



TRABAJO FINAL DE MASTER

Preparación y caracterización de microplataformas magnéticas para aplicaciones teranósticas

**Presentado por: Karam Nader Pisonero del
Pozo**

**Realizado en: Departamento de Química
Orgánica e Inorgánica UPV/EHU**

Bajo la dirección de:

**Idoia Castellanos-Rubio
Maite Insausti Peña**

Leioa-Santander, julio de 2022

Índice

RESUMEN.....	II
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	7
2.1 REACTIVOS.....	7
2.2 SÍNTESIS DEL OLEATO DE HIERRO(III).....	7
2.3 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Fe ₃ O ₄	7
2.4 FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Fe ₃ O ₄	8
2.5 RECUBRIMIENTO DE LAS MICROESFERAS EMBOZENE TANDEM ^{RT}	9
2.6 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	10
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
3.1 CARACTERIZACIÓN DEL OLEATO DE HIERRO(III).....	12
3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE Fe ₃ O ₄	13
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS.....	17
3.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS RECUBIERTAS CON Fe ₃ O ₄ @CTAB Y Fe ₃ O ₄ @PMAO	19
3.5 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD MAGNETOTÉRMICA DE MICROESFERAS RECUBIERTAS CON Fe ₃ O ₄ @CTAB Y Fe ₃ O ₄ @PMAO.....	21
4. CONCLUSIONES.....	25
5. BIBLIOGRAFÍA.....	26

Resumen

Los grandes avances experimentados por la nanomedicina en los últimos años se deben, en gran parte, al riguroso control en la preparación de nanopartículas (NPs) de diferentes características. Las nanopartículas magnéticas (NPMs), especialmente las NPs de magnetita (Fe_3O_4), han impulsado un cambio de paradigma en el campo biomédico gracias a su capacidad teranóstica. De hecho, uno de los tratamientos contra el cáncer con mayor potencial es la hipertermia magnética mediada por NPMs, que consiste en emplear el calor que producen estas NPMs (cuando se someten a campos magnéticos alternos) para eliminar selectivamente las células tumorales. Si este efecto de hipertermia magnética se acoplara al efecto embolizante y quimioterapéutico que presentan determinadas microesferas poliméricas utilizadas en tratamientos oncológicos, se podrían obtener plataformas multifuncionales con sinergias teranósticas, que mejorarían la calidad de vida de nuestra sociedad. En este contexto se enmarca el trabajo que se presenta, concretamente en la preparación y el estudio de nanopartículas de Fe_3O_4 de diferente tamaño, morfología y funcionalización superficial y en el posterior recubrimiento de microesferas comerciales Embozene TANDEM^{RT} con las NPs de magnetita sintetizadas. De este modo, la presente memoria abre un camino hacia el desarrollo de nuevas tecnologías médicas basadas en microplataformas con superficies nanoestructuradas y con multifunción.

In recent years, nanomedicine has evolved significantly thanks to the rigorous control in the synthesis of nanoparticles (NPs) of different characteristics. Magnetic nanoparticles (MNPs), especially magnetite (Fe_3O_4) NPs, have motivated a paradigm change in the biomedical field due to their theranostic capacity. In fact, one of the most promising cancer treatments is magnetic hyperthermia mediated by MNPs, based on the heat evolved by these MNPs (when an alternating magnetic field is applied) to selectively eliminate tumour cells. If this magnetic hyperthermia effect is coupled to the embolic and chemotherapeutic effect of certain polymeric microspheres used in cancer treatments, multifunctional platforms with theranostic synergies could be obtained, which would improve the quality of life of our society. This is the context of the work presented here, specifically the preparation and study of Fe_3O_4 nanoparticles of different sizes, morphology and surface functionalization and the subsequent coating of commercial Embozene TANDEM^{RT} microspheres with the magnetite NPs synthesised. In this way, the present report opens the way towards the development of new medical technologies based on microplatforms with nanostructured surfaces and multifunctionality.

1. Introducción

Desde que tiene uso de conciencia, el ser humano ha desarrollado la ciencia y la tecnología con el fin de mejorar su calidad de vida y resolver las dudas que le han ido surgiendo. Actualmente, también nos encontramos ante grandes retos y es desde la nanociencia y la nanotecnología donde podemos encontrar algunas de las claves que nos permitan seguir avanzando. Los materiales nanoestructurados presentan propiedades físico-químicas (mecánicas, eléctricas, ópticas, magnéticas, etc.) que son diferentes a las de sus equivalentes en estado masivo. ^[1,2] Gracias a estas propiedades, los nanomateriales pueden aportar una amplia gama de aplicaciones innovadoras en áreas como la contaminación medioambiental, la biomedicina, farmacología, energía, la catálisis, etc. ^[3]

Una de las áreas más influenciadas por el impacto de la nanociencia y la nanotecnología es la biomedicina, debido a que las estructuras de los sistemas biológicos se hallan, precisamente, en la dimensión nanométrica, pudiéndose lograr una interacción selectiva entre nanomaterial y componente biológico. Este ámbito, en el que se utilizan materiales nanométricos con aplicaciones en diagnóstico o terapias, se conoce como nanomedicina. Y, entre los materiales más utilizados, se encuentran las nanopartículas magnéticas (NPMs) ya que la posibilidad de manipulación por un campo magnético les posibilita su utilización tanto en diagnóstico como en terapias. ^[4]

En el ámbito de diagnóstico una aplicación importante de las NPMs es como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI), lo cual facilita la detección de enfermedades ya que permiten mejorar el contraste de la imagen tanto positiva como negativamente. ^[5]

En cuanto a las aplicaciones terapéuticas, una de las más conocidas es el transporte y la liberación de fármacos (Drug Delivery). Esta técnica tendría relevancia en el tratamiento de enfermedades que necesitan que los fármacos se dirijan a zonas específicas, sin alterar las zonas no dañadas. ^[6]

Otra de las aplicaciones terapéuticas de interés de las NPMs, y en la que se centra este trabajo, es la hipertermia magnética. Esta técnica se basa en el calor que generan las NPMs cuando son expuestas a un campo magnético alterno. Dicho calor se puede emplear en terapias antitumorales ya que la apoptosis de las células tumorales ocurre a temperaturas inferiores (41-46 °C) a la de las células sanas (48-50 °C). De esta manera se podría tratar la zona del tumor de manera selectiva, sin dañar el tejido sano adyacente. Esta aplicación permitiría también reducir los efectos secundarios generados por las terapias convencionales como la quimio- y radioterapia. ^[7]

Los fármacos embolizantes también son de gran interés para llevar a cabo terapias oncológicas. ^[8] Entre los empleados en algunos tratamientos clínicos se encuentran las microesferas Embozene TANDEM™ de Boston Scientific, y están compuestas por un hidrogel de poliácrlato y recubiertas por un polímero antitrombogénico y antibacteriano llamado Polyzene®-F (CeloNova Biosciences Inc.). ^[9] Estas microesferas,

tras ser inyectadas en el torrente sanguíneo, reducen el flujo de sangre que llega al tumor provocando lo que se conoce como embolia tumoral. ^[10] Además, estas microesferas pueden ser cargadas con fármacos utilizados en tratamientos tradicionales de quimioterapia (Irinotecan y Doxorubicina) ^[11, 12], dando lugar a un método conocido como quimioembolización, una aplicación que combina la previamente mencionada drug delivery, la quimioterapia y la embolización. ^[13,14]

Una gran ventaja de estas microplataformas es que pueden ser ‘decoradas’ con diferentes biomoléculas o nanosistemas, de forma que permitiría conseguir propiedades adicionales, dando lugar a plataformas multifuncionales que posibilitarían sinergias muy apropiadas y con tratamientos de gran eficiencia. ^[15, 16] Concretamente, sería posible recubrir las microesferas con NPMs consiguiendo añadir al sistema embolizante las aplicaciones biomédicas que se han descrito previamente (hipertermia magnética ^[17,18] y RMI ^[19,20]). Además, existen estudios que determinan que las sesiones de quimio- y radioterapia aumentan su efectividad cuando se aplican conjuntamente con hipertermia magnética. ^[21, 22] De esta manera se abre un nuevo horizonte con la posibilidad de llevar a cabo una terapia triple en un único sistema multifuncional; microesferas embolizantes cargadas con fármacos antitumorales y recubiertas por nanopartículas magnéticas. Dicho agente teranóstico multifuncional, además de combinar la embolización tumoral, la quimioterapia y la hipertermia magnética, también permitiría realizar el seguimiento y diagnóstico de enfermedades mediante RMI. Es en este contexto en el que se enmarcan los materiales fabricados en este trabajo.

Siendo la aplicación de hipertermia magnética uno de los principales objetivos de dichos materiales, es imprescindible introducir el parámetro que mide la capacidad de un sistema magnético para generar calor. La tasa de absorción específica (SAR), mide el poder de calentamiento de un material magnético respecto al tiempo y su masa ($W \cdot g^{-1}$). Existen dos métodos principales para analizar la capacidad calorífica; mediante métodos calorimétricos y mediante métodos magnéticos. En el primer caso, se mide la variación de temperatura del material en función del tiempo, al someterle a un campo magnético alterno, como se describe en la ecuación (1). ^[23] El método utilizado en este trabajo es el segundo, en el cual, si se representa la magnetización de un material frente a un campo magnético alterno, obteniéndose ciclos de histéresis. Conociendo el área de estos ciclos y la frecuencia del campo magnético aplicado se puede calcular el parámetro SAR como se presenta en la ecuación (2).

$$SAR = \frac{C_{p,s}}{m_{NP}} \left| \frac{dT}{dt} \right|_{t=0} \quad (1)$$

$$SAR = \frac{f}{c} \cdot A = \frac{f}{c} \cdot \mu_0 \oint M(t) dH \quad (2)$$

Donde M es magnetización del material en presencia del campo magnético alterno (H), f es la frecuencia del campo magnético y c la concentración de la muestra. Por ende, el área del ciclo de histéresis y el parámetro SAR son linealmente proporcionales, de manera que las NPMs que tengan ciclos más grandes tendrán mejor respuesta magnetotérmica y serán más adecuadas para lograr los efectos deseados. [24]

Las NPMs más utilizadas en biomedicina son las de magnetita por su baja toxicidad y alta imanación de saturación ($M_s = 92 \text{ Am}^2/\text{kg}$ a 20°C). [25] La magnetita es un mineral cuya fórmula química es Fe_3O_4 , en el que el hierro presenta dos estados de oxidación ($\text{Fe}^{3+}_2\text{Fe}^{2+}\text{O}_4$). Presenta una estructura de espinela inversa donde los aniones O^{2-} presentan un empaquetamiento cubico compacto, la mitad de los iones Fe^{3+} ocupan los huecos tetraédricos y la otra mitad de los iones Fe^{3+} y los iones Fe^{2+} los huecos octaédricos. Todas las nanopartículas de magnetita no presentan las mismas propiedades físico-químicas, ya que el tamaño, la morfología y la presencia de otros iones o las vacantes en las posiciones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ tienen un gran efecto sobre las propiedades. [26]

Antes de mencionar el gran efecto que tiene el tamaño de las nanopartículas de magnetita en la capacidad de generar calor, es imprescindible introducir el concepto de la temperatura de bloqueo (T_B). Por encima de la temperatura de bloqueo, un sistema magnético transita del régimen ferro- ferrimagnético al superparamagnético. Como se puede apreciar en la ecuación (3) los parámetros que condicionan la temperatura de bloqueo son la constante de anisotropía efectiva (K_{eff}) y el volumen magnético (V_M). [27]

En lo que a tamaño se refiere, cuando el diámetro de una nanopartícula de magnetita es superior a un tamaño alrededor de 20 nm presenta una naturaleza ferrimagnética, es decir, la temperatura de bloqueo (T_B), temperatura a partir de la cual el momento magnético neto es nulo, es superior a la temperatura ambiente (ecuación (3)).

$$T_B = \frac{K_{eff} \cdot V_M}{23K_B} \quad (3)$$

Cuando el diámetro de la nanopartícula es superior al tamaño crítico, unos 100 nm, los momentos magnéticos están divididos en dominios, regiones en las cuales los momentos están orientados de manera paralela. En la Figura 1a, se puede apreciar el comportamiento magnético de las NPMs en función del tamaño de las mismas. Como se detallará más adelante, estos monodominios son de interés para la respuesta en hipertermia magnética. [28]

Si el diámetro de la nanopartícula disminuye aún más, por debajo de los 20 nm, la temperatura de bloqueo disminuye por debajo de la temperatura ambiente y el sistema se encuentra en el régimen superparamagnético. En estos casos el momento magnético

de la partícula oscila por efecto de la temperatura, siendo el tiempo entre oscilaciones la relajación de Neel. Cuando el tiempo necesario para medir la magnetización del sistema es superior a la relajación de Neel, la magnetización promedio es nula y se dice que el sistema es de naturaleza superparamagnética. [29,30]

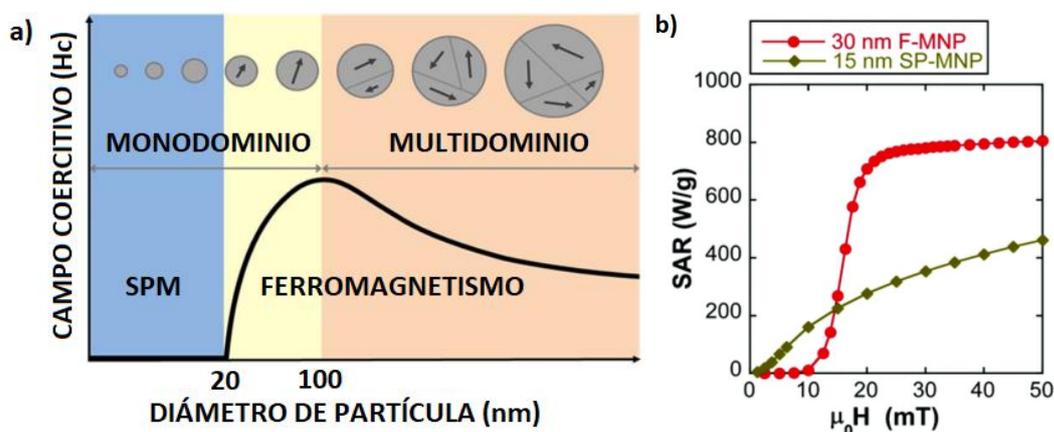


Figura 1. Efecto del tamaño en a) el campo coercitivo y b) valores de SAR.

Recientemente se ha demostrado que, las nanopartículas ferro-/ferrimagnéticas monodominio, tienen una eficacia magnetotérmica elevada si se evita su aglomeración.^[31] En la Figura 1b) se presenta una simulación, de los valores de SAR, de nanopartículas de magnetita de 15 y 30 nm en función del campo aplicado, suponiendo monodominios magnéticos sin interacciones (modelo Stoner–Wohlfarth), una constante de anisotropía uniaxial efectiva $K_{\text{eff}} = 10 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-3}$ y un campo alterno de 300 kHz. Teniendo en cuenta que las terapias clínicas de hipertermia magnética se suelen realizar en el intervalo de 20 - 40 mT, se puede apreciar en la figura que las que presentan mayor eficacia, a priori, serían las nanopartículas con tamaños superiores al límite superparamagnético. [32, 33]

En cuanto a la morfología, cuando las NPM presentan formas más regulares, como esféricas o cúbicas, dan lugar a una menor anisotropía magnética y por lo tanto tienden a presentar valores máximos de SAR más bajos.^[34] Sin embargo, con morfologías menos regulares como octaédricas, cuboctaédricas u octaédricas truncadas, por ejemplo, las nanopartículas presentan una mayor anisotropía magnética y, por lo tanto, mayor capacidad magnetotérmica.^[35] Por consiguiente, para optimizar la eficiencia magnetotérmica, las nanopartículas de magnetita más apropiadas serían las que presentan un tamaño entre 20 y 25 nm y morfologías facetadas como octaédricas truncadas y cuboctaédricas. De esta forma, teniendo en cuenta el efecto que tienen las características de las NPMs sobre la respuesta magnetotérmica, es imprescindible lograr un gran control del tamaño y morfología de las nanopartículas, ya que estas propiedades definirán el potencial biomédico.

Los métodos químicos empleados para la obtención de NPM más habituales son la coprecipitación de sales metálicas, la síntesis hidrotermal, la preparación de microemulsiones, el método sol-gel, la síntesis biológica, descomposición térmica, etc. los cuales condicionan la morfología, tamaño y polidispersidad. [36] Para la obtención de NPs de Fe_3O_4 un método sintético que proporciona un control del tamaño y morfología de las partículas es la descomposición térmica de precursores metal-orgánicos. El precursor utilizado, el tiempo y la temperatura de reacción condicionan el tamaño de las partículas. Además, el uso de surfactantes durante la síntesis permite el control del crecimiento y la morfología de las NPM. [37] La utilización de precursores con temperatura de descomposición baja como $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ($T_{\text{desc}} = 140^\circ\text{C}$), da lugar a NPs pequeñas (4-10 nm), los precursores con temperatura de descomposición media como $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ($T_{\text{desc}} = 185^\circ\text{C}$) originan nanopartículas más grandes (10-18 nm) [38,39] y cuando se emplean precursores con temperaturas de descomposición como las del oleato de hierro(III) ($T_{\text{desc}} = 200^\circ\text{C}$) se pueden lograr nanopartículas de magnetita de tamaños superiores a 20 nm. [40] Otra ventaja del oleato de hierro(III) es que modificando parámetros de síntesis (tiempo y temperatura de reacción, relación molar oleato/sal de hierro o el tiempo de secado del precursor, etc.) se puede controlar la morfología de las nanopartículas. [41]

Sin embargo, la síntesis de las nanopartículas a partir del precursor oleato presenta cierta complejidad ya que requiere de temperaturas de reflujo muy elevadas y unas condiciones redox muy concretas. Para conseguir estas temperaturas se utiliza una relación controlada de disolventes como el octadeceno ($T_{\text{eb}} = 315^\circ\text{C}$) y el éter bencílico ($T_{\text{eb}} = 298^\circ\text{C}$). El éter bencílico permite contrarrestar la naturaleza reductora del octadeceno evitando la formación de wüstita, FeO , fase paramagnética que reduciría la respuesta magnética de las nanopartículas. [42]

Las NPMs obtenidas mediante la descomposición térmica del oleato de hierro(III) son estables en un medio orgánico apolar como el cloroformo o el hexano. Estas NPs están rodeadas de ligandos oleato anfifílicos en los que la cabeza polar está quimioabsorbida al núcleo inorgánico y la parte apolar se despliega hacia fuera.

En este trabajo, se pretende recubrir las microesferas Embozene TANDEM^{RT} con las NPMs, y siendo el fin aplicaciones biomédicas, es imprescindible que las NPMs empleadas sean estables en medio fisiológico. [43] Para ello, se recubrirán las NPMs sintetizadas con moléculas anfifílicas para que las cadenas de carbonos interactúen con las cadenas hidrófobas del oleato y las cabezas polares de la capa secundaria queden expuestas al medio acuoso (véase Figura 2). De esta manera, se forma una capa hidrofílica, similar a la membrana celular, en torno a la nanopartícula.

El bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) es un surfactante muy empleado para transformar nanopartículas hidrofóbicas en hidrofílicas (Figura 2a). [44, 45] Las NPM recubiertas por este compuesto presentan una carga superficial positiva debido al grupo amino en el extremo polar de la cadena, lo que es de gran utilidad para unirse electroestáticamente a sistemas cargados negativamente. Otra especie molecular que es muy empleada para solubilizar las NPs en disolventes acuosos es el poli(anhídrido

maleico-alt-1- octadeceno) PMAO, que tras una reacción polimérica encapsula la nanopartícula (veáse Figura 2b). Una vez recubiertas las NPs con PMAO y tras efectuar la hidrólisis de los grupos funcionales anhídrido, se obtiene un sistema con carga superficial negativa, que permite uniones electrostáticas con sistemas cargados positivamente. [46]

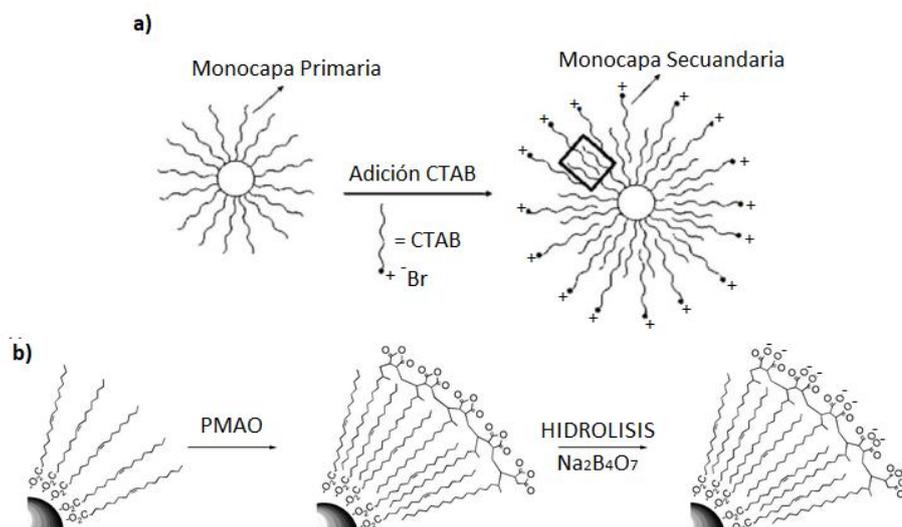


Figura 2. Esquema del proceso de recubrimiento con a) CTAB y b) PMAO.

Las microesferas Embozene TANDEM^{RT} poseen una carga superficial negativa, lo que permite que nanopartículas con carga superficial positiva, como las recubiertas con CTAB, se adhieran a la superficie mediante interacciones electrostáticas.

Por otra parte, se ha comprobado que es posible el recubrimiento de microplataformas poliméricas capa por capa (LbL assembly) con un polielectrólito positivo, pudiendo modificar la carga superficial. [47] De esta manera se pueden adherir nanopartículas con carga superficial negativa, como las previamente mencionadas con PMAO, tras cargar positivamente las microesferas.

En este marco se define el principal objetivo de este trabajo, que es la síntesis de nanopartículas de magnetita de alta calidad (cristalinidad, monodispersidad, respuesta magnética óptima, etc.) y con un tamaño superior a 20 nm. Tras su respectiva funcionalización con CTAB y PMAO, se han recubierto las microesferas comerciales Embozene TANDEM^{RT} dando lugar a microplataformas embolizantes y magnéticas con gran potencial como agentes teranósticos.

2. Procedimiento experimental

En este apartado se resume el procedimiento experimental llevado a cabo en la síntesis del oleato de hierro(III), nanopartículas de magnetita y microesferas recubiertas con nanopartículas, así como su correspondiente caracterización.

2.1 Reactivos

Para la síntesis del oleato de hierro(III) se han utilizado los siguientes reactivos: oleato sódico (97 %, TCI), cloruro de hierro(III) hexahidratado (99 %, Sigma Aldrich), etanol (96 %, PanReac), hexano (99 %, Sigma Aldrich) y agua destilada. En la síntesis y funcionalización de las nanopartículas se ha utilizado ácido oleico (90 %, Aldrich), 1-octadeceno (90 %, Aldrich), éter bencílico (98 %, Aldrich), tetrahidrofurano (THF) (99 %, Emlura), cloroformo (99 %, Sigma Aldrich), bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB) (99 %, Sigma Aldrich) y poli(anhidruro maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) (99 %, Aldrich, 30-50 kDa). Por último, para recubrir las microesferas se ha utilizado poli (cloruro de dialildimetilamonio) (PDAC) (20 %, Aldrich) y las microesferas poliméricas comerciales de 40 μm de diámetro Embozene TANDEM^{RT} adquiridas en Boston Cientific.

2.2 Síntesis del oleato de hierro(III)

Se ha añadido cloruro de hierro(III) (40 mmol) y oleato sódico ($\text{NaC}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2$, 120 mmol), en un matraz de 3 bocas de 500 mL, junto con hexano (140 mL), etanol (80 mL) y agua destilada (60 mL). Como se puede apreciar en la Figura 3, se ha colocado un agitador mecánico con una pala de teflón, un refrigerante y, con ayuda de dos septums, se han instalado las agujas de salida y entrada del flujo de N_2 y un termopar para realizar el control de la temperatura.

A continuación, mientras el sistema es agitado mecánicamente, se ha hecho pasar un flujo de N_2 durante 20 minutos. Después, se ha calentado el sistema hasta 60°C y se ha mantenido en reflujo durante 1 hora. Al finalizar el mismo, y después de enfriar la mezcla a temperatura ambiente, se ha transferido a un embudo de decantación para separar la fase orgánica y la acuosa. La fase orgánica se ha limpiado con agua destilada (3 X 100 mL). Después de la limpieza, mientras se agita magnéticamente, se han evaporado los residuos de disolvente a 110°C, temperatura a la que se ha mantenido durante 21 horas. El oleato resultante presenta una textura viscosa y un color marrón-rojizo.

2.3 Síntesis de las nanopartículas de Fe_3O_4

Para la preparación de las NPs de Fe_3O_4 se ha seguido el método optimizado por el grupo de investigación en los últimos años.^[41] Se ha partido de 5 mmol del oleato de hierro(III) ($\text{Fe}(\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_2)_3$), los cuales se han calentado previamente a $\approx 70^\circ\text{C}$ junto con los disolventes utilizados en la síntesis, octadeceno (10 mL), éter bencílico (5 mL) y ácido oleico (3.2 mL), debido a la viscosidad y el difícil manejo que presenta el oleato. La mezcla de oleato y disolventes se ha introducido en un matraz de 3 bocas de 250 mL. Al igual que en la síntesis del oleato de hierro(III), se ha utilizado agitación mecánica, un flujo de N_2 , el refrigerante y el termopar para el control de la temperatura.

Mientras se agita mecánicamente, el sistema se ha calentado hasta 110 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Una vez alcanzada esta temperatura, se ha hecho pasar un flujo de N₂ durante 30 minutos. Luego, se ha calentado hasta 190 °C a 10 °C/min y hasta 330 °C a 3 °C/min. En torno a 320 °C ha comenzado el reflujo, manteniéndose el sistema 1 hora a ebullición.



Figura 3. Montaje experimental para la síntesis de oleato de hierro(III) y de las nanopartículas de magnetita.

Al finalizar la síntesis, se enfría a temperatura ambiente y se recogen las nanopartículas en tubos de 50 mL. A continuación, se añade THF (5 mL) en el matraz de reacción para recoger las nanopartículas restantes y en cada tubo se adicionan 10 ml de etanol.

Para realizar la limpieza de las nanopartículas, se han centrifugado a 22000 rpm durante 50 minutos a 6 °C. Después, se ha eliminado el sobrenadante, se han dispersado en THF y después de añadir etanol (20 mL), se han vuelto a centrifugar. Este proceso se ha repetido 3 veces, realizándose la última dispersión en cloroformo (15 mL). Finalmente, la muestra formada por dispersión coloidal, la cual denominaremos *Stock*, se recoge en un vial.

Siguiendo este procedimiento se han llevado a cabo un total de 3 síntesis; una con las cantidades previamente descritas (Fe₃O₄_A), y otras dos manteniendo las proporciones molares, pero aumentando la cantidad de reactivos y disolventes 4 veces (X4) (Fe₃O₄_B y Fe₃O₄_C), con el fin de analizar el proceso de escalado y su reproducibilidad.

2.4 Funcionalización de las nanopartículas de Fe₃O₄

Las nanopartículas de magnetita previamente sintetizadas se encuentran funcionalizadas con ácido oleico, de forma que, para su posterior deposición en las microesferas de Embozene TANDEM^{RT}, se han recubierto con CTAB y PMAO.

En 1 mL de cloroformo se ha disuelto la cantidad de CTAB necesaria para obtener un recubrimiento de 200 ligandos/nm², los cuales se han añadido sobre una disolución diluida (0.5 mg/mL) de nanopartículas de magnetita en cloroformo (20 mL). Después de la adición, se han agitado durante 15 minutos con ayuda de una placa agitadora y se ha

evaporado el disolvente en vacío. A continuación, se ha añadido el mismo volumen de cloroformo (20 mL) y se ha repetido el proceso dos veces. Finalmente, se han añadido 4 mL de agua destilada y las nanopartículas se han dispersado con ayuda de un baño de ultrasonidos. Las nanopartículas se han centrifugado a 13000 rpm durante 20 minutos y después de retirar el sobrenadante se han dispersado en agua destilada. Este proceso se ha repetido 3 veces. El recubrimiento con CTAB se ha aplicado a las 3 muestras de nanopartículas sintetizadas, obteniendo las NPs denominadas Fe₃O₄_A@CTAB, Fe₃O₄_B@CTAB y Fe₃O₄_C@CTAB.

Parte de la muestra Fe₃O₄_C también se ha funcionalizado con el monómero PMAO, con un protocolo similar al usado con CTAB. Se ha disuelto en 1 mL de cloroformo el PMAO necesario para obtener un recubrimiento de 50 monómeros/nm². El procedimiento de agitación, evaporación del cloroformo y limpieza es idéntico al usado con CTAB. Sin embargo, la última dispersión, en lugar de realizarla únicamente en agua, se ha llevado a cabo con 2 mL de agua destilada y 2 mL de una disolución buffer (Na₂B₄O₇, pH = 9), para realizar la hidrólisis de los grupos anhídrido del PMAO. La muestra obtenida ha sido denominada Fe₃O₄_C@PMAO.

2.5 Recubrimiento de las microesferas Embozene TANDEM^{RT}

En este apartado se detalla el procedimiento utilizado para recubrir las microesferas con las nanopartículas estabilizadas en medio acuoso. Se han seguido dos protocolos distintos, en función de la carga superficial que presentan las nanopartículas.

Debido a que las microesferas Embozene TANDEM^{RT} presentan un potencial Z negativo, presentarían afinidad por las NPs con potencial positivo, del tipo Fe₃O₄@CTAB. De esta forma, en un eppendorf de 2 ml que contiene una concentración de Fe₃O₄@CTAB de 2 mg/mL, se han añadido 50 µL de microesferas Embozene Tandem^{RT}, gota a gota. Se ha agitado la mezcla durante una noche con ayuda de una placa agitadora y se ha limpiado con agua destilada 7 veces intercalando centrifugación a 1000 rpm durante 10 minutos.

Para la deposición de Fe₃O₄@PMAO sobre las microesferas, estas se han tratado previamente con el polielectrolito positivo poli(cloruro de dialildimetilamonio), PDAC. Así, se han añadido, gota a gota, 50 µL de microesferas sobre una disolución de 10 % PDAC en agua. Tras agitar la mezcla durante una hora, se ha limpiado el exceso de polímero 3 veces con agua y centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos. Después de este tratamiento, en un tubo eppendorf de 2 ml, se ha añadido gota a gota 50 µL de microesferas Embozene TANDEM^{RT} sobre una concentración de 2 mg/mL de Fe₃O₄@PMAO en agua. Después de agitar durante una noche se ha seguido el protocolo de limpieza previamente descrito para las microesferas recubiertas con Fe₃O₄@CTAB.

En la Tabla 1 se recogen los recubrimientos realizados y los parámetros críticos como la cantidad de magnetita añadida, el tipo de muestra de nanopartículas recubiertas empleada y las monocapas teóricas de NPs en torno a la microesfera. A este parámetro, se le ha denominado exceso e indica la relación entre las nanopartículas añadidas y las que serían necesarias para formar una monocapa en torno a la microesfera.

Tabla 1. Cantidad de Fe₃O₄ (mg) añadida y relación de las funcionalizaciones de las microesferas Embozene TANDEM^{RT}.

Muestra	Fe ₃ O ₄ inicial (mg)	Exceso	NPM	Muestra	Fe ₃ O ₄ inicial (mg)	Exceso	NPM
Embo_1	2.70	10	Fe ₃ O ₄ _C @PMAO	Embo_5	0.30	1	Fe ₃ O ₄ _A @CTAB
Embo_2	*	*	Fe ₃ O ₄ _C @CTAB	Embo_6	0.60	2	Fe ₃ O ₄ _B @CTAB
Embo_3	2.21	7.4	Fe ₃ O ₄ _A @CTAB	Embo_7	0.30	1	Fe ₃ O ₄ _B @CTAB
Embo_4	0.60	2	Fe ₃ O ₄ _A @CTAB	Embo_8	0.15	0.5	Fe ₃ O ₄ _B @CTAB

* En la muestra Embo_2 no se ha podido determinar la cantidad de magnetita añadida por problemas instrumentales.

2.6 Técnicas de caracterización

En este apartado, se detallan las técnicas que han sido utilizadas para la caracterización del oleato de hierro(III), las nanopartículas de magnetita y las microesferas recubiertas por nanopartículas.

❖ Espectroscopia de infrarrojos (IR)

Para realizar el espectro de IR del oleato de hierro(III), 10 mg de muestra han sido mezclados con 100 mg de KBr. Después de realizar una pastilla al someter la mezcla a 10 atm de presión, se ha realizado el espectro en el intervalo 400-4000 cm⁻¹ en el equipo FTIR-8400S del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la UPV/EHU.

❖ Difracción de Rayos X

La caracterización cristalográfica de las nanopartículas sintetizadas, se ha realizado mediante difracción de rayos X en muestra policristalina. Las medidas se han realizado a temperatura ambiente, utilizando el difractómetro Panalytical X'Pert PRO de los Servicios Generales SGiker de la UPV/EHU. El difractómetro está equipado con un ánodo de cobre (40 kV y 40 mA), un monocromador secundario de grafito y un detector rápido PIXcel. Los difractogramas se han obtenido en el intervalo $2\theta = 5 - 90^\circ$ con un salto de 0.02° y velocidad de medida de 1,25 s. Para el análisis de los datos se han utilizado los programas FullProf y X'Pert HighScore.^[48]

❖ Análisis termogravimétrico

Esta técnica se ha utilizado para determinar el porcentaje de materia orgánica presente en las nanopartículas hidrofóbicas sintetizadas. Se han llevado a cabo los tratamientos térmicos en atmosfera de argón, con 10 mg de muestra, una velocidad de calentamiento de 10 °C/min entre 25-900 °C. Las medidas se han realizado en el equipo NETZSCH STA 449C, en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la UPV/EHU.

❖ Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica se ha utilizado para analizar el tamaño y la morfología de las nanopartículas sintetizadas. Las medidas se han realizado en los servicios generales de microscopia y microanálisis SGIker de la UPV/EHU, en el equipo Philips CM200 que opera a 200 kV. Para preparar la muestra se han diluido 10 μL de la disolución stock en 1.5 mL de cloroformo y se ha depositado una gota sobre una rejilla de cobre recubierta con una capa de carbono.

❖ Magnetometría de muestra vibrante (VSM) y SQUID

Las medidas magnetométricas se han llevado a cabo en los servicios generales de medidas magnéticas SGIker de UPV/EHU. Las medidas de imanación a temperatura ambiente se han realizado en sólido, en un magnetómetro comercial de la marca Cryogenic Ltd. Las NPs se han precipitado al añadir 1 mL de etanol sobre 1 mL de la disolución stock y posterior centrifugación durante 20 minutos a 13000 rpm.

Las medidas de imanación a campo constante en función de la temperatura (ZFC/FC) se han realizado en el magnetómetro SQUID (MPMS3, Quantum design). Las muestras se han preparado depositando unas gotas de la disolución stock sobre un papel de filtro. También se ha medido la magnetización de las muestras a 300 K y a 5 K.

❖ Dispersión de luz dinámica (DLS)

Para conocer el radio hidrodinámico y el potencial Z de las nanopartículas en disolución, se ha utilizado el equipo Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments), que se encuentra en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la UPV/EHU.

❖ Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica se ha utilizado para hacer un análisis detallado sobre la funcionalización de la superficie de las microesferas recubiertas por nanopartículas. Se ha utilizado un microscopio FEG-SEM Hitachi S-4800 del Servicio de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de los servicios generales SGIker.

❖ Medidas de Hipertermia Magnética. Magnetometría AC

Esta técnica permite determinar los valores de SAR de las nanopartículas una vez han sido transferidas a fase acuosa y de las microesferas recubiertas. Las medidas de hipertermia se han realizado en un magnetómetro AC diseñado y fabricado en el Departamento de Electricidad y Electrónica de UPV/EHU, que genera campos magnéticos capaces de saturar la muestra. Este equipo es capaz de generar hasta 90 mT en un amplio intervalo de frecuencias (100-950 kHz). Para preparar la muestra, se introducen disoluciones de NPs de magnetita de 1,2 mg/mL de concentración y 2 % de agar en cápsulas de 100 μL .

3. Resultados y discusión

En primer lugar, se ha caracterizado el precursor de oleato de hierro(III) y las nanopartículas de magnetita sintetizadas a partir de dicho precursor. A continuación, se han analizado las propiedades de las NPs de magnetita funcionalizadas con CTAB y PMAO; y finalmente, se han examinado las características de las microesferas Embozene TANDEM^{RT} recubiertas con Fe₃O₄@CTAB y Fe₃O₄@PMAO.

3.1 Caracterización del oleato de hierro(III)

Como precursor de las nanopartículas de magnetita, se ha sintetizado un único oleato de hierro(III). Con objeto de conocer la información sobre el modo de coordinación metal-carboxilato, se ha realizado el espectro de infrarrojo del precursor en el rango 400 - 4000 cm⁻¹ (Figura 4a). En el intervalo ampliado (Figura 4b) aparecen 3 bandas principales; la banda de vibración $\nu_{C=O}$ correspondiente al grupo carbonilo en torno a 1700 cm⁻¹, la banda de vibración asimétrica, ν_{as} , del grupo carboxilato en torno 1500-1600 cm⁻¹, la cual aparece desdoblada, y la banda de vibración simétrica, ν_{sim} , del grupo carboxilato en torno 1400-1500 cm⁻¹. La presencia de la banda del carbonilo hace referencia a un enlace iónico entre el metal y el ligando, o a una coordinación débil del ligando. Por otra parte, definiendo como Δ la diferencia entre la banda asimétrica y simétrica ($\Delta = \nu_{as} - \nu_{sim}$), se ha constatado que para valores de $\Delta < 100$ cm⁻¹ la coordinación metal-ligando sería una coordinación bidentada y para valores Δ entre 110 - 200 cm⁻¹ aparecería una coordinación tipo puente.^[49]

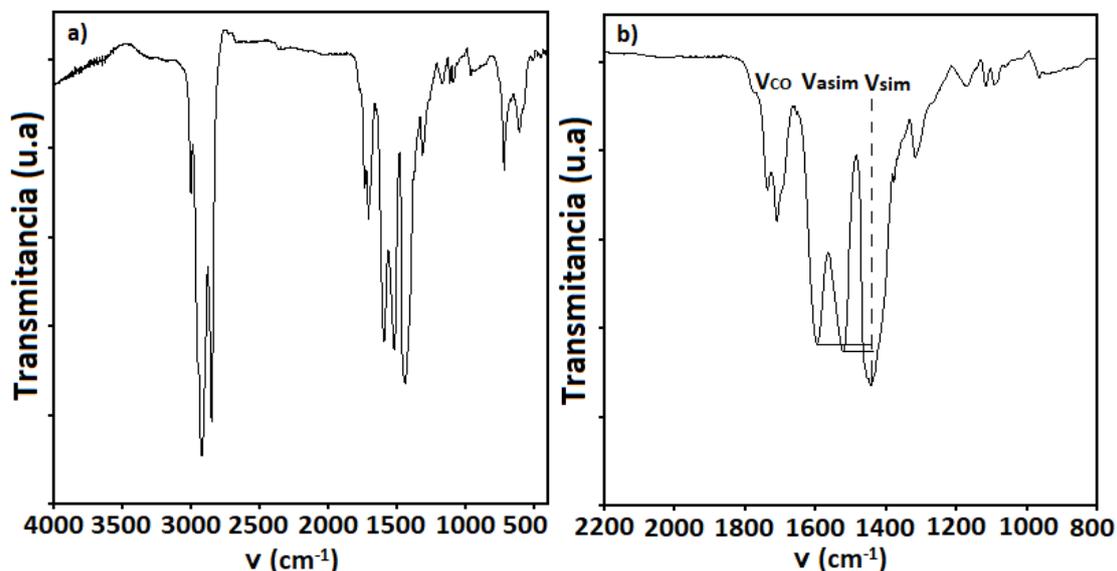


Figura 4. a) Espectro de infrarrojos del oleato de hierro(III) y b) ampliación del espectro en el intervalo 800-2200 cm⁻¹.

Si se tiene en cuenta el desdoblamiento de la banda a 1600 cm⁻¹, valores $\Delta_1 = 76$ cm⁻¹ y $\Delta_2 = 151$ cm⁻¹ obtenidos permiten deducir que en el oleato sintetizado se encuentran presentes todos los modos de coordinación mencionados previamente (bidentada, puente y ligando libre/iónico). Esto da lugar a una distribución homogénea de iones

hierro(III) en el oleato con diferente entorno y coordinación que genera una ventana de descomposición térmica más amplia y permitiría diferenciar la etapa de nucleación y de crecimiento de las nanopartículas de magnetita, y de esta manera generar partículas con tamaños y morfologías homogéneas.

3.2 Caracterización de las nanopartículas de Fe_3O_4

Como se ha comentado previamente, la descomposición controlada del precursor de oleato de hierro(III) ha generado 3 tipos de NPs magnéticas, Fe_3O_4 _A, Fe_3O_4 _B y Fe_3O_4 _C. La caracterización cristalográfica de las muestras se ha realizado mediante difracción de rayos X (Figura 5).

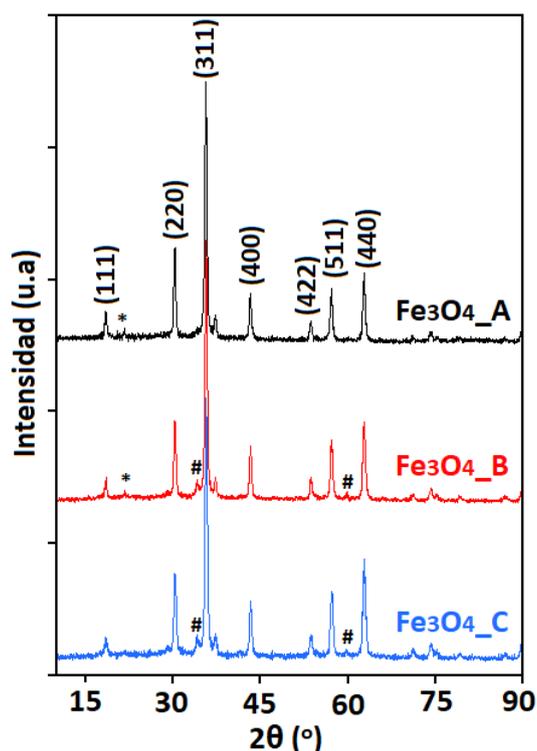


Figura 5. Difractogramas de las muestras Fe_3O_4 _A, Fe_3O_4 _B y Fe_3O_4 _C.

Como se puede apreciar, en todos los casos se han obtenido los picos característicos de la magnetita (111), (220), (311), (400), (422) y (511). Por otra parte, no se ha observado ningún pico correspondiente a la fase FeO (wüstita), con lo que se puede deducir que las nanopartículas están formadas únicamente por magnetita. En las muestras Fe_3O_4 _A y Fe_3O_4 _B aparecen unos máximos (*) presentes en la zona de $2\theta = 20 - 25^\circ$ que pueden ser atribuidos a la cristalización de alguno de los disolventes orgánicos usados en la síntesis, pudiendo eliminarse con sucesivas limpiezas. Por otra parte, en ángulos inferiores a los picos más intensos se pueden apreciar máximos que no pertenecen al difractograma de la magnetita (#). Este hecho se debe al deterioro del filamento de wolframio y su deposición sobre el ánodo de cobre, emitiendo radiación ($\text{WL}\alpha_1$) con longitud de onda similar a la del cobre y dando lugar a estos picos. Para determinar el tamaño cristalino, se ha utilizado la ecuación de Debye-Scherrer, como se presenta en la ecuación (4), a partir del máximo principal (311).^[50]

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (4)$$

El factor de forma utilizado oscila entre 0.85 y 0.95, consiguiéndose valores en un intervalo de 20 - 28 nm. A continuación, se han promediado los valores obtenidos para cada muestra. En la tabla 2 se reúnen los tamaños cristalinos y se comparan con los obtenidos mediante la técnica de microscopía TEM.

Para estudiar el tamaño y la morfología de las nanopartículas de magnetita se han realizado medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Una vez medido el tamaño de aproximadamente 200 partículas, se ha ajustado mediante una función gaussiana. Para discutir la polidispersidad de tamaño de las muestras se ha utilizado el parámetro de dispersidad β_{TEM} , es decir la desviación relativa de cada muestra. En la Figura 6 se pueden apreciar las imágenes de TEM, así como el histograma con la distribución de tamaños.

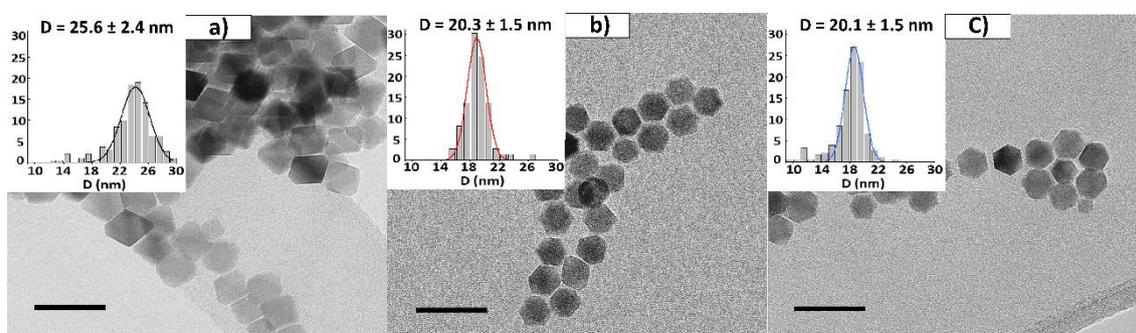


Figura 6. Imágenes de TEM e histogramas de las muestras a) Fe_3O_4_A , b) Fe_3O_4_B y c) Fe_3O_4_C . Barra de escala 50 nm.

La muestra Fe_3O_4_A presenta una morfología octaédrica truncada y un diámetro medio de 25 nm. Sin embargo, las muestras que han sido sintetizadas en escala $\times 4$ (Fe_3O_4_B y Fe_3O_4_C) presentan morfologías cubo-octaédricas y un tamaño de 20 nm, quedando en evidencia que la escala de síntesis afecta tanto a la morfología como al tamaño obtenidos. Es de destacar la similitud tanto morfológica como de tamaño entre ambas muestras, a pesar del proceso de escalado llevado a cabo. De esta forma, queda demostrada la versatilidad del proceso sintético para la producción de NPs de tamaño y morfología controlada. En lo que respecta a la distribución de tamaño, se han obtenido muestras homogéneas, ya que en ningún caso el parámetro β_{TEM} ha excedido el 10%. Sin embargo, si se comparan las muestras sintetizadas a escala $\times 4$ con Fe_3O_4_A se puede apreciar que al aumentar el volumen se obtiene una distribución aún más estrecha.

Tal como se deduce de la Tabla 2 los valores de los tamaños obtenidos a partir de TEM y DRX son comparables, corroborando que las NPs preparadas son monocristalinas y que no presentan defectos cristalinos o maclas.

Como se ha explicado con anterioridad, al finalizar la síntesis, las nanopartículas de magnetita quedan recubiertas por ligandos de ácido oleico. El análisis termogravimétrico es de utilidad para determinar la cantidad de materia orgánica que

rodea al núcleo magnético y los ligandos que se encuentran por unidad de superficie, ya que para un correcto recubrimiento se necesitan en torno a 5-15 ligandos/nm².^[40] En la Figura 7 se puede apreciar el perfil de descomposición térmica de las muestras de magnetita y en la Tabla 2 la materia orgánica y el número de ligandos por unidad de superficie.

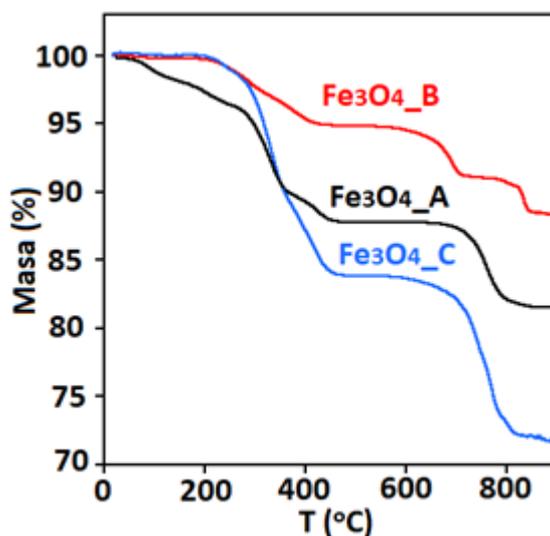


Figura 7. Termogramas de las muestras Fe₃O₄_A, Fe₃O₄_B y Fe₃O₄_C.

Todas las muestras presentan un perfil de temperatura similar, diferenciado en 3 etapas. La primera, en torno a 100 °C se aprecia una ligera pérdida de masa debido a la humedad de la muestra. A continuación, alrededor de 200-400 °C, se produce la descomposición de los ligandos orgánicos. Por último, entre 650-700 °C, se aprecia la pérdida de masa relacionada con los carbonatos o productos intermedios formados en la segunda etapa. Se puede observar que la cantidad de materia orgánica en el recubrimiento varía entre las muestras. Las NPs más pequeñas, Fe₃O₄_C, con mayor relación superficie/volumen presentan un 27 % de ligandos y las mayores, Fe₃O₄_A y Fe₃O₄_B, menores cantidades, 18 % y 11 %, respectivamente. En estos valores también se debe de tener en cuenta la pérdida de ligandos que se produce en los sucesivos lavados de las muestras.

Tabla 2. Resumen de la caracterización química y estructural de las nanopartículas Fe₃O₄_A, Fe₃O₄_B y Fe₃O₄_C. Tamaño cristalino (D_{DRX}), tamaño determinado por TEM (D_{TEM}), polidispersidad (β_{TEM}), materia orgánica (M.O.) y moléculas de ácido oleico por nm² de superficie de NP (ligando/nm²)

Muestra	D_{DRX} (nm)	D_{TEM} (nm)	β_{TEM} (%)	M.O. (%)	Ligando/nm ²
Fe ₃ O ₄ _A	26.9 ± 1.5	25.6 ± 2.4	9.4	18.5	11
Fe ₃ O ₄ _B	24.8 ± 1.4	20.3 ± 1.5	7.4	11.5	5
Fe ₃ O ₄ _C	22.1 ± 1.3	20.1 ± 1.5	7.5	27.9	14

Una vez caracterizadas las propiedades químicas y estructurales, es de interés analizar el comportamiento magnético de las muestras de magnetita, ya que de éstas depende su interés en aplicaciones biomédicas. En la Figura 8 se muestran las curvas $M(H)$ obtenidas a 5 K y temperatura ambiente, y en la Tabla 3 los datos más significativos obtenidos a partir de las curvas; saturación de imanación (M_s), campo coercitivo (H_c), remanencia reducida (M_r/M_s) y la temperatura de la transición de Verway.

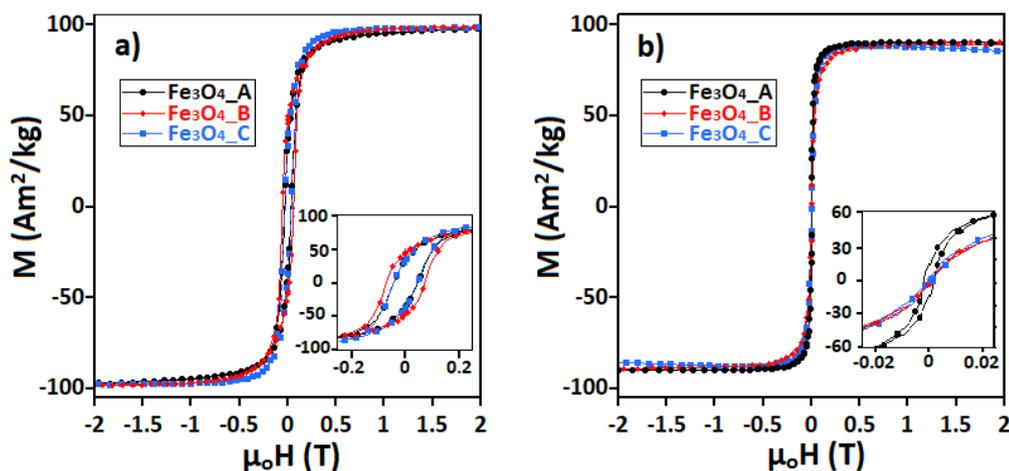


Figura 8. Curvas $M(H)$ de las nanopartículas obtenidas a a) 5K y b) 300K.

Como se puede apreciar en la Figura 8b, todas las muestras presentan ciclo de histéresis a temperatura ambiente pudiendo determinar que se hallan en el régimen ferrimagnético. Los valores de campo coercitivo a 5 K oscilan entre 35-55 mT (véase Figura 8a y Tabla 3), valores que se ajustan a los obtenidos en otros estudios para nanopartículas de magnetita.^[32] En el caso de la muestra $Fe_3O_4_A$ el valor del campo coercitivo es superior a las otras dos muestras, debido al tamaño superior de las nanopartículas. En cuanto a los valores de saturación a 5 K y 300 K, son similares a los de la magnetita en estado masivo (92 Am^2/kg a 300K y 98 Am^2/kg a 5K) para las tres muestras. Sin embargo, en las muestras $Fe_3O_4_B$ y $Fe_3O_4_C$ la reducción de la M_s de 5 K a 300 K ($\sim 10\%$) es algo superior que la de la magnetita pura (6.1 %), posiblemente por defectos cristalográficos como vacantes de Fe^{2+} o Fe^{3+} .^[28] Por otra parte, los valores de M_r/M_s a 5 K de estas dos muestras se aleja del 0.5, predicho según el modelo de Stoner-Wohlfarth para monodominios uniaxiales sin interacciones magnéticas entre partículas.^[51]

Tabla 3. Imanación de saturación (M_s), variación térmica de M_s , campo coercitivo (H_c), remanencia reducida (M_r/M_s) y la temperatura de la transición de Verway (T_v) de las nanopartículas de magnetita $Fe_3O_4_A$, $Fe_3O_4_B$ y $Fe_3O_4_C$.

Muestra	M_s 300 K (Am^2/kg)	M_s 5 K (Am^2/kg)	Variación % M_s	H_c 300 K (mT)	H_c 5 K (mT)	M_r/M_s 300 K	M_r/M_s 5 K	T_v (K)
$Fe_3O_4_A$	90 (2)	98 (2)	7.2	0.72 (1)	54.5 (1)	0.06 (2)	0.48 (2)	101 (1)
$Fe_3O_4_B$	88 (2)	98 (2)	10.2	0.35 (1)	34.0 (1)	0.01 (2)	0.37 (2)	88 (1)
$Fe_3O_4_C$	90 (2)	101 (2)	10.9	0.43 (1)	34.9 (1)	0.01 (2)	0.35 (2)	88 (1)

Por otra parte, en la Figura 9 se presentan las medidas $M(T)$, es decir, las curvas ZFC-FC para las tres muestras. Lo primero que se deduce de estas curvas es que todas las muestras tienen la T_b por encima de temperatura ambiente.

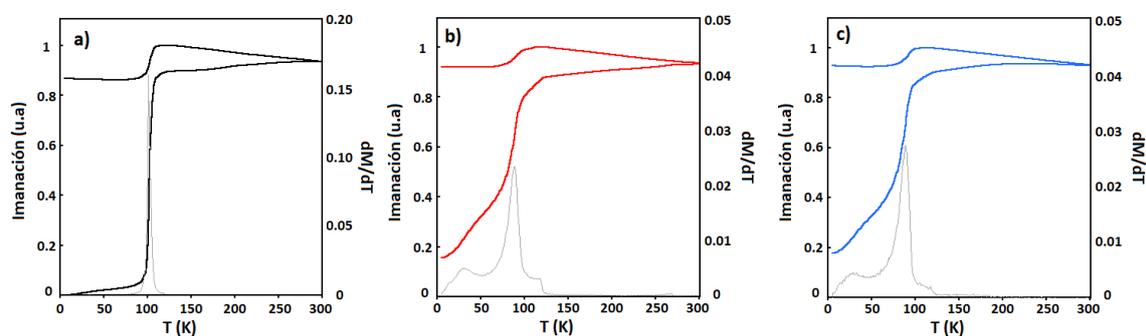


Figura 9. Curvas ZFC-FC y la derivada de la curva (en gris) de las muestras a) Fe_3O_4_A , b) Fe_3O_4_B y c) Fe_3O_4_C .

Además, en el caso de la magnetita estas medidas aportan información suplementaria, ya que en torno a 120 K se produce un cambio brusco en la susceptibilidad del material, conocido como la transición de Verwey, que representa una transición de fase cristalina de cúbica a monoclinica. Cuando la transición de Verwey está ligeramente desplazada a temperaturas inferiores a 120 K es indicativo de que la fase de magnetita no es perfectamente estequiométrica y si es abrupta es indicativa de la alta pureza de la muestra; en cambio, si la transición es más suave implica que el sistema tiene varias composiciones. Una forma de analizar mejor la agudeza de la transición es representando la derivada de la curva ZFC, como aparece en las Figura 9 a, b y c. De la posición y del ancho de la derivada ZFC de las tres muestras se puede deducir que la muestra Fe_3O_4_A es la que presenta la fase más estequiométrica y con menor dispersión de composiciones.

3.3 Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas

Previamente a la deposición de las NPs sobre las microesferas se ha llevado a cabo la funcionalización de las mismas con los dos ligandos mencionados, CTAB y PMAO. Las muestras Fe_3O_4_A , Fe_3O_4_B y Fe_3O_4_C han sido funcionalizadas con CTAB, y una sola muestra, Fe_3O_4_C , con PMAO. La efectividad de la funcionalización se ha analizado mediante la técnica de DLS a partir de la cual se han determinado los tamaños hidrodinámicos (D_h) y el potencial Z de las NPs (Tabla 4).

Tabla 4. Diámetro hidrodinámico (D_h) y potencial Z de las nanopartículas recubiertas.

Muestra	D_h (nm)	Potencial Z (mV)
$\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$	1399 ± 134	4.4 ± 0.4
$\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$	140 ± 27	15.7 ± 0.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4_C@CTAB$	72 ± 7	5.1 ± 0.2
$\text{Fe}_3\text{O}_4_C@PMAO$	103 ± 19	-39.1 ± 1.5

La muestra $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$ presenta un tamaño hidrodinámico un orden de magnitud superior al resto de las muestras, hecho indicativo de la formación de grandes aglomerados de nanopartículas en el proceso de funcionalización. El resto de compuestos presentan valores más bajos, lo que puede significar que se han recubierto grupos más reducidos de NPs.

Como era de esperar las NPs recubiertas con CTAB presenta carga superficial positiva, y las recubiertas con PMAO carga superficial negativa. Por otra parte, a la hora de analizar la magnitud de la carga superficial de las muestras, las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4_C@PMAO$ presentan el valor absoluto más alto, es decir, esta es la muestra más estable en agua. Las que han sido recubiertas con CTAB presentan valores más bajos, posiblemente porque el proceso de recubrimiento es menos eficaz que con el PMAO, que mantiene las cadenas hidrofóbicas unidas en la estructura polimérica.

Para obtener información visual de cómo se ha producido la funcionalización de las nanopartículas, se han realizado medidas de microscopia TEM (Figura 10).

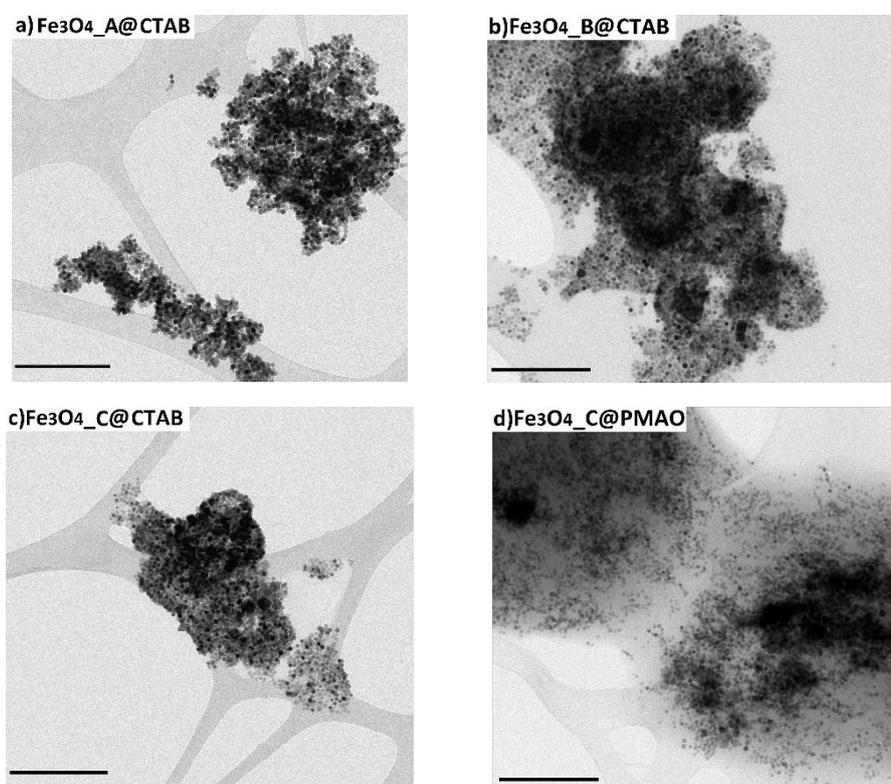


Figura 10. Imágenes de TEM de las nanopartículas a) $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$, b) $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$, c) $\text{Fe}_3\text{O}_4_C@CTAB$ y d) $\text{Fe}_3\text{O}_4_C@PMAO$. Barra de escala 250 nm

En la Figura 10 se puede apreciar que en todos los casos se han formado aglomerados de nanopartículas. Aunque en principio estos resultados parezcan contradictorios con los resultados de D_h presentados en la tabla 4, hay que tener en cuenta que, debido a la baja estabilidad en agua de los agregados más grandes, es posible que en el periodo de estabilización de la medida de DLS las agrupaciones de NPs hayan precipitado y no hayan interactuado con el haz de luz.

3.4 Caracterización de las microesferas recubiertas con Fe₃O₄@CTAB y Fe₃O₄@PMAO

En este apartado se presentan los recubrimientos de microesferas Embozene TANDEM^{RT} con las NPs presentadas en la Tabla 4, siguiendo el protocolo descrito en el apartado experimental.

La cantidad de NPs de magnetita depositada en la superficie de las microesferas se ha determinado mediante magnetometría de muestra vibrante y los resultados se recogen en la Tabla 5, junto con las cantidades de magnetita añadidas inicialmente y el rendimiento de proceso de recubrimiento.

Tabla 5. Muestra empleada en el recubrimiento de microesferas, cantidad de NPs añadida inicialmente, cantidad de NPs depositadas en la microplataforma y rendimiento del proceso de recubrimiento

Muestra	NPM	Fe ₃ O ₄ inicial (mg)	Fe ₃ O ₄ depositada (mg)	NPs/ME	Rendimiento (%)
Embo_1	Fe ₃ O ₄ _C@PMAO	2.70	0.270	1.45 · 10 ⁷	10
Embo_2	Fe ₃ O ₄ _C@CTAB	-	0.074	4.00 · 10 ⁶	-
Embo_3	Fe ₃ O ₄ _A@CTAB	2.21	0.660	1.82 · 10 ⁷	30
Embo_4	Fe ₃ O ₄ _A@CTAB	0.60	0.220	6.08 · 10 ⁶	36
Embo_5	Fe ₃ O ₄ _A@CTAB	0.30	0.075	2.07 · 10 ⁶	25
Embo_6	Fe ₃ O ₄ _B@CTAB	0.60	0.147	7.94 · 10 ⁶	25
Embo_7	Fe ₃ O ₄ _B@CTAB	0.30	0.030	1.62 · 10 ⁶	10
Embo_8	Fe ₃ O ₄ _B@CTAB	0.15	0.012	6.48 · 10 ⁵	8

Como se observa en la Tabla 5, todas las muestras presentan magnetita; por lo tanto, las microesferas Embozene TANDEM^{RT} pueden ser recubiertas tanto por los sistemas Fe₃O₄@CTAB como por los sistemas Fe₃O₄@PMAO.

La Figura 11 muestra micrografías de SEM de las microesferas Embozene TANDEM^{RT} antes del recubrimiento (Figuras 11a, b) y de las microesferas recubiertas mediante las diferentes NPs y funcionalizaciones (Figuras c-j).

El procedimiento para recubrir microesferas con NPs de tipo Fe₃O₄@PMAO requiere de una pre-modificación de las microesferas con un polielectrolito positivo (véase apartado experimental). Precisamente, en la Figura 11c se observa exceso de este polielectrolito (PDAC), por lo que en este caso sería conveniente optimizar la etapa de pre-modificación para obtener mayores rendimientos de recubrimiento (>10 %, Tabla 5).

En cuanto a las microplataformas con Fe₃O₄@CTAB, se observa que las microesferas recubiertas con NPs de mayor tamaño (Fe₃O₄_A) son más eficientemente revestidas (rendimiento=25-36 %, Tabla 5). Este hecho se muestra claramente en las micrografías de SEM de las muestras Embo_3, Embo_4 y Embo_5 (Figuras 11e, f, g).

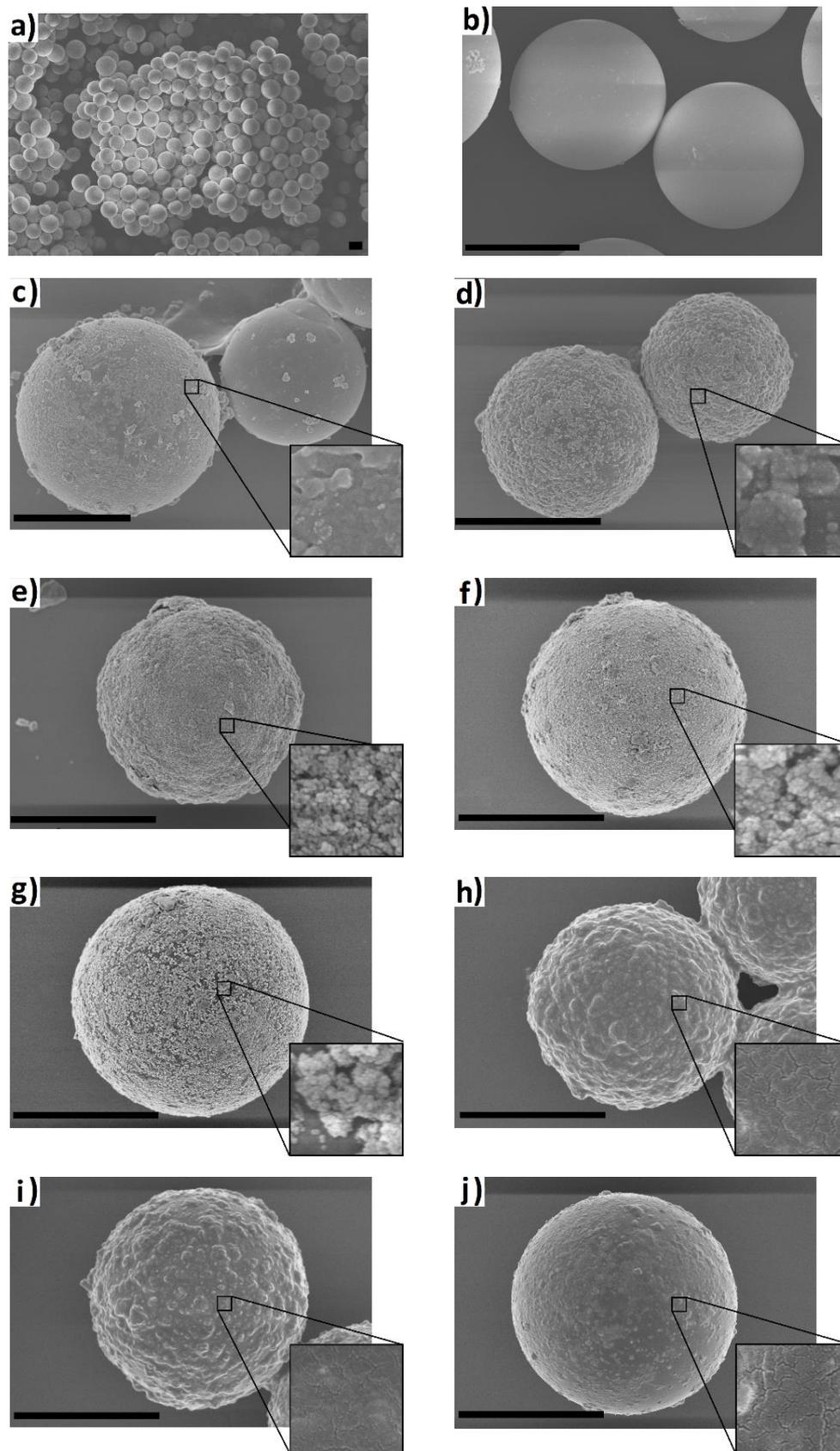


Figura 11. Imágenes de SEM de a, b) microesferas sin recubrir, c) Embo_1, d) Embo_2 , e) Embo_3 , f) Embo_4 , g) Embo_5 , h) Embo_6 , i) Embo_7 , j) Embo_8. Barra de escala 20 μm .

Por el contrario, se observa que las microesferas recubiertas con NPs más pequeñas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$) dan lugar a un revestimiento menos eficiente (muestras Embo_6, 7, 8 en Tabla 5 y Figuras h, i, j).

Por último, tanto en las plataformas compuestas por NPs de tipo $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ (Embo_3, 4, 5) como en las formadas por $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$ (Embo_6, 7, 8) se observa un incremento del rendimiento de recubrimiento cuando se emplean cantidades iniciales de magnetita mayores.

3.5. Evaluación de la capacidad magnetotérmica de microesferas recubiertas con $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$

Para conocer el potencial de las microplataformas fabricadas en terapias de hipertermia magnética, se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la capacidad magnetotérmica de NPs funcionalizadas y de microesferas recubiertas con estas NPs. Se han analizado dos tipos de NPs funcionalizadas, concretamente las muestras $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$, y tres tipos de microplataformas:

- 1) Embo_3 con un recubrimiento de $1.82 \cdot 10^7$ NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ por microesfera.
- 2) Embo_5 con un recubrimiento de $2.07 \cdot 10^6$ NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ por microesfera.
- 3) Embo_6 un recubrimiento de $7.94 \cdot 10^6$ NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$ por microesfera.

De esta manera ha sido posible estudiar tanto el efecto de la naturaleza de las NPMs depositadas sobre las microesferas, como el de la cantidad depositada. Cabe mencionar que la cantidad de magnetita en el resto de las microplataformas está por debajo del límite de detección del equipo, y por ello no han sido analizadas (Embo_1,2,7,8).

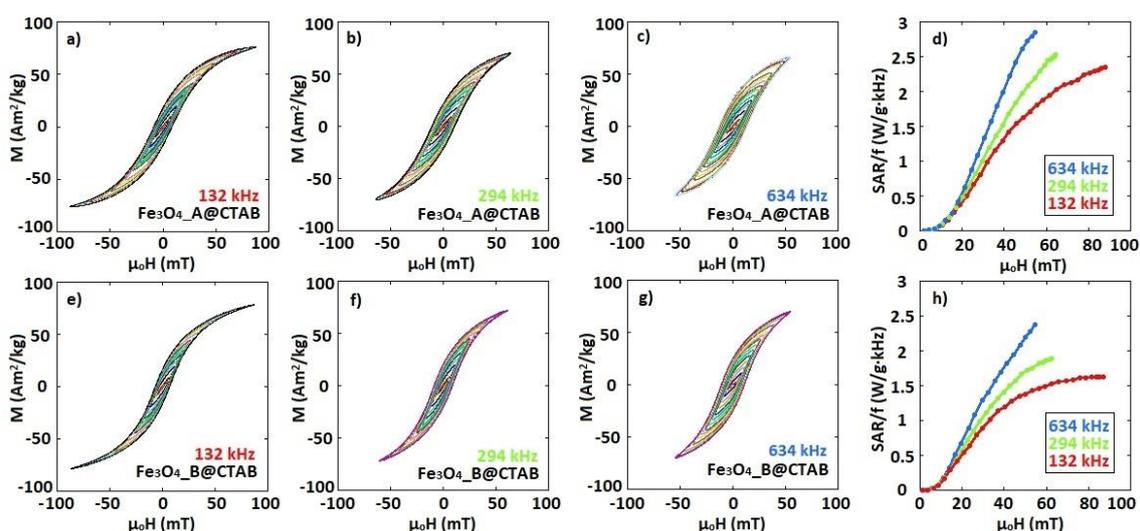


Figura 12. Ciclos AC de las muestras $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-A@CTAB}$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-B@CTAB}$ medidas con frecuencias de 132kHz (a, e), 294 kHz (b, f) y 634 kHz (c, g), así como las curvas de SAR/f (H) obtenidas en las tres frecuencias (d, h).

La Figura 12 muestra los ciclos AC de las nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$ inmovilizadas en agar medidas a tres frecuencias diferentes (132, 294 y 634 kHz). El objetivo de estas medidas es analizar el potencial de calentamiento que presentan las nanopartículas de 25 nm (Fe_3O_4_A) y de 20 nm (Fe_3O_4_B) funcionalizadas con CTAB antes de ser insertadas en la microplataforma.

Los ciclos de histéresis correspondientes a la amplitud máxima de campo aplicado alcanzan valores de imanación significativamente menores que la imanación de saturación de las muestras en magnetometría DC (véase figura 8b). Así mismo, la forma general de los ciclos de la figura 12 se aleja de la esperable en monodominios magnéticos térmicamente estables según el modelo de Stoner-Wohlfarth. Se aprecian bajas imanaciones remanentes y menores campos coercitivos que en las muestras sin recubrir Fe_3O_4_A y Fe_3O_4_B .

En el caso de la muestra de mayor tamaño ($\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$) estas características sugieren una fuerte influencia de las interacciones dipolares entre partículas, fruto de la intensa aglomeración que se deduce de los resultados obtenidos en DLS mostrados en la Tabla 4.

Para la muestra $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$, compuesta de partículas significativamente más pequeñas (20 nm), y con mucha menor tendencia a la aglomeración, los resultados obtenidos apuntan más bien a los fenómenos asociados a la relajación térmica de la imanación, dado que la forma de la curva roja en Figura 12(h) se aproxima a la respuesta magnética de partículas SPM.

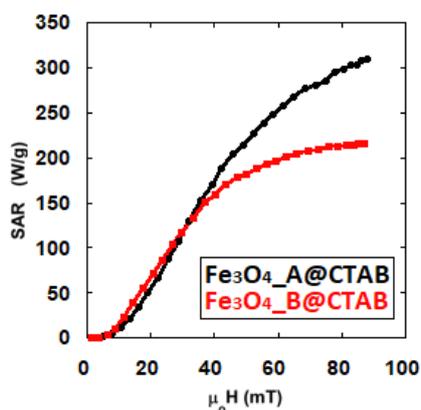


Figura 13. Comparación de curvas SAR (H) de las muestras $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$ a 132 kHz.

Comparando las muestras $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$ y $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$ se ve cierta similitud con la Figura 1b presentada en la introducción. La muestra $\text{Fe}_3\text{O}_4_A@CTAB$ tiene un tamaño mayor (25nm) y presenta una curva similar a las nanopartículas ferrimagnéticas teniendo valores de SAR ligeramente inferiores a la muestra $\text{Fe}_3\text{O}_4_B@CTAB$ en campos bajos y superiores en campos altos. Sin embargo, la curva de SAR no satura a campos altos, lo que es indicativo de la alta interacción entra NPs.

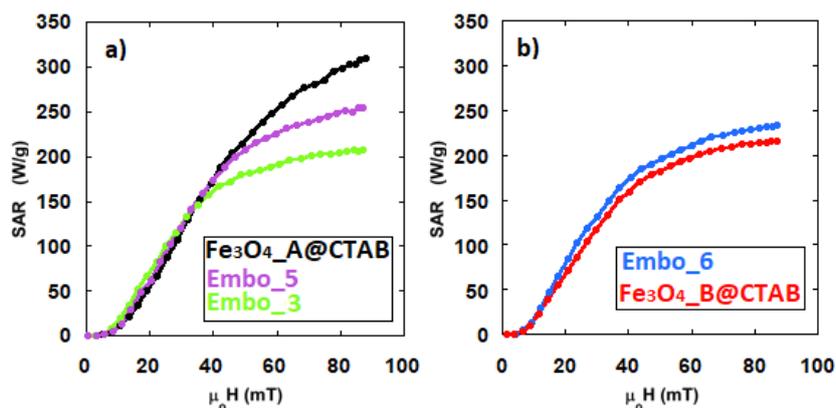


Figura 14. Comparación de las curvas de SAR (H) obtenidas a 132 kHz de las NPs funcionalizadas y de las microesferas recubiertas con dichas NPs. a) Curvas de SAR (H) correspondientes a las NPs Fe₃O₄_A@CTAB y a las microesferas Embo_3 y Embo_5. b) Curvas de SAR (H) correspondientes a las NPs Fe₃O₄_B@CTAB y a las microesferas Embo_6.

En consonancia con los anteriores resultados, cuando se recubren las microesferas con la muestra más aglomerada y con nanopartículas más grandes (Fe₃O₄_A@CTAB), la respuesta magnetotérmica (por gramo de magnetita) disminuye, ya que se consigue un sistema con más interacciones y aglomeración. Esta tendencia se ve también comparando las microesferas Embo_3 y Embo_5 (Figura 14a). Teniendo en cuenta que Embo_3 tiene una concentración mayor de nanopartículas en la superficie y un mayor grado de aglomeración, es lógica la disminución de la respuesta magnetotérmica.

Por otra parte, al recubrir las microesferas con nanopartículas de menor tamaño y menor aglomeración, el caso de Embo_6, la respuesta magnetotérmica mejora ligeramente (Figura 14b).

A pesar de las diferentes características de las nanopartículas Fe₃O₄_A@CTAB y Fe₃O₄_B@CTAB y las diferentes deposiciones llevadas a cabo sobre microesferas (Embo_3, Embo_5 y Embo_6), las diferencias en la capacidad magnetotérmica de las microplataformas (por gramo de magnetita) no es muy significativa (véase Tabla 6).

Debido a que en los tratamientos clínicos de embolización se inyectan 2 mL de Embozene TANDEM^{RT} ($3.4 \cdot 10^7$ microesferas) al paciente, es de interés estudiar el poder magnetotérmico de una dosis (Tabla 6).

Tabla 6. Valores de SAR por unidad de masa de magnetita e inyección en una dosis clínica a 80 mT.

Muestra	SAR (W/g)	SAR (W/ inyección)
M19@CTAB	309	
M37@CTAB	215	
Embo_3	208	5.48
Embo_5	255	0.76
Embo_6	233	1.36

Aunque, los valores de SAR (W/g) sean inferiores en las microesferas con mayor concentración de magnetita (debido al aumento de las interacciones dipolares), cuando se hace un ensayo clínico de embolización se usan en torno a $3.4 \cdot 10^7$ microesferas. De modo que si se comparan los vatios (W) producidos en esa cantidad de microesferas, se observa que una dosis de microplataformas de tipo Embo_3 calentarían mucho más que una dosis con las microplataformas Embo_5 y Embo_6 (Tabla 6).

Por ende, habría que contemplar también la posibilidad de recubrir las microesferas con grandes cantidades de magnetita para conseguir un mayor rendimiento calorífico por cada microesfera.

4. Conclusiones

Se han conseguido NPMs de magnetita monodispersas y monocristalinas con tamaños entre 20 y 25 nm, a partir de la descomposición térmica controlada del oleato de hierro(III). Además, se ha llevado a cabo un proceso de escalado del método sintético de NPMs, obteniendo resultados reproducibles. Las propiedades magnéticas obtenidas en las NPMs (imaneación de saturación y temperatura de Verway) son comparables con las de la magnetita en estado masivo, lo que indica la alta calidad de la fase cristalina de magnetita. Se ha llevado a cabo con éxito la funcionalización de las nanopartículas con las moléculas anfifílicas CTAB y PMAO, consiguiendo dispersiones estables en medio acuoso. En cuanto a la agregación de NPMs en el proceso de funcionalización, las nanopartículas de mayor tamaño forman aglomerados de mayor dimensión debido al incremento de las interacciones dipolares entre partículas.

Una vez se han funcionalizado las NPMs se ha llevado a cabo un trabajo sistemático de recubrimiento de las microesferas Embozene TANDEM^{RT}, consiguiéndose la deposición de nanopartículas de tipo Fe₃O₄@CTAB y Fe₃O₄@PMAO sobre la superficie de las microesferas. Se ha observado que el rendimiento del proceso de recubrimiento disminuye cuando aumenta la cantidad de magnetita empleada. Los sistemas de tipo Fe₃O₄@CTAB dan lugar a recubrimientos de microesferas más eficientes en comparación con sus homólogos de PMAO. En lo que a respuesta magnética se refiere, se han obtenido valores de SAR entre 215-309 W/g para las nanopartículas funcionalizadas y 208-255 W/g para las microesferas recubiertas. En el caso de las microesferas, cuanto mayor es la cantidad de magnetita depositada el valor de SAR (por unidad de masa de magnetita) disminuye, debido a los efectos de aglomeración. Sin embargo, si se calcula la cantidad de calor que produciría una dosis habitual en terapias clínicas de quimioembolización (aproximadamente 30 millones de microesferas), la muestra con mayor concentración de nanopartículas es la que generaría el mayor aumento de temperatura, por lo que, probablemente, las microplataformas más cargadas de NPs serían las más prometedoras para desarrollar agentes teranósticos de gran eficiencia y versatilidad.

5. Bibliografía

- [1] B.S. Murty, P. Shankar, B. Raj, B. B. Rath, J. Murday. "Textbook of Nanoscience and Nanotechnology". 2013, 29-65.
- [2] M.T. Crispin, R. Kudzai, C. Haleden. *Miner. Eng.* 2021, 166, 106881.
- [3] A. A. Rempel. *Russ. Chem. Rev.* 2007, 76, 435.
- [4] D. Maity, G. Zoppellaro, V. Sedenkova, J. Tucek, K. Safarova, K. Polakova, K. Tomankova, C. Diwoy, R. Stollberger, L. Machala, R. Zboril. *Chem. Commun.* 2012, 48, 11398-11400.
- [5] V. Amendola, A. Guadagnini, S. Agnoli, D. Badocco, P. Pastore, G. Fracasso, M. Gerosa, F. Vurro, A. Busato, P. Marzola. *J. Colloid Interf. Sci.* 2021, 596, 332-341.
- [6] D. Thomas, N. Mathew, M. S. Nath. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, 173, 277-284.
- [7] C. Prieto, I. Linares. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2018, 23 (5), 474-480.
- [8] Y. J. Wáng, T. D. Baere, J. Idée, S. Ballet. *Chin. J. Cancer. Res.* 2015, 27 (2), 96-121.
- [9] M. T. Lee, A. Vargas, S. Dua, R. M. Dafer. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases.* 2017, 26 (12), e224-e225.
- [10] K. Nakasumi, H. Sunahara, K. Igari, H. Itoh, K. Itamoto, N. Yamamoto, T. Ishikawa, T. Takami, I. Sakaida, Y. Taura, K. Tani. *Research in Veterinary Science.* 2020, 129, 174-177.
- [11] R. C. G. Martin, C. R. Scoggins, M. Schreeder, W. S. Rilling, C. J. Laing, C. M. Tatum, L. R. Kelly, R. D. Garcia-Monaco, V. R. Sharma, T. S. Crocenzi, S. M. Strasberg. *Cancer.* 2015, 121 (20), 3649-3658.
- [12] K. T. Brown, K. D. Richard, M. Gonen. *J. Clin. Onco.* 2016, 34 (17), 2046-2053.
- [13] Kin Y. Tam, et al. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2011, 44 (1-2), 1-10.
- [14] J. G. Drougas, L. B. Anthony. *Am. J. Surg.* 1998, 175 (5), 408-412.
- [15] N. E. Kazantseva, I. S. Smolkova, V. Babayan, J. Vilcakova. *Nanomaterials.* 2021, 11 (12), 3402.
- [16] W. Cai, W. Wang, L. Lu. *Colloid. Polym. Sci.* 2013, 291, 2023-2029.
- [17] R. T. Araujo, G. R. Ferreira, T. Segura, G. F. Souza, F. Machado. *Eur. Polym. J.* 2015, 68, 441-459.
- [18] R. R. Shah, T. P. Davis, A. L. Glover. *J. Magn. Magn. Mater.* 2015, 387, 96-106.
- [19] Z. Li, X. Qin, L. Guo, H. Wang, X. Liu. *Inter. J. of Pharm.* 2017, 527, 31-41.
- [20] D. Goéré, O. Glehen. *The Lancet Oncology.* 2020, 21 (9), 1147-1154.
- [21] Z. Liang, D. Yang. *Acta Medica Mediterranea.* 2020, 36 (1), 465-469.
- [22] A. V. Shabunin, M. M. Tavobilov, et al. *Siberian J. Onco.* 2018, 17 (3), 34-40.
- [23] R. Hergt, S. Dutz, R. Müller. *J. Phys.: Condens. Matter.* 2006, 18 (38), 2919-2934.

- [24] P. Das, L. Salvioni, et al. *J. Coll. Inter. Sci.* 2020, 579, 186-194.
- [25] J. Xie, G. Liu, et al. *Acc. Chem. Res.* 2011, 44 (10), 883-892.
- [26] Z. R. Stephen, F. M. Kievit, et al. *Material Today.* 2011, 14 (7-8), 330-338.
- [27] W. Brown. *Phys. Rev.* 1963, 130 (5), 1677-1686.
- [28] B. D. Cullity, C. D. Graham. "Introduction to Magnetic Materials". 2008, 115– 149.
- [29] L. Zhou, J. Yuan, et al. *Materials Letters.* 2009, 63 (18-19), 1567-1570.
- [30] M. Virumbrales, V. Blanco-Gutiérrez, et al. *J. Alloys. Comp.* 2018, 767, 559-566.
- [31] A. Aldaoud, O. M. Lemine, et al. *Physica B: Condensed Matter.* 2022, 639, 413993.
- [32] A. Muela, D. Muñoz, et al. *J. Phys. Chem.* 2016, 120 (42), 24437-24448.
- [33] M. Harabech, J. Leliaert, et al. *J. Magn. Magn. Mater.* 2017, 426, 206-210.
- [34] A. Das, K. K. Bestha, et al. *Nanotechnology.* 2020, 31 (33), 335716.
- [35] H. Mamiya, H. Fukumoto, et al. *ACS Nano.* 2020, 14 (7), 8421-8432.
- [36] A. G. Niculescu, C. Chircov, et al. *Methods.* 2022, 199, 16-27.
- [37] T. Iwamoto, T. Kinoshita, et al. *J. sol. state chem.* 2016, 237, 19-26.
- [38] L. Qiao, Z. Fu, et al. *ACS nano.* 2017, 11, 6370-6381.
- [39] B. Qi, L. Ye, et al. *J. Phys. Chem.* 2013, 177, 5429-5435.
- [40] I. Castellanos-Rubio, I. Rodrigo, et al. *ACS. Appl. Mater. Interfaces.* 2020, 12, 27917-27929.
- [41] I. Castellanos-Rubio, O. Arriortua, et al. *Chem. Mater.* 2021, 33, 8693-8704.
- [42] O. Chen, X. Chen, et al. *Angew. Chemie.* 2008, 47 (45), 8638-8641.
- [43] T. Pellegrino, L. Manna, et al. *J. Nano Lett.* 204, 4 (4), 703-707.
- [44] A. Rajan, B. Kaczmarek-Szczepańska, et al. *Materials Today.* 2021, 28, 102583.
- [45] K. Musza, R. Mészáros, et al. *J. Mol. Struc.* 2022, 1262, 132948.
- [46] C. G. Lavorato, J. C. Azcárate et al. *Applied Surface Science.* 2021, 570, 151171.
- [47] W. Yuan, G. Weng, et al. *Adv. Colloid. Interface Sci.* 2020, 282, 102200.
- [48] J. Rodríguez-Carvajal. *Physica B: Condensed Matter.* 1993, 192 (1-2), 55-69.
- [49] Y. Lu, J. D. Miller. *J. Coll. Inter. Sci.* 2002, 256 (1), 41-52.
- [50] M. Basak, M. L. Rahman, et al. *J. All. Comp.* 2022, 895, 162694.
- [51] E. C. Stoner, E. P. Wohlfarth, et al. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.* 1948, 240 (826), 599-642.