. 191- 218, 2015.
- [16] A. Avasthi, C. Caro, E. Pozo-Torres, M. P. Leal y M. L. García-Martín, «Magnetic nanoparticles as MRI contrast agents,» *Topics in Current Chemistry*, vol. 378, nº 40, pp. 1- 43, 2020.
- [17] X.-D. Liu, H. Chen y S.-S. Y. L.-Q. L. Y.-P. Liu, «Hydrothermal synthesis of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles with ionic liquids as stabilizer,» *Materials Research Bulletin*, vol. 62, pp. 217- 221, 2015.
- [18] D. Jiles, *Introduction to magnetism and magnetic materials*, NY: CRC Press, 2016.
- [19] N. T. Thanh, *Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications*, NW: CRC Press, 2012.
- [20] M. Getzlaff, *Fundamentals of Magnetism*, New York: Springer Science & Business Media, 2007.
- [21] S. P. Gubin, *Magnetic nanoparticles*, Moscow: Wiley-VCH, 2009.
- [22] M. Faraji, Y. Yamini y M. Rezaee, «Magnetic nanoparticles: synthesis, stabilization, functionalization, characterization, and applications,» *Journal of the Iranian Chemical Society*, vol. 7, nº 1, pp. 1- 37, 2010.
- [23] Y.-w. Jun, J.-H. Lee y J. Cheon, «Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging,» *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 47, nº 28, pp. 5122- 5135, 2008.

- [24] T. D. Schladt, K. Schneider, H. Schild y W. Tremel, «Synthesis and bio-functionalization of magnetic nanoparticles for medical diagnosis and treatment,» *Dalton Transactions*, vol. 40, n° 24, pp. 6315- 6343, 2011.
- [25] A. Taqaddas, «Use of magnetic nanoparticles in cancer detection with MRI,» *International Journal of Medical, Health, Biomedical and Pharmaceutical Engineering*, vol. 8, n° 9, pp. 586- 594, 2014.
- [26] M. L. Mojica Piscioti, «Estudio del proceso de calentamiento de nanopartículas magnéticas con campos magnéticos ac para su utilización en tratamiento de tumores por hipertermia,» de *Tesis de maestría*, Argentina, Instituto Balseiro, Universidad Nacional de Cuyo, 2009.
- [27] Y. Zhou, S. Wang, B. Ding y Z. Yang, «Modification of magnetite nanoparticles via surface-initiated atom transfer radical polymerization (ATRP),» *Chemical Engineering Journal*, vol. 138, n° 1-3, pp. 578- 585, 2008.
- [28] D. Yoo, J.-H. Lee, T.-H. Shin y J. Cheon, «Theranostic magnetic nanoparticles,» *Accounts of chemical research*, vol. 44, n° 10, pp. 863- 874, 2011.
- [29] N. Schleich, F. Danhier y V. Préat, «Iron oxide-loaded nanotheranostics: major obstacles to in vivo studies and clinical translation,» *Journal of Controlled Release*, vol. 198, pp. 35- 54, 2015.
- [30] E. Amstad, M. Textor y E. Reimhult, «Stabalization and functionalizations of iron oxide nanoparticles for biomedical applications,» *Nanoscale*, vol. 3, n° 7, pp. 2819- 2843, 2011.
- [31] A. Petran, T. Radu, G. Borodi, A. Nan y M. Suciu, «Effects of rare earth doping on multi-core iron oxide nanoparticles properties,» *Applied Surface Science*, vol. 428, pp. 492- 499, 2018.
- [32] L. Kopanja, S. Kralj, D. Zunic, B. Loncar y M. Tadic, «Core-shell superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) clusters: TEM micrograph analysis, particle design and shape analysis,» *Ceramics International*, vol. 42, n° 9, pp. 10976- 10984, 2016.
- [33] O. Icten, A. D. Kose y B. Zumreoglu-Karan, «Fabrication and characterization of magnetite-gadolinium borate nanocomposites,» *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 726, pp. 437- 444, 2017.
- [34] M. Aghazadeh, I. Karimzadeh, M. R. Ganjali, D. Gharailou y S. M. Hamad, «EDTA-grafted Cu²⁺- doped superparamagnetic nanoparticles: facile novel synthesis and their structural and magnetic characterizations,» *Applied Physics A*, vol. 125, n° 8, pp. 1- 7, 2019.

- [35] D. Maity, P. Chandrasekharan, C.-T. Yang, K.-H. Chuang y B. Shuter, «Facile synthesis of water-stable magnetite nanoparticles for clinical MRI and magnetic hyperthermia applications,» *Nanomedicine*, vol. 5, n° 10, pp. 1571- 1584, 2010.
- [36] N. D. Thorat, R. A. Bohara, H. M. Yadav y S. A. M. Tofail, «Multi-modal MR imaging and magnetic hyperthermia study of Gd doped Fe₃O₄ nanoparticles for integrative cancer therapy,» *RSC Advances*, vol. 6, n° 97, pp. 94967- 94975, 2016.
- [37] A. Shabanzadeh-Kouyakhi, A. Masoudi y M. Ardestani, «Synthesis method of novel Gd₂O₃@Fe₃O₄ nanocomposite modified by dextrose capping agent,» *Ceramics International*, vol. 46, n° 9, pp. 13442- 13448, 2020.
- [38] F. J. Douglas, D. A. Maclean, N. Maclean, I. Andreu, F. J. Kettles, F. Tuna, C. C. Berry, Castro, M. y M. Murrie, «Gadolinium-doped magnetite nanoparticles from a single-source precursor,» *RSC Advances*, vol. 6, n° 78, pp. 74500- 74505, 2016.
- [39] A. Farzin, S. A. Etesami, J. Quint, A. Memic y A. Tamayol, «Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis,» *Advanced healthcare materials*, vol. 9, n° 9, 2020.
- [40] P. Drake, H.-J. Cho, P.-S. Shih, C.-H. Kao, K.-F. Lee, C.-H. Kuo, X.-Z. Lin y Y.-J. Lin, «Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumour therapy via magnetic field hyperthermia,» *Journal of Materials Chemistry*, vol. 17, n° 46, pp. 4914- 4918, 2007.
- [41] E. C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion y A. C. S. Samia, «Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles,» *Progress in Natural Science: Materials International*, vol. 26, n° 5, pp. 440- 448, 2016.
- [42] Z. Bakhtiary, A. A. Saei, M. J. Hajipour, M. Raoufi, O. Vermesh y M. Mahmoudi, «Targeted superparamagnetic iron oxide nanoparticles for early detection of cancer: possibilities and challenges,» *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, vol. 12, n° 2, pp. 287- 307, 2016.
- [43] Y. N. Ertas, «Tesis doctoral,» de *Oxide-free gadolinium nanoparticles as MRI contrast agents*, Los Angeles, University of California, 2017.
- [44] J. Estelrich, M. J. Sánchez-Martín y M. A. Busquets, «Nanoparticles in magnetic resonance imaging: from simple to dual contrast agents,» *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, p. 1727, 2015.
- [45] G. Azizian, N. Riyahi-Alam, S. Haghgoo, H. R. Moghimi, R. Zohdiaghdam, B. Rafiei y E. Gorji, «Synthesis route and three different core-shell impacts on magnetic characterization of gadolinium oxide-based nanoparticles as new contrast agents for molecular magnetic resonance imaging,» *Nanoscale research letters*, vol. 7, n° 1, pp. 1- 10, 2012.

- [46] H. Yang, Y. Zhuang, Y. Sun, A. Dai, X. Shi, D. Wu, F. Li, H. Hu y S. Yang, «Targeted dual-contrast T1- and T2 weighted magnetic resonance imaging of tumours using multifunctional gadolinium-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles,» *Biomaterials*, vol. 32, nº 20, pp. 4584- 4593, 2011.
- [47] S. Caspani, R. Malgalhaes, J. P. Araújo y C. T. Sousa, «Magnetic nanomaterials as contrast agents for MRI,» *Materials*, vol. 13, nº 11, p. 2586, 2020.
- [48] N. A. Keasberry, M. Bañobre-López, C. Wood, G. J. Stasiuk, J. Gallo y N. J. Long, «Tuning the relaxation rates of dual-mode T1/T2 nanoparticle contrast agents: a study into the ideal system,» *Nanoscale*, vol. 7, nº 38, pp. 16119- 16128, 2015.
- [49] H.-H. Xiang, M.-M. Song, M.-Y. Fei, R.-J. Wang, X.-F. Tao, Y.-X. Shen y Y.-Q. Yu, «Facile synthesis of multifunctional nanocomposites for efficient dual-mode T1 and T2 magnetic resonance imaging and gene delivery,» *Applied Nanoscience*, vol. 9, nº 8, 2019.
- [50] V. Rebutini, «Functional iron oxide-based hybrid nanostructures,» de *Tesis doctoral*, Berlín, Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales, Universidad Humboldt de Berlín, 2014.
- [51] J. A. Ramos Guivar, «Tesis de maestría,» de *Funcionalización de nanomateriales magnéticos de óxido de hierro con aplicaciones en biosensores y regeneración de tejidos óseos*, Lima, Facultad de Ciencias Físicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2015.
- [52] M. Z. Kassae, H. Masrouri y F. Movahedi, «Sulfamic acid-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for one-pot synthesis of alpha-amino nitriles in water,» *Applied Catalysis A: General*, vol. 395, nº 1-2, pp. 28-33, 2011.
- [53] R. Massart, «Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media,» *IEEE transactions on magnetics*, vol. 17, nº 2, pp. 1247- 1248, 1981.
- [54] J. Santoyo-Salazar, L. Perez, O. De Abril, L. T. Phuoc, D. Ihiwakrim, M. Vazquez, J.-M. Greneche, S. Begin-Colin y G. Pourroy, «Magnetic iron oxide nanoparticles in 10- 40 nm range: composition in terms of magnetite/maghemite ratio and effect of the magnetic properties,» *Chemistry of Materials*, vol. 23, nº 6, pp. 1379- 1386, 2011.
- [55] S. Santra, S. D. Jativa, C. Kaittanis, G. Normand, J. Grimm y J. M. Perez, «Gadolinium-encapsulating iron oxide nanoprobe as activatable NMR/MRI contrast agent,» *ACS Nano*, vol. 6, nº 8, pp. 7281- 7294, 2012.
- [56] P. Voisin, E. J. Ribot, S. Miraux, A.-K. Bouziers-Sore, J.-F. Lahitte, V. Bouchaud, S. Mornet, E. Thiaudiere, J.-M. Franconi, L. Raison, C. Labrugere y M.-H. Delville, «Use of lanthanide-grafted inorganic nanoparticles as effective contrast agents for

cellular uptake imaging,» *Bioconjugate Chemistry*, vol. 18, nº 4, pp. 1053- 1063, 2007.

- [57] S.-W. Choi, W.-S. Kim y J.-H. Kim, *Methods in molecular biology: nanotechnology protocols*, Totowa, NJ: Human Press Inc..
- [58] J. H. v. Steenis, E. M. Maarseveen, F. J. Verbaan, R. Verrijck, D. J. A. Crommelin, G. Storm y W. E. Hennik, «Preparation and characterization of folate-targeted pEG-coated pDMAEMA-based polyplexes,» *Journal of Controlled Release*, vol. 87, nº 1-3, pp. 167- 176, 2003.
- [59] G. Nolze y W. Kraus, «PowderCell 2.0 for Windows,» Powder Diffr, 1998.
- [60] U. Instituto de Química, «Protocolo».
- [61] D. Maity, S.-G. Choo, J. Yi, J. Ding y J. M. Xue, «Synthesis of magnetite nanoparticles via a solvent-free thermal decomposition route,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, nº 9, pp. 1256- 1259, 2009.
- [62] I. Moraleja San José, «Tesis doctoral,» de *Nuevas estrategias de espectrometría de masas para la obtención y cuantificación de bioimágenes de platino y determinación de proteínas ligadas a fármacos platinados en estudios de nefrotoxicidad*, Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, 2018.
- [63] M. A.-F. Basha, «Magnetic and optical studies on polyvinylpyrrolidone thin films doped with rare earth metal salts,» *Polymer Journal*, vol. 42, nº 9, pp. 728- 734, 2010.
- [64] M. F. Cipreste, A. M. Peres, A. A. C. Cotta, F. H. Aragón, A. d. M. Antunes, A. S. Leal, W. A. A. Macedo y E. M. B. de Sousa, «Synthesis and characterization of 159Gd-doped hydroxyapatite nanorods for bioapplications as theranostic systems,» *Materials Chemistry and Physics*, vol. 181, pp. 301- 311, 2016.
- [65] A. Szpak, S. Fiejdasz, W. Prendota, T. Straczek, C. Kapusta, J. Szmyd, M. Nowakowska y S. Zapotoczny, «T1-T2 dual-modal MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles with surface attached gadolinium complexes,» *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 16, nº 11, pp. 1- 11, 2014.
- [66] H. Zhang, V. Malik, S. Mallapragada y M. Akinc, «Synthesis and characterization of Gd-doped magnetite nanoparticles,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 423, pp. 386- 394, 2017.
- [67] S. Sundar, R. Mariappan y S. Piraman, «Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug,» *Powder Technology*, vol. 266, pp. 321- 328, 2014.
- [68] A. Amiri, M. Shanbedi, M. Savari y S. N. Kazi, «Cadmium ion sorption from aqueous solutions by high surface area ethylenediaminetetraacetic acid-and diethylene triamine

pentaacetic acid-treated carbon nanotubes,» *RSC Advances*, vol. 5, n° 87, pp. 71144-71151, 2015.

- [69] M. Yamaura, R. L. Camilo, L. C. Sampaio, M. A. Macedo y H. E. Toma, «Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 279, n° 2-3, pp. 210- 217, 2004.
- [70] A. M. Kumar, M. C. Varma, G. S. V. R. K. Choudary, P. Prameela y K. H. Rao, «Influence of gadolinium on magnetization and DC resistivity of Ni-Zn nanoferrites,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 324, n° 1, pp. 68- 71, 2012.
- [71] L. B. Tahar, L. S. Smiri, M. Artus, A.-L. Joudrier, F. Herbst, M. J. Vaulay, S. Ammar y F. Fiévet, «Characterization and magnetic properties of Sm- and Gd-substituted CoFe₂O₄ nanoparticles prepared by forced hydrolysis in polyol,» *Materials Research Bulletin*, vol. 42, n° 11, pp. 1888- 1896, 2007.
- [72] J. Santoyo-Salazar, M. A. Castellanos-Roman y L. B. Gómez, «Structural and magnetic domains characterization of magnetite nanoparticles,» *Materials Science and Engineering: C*, vol. 27, n° 5- 8, pp. 1317- 1320, 2007.
- [73] R. A. Bini, R. F. C. Marques, F. J. Santos, J. A. Chaker y M. Jafelicci Jr., «Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxysilanes,» *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 324, n° 4, pp. 534- 539, 2010.
- [74] A. Durdureanu-Angheluta, M. Pinteala y B. C. Simionescu, «Tailored and functionalized magnetite nanoparticles for biomedical and industrial applications,» de *Materials Science and Technology*, Croatia, IntechOpen, 2012.
- [75] V. Darras, M. Nelea, F. M. Winnik y M. D. Buschmann, «Chitosan modified with gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid for magnetic resonance imaging of DNA/chitosan nanoparticles,» *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, n° 4, pp. 1137- 1146, 2010.
- [76] S. d. N. Almeida y H. E. Toma, «Neodymium(III) and lanthanum(III) separation by magnetic nanohydrometallurgy using DTPA functionalized magnetite nanoparticles,» *Hydrometallurgy*, vol. 161, pp. 22- 28, 2016.
- [77] A. Toro-Cordova, M. Flores-Cruz, J. Santoyo-Salazar, E. Carrillo-Nava, R. Jurado, P. A. Figueroa-Rodríguez, P. Lopez-Sanchez, L. A. Medina y P. García-Lopez, «Liposomes loaded with cisplatin and magnetic nanoparticles: physicochemical characterization, pharmacokinetics, and in-vitro efficacy,» *Molecules*, vol. 23, n° 9, p. 2272, 2018.

- [78] K. H. Bae, Y. B. Kim, Y. Lee, J. Hwang, H. Park y T. G. Park, «Bioinspired synthesis and characterization of gadolinium-labeled magnetite nanoparticles for dual contrast T1- and T2-weighted magnetic resonance imaging,» *Bioconjugate chemistry*, vol. 21, n° 3, pp. 505- 512, 2010.
- [79] Y. Si, G. Zhang, D. Wang, C. Zhang, C. Yang, G. Bai, J. Qian, Q. Chen, Z. Zhang, Z. Wu, Y. Xu y D. Zou, «Nanostructure-enhanced water interaction to increase the dual-mode MR contrast performance of gadolinium-doped iron oxide nanoclusters,» *Chemical Engineering Journal*, vol. 360, pp. 289- 298, 2019.
- [80] R. Valenzuela, M. C. Fuentes, C. Parra, J. Baeza, N. Duran, S. K. Sharma, M. Knobel y J. Freer, «Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) by the co-precipitation method,» *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 488, n° 1, pp. 227- 231, 2009.
- [81] J. C. Park, S. Yeo, M. Kim, G. T. Lee y J. H. Seo, «Synthesis and characterization of novel lanthanide-doped magnetite@Au core@shell nanoparticles,» *Materials Letters*, vol. 181, pp. 272- 277, 2016.
- [82] F. Chen, X. H. Zhang, X. D. Hu, W. Zhang, R. Zeng, P. D. Liu y H. Q. Zhang, «Synthesis and characterization of nanorods of gadolinium hydroxide and gadolinium oxide,» *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 664, pp. 311- 316, 2016.
- [83] F. Velandia y M. F. Hurtado M., «Difracción de rayos x: un mundo de aplicaciones por descubrir,» *Ingeciencia*, vol. 2, n° 2, pp. 67- 75, 2017.
- [84] R. Gómez y R. Murillo, «Espectroscopía infrarroja,» [En línea]. Available: <http://sistemas.fcencias.unam.mx/~fam/Infrarroja.pdf>.
- [85] J. S. Feliu, «Caracterización química de nanosuperficies. Introducción a la espectroscopia fotoelectrónica de rayos x (XPS),» *Técnicas de Laboratorio*, vol. 356, pp. 838- 843, 2010.
- [86] S. R. Merrlo Castanho, «Espectroscopía fotoelectrónica de rayos-x,» *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 36, n° 4, pp. 425- 434, 1997.
- [87] I. Laboratorio Nacional de Investigaciones en Nanociencias y Nanotecnología, «[http://www.linan-ipicyt.mx/Electrones_fotoemitidos_\(XPS\).html](http://www.linan-ipicyt.mx/Electrones_fotoemitidos_(XPS).html),» [En línea].
- [88] E. Adem Chahin, H. Alva Sánchez, M. Avalos Borja, R. A. Barrio, X. Bokhimi y e. al., *Física Experimental Interdisciplinaria*, Ciudad de México: CopIt-arXives, 2019.
- [89] D. B. Williams y C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy: a textbook for materials science*, New York: Springer Science & Business Media, 1996.
- [90] Jeol, «<https://www.jeol.co.jp/en/science/sem.html>,» [En línea].

- [91] Ranau-Piqueras y M. Faura, «Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido,» Sección de Microscopia Electrónica, Valencia, 1994.
- [92] L. N. d. I. e. N. y. Nanotecnología, «http://www.linanipicyt.mx/Microscopio_de_Fuerza_Atomic.html,» [En línea].
- [93] R. L. Fagaly, «Superconducting quantum interference device instruments and applications,» *Review of scientific instruments*, vol. 77, n° 10, p. 101101, 2006.
- [94] R. M. Gutierrez Perez, «Tesis doctoral,» de *Transición antiferro-A ferromagnética parcial de átomos de Mn en películas delgadas de Mn₃Ga mediante dopaje con carbono*, Chihuahua, Centro de Investigación en Materiales Avanzados (CIMAV), 2018.

ANEXO A.

Información adicional

A.1. Comparación SPIONs(no funcionalizadas) y SPIONs(-NH₂)

La deconvolución del pico Fe(2p_{3/2}) de ambas muestras, Fig. A.1, reveló señales de Fe²⁺ (710 eV) y Fe³⁺ (711.5 eV) [80]. Con la ayuda del programa Origin se calculó el área bajo la curva de las regiones Fe³⁺ y Fe²⁺, Tabla A.1. De los datos obtenidos podemos concluir que en la deconvolución de SPIONs-NH₂ disminuye Fe²⁺ y aumenta Fe³⁺; en comparación con lo obtenido en SPIONs. Tales variaciones, indican una mayor oxidación superficial en SPIONs-NH₂; atribuido al uso del agente precipitante, 3-amino-1-propanol.

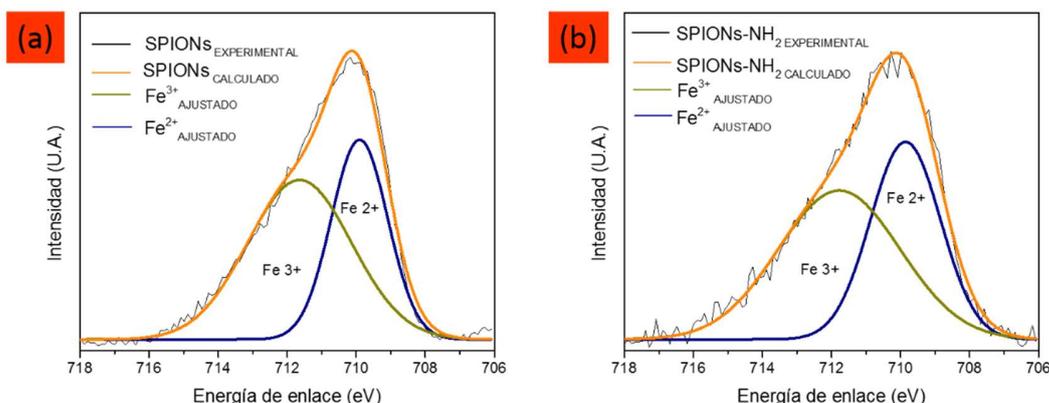


Figura A.1 Deconvolución del pico Fe (2p_{3/2}) de (a) SPIONs y (b) SPIONs(-NH₂).

Tabla A.1 Comparación de las curvas generadas por la deconvolución del pico Fe(2p_{3/2}).

Muestra	Área bajo la curva de la deconvolución	
	Fe 2+	Fe 3+
SPIONs	43.8914	56.1086
SPIONs(-NH ₂)	40.70542	59.29458

A.2 Caracterización de SPIONs@Gd-DTPA (Método 1)

La muestra MG-3 se sintetizó en base a la ruta de adsorción post-síntesis. Para formar la solución de Gd-DTPA, se disolvió 800 mg de Gd-DTPA en 10 mL de agua destilada. La solución de Gd-DTPA se agregó a la reacción después de la precipitación de las nanopartículas de óxido de hierro. Luego, se mantuvo en una agitación fuerte bajo una

atmósfera de argón y a 80 °C por 12 horas. La nanoestructura obtenida se denominó MG-3. En la Fig. A.2 se muestra el patrón de difracción de rayos-x. Todos los picos de difracción de la nanoestructura MG-3 se indexaron a la FCC espínela inversa de la magnetita, PDF #00-019-0629. Por medio del programa *Powder Cell*, utilizando una función *Pseudo-Voigt*, se calcularon las propiedades estructurales, Tabla A.2, obteniendo a_0 menor al valor 8.396 Å de Fe_3O_4 , lo cual indica una oxidación superficial, como consecuencia $Fe_3O_4@γ-Fe_2O_3$. El tamaño de partícula calculado se encuentra en un rango nanométrico.

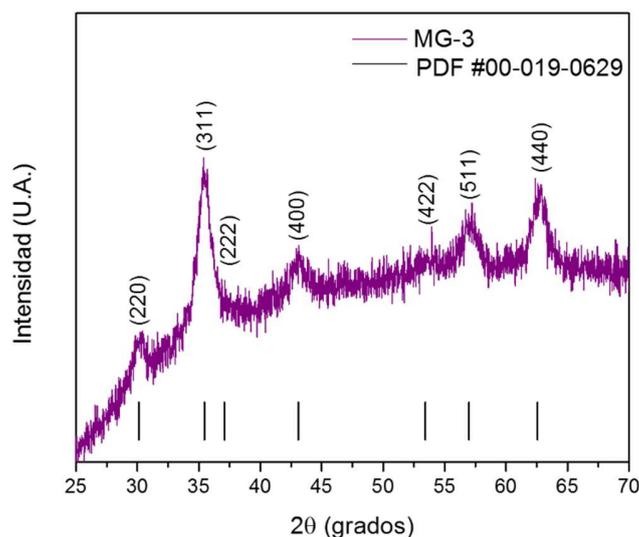


Figura A.2 Patrón de XRD de MG-3.

Tabla A.2 Propiedades estructurales de la nanoestructura MG-3.

Muestra	hkl	2θ	FWHM	a_0 (Å)	D (nm)
MG-3	311	35.531	1.040	8.373	8

En el espectro FTIR, Fig. se tienen las bandas a 570 cm^{-1} que proviene de la vibración del enlace de Fe-O [54], 3408 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones de estiramiento de los grupos -OH absorbidos en la superficie de las nanopartículas magnéticas [68], y 1626 cm^{-1} que confirma la presencia del compuesto Gd-DTPA, Fig. A.3.

En la imagen Fig. A.4(a) se presentan nanopartículas con forma semi-esférica y aglomeradas. En alta resolución, Fig. A.4(b) se observa una capa alrededor de estas nanopartículas magnéticas, que corresponde al compuesto Gd-DTPA. Los aros concéntricos que aparecen en SAED, Fig. A.4(c) corresponden a la magnetita, corroborando el patrón de DRX.

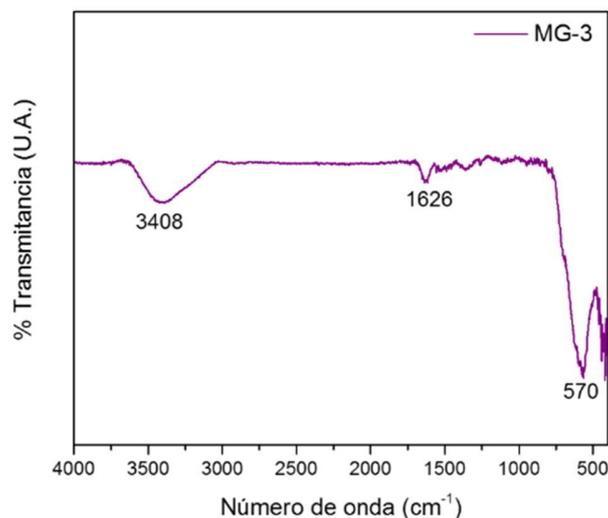


Figura A.3 Espectro FTIR de MG-3.

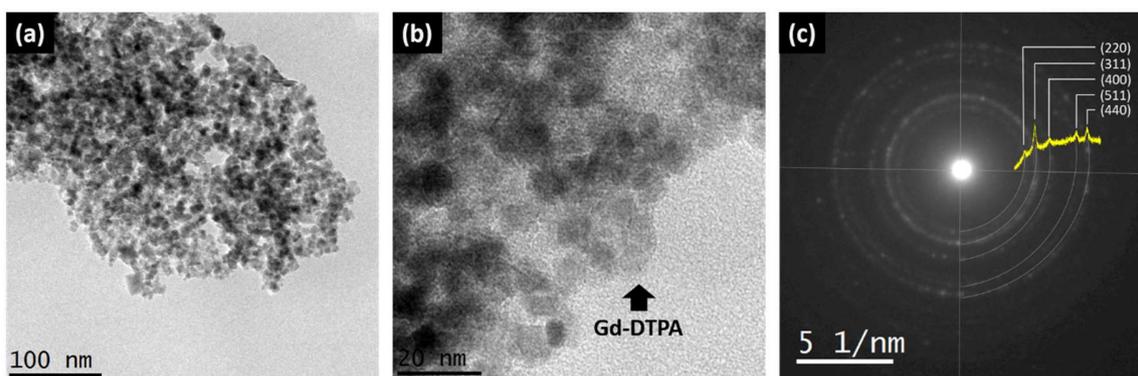


Figura A.4 (a, b) Imágenes de TEM a diversas escalas y (c) SAED de MG-3.

A.2 Caracterización de SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA (Método 3)

A.3.1 Propiedades estructurales y morfología de las muestras de SPIONs(-APTES)

En los patrones de DRX de las muestras SPIONs(-APTES), Fig. A.5, se observan las reflexiones características de la estructura fcc de espínela inversa, Fe_3O_4 . No se observa la presencia de alguna otra fase cristalina. La Tabla A.3 exhibe las propiedades estructurales de las nanoestructuras SPIONs(-APTES).

En los espectros FTIR, Fig. A.6, la oxidación superficial que sufren las NPs se presentan en la banda a 630 cm^{-1} , atribuida a la fase de maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Las bandas de los grupos silanol (Si-OH) y siloxano (Si-O-Si), son observadas alrededor de 1000 y 800 cm^{-1} . Las vibraciones de estiramiento del enlace N-H se exhiben entre 1720 y 1530 cm^{-1} , las cuales

indican grupos aminos libres [73]. El pico alrededor de 1260 cm^{-1} se atribuye a la vibración de estiramiento de C-N.

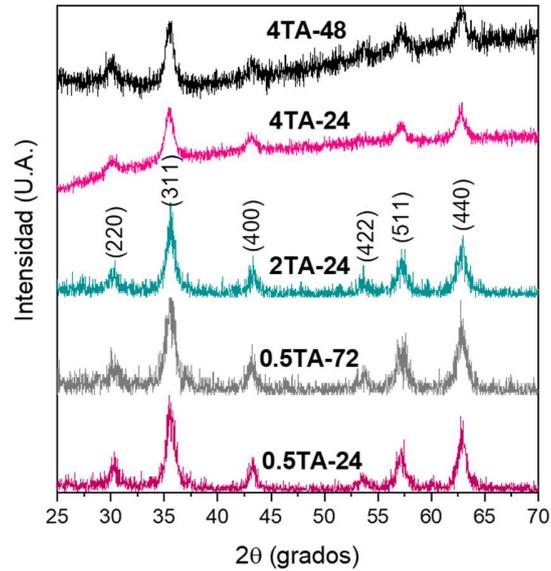


Figura A.5 Patrón de XRD de las nanoestructuras SPIONs(-APTES).

Tabla A.3 Propiedades estructurales de las diversas nanoestructuras SPIONs(-APTES).

Muestra	hkl	2θ	FWHM	a_0 (Å)	D (nm)
0.5TA-24	311	35.489	0.810	8.382	10.29
0.5TA-72	311	35.617	0.937	8.353	8.90
2TA-24	311	35.554	0.864	8.367	9.65
4TA-24	311	35.711	0.851	8.332	9.80
4TA-48	311	35.574	0.810	8.363	10.30

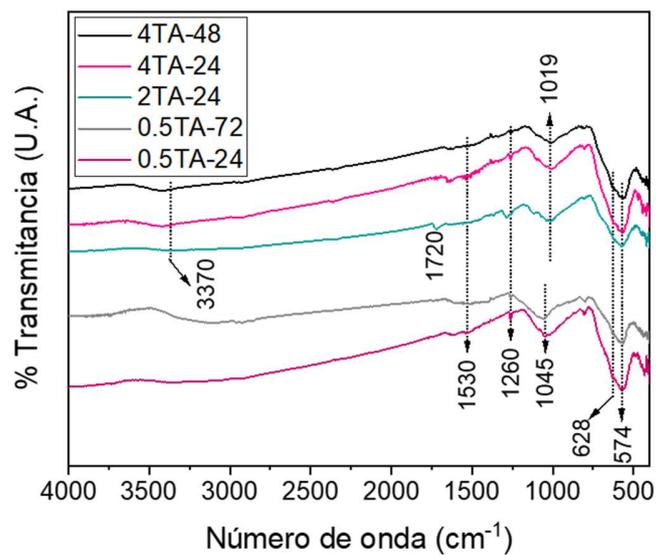


Figura A.6 Espectros FTIR de las nanoestructuras SPIONs(-APTES).

Los espectros de XPS de las nanoestructuras SPIONs(-APTES) se muestran en la Fig. A.7. La presencia del APTES en la superficie de las NPMs se representa por las bandas: Si(2p) a 102.4 eV, Si(2s) a 153.08 eV y N(1s) a 400.08 eV [56, 74]. La Tabla A.4 exhibe la composición elemental de cada una de las nanoestructuras de SPIONs(-APTES).

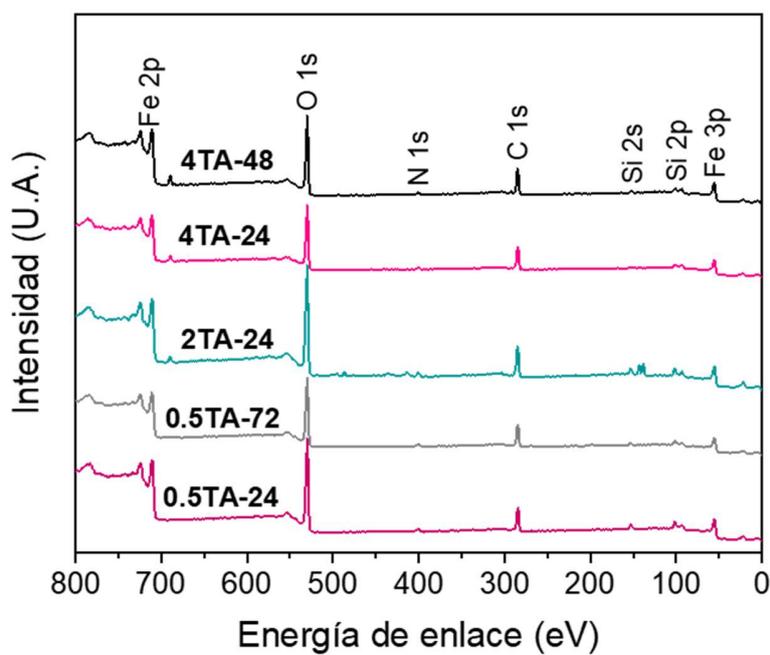


Figura A.7 Espectros XPS las nanoestructuras SPIONs(-APTES).

Tabla A.4 Composición elemental de las nanoestructuras SPIONs(-APTES).

Muestra	% At				
	Fe	O	C	N	Si
0.5TA-24	20.87	37.96	26.41	2.07	12.69
0.5TA-72	21.56	35.39	31.90	1.65	9.50
2TA-24	18.58	37.82	28.25	2.63	12.72
4TA-24	20.56	28.95	29.33	1.37	19.79
4TA-48	21.12	35.09	34.05	1.64	8.10

En las imágenes TEM, Fig. A.8, se observan aglomerados de SPIONs envueltas en su totalidad por una capa amorfa; la cual se atribuye al APTES.

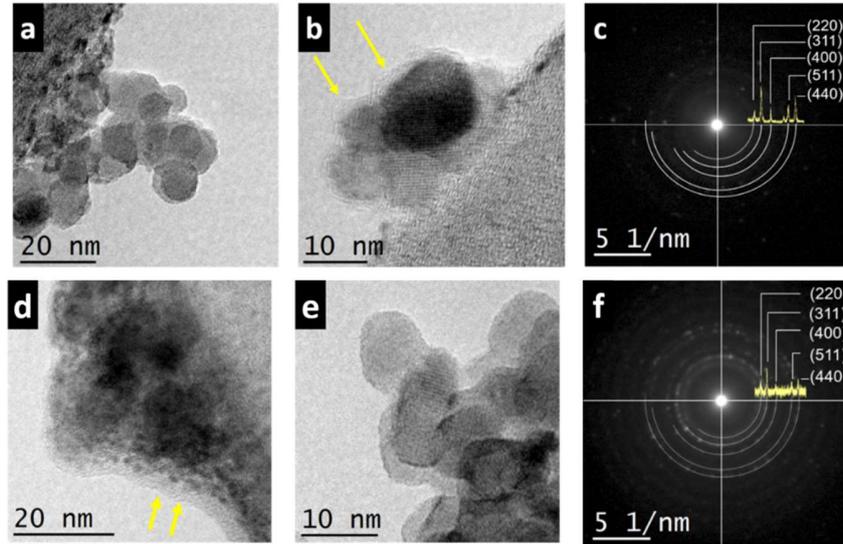


Figura A.8 Imágenes TEM y SAED de las muestras (a, b, c) 0.5TA-24 y (d, e, f) 4TA-48 de SPIONs(-APTES).

A.3.2 Morfología de SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA

En la Fig. A.9 se presenta la imagen TEM de la muestra 15TADGC; observándose que las nanopartículas magnéticas están aglomeradas y envueltas por una capa orgánica; atribuida tanto al APTES como al DTPA.

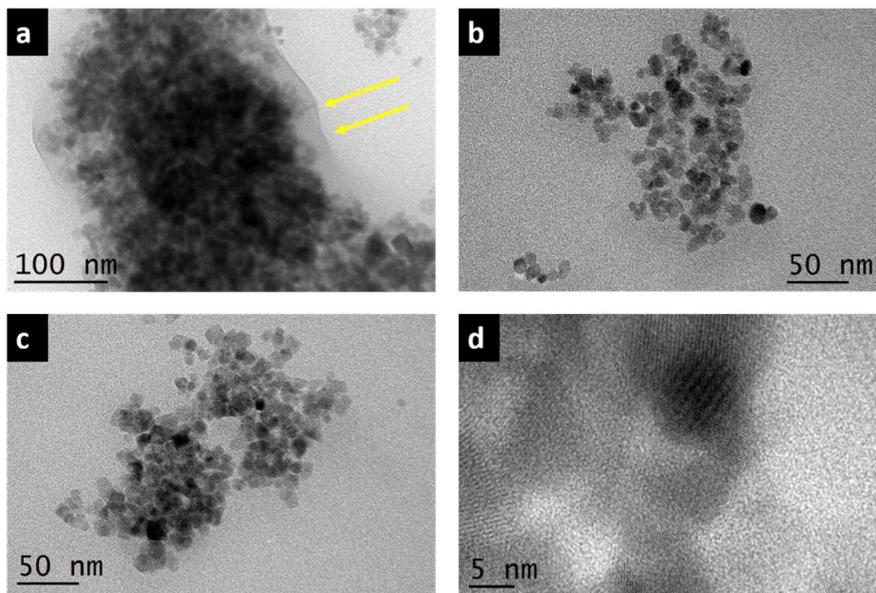


Figura A.9 Imágenes TEM de la nanoestructura SPIONs(-APTES) @Gd-DTPA (15TADGC).

A.4 Caracterización de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA (Método 2)

A.4.1 AFM/MFM de SPIONs(-NH₂)

Para analizar con mayor detalle las propiedades magnéticas de las SPIONs(-NH₂), se utilizó MFM; en un área escaneada de 300 x 300 nm, con una altura de escaneo de 0-18.605 y en modo “lift”, Fig. A.10. Las mediciones se efectuaron sin la presencia de un campo magnético, H=0, Fig. A.10(a), bajo un campo magnético aplicado, -12 kOe < H < 12 kOe, Fig. A.10(b), y al removerse el campo magnético, H=0, Fig. A.10(c). Cuando se aplica el campo magnético, se observa la orientación de los dominios magnéticos hacia la dirección del campo aplicado. Una vez removido el campo magnético, se tiene de nuevo una dirección aleatoria de los dominios magnéticos. Este efecto es una consecuencia del comportamiento superparamagnético, observado en la curva de magnetización.

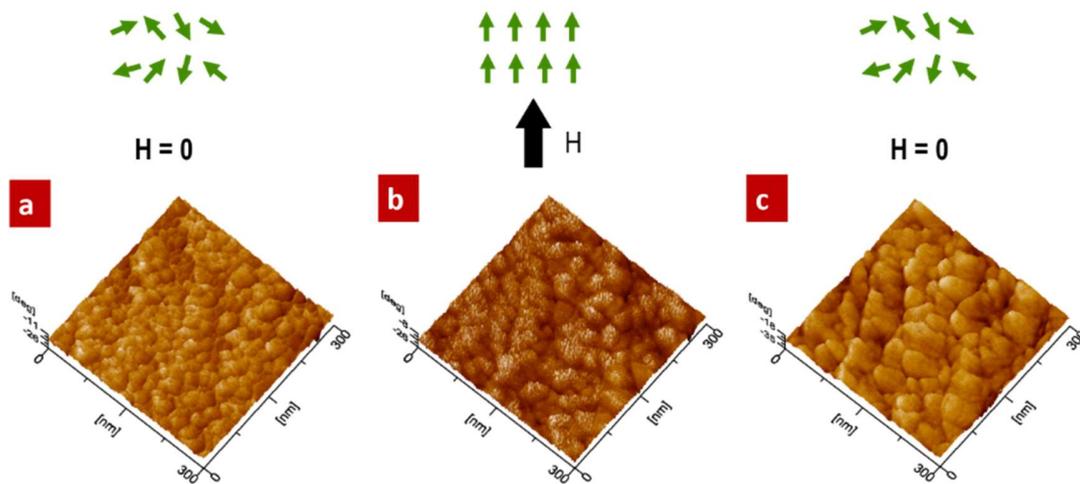


Figura A.10 Interacciones de los dominios magnéticos de las SPIONs(-NH₂).

Del análisis anterior de MFM, específicamente de la saturación de los dominios magnéticos se seleccionó un área de 50 x 50 nm. En la imagen 3D, Fig. A.11, aparecen los dominios magnéticos orientados al campo aplicado con una naturaleza uniaxial. El tamaño promedio de los dominios magnéticos se calculó en 1.17 nm en una sección transversal de 14 nm.

En la imagen 3D de AFM, Fig. A.12, se observan partículas con una forma esférica y una buena monodispersidad, lo cual va de acuerdo con lo observado en TEM. La medición se realizó en modo “tapping”, escaneando un área de 300 x 300 nm con un perfil MRS de 26.3 nm. En el perfil de la sección transversal se estimó el tamaño promedio de partícula, con valor de 17.4 nm.

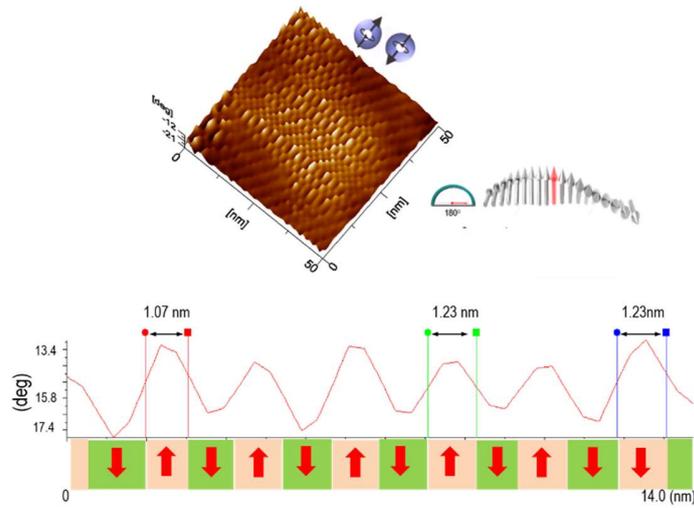


Figura A.11 Dominios magnéticos en un área seleccionada y su perfil a través de una dirección transversal de las SPIONs(-NH₂).

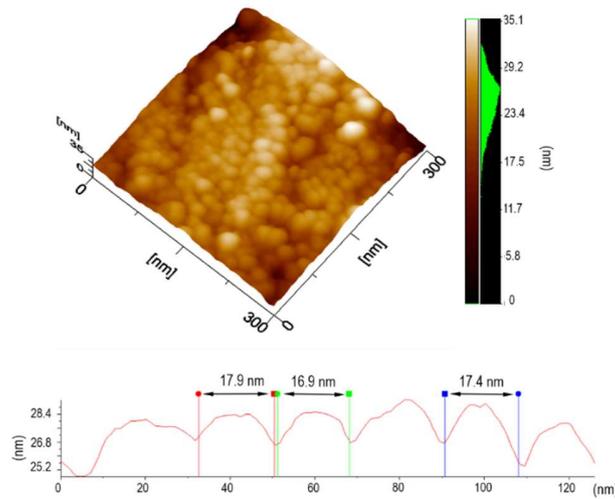


Figura A.12 Imagen en 3D y perfil a lo largo de una dirección transversal de las SPIONs(NH₂).

A.4.2 Propiedades estructurales, magnéticas y morfología de las muestras SPIONs(-NH₂)@DTPA

Los patrones de DRX de las muestras de SPIONs(-NH₂)@DTPA, Fig. A.13, corresponden al patrón reportado para la fcc de espínela inversa, Fe₃O₄. No se observan picos de difracción que correspondan a alguna otra fase como la hematita (α -Fe₂O₃, PDF #06-0502). La disminución de a_0 con respecto al valor de SPIONs(-NH₂) representa una oxidación superficial, Tabla A.5.

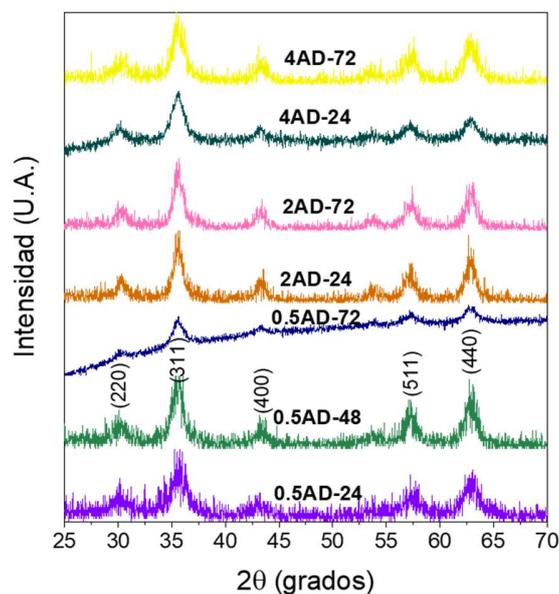


Figura A.13 Patrón de XRD de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@DTPA.

Tabla A.5 Propiedades estructurales de las diversas nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@DTPA.

Muestra	hkl	2θ	FWHM	a ₀ (Å)	D (nm)
0.5AD-24	311	35.657	1.286	8.344	6.17
0.5AD-48	311	35.660	1.006	8.343	7.89
0.5AD-72	311	35.731	1.006	8.327	7.89
2AD-24	311	35.660	0.863	8.343	9.20
2AD-72	311	35.531	0.938	8.373	8.46
4AD-24	311	35.564	1.084	8.365	7.32
4AD-72	311	35.554	1.136	8.367	6.99

La presencia del DTPA en la superficie de las NPMs se representa por la banda de transmitancia a 1632 cm⁻¹, que se deben a la torsión del enlace C=O del COOH, Fig. A.14, [75]. La banda a 1398 cm⁻¹ también se atribuye a la vibración de los grupos carboxilos del DTPA [76]. A 1530 cm⁻¹ se presenta la banda de amida II, la presencia de esta banda sugiere que el DTPA está enlazado covalentemente a la superficie de las SPIONs(-NH₂), por medio de la formación de un enlace amida, entre la amina que se encuentra SPIONs(-NH₂) y los grupos carboxilos del DTPA [65, 75]. Alrededor de 1000 cm⁻¹ se siguen observando las bandas de vibración de estiramiento de C-N y C-O; que aparecen en SPIONs(-NH₂), pertenecientes a 3-amino-1-propanol. Al conjugarse el DTPA en la superficie de las nanopartículas recubiertas, la banda de la formación de la magnetita sufre un corrimiento a 574 cm⁻¹; al igual que un ensanchamiento, lo que permite observar la aparición de un pico en 628 cm⁻¹. Estos efectos se deben a la presencia de la oxidación de la superficie de las NPMs, lo cual indica dos fases de óxido de hierro, Fe₃O₄ y γ-Fe₂O₃, Fig. A.14.

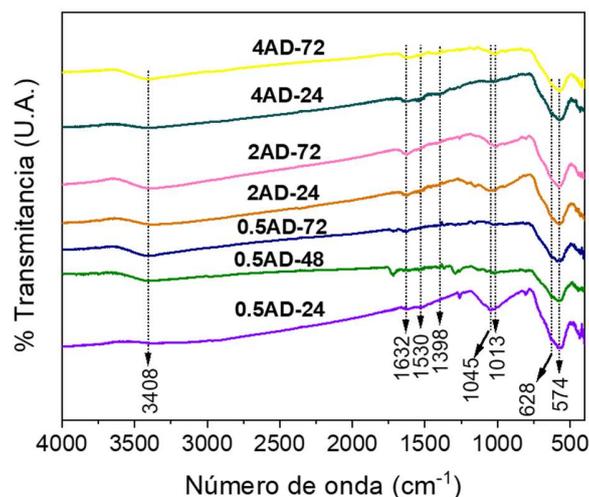


Figura A.14 Espectros FTIR de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@DTPA.

El DTPA está compuesto por cinco grupos carboxilos y 3 nitrógenos, los cuales se utilizarán posteriormente para anclar el gadolinio en la superficie de las nanopartículas magnéticas. Por lo tanto, es importante saber que concentración de estos elementos del DTPA están presentes en la superficie de SPIONs(-NH₂) por medio de XPS, Fig. A.15. En cada uno de los espectros aparecen las bandas de energía de enlace: Fe (3p_{3/2}), O (1s), Fe (2p_{3/2}) y Fe (2p_{1/2}) a 55.2, 530.2, 710.8 y 724.4 eV, respectivamente. También, se presenta C (1s) a 284.08 eV; el cual puede deberse al 3-amino-1-propanol o al DTPA. La banda de energía de enlace de N (1s) no aparece en los espectros, pero en la composición elemental (calculada a través del software CasaXPS), se exhibe un porcentaje atómico para este elemento, Tabla A.6. En la mayoría de las muestras se tiene un aumento en el porcentaje atómico de O y N, en comparación con lo obtenido en SPIONs(-NH₂). Este incremento se debe a la presencia del DTPA en la superficie de las nanopartículas magnéticas.

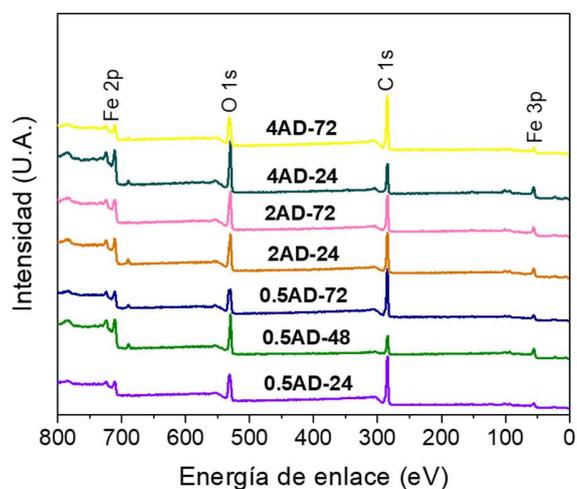


Figura A.15 Espectros XPS de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@DTPA.

Tabla A.6 Composición elemental de las nanoestructuras de SPIONs-NH₂@DTPA.

Muestra	% At			
	Fe	O	C	N
0.5AD-24	6.46	19.14	74.40	-
0.5AD-48	6.72	20.10	72.975	0.205
0.5AD-72	7.66	20.63	71.40	0.31
2AD-24	11.09	25.29	63.28	0.34
2AD-72	12.09	27.26	60.38	0.27
4AD-24	16.47	32.99	50.45	0.09
4AD-72	5.94	19.38	74.68	-

A.4.3 AFM/MFM de SPIONs(-NH₂)@DTPA

Como consecuencia a los resultados obtenidos, se prosiguió con un estudio más profundo de las propiedades magnéticas por medio de AFM, solo para la nanoestructura 2AD-48. La medición se llevó a cabo en un área escaneada de 300 x 300 nm, con una altura de escaneo de 0-18.605 y en modo “lift”, Fig. A.16. Las mediciones se efectuaron sin la presencia de un campo magnético, $H=0$, Fig. A.16(a), bajo un campo magnético aplicado, $-12 \text{ kOe} < H < 12 \text{ kOe}$, Fig. A.16(b), y al removerse el campo magnético, $H=0$, Fig. A.16(c). Cuando se aplica el campo magnético, se observan menos dominios magnéticos orientados en 2AD-48, en comparación con los observados en SPIONs-NH₂. Esta disminución se debe a la obstrucción del compuesto orgánico DTPA a la señal magnética del núcleo de óxido de hierro de las SPIONs-NH₂.

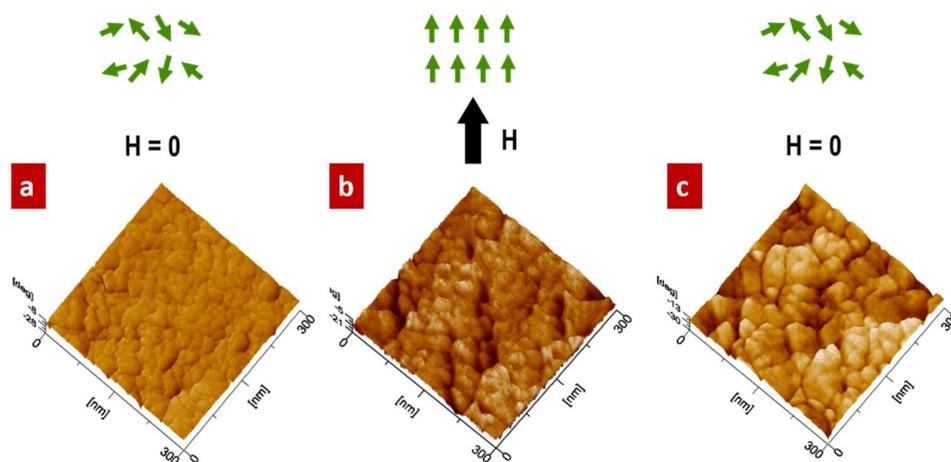


Figura A.16 Interacciones de los dominios magnéticos de SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48).

Del análisis anterior de MFM, específicamente de la saturación de los dominios magnéticos se seleccionó un área de 50 x 50 nm. En las imágenes 3D, Fig. A.17, aparecen dominios magnéticos orientados al campo aplicado. Los dominios magnéticos presentan una naturaleza

uniaxial. El tamaño promedio de los dominios magnéticos se calculó en 1.18 nm, en una sección transversal de 14 nm, muy similar a lo calculado en las SPIONs(NH₂).

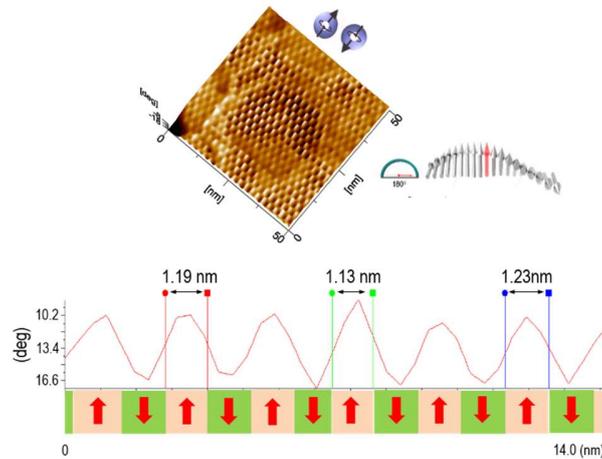


Figura A.17 Dominios magnéticos en un área seleccionada y su perfil a través de una dirección transversal de SPIONs(-NH₂)@DTPA (2AD-48).

En el análisis de la morfología también se recurrió a AFM, en modo “tapping”, escaneando un área de 300 x 300 nm con un perfil MRS de 29.55 nm, Fig. A.18. En la imagen 3D se observan partículas con una forma esférica y una buena monodispersidad, lo cual va de acuerdo con lo observado en TEM. En las imágenes, se distinguen muy bien las fronteras y los núcleos de cada partícula. En el perfil de la sección transversal se estimó el tamaño promedio de partícula, con un valor de 21.26 nm.

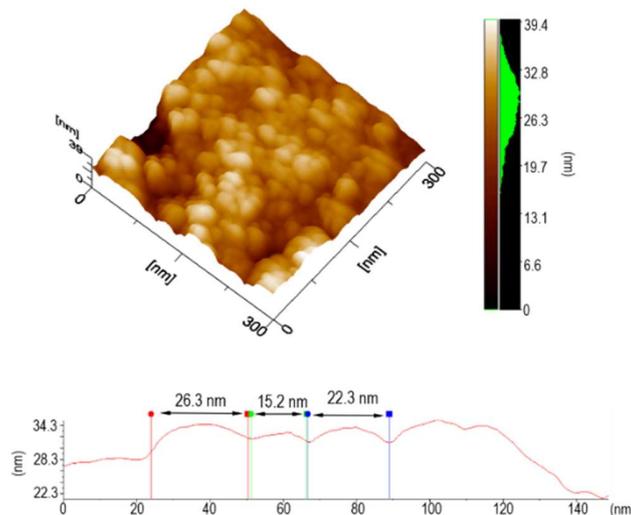


Figura A.18 Imagen en 3D y perfil a lo largo de una dirección transversal de SPIONs(NH₂)@DTPA (2AD-48).

A.4.4 Propiedades estructurales y magnéticas de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA

En la Fig. A.19(a) se exhibe el difractograma de la nanoestructura 50ADGC de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA; en el cual se observa que los picos difractados corresponde a la estructura de Fe₃O₄. No se observa la presencia de otras fases como hematita o alguna otra compuesta por gadolinio. En la Tabla A.7 aparecen las propiedades estructurales.

El espectro FTIR, Fig. A.19(b), contiene dos señales, 1626 y 1595 cm⁻¹, que corresponden a los estiramientos asimétricos y simétricos de los grupos carboxilos del DTPA al coordinarse con el Gd³⁺ [75]. La presencia de esta banda indica el enlace del gadolinio a la superficie de las nanoestructuras. Las bandas a 1398 y 1230 cm⁻¹ se deben a la presencia del DTPA, a las vibraciones de sus grupos carboxilos y de estiramiento de C-N, respectivamente [68, 76]. La presencia de GdCl₃•6H₂O, también se observa, a 1156 y 640 cm⁻¹ que son las vibraciones de flexión del enlace H-O-H. ¹ Se siguen apreciando las bandas pertenecientes a las fases del óxido de hierro, 628 y 566 cm⁻¹.

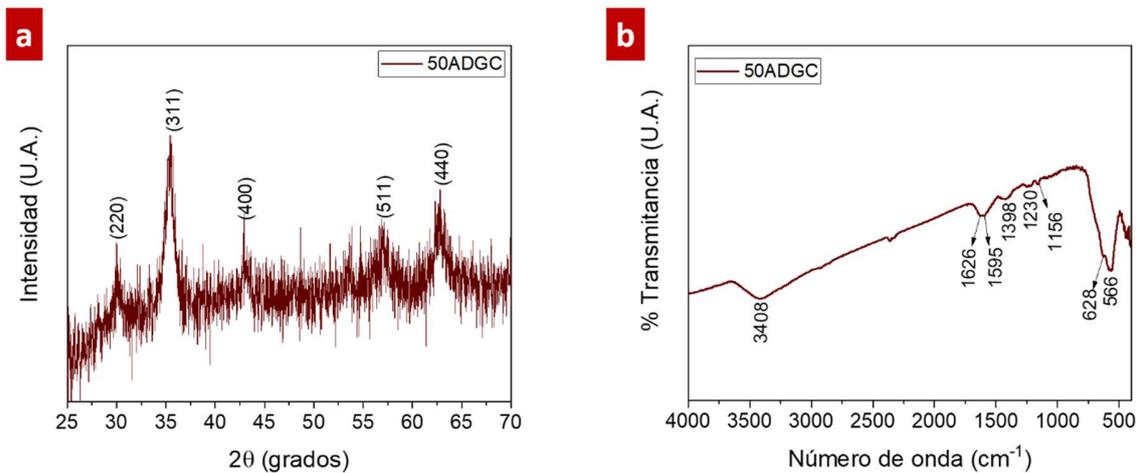


Figura A.19 (a) Patrón de XRD y (b) espectro FTIR de la nanoestructura 50ADGC de SPIONs(NH₂)@Gd-DTPA.

Tabla A.7 Propiedades estructurales de de la nanoestructura 50ADGC de SPIONs(NH₂)@Gd-DTPA.

Muestra	hkl	2θ	FWHM	a ₀ (Å)	D (nm)
50ADGC	311	35.594	0.885	8.358	8.97

En la curva se presenta un lazo de histéresis cerrado, Fig. A.20, como consecuencia del comportamiento superparamagnético proveniente del núcleo de óxido de hierro de la nanoestructura. Al ser enlazado el gadolinio a la nanoestructura SPIONs(-NH₂)@DTPA, se adhiere una capa orgánica más alrededor de las NPMs de óxido de hierro; por lo tanto, se tiene una disminución en los valores de la magnetización de saturación, Tabla A.8.

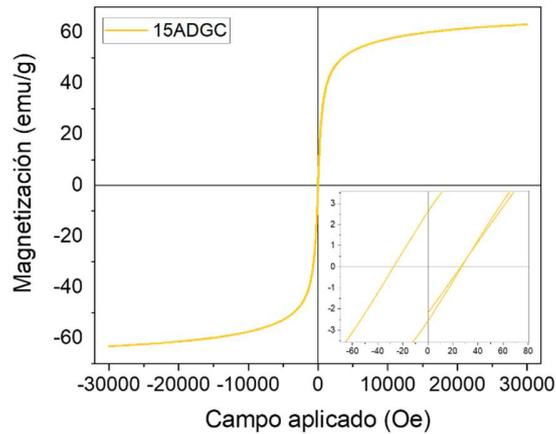


Figura A.20 Curva de magnetización a temperatura ambiente de la nanoestructura 15ADGC de SPIONs(NH₂)@Gd-DTPA.

Tabla A.8 Propiedades magnéticas a temperatura ambiente de la nanoestructura 15ADGC de SPIONs(NH₂)@Gd-DTPA.

Muestra	M _S (emu/g)	M _R (emu/g)	H _C (Oe)
15AciDGC	63.11	2.59	27.55

A.5 Ensayo de citotoxicidad

En las Fig. A.21 y A.22 se presentan las actividades citotóxicas de las muestras SPIONs(-NH₂) y SPIONs(-NH₂)@DTPA en las células cancerígenas MCF-7 y PC-3. En el caso de MCF-7 se observa que el acoplamiento de DTPA a la superficie de SPIONs(-NH₂), aumenta la citotoxicidad de la nanoestructura, debido a que a la concentración de 10 m/mL comienza a observarse una respuesta citotóxica.

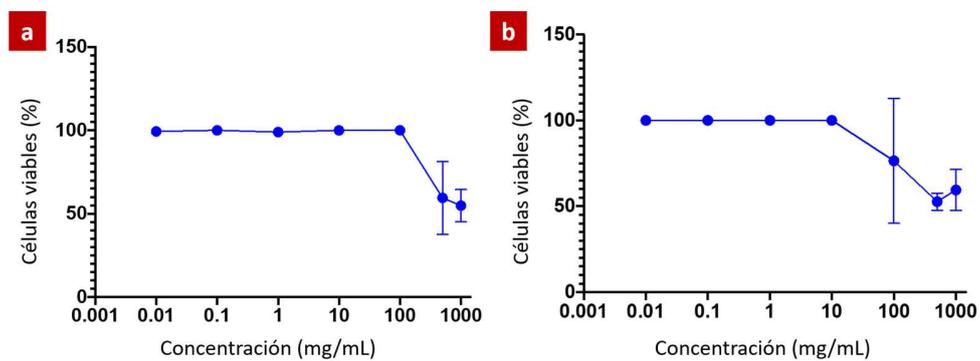


Figura A.21 Actividad citotóxica de (a) SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-NH₂)@DTPA (muestra 2AD-48) en células MCF-7.

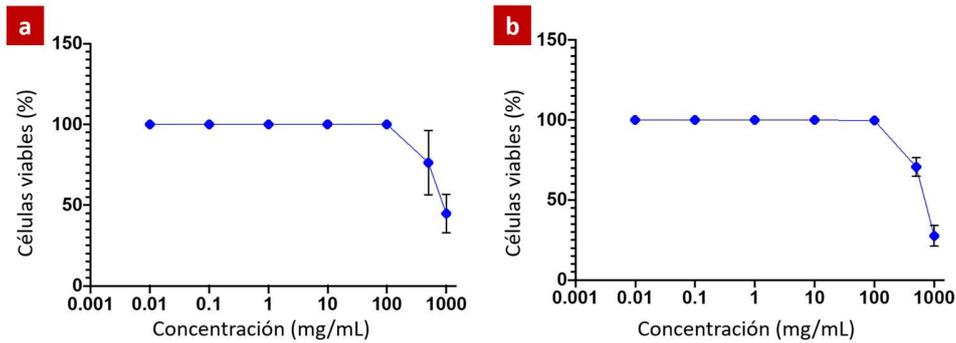


Figura A.22 Actividad citotóxica de (a) SPIONs(-NH₂), y (b) SPIONs(-NH₂)@DTPA (muestra 2AD-48) en células PC-3.

Las respuestas citotóxicas de SPIONs(desnudas), SPIONs(-APTES) y SPIONs(-APTES)@DTPA se analiza en las Fig. A.23 y A.24. La viabilidad celular en las líneas MCF-7 y PC-3 se mantiene al 100% para cada una de las muestras, en concentraciones de 0.01-100 mg/mL. En la máxima concentración (1000 mg/mL) disminuye notablemente, alrededor del 70% para MCF-7 y del 85% para PC-3.

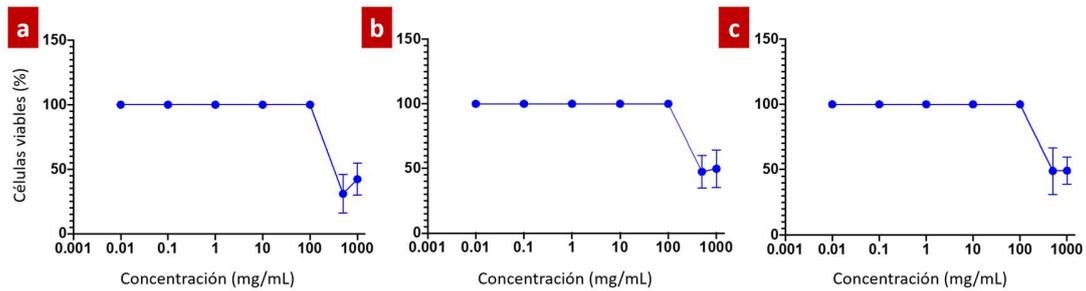


Figura A.23 Actividad citotóxica de (a) SPIONs(no funcionalizadas), (b) SPIONs(-APTES) (muestra 2TA-48), y (c) SPIONs(-APTES)@DTPA (muestra 2TAD) en células MCF-7.

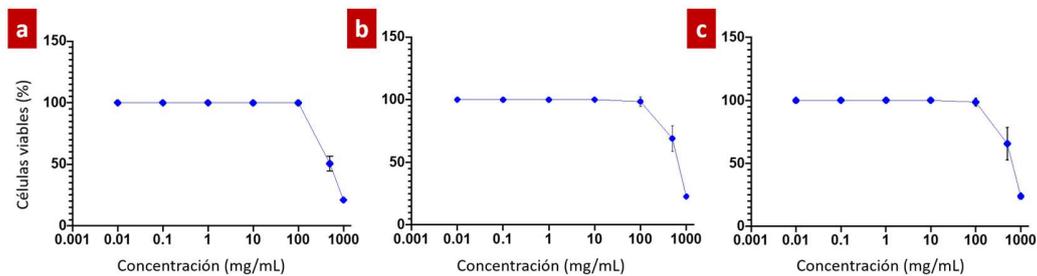


Figura A.24 Actividad citotóxica de (a) SPIONs(desnudas), (b) SPIONs(-APTES) (muestra 2TA-48), y (c) SPIONs(-APTES)@DTPA (muestra 2TAD) en células PC-3.

A.6 Funcionalización de las nanoestructuras SPIONs(-NH₂)@DTPA y SPIONs(-APTES)@DTPA utilizando Gd₂O₃

Una solución acuosa de Gd₂O₃ fue preparada, en la cual se varió la concentración del precursor de gadolinio utilizado, Tabla A.9. Después, la solución se agregó por goteo a la muestras 2AD-48 de SPIONs(-NH₂)@DTPA, previamente dispersada en agua destilada. La reacción se mantuvo con una fuerte agitación, bajo una atmósfera de Ar y a una temperatura ambiente por 24 horas. Se obtuvieron 7 muestras distintas, de acuerdo con la concentración del óxido de gadolinio utilizado.

Tabla A.9 Variación de la concentración de Gd₂O₃.

mM(Gd ₂ O ₃)	Muestra
60	100ADG
30	50ADG
17	25ADG
10	15ADG
6	10ADG
3	5ADG
1.7	2.5ADG

Los productos resultantes se precipitaron, lavaron y liofilizaron; para posteriormente caracterizarlos.

Los patrones de DRX de las muestras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA, utilizando Gd₂O₃ como precursor, aparecen en la Fig. A.25. Los cálculos obtenidos de sus propiedades estructurales a través del programa Origin se muestran en la Tabla A.10. En los difractogramas de 100ADG, 50ADG, 25ADG, 15ADG y 10ADG los planos difractados; (222), (400), (411), (440) y (622) se indexan a la estructura cúbica de Gd₂O₃ (JCPDS No. 86-2477), con un parámetro de red de 10.809 Å. No se muestran picos adicionales, pertenecientes a la magnetita o hematita. La ausencia de reflexiones pertenecientes a las fases del óxido de hierro puede deberse a que el gadolinio se encuentra decorando la superficie de las nanopartículas; es decir, no está enlazado al DTPA. Por lo tanto, la intensidad de los picos de Gd₂O₃ sobrepasan a los del Fe y O, debido al efecto del átomo pesado de Gd [81]. Conforme la concentración de Gd₂O₃ presente en las nanoestructuras va disminuyendo, van apareciendo los picos de difracción que corresponde al óxido de hierro. A partir de 25ADG se comienza a apreciar los picos de mayor intensidad que corresponden a Fe₃O₄; (311) y (440). De hecho, en 5ADG y 2.5ADG, solo aparecen los picos de difracción que corresponden a la estructura fcc del óxido de hierro. El parámetro de red calculado para estas dos nanoestructuras es mayor a lo reportado para Fe₃O₄ (8.396 Å), lo cual puede deberse a la incorporación de iones de Gd³⁺ en la estructura de las nanopartículas de óxido de hierro.

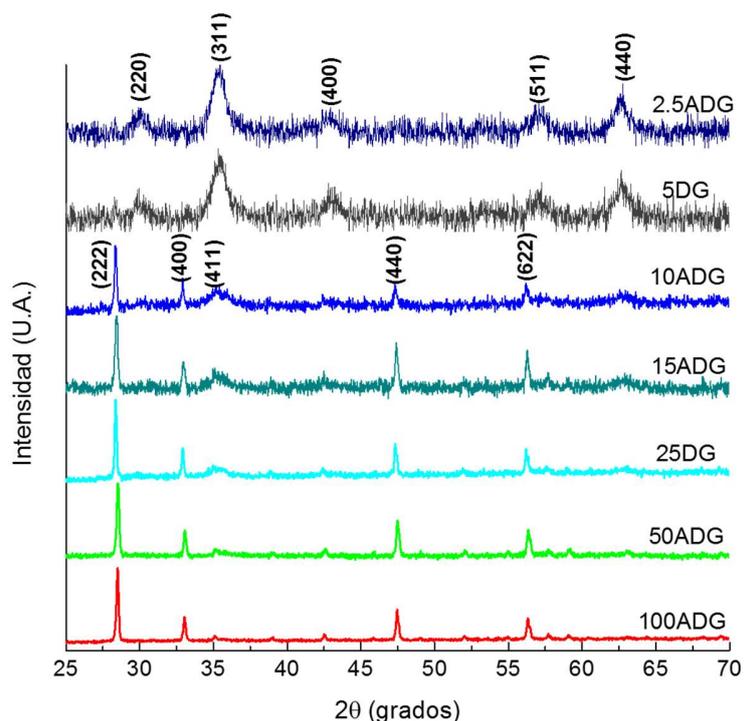


Figura A.25 Patrones de XRD de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA con Gd₂O₃.

Tabla A.10 Propiedades estructurales de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA con Gd₂O₃.

Muestra	hkl	2θ	FWHM	a ₀ (Å)
100ADG	222	28.50007	0.18088	10.836
50ADG	222	28.52963	0.19841	10.825
25ADG	222	28.36666	0.12436	10.886
15ADG	222	28.43185	0.22093	10.861
10ADG	222	28.37384	0.18207	10.883
5ADG	311	35.42449	1.06624	8.394
2.5ADG	311	35.35508	1.0611	8.410

En los espectros FTIR, Fig. A.26, aparece la banda que corresponde a la torsión del enlace C=O del COOH en la forma de carboxilato, a 1631 cm⁻¹ [75]. Las bandas a 1518 y 1396 cm⁻¹ se deben a Gd₂O₃. Estas bandas desaparecen conforme la cantidad de gadolinio disminuye, estos resultados concuerdan con lo observado en DRX. Las bandas a 1223 y 1152 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de estiramiento de C-N y C-O, del DTPA y HO(CH₂)₃NH₂, respectivamente. En la banda ancha de transmitancia entre 600 y 500 cm⁻¹, se localizan dos picos. El pico a 634 cm⁻¹ se debe a la fase de maghemita [54], y 552 cm⁻¹ se asocia a la vibración del enlace del Gd-O [82]. En todos los espectros analizados están ausentes las bandas 1626 y 1595 cm⁻¹, que pertenecen a las vibraciones de estiramiento del enlace del Gd con DTPA. Por lo tanto, el gadolinio no está enlazado al DTPA, solo se encuentra “decorando” la superficie de las nanopartículas magnéticas.

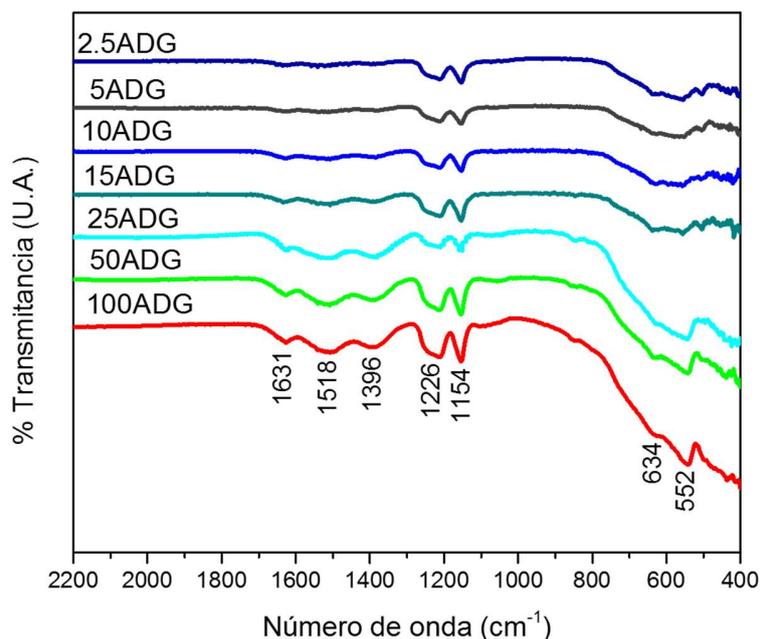


Figura A.26 Espectros FTIR de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA con Gd₂O₃.

En los espectros de XPS, Fig. A.27, de cada muestra, se visualizan los picos característicos de la fase del óxido de hierro Fe (3p_{3/2}), O (1s), Fe (2p_{3/2}) y Fe (2p_{1/2}) a 55.2, 530.2, 710.8 y 724.4 eV [56]. También, se ilustra la presencia del ion de Gd³⁺ por medio de los picos de fotoelectrones de 143 eV para Gd 4d; y 1186 y 1219 eV para Gd 3d_{5/2} y Gd 3d_{3/2}, respectivamente [61]. En la composición elemental superficial de cada muestra, que fue calculada a través del programa CasaXPS, existe una disminución de Fe y O, y un aumento en Gd; conforme la cantidad de óxido de gadolinio aumenta, Tabla A.11.

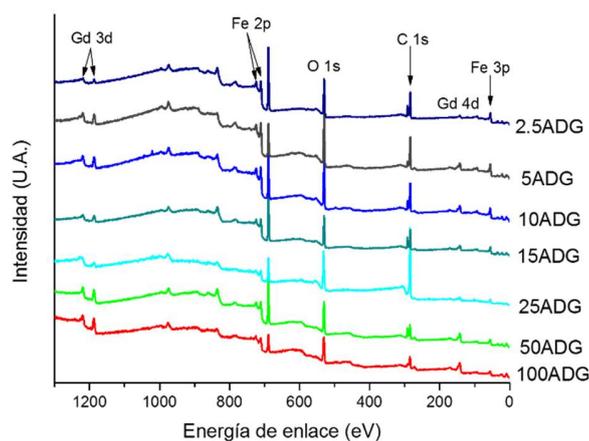


Figura A.27 Espectros XPS de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA con Gd₂O₃.

Tabla A.11 Composición elemental de las nanoestructuras de SPIONs(-NH₂)@Gd-DTPA con Gd₂O₃.

Muestra	% At				
	Fe	O	C	N	Gd
100ADG	15.94	33.31	43.51	0.25	7.00
50ADG	13.49	29.84	49.86	0.67	6.14
25ADG	3.91	18.84	75.68	0.09	1.48
15ADG	24.94	30.70	40.09	0.48	3.78
10ADG	24.43	31.70	40.13	0.40	3.34
5ADG	25.84	31.39	39.08	0.56	3.12
2.5ADG	26.69	29.33	43.78	-	0.20

En la Fig. A.28 se exhibe el análisis de las propiedades magnéticas de las muestras 25ADG, 15ADG y 10ADG. La respuesta magnética disminuye notablemente al utilizar como precursor el óxido de gadolinio, lo cual se atribuye a la formación de una barrera diamagnética del Gd³⁺ alrededor de SPIONs, Tabla A.12.

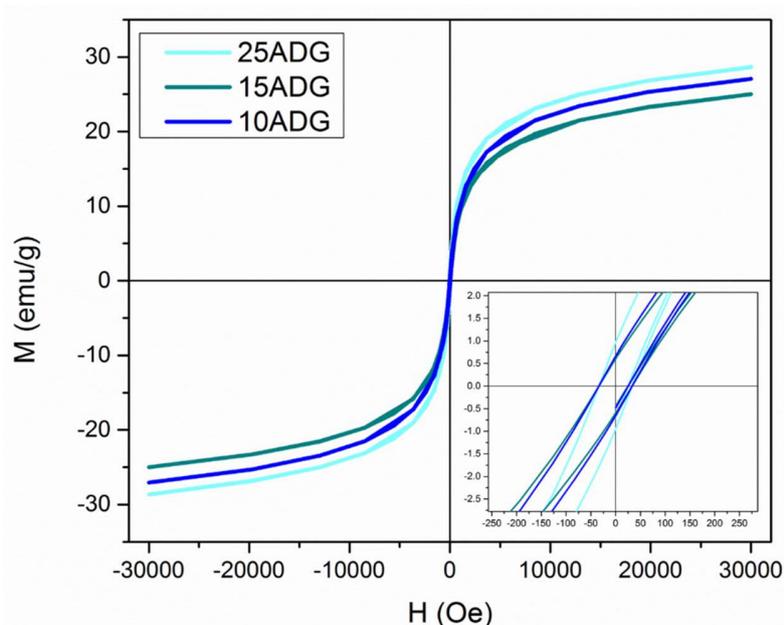


Figura A.28 Curvas de magnetización a temperatura ambiente de las nanoestructuras 10ADG, 15ADG y 25ADG.

Tabla A.12 Propiedades magnéticas a temperatura ambiente de las nanoestructuras 10ADG, 15ADG y 25ADG.

Muestra	M _S (emu/g)	M _R (emu/g)	H _C (Oe)
25ADG	28.64	0.8891	35.71
15ADG	25.01	0.5604	35.91
10ADG	27.05	0.6104	35.79

A.7 Acoplamiento del Gd a la nanoestructura SPIONs(-APTES)@DTPA, utilizando Gd₂O₃

Los picos de difracción de las nanoestructuras 15TADG y 25TADG, Fig. A.29, corresponden a dos fases distintas, al igual que los observados en las nanoestructuras ADG. Estas fases presentes son del óxido de hierro y del óxido de gadolinio.

Los espectros FTIR, Fig. A.30, son muy similares a los obtenidos en las nanoestructuras ADG. En ellos aparece la banda característica de la torsión del enlace C=O del COOH en la forma de carboxilato, a 1631 cm⁻¹ [75]. Las bandas entre 1220 y 1213 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de estiramiento de C-N del DTPA; y a 1152 cm⁻¹ del C-O del cubrimiento de las nanopartículas magnéticas con HO(CH₂)₃NH₂. Las bandas anchas de transmitancia que se observan en cada muestra pertenecen a las fases del óxido de hierro presentes; y también, a la vibración del enlace del Gd-O [82]. En ambos espectros están ausentes las bandas características de la conjugación del Gd al DTPA; por lo tanto, en estas muestras el gadolinio también está “decorando” la superficie de las nanopartículas magnéticas.

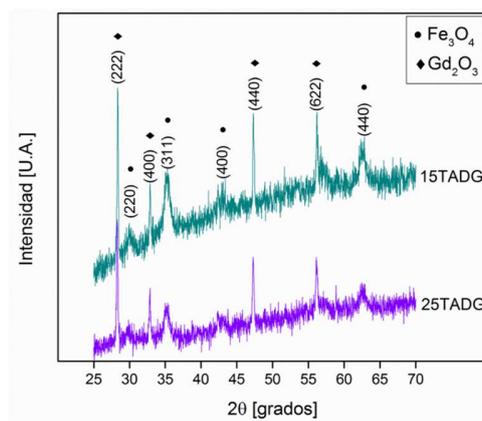


Figura A.29 Patrones de XRD de las nanoestructuras de SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA, con Gd₂O₃.

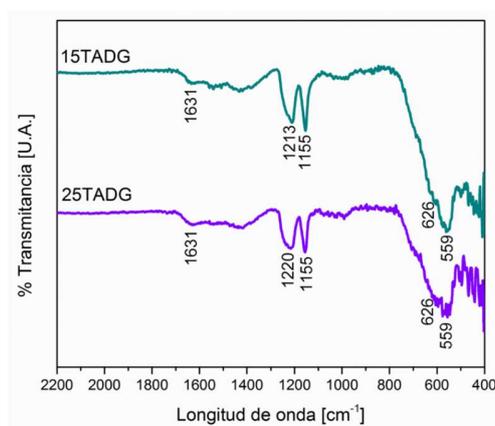


Figura A.30 Espectros FTIR de las nanoestructuras de SPIONs(-APTES)@Gd-DTPA, con Gd₂O₃.

ANEXO B.

TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

B.1. Difracción de Rayos-X [83]

La difracción de rayos x es una técnica analítica no destructiva que se emplea para identificar las fases cristalinas presentes en un material y detectar propiedades estructurales como; defectos estructurales, tamaño de grano, composición de fase y orientación preferencial. Además, permite diferencias entre formas alotrópicas e isotrópicas.

Los rayos x son radiación electromagnética de la misma naturaleza que la luz, pero de longitud de onda mucho más corta. Los rayos x usados en difracción tienen longitudes de onda en el rango 0.5-2.5 Å. Estos se producen cuando una partícula cargada eléctricamente con suficiente energía cinética es frenada rápidamente. Los electrones son las partículas utilizadas habitualmente y la radiación se obtiene en un dispositivo conocido como tubo de rayos. La interacción de los rayos x con la materia ocurre mediante dos procesos:

- Algunos fotones del haz incidente son desviados sin pérdida de energía, constituyen la radiación dispersada exactamente con la misma λ que la radiación incidente. Este es lo que origina el fenómeno de la difracción.
- Los fotones pueden sufrir una serie de choques inelásticos al incidir sobre un blanco y su energía incrementa la temperatura de la muestra o da lugar al fenómeno de fluorescencia.

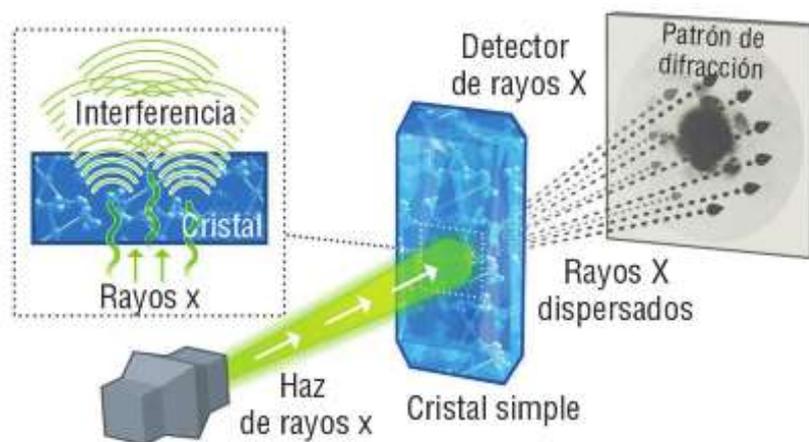


Figura B.1 Fenómeno de XRD.

La difracción es esencialmente un fenómeno de dispersión. Los átomos dispersan la radiación incidente en todas direcciones, y en algunas direcciones los rayos dispersados estarán completamente en fase y por tanto se refuerzan mutuamente para formar rayos difractados. Los rayos dispersados estarán completamente en fase si esa diferencia de fase es igual a un número entero n de longitudes de onda:

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

Esta relación se conoce como Ley de Bragg y establece la condición esencial que debe cumplirse para que ocurra la difracción.

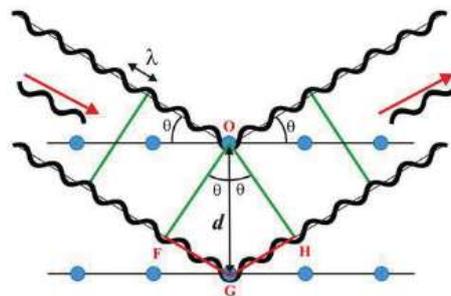


Figura B.2 Interferencia constructiva.

El difractómetro de polvo usa un detector de rayos x, un contador Geiger o un detector de centelleo. En la geometría Bragg-Brentano el tubo de rayos x y el detector se colocan a igual distancia y ángulo de la superficie de la muestra. El ángulo 2θ se varía de forma continua.

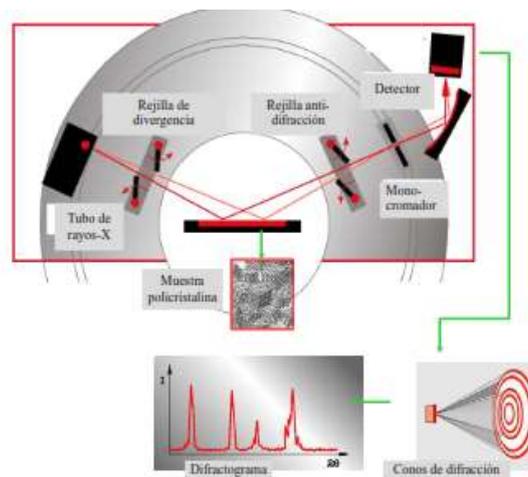


Figura B.3 Esquema del proceso de difracción de un policristal, en un equipo con geometría Bragg-Brentano.

El tubo de rayos x, Fig. B.4, consiste en un cátodo con un filamento de W que emite e^- que son acelerados bajo vacío por un alto voltaje aplicado a lo largo del tubo (del orden de 30kV). El haz de electrones incide sobre un blanco metálico llamado ánodo (habitualmente Cu o Mo y menos frecuentemente Cr, Fe o Ag), emitiendo los rayos x.

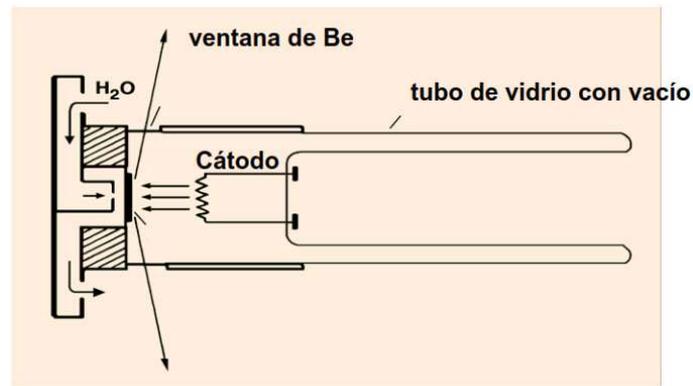


Figura B.4 Tubo de rayos x.

B.2 Espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR, siglas en inglés) [84]

La espectroscopía infrarroja se utiliza para observar espectros vibracionales. Una sustancia definida puede identificarse por su espectro infrarrojo. Estos espectros pueden ser considerados como las huellas digitales de dicha sustancia.

Los átomos que constituyen a una molécula están unidos entre sí por fuerzas de origen electrostático, que semejan uniones elásticas y, en consecuencia, sus movimientos son periódicos o cuasiperiódicos. Todos los movimientos relativos de los átomos en una molécula son en realidad la superposición de los llamados modos normales de vibración, en los cuales todos los átomos se encuentran vibrando con la misma fase y frecuencia normal. El número de modos normales de vibración define el espectro vibracional de cada molécula. Estos espectros también dependen de las masas de los átomos involucrados, su arreglo geométrico dentro de la molécula, y la "elasticidad" de los enlaces químicos. Las moléculas pueden presentar movimiento traslacional, rotacional y vibracional.

Un espectrómetro por transformada de Fourier consta de tres elementos básicos: una fuente luminosa, un interferómetro de Michelson y un detector.

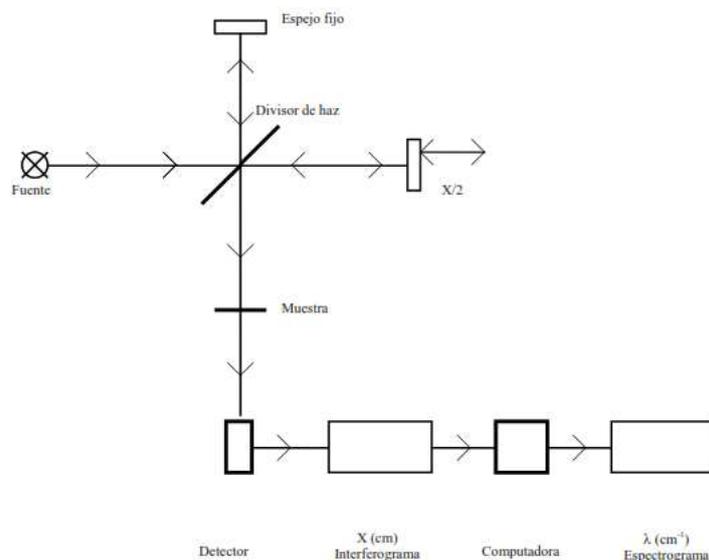


Figura B.5 Diagrama de un espectrómetro por transformada de Fourier.

Su funcionamiento es el siguiente: un haz colimado, proveniente de una fuente que emite en toda la región infrarroja, incide sobre un divisor de haz. El haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno de los cuales incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Los haces son reflejados por ambos espejos y se recombinan al llegar al divisor de haz. Esto da lugar a una interferencia, la cual puede ser constructiva o destructiva dependiendo de la posición relativa del espejo móvil con respecto del espejo fijo. El haz que emite en toda la región infrarroja incide sobre un divisor de haz resultante pasa a través de la muestra, en donde sucede una absorción selectiva de longitudes de onda y, finalmente, llega al detector. La información recabada por el detector se utiliza para obtener el interferograma, el cual es digitalizado. Una computadora desarrolla el cálculo aproximado de la transformada de Fourier del interferograma, debido a que después de digitalizar la información ya no se puede trabajar con variables continuas.

B.3 Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, siglas en inglés)

Es una técnica de análisis superficial limitada a las capas más externas del material, alcanzando una profundidad de hasta 3 nm. El análisis proporciona información sobre la composición elemental, el estado químico de cada elemento, la posición de los átomos con respecto a la estructura cristalina del material y la homogeneidad superficial [85].

La técnica mide la energía cinética de los electrones que son emitidos por un material como consecuencia de haber sido bombardeado por una radiación ionizante o por partículas de alta energía [86]. Su funcionamiento se basa en el efecto fotoeléctrico [87]. El procedimiento consiste en hacer incidir un fotón de rayos-X con energía conocida sobre los átomos situados más superficialmente en la muestra, excitando los electrones de los niveles más profundos.

La energía incidente excede a la energía de enlace y los electrones salen liberados con una energía cinética que es detectada y convertida en una señal digital (espectro). De esta manera, a través de la relación $E_K = h\nu - E_B$, se obtiene información de la energía de enlace de los elementos que componen la superficie, ⁷ donde $h\nu$ es la energía de los fotones, E_K es la energía cinética del fotoelectrón producido y detectada por el analizador, y E_B es la energía de enlace del electrón o fotoelectrón, como se le llama debido al proceso por el que fue liberado [86, 87].

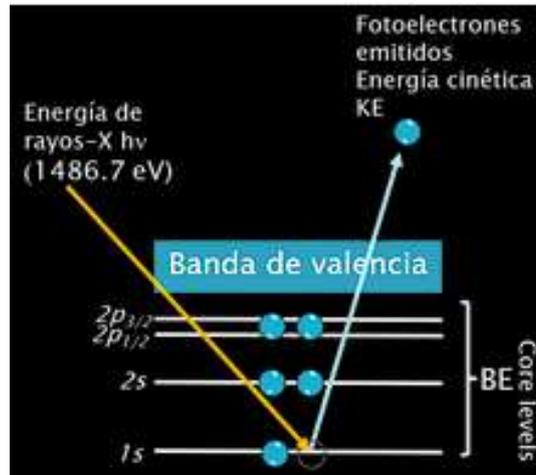


Figura B.6 Diagrama del proceso fotoelectrónico [87].

B.4. Microscopia electrónica (SEM/TEM)

Existen dos tipos de microscopios electrónicos; el microscopio electrónico de barrido (MEB por sus siglas en español o SEM por sus siglas en inglés (Scanning Electron Microscopy)) y el microscopio electrónico de transmisión (MET por sus siglas en español o TEM por sus siglas en inglés (Transmission Electron Microscopy)). Ambos microscopios funcionan con ondas de período más pequeño que las de la luz. Estas “ondas” corresponden a electrones que viajan a alta velocidad. Los electrones acelerados por diferencias de potencial de miles de voltios se comportan como si fueran ondas con un periodo mucho menor a 1 nm [88].

Los microscopios electrónicos tienen una fuente de generación de electrones que funciona a través de un emisor termoiónico, el cual emite electrones a velocidades muy semejantes obteniendo una mayor homogeneidad en la velocidad del haz formado. Esto es de gran utilidad porque se busca que el haz sea lo más monocromático posible para obtener una imagen libre de aberraciones cromáticas. También se busca que el haz sea lo más intenso posible, por lo tanto, se utilizan filamentos de tungsteno para generar el haz. Además, para aumentar la resolución de la imagen, se requiere un haz muy energético. Esto se logra mediante la implementación de lentes electrostáticas o electromagnéticas que sirven para focalizar el haz [13, 89].

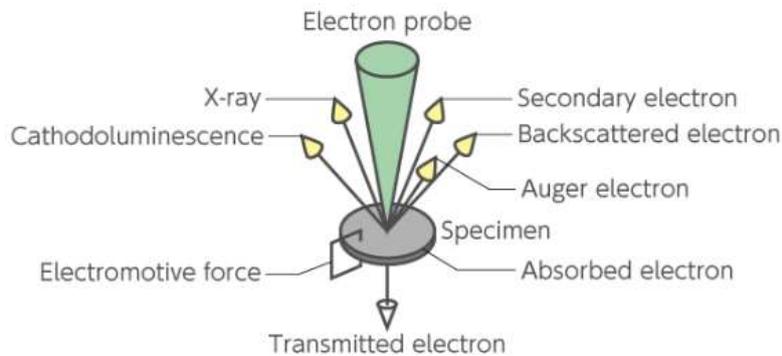


Figura B.7 Señales generadas de la interacción de un haz de electrones de alta energía con una muestra [90].

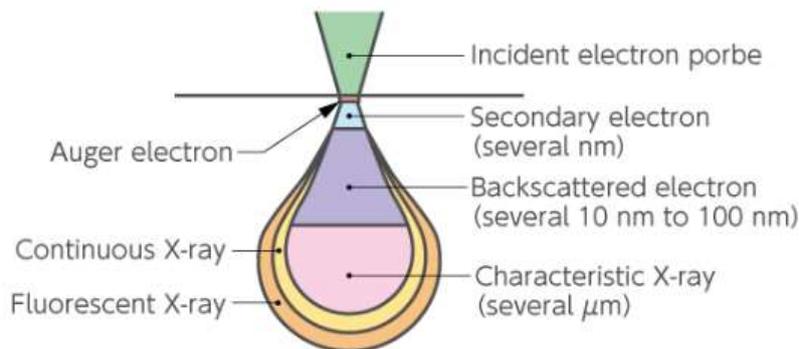


Figura B.8 Profundidad de cada las señales obtenidas de la interacción del haz de electrones con la muestra [90].

La interacción de los electrones con la materia produce una gran variedad de señales, Fig. B.7. Algunas de estas señales proporcionan información química y física de la muestra analizada [90]. El tipo de señales que se obtienen son:

- *Electrones retrodispersados*: Son los que se desvían del haz debido a la dispersión elástica por los átomos de la red, se caracterizan porque sus energías están muy cercanas a las del haz incidente. Estos electrones se utilizan para determinar la topografía de la muestra, y también para detectar zonas de diferente composición en el material [13].
- *Electrones secundarios*: Son originados en la muestra y emitidos como resultado de la excitación atómica de los átomos de la muestra al interactuar con el haz primario. Se caracterizan por tener un espectro de energías comparativamente bajo (< 50 eV) en relación con el haz inicial. También, se utilizan para formar imágenes topográficas de la muestra [13].
- *Electrones absorbidos*: Estos son los electrones que pierden tal cantidad de energía que no pueden salir de la muestra, y solo pueden ser detectados si se colocan

electrodos en la muestra de tal manera que cualquier exceso de carga fluya a tierra. Esta técnica puede ser utilizada para examinar variaciones de la resistividad en juntas semiconductoras [13].

- *Rayos X característicos y electrones Auger*: Son emitidos debido a transiciones de los electrones excitados por el haz primario. De estas señales se mide el perfil de intensidades (en el caso de rayos X) y así determinar la composición y la concentración de elementos químicos que componen la muestra. Como los electrones Auger presentan valores discretos y definidos de energía, también se utilizan para determinar un análisis químico de la muestra [13].
- *Electrones transmitidos*: Son los electrones del haz inicial que logran atravesar la muestra, por lo tanto, recaban información sobre la estructura interna de la misma [13].

B.4.1 Microscopio electrónico de barrido

El funcionamiento de la microscopía electrónica de barrido consiste en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho un vacío de alrededor de 10^{-7} Torr. En la columna, el haz inicial es concentrado por una serie de lentes electromagnéticas (condensadora, objetivo) desde unos 25,000-50,000 nm hasta unos 10 nm. El diámetro del haz disminuye hasta hacerse casi puntual. Al mismo tiempo, la intensidad de corriente se disminuye desde unos 10^{-14} Å hasta unos 10^{-10} - 10^{-12} Å. Esta disminución en la intensidad implica una menor cantidad de electrones primarios. El haz electrónico con estas últimas características es desplazado sobre toda la superficie de la muestra, barriendo la muestra con continuas idas y venidas. Tal funcionamiento del haz se consigue gracias a un sistema de bobinas de barrido situadas en la columna del instrumento [91].

Con ayuda de algunos dispositivos incorporados al SEM se puede obtener información adicional, como a través de los espectrómetros de energía se puede determinar la composición química de la muestra por emisión de rayos X [13].

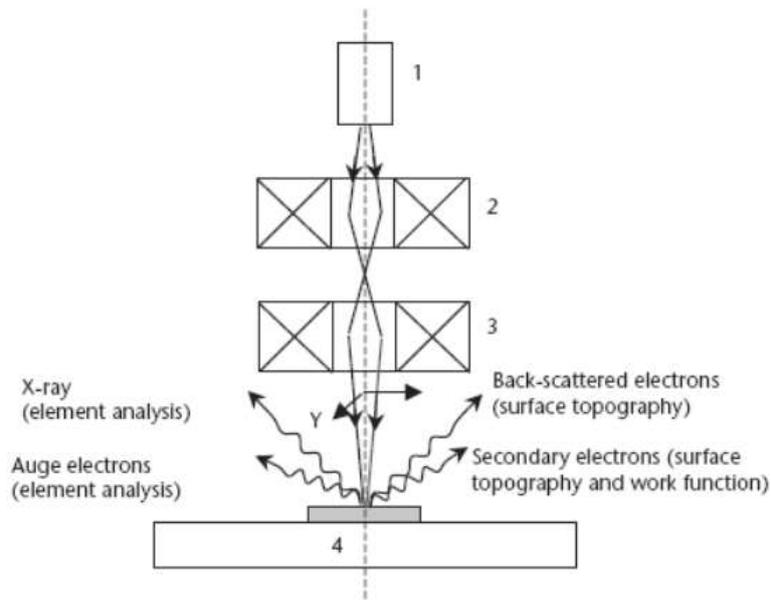


Figura B.9 Esquema del Microscopio electrónico de barrido: (1) cañón de electrones, (2) sistema de enfoque de haz electromagnético, (3) escáner electromagnético, y (4) muestra [13].

B.4.2 Microscopio electrónico de transmisión

El microscopio de transmisión permite diferenciar la morfología de partículas muy pequeñas, en el intervalo de nanómetros. El TEM permite conocer detalles como el espesor relativo de las muestras, la obtención de patrones de difracción, e información química y estructural [88].

El análisis del microscopio electrónico de transmisión consiste en estudiar la parte de los electrones del haz focalizado que logran atravesar la muestra, una parte de los electrones es transmitida y otra parte es difractada con un ángulo dependiente del espaciado interplanar según la Ley de Bragg. A diferencia del SEM, el TEM posee una lente intermedia y una lente proyectora que le permite manipular el haz electrónico según sea el caso. El microscopio cuenta con dos modos de operación: puede producir un patrón de difracción cuando el haz transmitido y el difractado se reúnen en distintos puntos sobre el plano focal, y también pueden producir una imagen enfocando el haz más allá del plano focal en el plano imagen, Fig. B.10, [13].

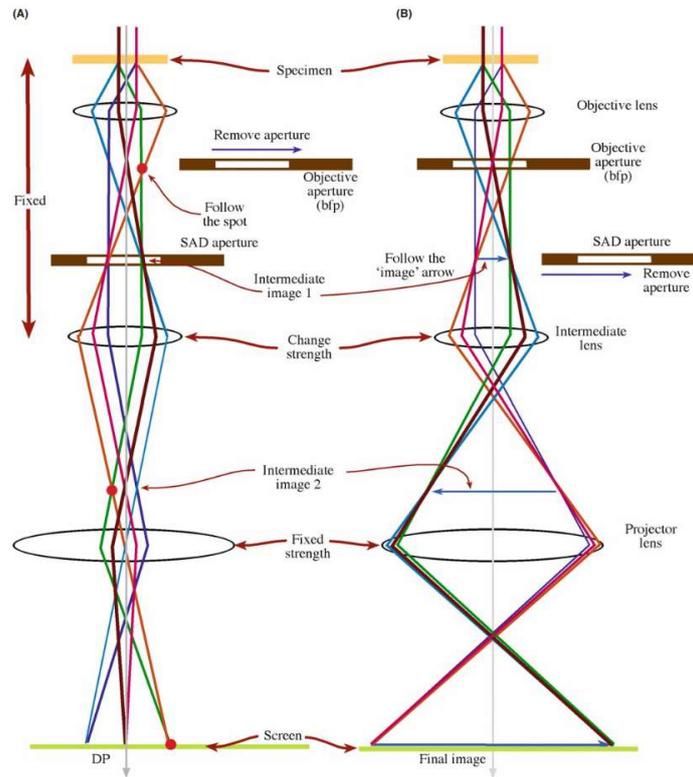


Figura B.10 Los dos modos de operación de un TEM: (A) modo de difracción y (B) modo imagen [89].

B.5. Microscopia de fuerza atómica y de fuerza magnética (AFM/MFM)

El microscopio de fuerza atómica es un instrumento mecano-óptico que forma imágenes de las superficies utilizando una sonda o cantilever (micropalanca), este recorre la muestra haciendo una exploración línea por línea, es decir escanea la muestra en función de la posición generando una imagen. Esta técnica nos permite obtener imágenes topográficas en 3D, hacer mediciones del orden de los nm, detectar fuerzas de nN, hacer mediciones de visco-elasticidad y dureza de la muestra, entre otras [92].

La punta es el componente más importante del equipo, es la que puede hacer contacto físico con la superficie de la muestra. Generalmente está hecha de silicio o nitruro de silicio. La punta está montada en el cantilever, el cual permite a la punta moverse en relación a la topografía de la muestra [13]. Una vez montada la punta en el cantilever, se le hace incidir un láser, así, cada vez que la punta sube o baja debido a la interacción con la superficie de la muestra que se encuentra analizando, el cantilever refleja la desviación del láser a un fotodetector y es interpretada por el software generando una imagen [92].

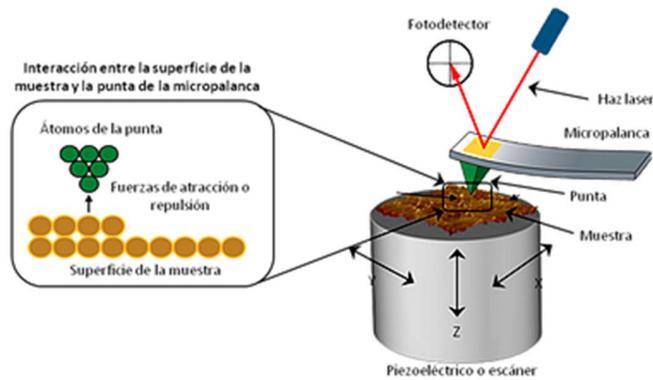


Figura B.11 Interacción de la punta con la muestra [92].

La fuerza normal entre la punta y la muestra provoca una deflexión de la micropalanca (hacia abajo si la fuerza es atractiva y hacia arriba si es repulsiva), mientras que las fuerzas de fricción laterales provocan una torsión de la misma. Estas interacciones permiten que existan diferentes modos de operación del microscopio:

- *Modo de contacto*: La punta permanece en contacto durante el barrido. Predominan las fuerzas repulsivas [13].
- *Modo de no contacto*: La punta se mantiene ligeramente alejada de la superficie durante el barrido. La topografía de la muestra se obtiene por las interacciones atractivas entre la punta y la superficie [13].
- *Modo Tapping*: El cantilever se hace vibrar tocando intermitentemente la superficie, detectando el cambio en la amplitud de oscilación al cambiar la distancia cantilever-muestra [13].

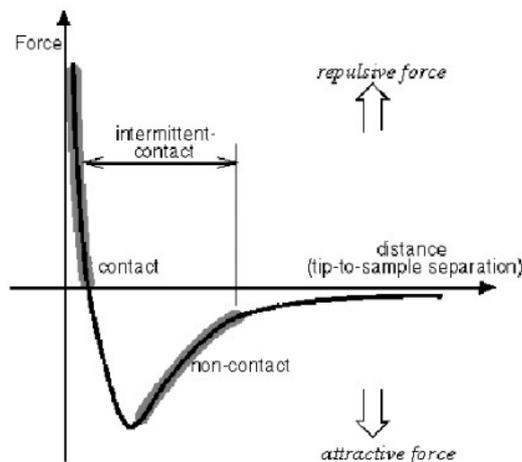


Figura B.12 Esquema de modalidades en el microscopio [13].

B.6. Dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID)

El dispositivo superconductor de interferencia cuántica mide variaciones muy pequeñas del flujo magnético (momentos magnéticos); a través de un anillo superconductor interrumpido por una o más uniones de Josephson, que permite el paso de los pares de Cooper a través de ella por efecto túnel [93, 94, 7].

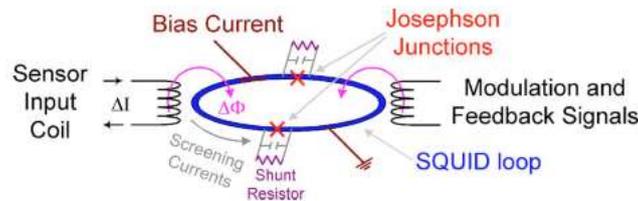


Figura B.13 Dispositivo superconductor de interferencia cuántica [93].

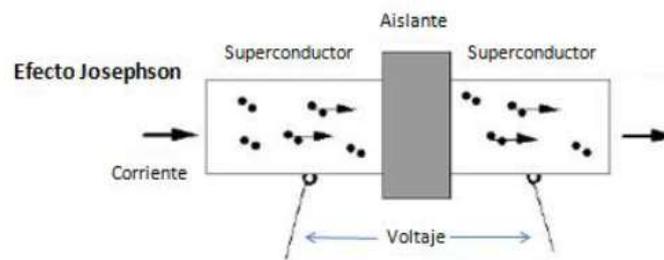


Figura B.14 Esquema del funcionamiento de un magnetómetro SQUID [7].

El funcionamiento del dispositivo radica en aplicar una corriente polarizada (I_b) para comenzar la variación de $I-V$, entre el comportamiento superconductor y resistivo, Fig. B.14, [93]. Mediante la medición del voltaje inducido debido a un cambio en el flujo magnético ocasionado por una muestra, se obtiene información de la magnetización y susceptibilidad de la muestra en un rango grande de temperatura de 1.7 a 300 K y campos magnéticos hasta de 5 ó 7 T según el modelo del equipo [94].

El magnetómetro cuenta un motor de paso que mueve la muestra a lo largo de un eje vertical para alterar el campo magnético alterno que es producido por una bobina primaria (bobina de excitación), la cual es alimentada por una corriente alterna, posteriormente, la inducción del voltaje producido es captado por una bobina secundaria (bobina de captación), Fig. B.16. Esta señal llega posteriormente a un amplificador de frecuencia para reconvertir la señal en un voltaje analógico [94].

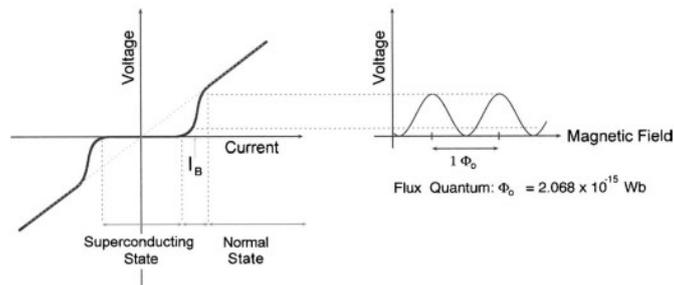


Figura B.15 Variaciones físicas en el dispositivo [93].

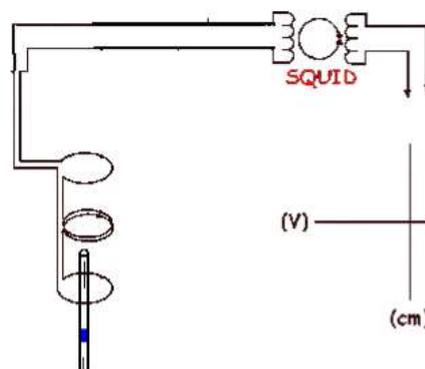


Figura B.16 Esquema del magnetómetro SQUID [94].

B.7. Ensayo de Sulforrodamina B [60]

La Sulforrodamina B es una aminoxanteno de color rosa brillante con dos grupos sulfónicos que se enlazan a los residuos básicos de aminoácidos en condiciones ligeras de acidez y se disocia en condiciones de pH básico, absorbe a una longitud de onda de lectura óptima de 564nm o en un rango de 490 a 550, según el lector de placas que se tenga. La cantidad de sulforrodamina enlazada en la célula es directamente proporcional a la masa celular.

- **Equipo e instrumentos:**

- ✓ Balanza Analítica
- ✓ Baño María
- ✓ Bomba de vacío
- ✓ Cajas de cultivo estériles de 25 ml
- ✓ Cajas de cultivo estériles de 75ml
- ✓ Campana de flujo laminar clase II
- ✓ Centrífuga clínica de 1000 a 2500 rpm
- ✓ Criotubos

- ✓ Filtros estériles de 0.22
- ✓ Incubadora de CO₂
- ✓ Jeringas de 5 ml
- ✓ Matraz volumétrico de 100ml
- ✓ Microscopio invertido
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Pipeta automática de 10 a 100 µL
- ✓ Pipeta automática de 100 a 1000 µL
- ✓ Pipeta automática multicanal de 20 a 200 µL
- ✓ Pipetas pasteur estériles
- ✓ Pipetas serológicas estériles de 1, 5, 10 ml
- ✓ Pipeteadores
- ✓ Placas de 96 pozos estériles
- ✓ Puntas para micro pipeta de 100 y 1000 µL
- ✓ Quitasato
- ✓ Tanque de nitrógeno líquido
- ✓ Termómetros de -20 a 100 °C
- ✓ Tubos cónicos estériles de polipropileno de 15 µL.
- ✓ Tubos de microcentrifuga de 1.5 ml
- ✓ Ultracongelador (- 70 °c)

- **SOLUCIONES:**

- ✓ Ácido acético al 1 %
- ✓ Ácido Tricloroacético al 10 %
- ✓ Antibiótico y antimicótico.- 10,000 unidades/mL de Penicilina G-sódica, 10,000 µg/mL de Sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de Anfotericina b en Solución salina al 0.85%.
- ✓ Azul Tripano al 0.4%
- ✓ Etanol al 70 %
- ✓ Sulforrodamina B 0.4%
- ✓ Tris-Base 10mM

- **REACTIVOS:**

- ✓ Ácido acético glacial
- ✓ Ácido tricloroacético
- ✓ Bicarbonato ácido sodio
- ✓ Dimetil sulfóxido
- ✓ Medio de cultivo con rojo fenol

- **BIOLÓGICOS:**

- ✓ Líneas Celulares
- ✓ Cultivo primario

- ✓ Medios de cultivo
- ✓ Suero fetal bovino (irradiado)

Una vez obtenidas las absorbancias de las placas, se realiza la determinación del porcentaje de células adheridas al final del experimento, el cual indica el porcentaje de células viables al momento de la fijación. Se considera la proliferación celular máxima (100%) de los pozos que no reciban tratamiento del compuesto de prueba (control negativo).

Con los porcentajes obtenidos en cada una de las concentraciones ensayadas se realiza una regresión lineal Probit, obteniendo así la concentración inhibitoria media (IC_{50}), cuando sea posible. Si no se abate al menos el 50% de la proliferación celular, se deberá de realizar de nuevo toda la prueba utilizando concentraciones mayores a las utilizadas.

