



## INGENIERÍA DE LA SALUD

Rutas sintéticas de nanopartículas metálico-magnéticas  
para teranóstico tumoral.

Synthetic routes of metallic-magnetic nanoparticles for  
tumor theranostic.

Realizado por:  
Elena De Gomar Vilchez

Tutorizado por:  
Juan Manuel Romero Jerez  
Carlos Caro Salazar

Departamento de Tecnología Electrónica

MÁLAGA, Septiembre de 2021

## Agradecimientos

La realización de este trabajo debo agradecerla principalmente a mi tutor el Dr. Carlos Caro Salazar, quien guió todos mis pasos tanto dentro de Bionand como fuera hasta el final de la entrega de mi proyecto; acompañándome y compartiendo conmigo su conocimiento y su tiempo. Gracias a él he podido descubrir los entresijos de la Nanomedicina, de la investigación y encontrar la vía que quiero seguir.

Gracias a mi tutor académico el Dr. Juan Manuel Romero Jerez por introducirme en este mundo con su asignatura, enviarme la noticia del grupo de Bionand en el momento apropiado y animarme a ponerme en contacto con ellos. Asimismo, estoy muy agradecida a la Dra. María Luisa García Martín, por abrirme las puertas del centro y darme la confianza de introducirme en su grupo. Gracias a todo el equipo de Bionand por ofrecerme las instalaciones donde se pudo llevar a cabo el trabajo realizado, por dejarme formar parte de su día a día y aprender de la mano de profesionales con ese factor tan humano. Gracias al ingeniero Roberto Gallardo Gil por proponerme la parte técnica del proyecto y resolver mis dudas.

Quiero agradecer a mi amigo, el ingeniero Ferran Llorente Poblador, por ayudarme en la parte más técnica del proyecto.

A mis compañeros de la hostelería, con especial mención a mi jefe Moisés por ser tan flexible y entender que para mí lo primero era mi carrera y mi proyecto.

A mis amigos, los que conocí desde el principio de esta etapa y los que han ido llegando, a todos los que se han quedado conmigo y me han ayudado y animado tanto. Gracias por ser mi familia en esta etapa. A mis compañeros de piso de este último curso, los Jesuses, por su comprensión, su música y su amor.

Toda mi gratitud a mi madre por estar siempre a una llamada, a mi padre por sentirse tan orgulloso de mí, a mi hermana Zaira por apoyarme en todos los pasos que doy, a mis tíos y a mi primilla Anna por confiar en mí y remontarme con todo el amor en las veces que me muestro insegura y dudo de mis capacidades. Sois mi motor.

Este proyecto va dedicado a la memoria de mi prima Raquel. Una más de las incansables luchadoras contra el cáncer y el principal motor de mi interés por este tema. Con tu cariño has guiado mis pasos hacia este mundo y en honor a tus palabras, seguiré tu lucha contra esta enfermedad.

## Resumen

Actualmente, el cáncer es una enfermedad con un elevado impacto socio-económico. Los métodos actuales de diagnóstico y terapia presentan problemas de especificidad y, como consecuencia, toxicidad no selectiva, acarreando efectos secundarios que afectan notablemente a la calidad de vida de los pacientes.

La nanotecnología permite desarrollar sistemas con cualidades únicas y customizables. En los últimos años, se están realizando avances con nanopartículas (NPs) que permiten el reconocimiento específico de células tumorales, y por lo tanto, abordar nuevos enfoques para el teranóstico tumoral. Las nanopartículas magnéticas (NPMs) son especialmente interesantes ya que engloban potenciales capacidades para diagnóstico y terapia tumoral, en una sola entidad nanométrica.

En este proyecto se han sintetizado NPMs de óxido de hierro mediante protocolos sintéticos diferentes, obteniendo distintos tamaños, formas y estados de agregación. Algunas de las NPMs obtenidas no eran dispersables en agua, por lo que se funcionalizaron con un ligando derivado de polietilenglicol (PEG), que permite su suspensión en medio acuoso y además, reduce la opsonización de estas en ambientes biológicos (cultivos celulares o torrente sanguíneo por ejemplo).

Finalmente, se evaluaron sus capacidades tanto como agentes de contraste, evaluando sus relajatividades a 1.5 y 9.4 T; como de agentes terapéuticos, realizando medidas de incremento de temperatura y tasa de absorción específica (SAR) con resultados muy prometedores.

Palabras clave: Nanotecnología, nanopartículas magnéticas, relajatividades, agentes de contraste, MRI, hipertermia magnética.

## Abstract

Currently, cancer is a disease with a high socio-economic impact. Current methods of diagnosis and therapy have specificity problems and, as a consequence, non-selective toxicity, leading to side effects that significantly affect the quality of life of the patients.

Nanotechnology allows the development of systems with unique and customizable qualities. In recent years, advances are being made with nanoparticles that allow the specific recognition of tumor cells, and therefore, address new approaches for tumor theranostic. Magnetic nanoparticles (NPMs) are especially interesting since they encompass potential capabilities for tumor diagnosis and therapy, in a single nanometric entity.

In this project, iron oxide NPs have been synthesized using different synthetic protocols, obtaining different sizes, shapes and states of aggregation. Some of the NPMs obtained were not dispersible in water, so they were functionalized with a ligand derived from polyethylene glycol (PEG), which allows their suspension in aqueous medium and also reduces their opsonization in biological environments (for instance cell cultures or bloodstream).

Finally, their abilities as contrast agents were evaluated, by their relaxivities at 1.5 and 9.4 T; and as therapeutic agents, performing measurements of temperature increase and specific absorption rate (SAR) with very promising results.

Keywords: Nanotechnology, magnetic nanoparticles, relaxativities, contrast agents, MRI, magnetic hyperthermia.

## Índice

Listado de abreviaturas .....	1
1. Introducción.....	2
1.1.    Cáncer (¿Qué es? Tratamiento actual, problemas de este tratamiento.....)	2
1.2.    Nanotecnología y nanomedicina.....	8
1.3.    Nanomateriales magnéticos .....	9
1.4.    Direccionamiento de NPs.....	14
1.5.    Hipertermia .....	15
2. Objetivos.....	19
3. Materiales y metodología .....	20
3.1.    Materiales .....	20
3.2.    Síntesis de los precursores metálicos.....	21
3.3.    Síntesis de las nanopartículas magnéticas.....	23
3.3.1. Síntesis por descomposición térmica de precursores.....	23
3.3.2. Síntesis por coprecipitación de sales de hierro .....	26
3.3.    Síntesis del ligando para estabilización en medios acuosos .....	26
3.4.    Intercambio del ligando.....	28
3.5.    Caracterización físico-química .....	29
3.5.4. Recursos tecnológicos empleados.....	29
4. Resultados y discusión .....	33
4.1.    Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) .....	33
4.2.    Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	35
4.3.    Relaxometría.....	36
4.4.    Medidas de hipertermia magnética.....	37
5. Conclusiones .....	43
6. Referencias.....	45
7. Anexos.....	53
7.1.    Anexo I: Código del controlador de temperatura .....	53
7.2.    Anexo II: Introducción de un sensor .....	55

## Listado de abreviaturas

ACAC. Acetilacetinado

CMEAF. Campos magnéticos externos de alta frecuencia

DLS. Dispersión dinámica de la luz

EPR. Efecto de permeabilidad y retención aumentada

Hc. Campo coercitivo

HT. Hipertermia

Mr. Imanación remanente

MRI. Imagen por resonancia magnética

Ms. Magnetización de saturación

NPMs. Nanopartículas magnéticas

NPs. Nanopartículas

PEG. polietilenglicol

r<sub>1</sub>. Relajatividad longitudinal

r<sub>2</sub>. Relajatividad transversal

SAR. Tasa de absorción específica

T<sub>1</sub>. Tiempo de relajación longitudinal

T<sub>2</sub>. Tiempo de relajación transversal

## 1. Introducción

### 1.1. Cáncer (¿Qué es? Tratamiento actual, problemas de este tratamiento...)

Se puede describir como ciclo de una célula normal, al conjunto de eventos, regulados por factores internos y externos, encaminados a la división celular. Cuando una célula envejece o se daña, el ciclo celular se ve alterado, y como consecuencia, se desencadena un proceso de muerte celular controlada o apoptosis. Sin embargo, algunas de estas células son capaces de evadir los procesos reguladores del ciclo celular y adquieren la capacidad de dividirse sin control, formando en la mayoría de los casos, masas sólidas de células (tumores). Este estado patológico se denomina cáncer, y la diseminación de estas células a otros tejidos distintos al origen por medio del sistema circulatorio o linfático, para formar nuevos tumores, metástasis[1].

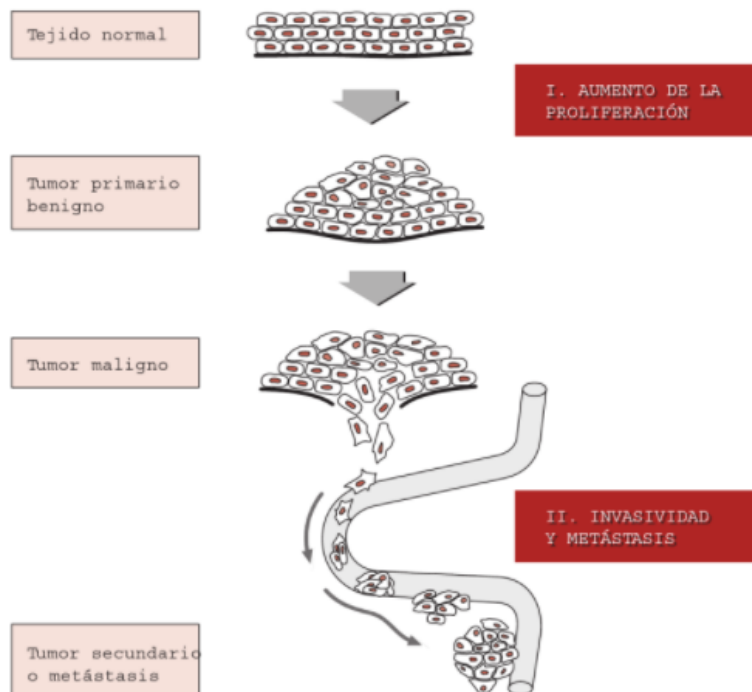


Fig.1. Fases de la aparición de un cáncer [2].

La International Agency for Research on Cancer estimó que en el año 2018 se diagnosticaron alrededor de 18,1 millones de cánceres en el mundo y unos 19,3 millones en el 2020. Las estimaciones a nivel mundial indican que el número de nuevos casos aumentará en las dos próximas décadas, llegando a los 30,2 millones en el año 2040.

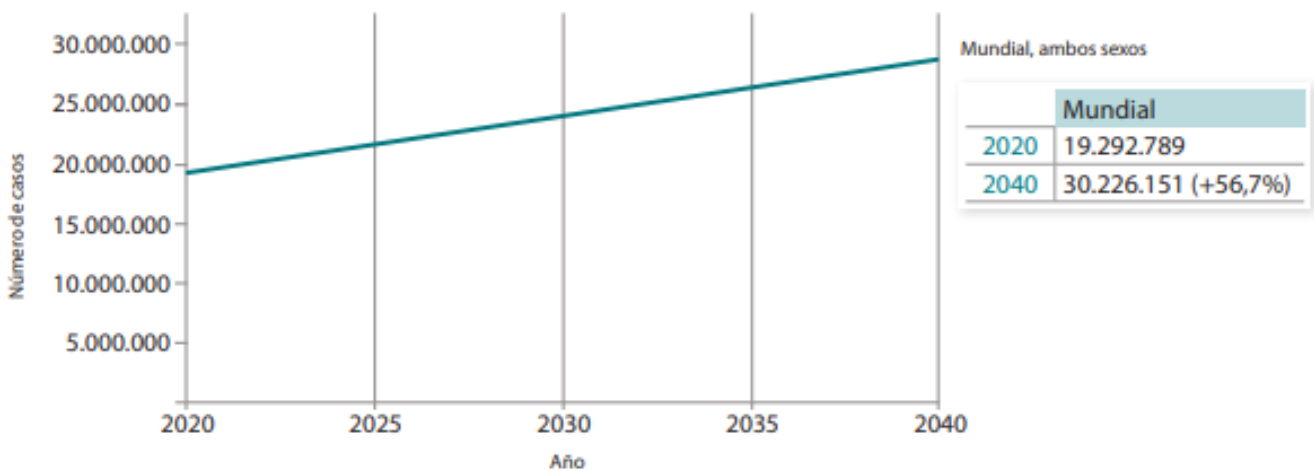


Fig.2. Incidencia estimada de nuevos casos de cáncer en la población mundial en los años 2020 y 2040[3].

De igual forma que pasa con la incidencia, se espera un incremento de la mortalidad en los próximos años, estimándose en más de 16 millones en 2040; y en España se estima que incrementará de 113.000 casos en 2020 a más de 160.000 en 2040[3].



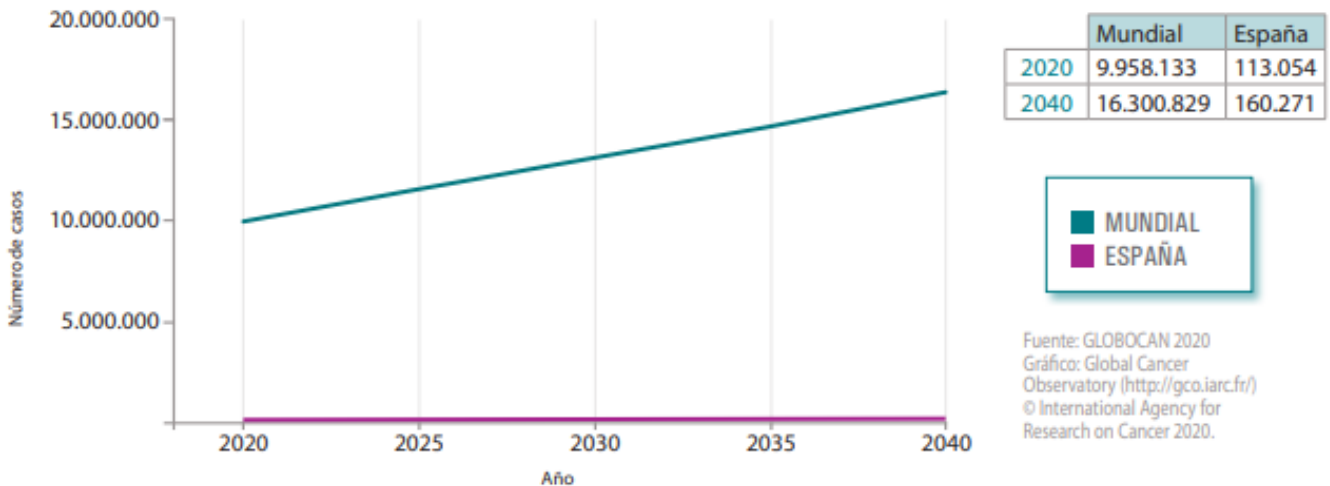


Fig.3. Mortalidad estimada por cáncer en la población mundial para los años 2020 y 2040[3].

La mayoría de los cánceres en estadio IV presentan un pronóstico con incluso menos de 2 años de mediana de supervivencia general, lo que da una idea de su agresividad y letalidad [4].

Entre los métodos diagnósticos actuales se encuentran las pruebas analíticas (de sangre, de orina...), pruebas de tejidos a través de una biopsia o citología y las pruebas por imagen, siendo estas últimas una herramienta muy potente y no invasiva.

Dependiendo de la longitud de onda de la radiación electromagnética utilizada, existen diferentes métodos de imagen diagnóstica: rayos X en el caso de las radiografías y la tomografía computarizada, ultrasonidos para las ecografías, partículas radiactivas para la tomografía por emisión de positrones (PET) y para la tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) o campos magnéticos para el caso de la imagen por resonancia magnética (MRI)[5].

Entre todas ellas, la MRI se considera la técnica más versátil, ya que permite tener información tanto anatómica como funcional. En esta técnica los espines de átomos magnéticos se alinean cuando se encuentran sometidos a un campo magnético externo. Los espines en este estado empiezan a realizar un movimiento cónico o de precesión en distinta fase. Al excitar la muestra mediante la aplicación de un pulso de radiofrecuencia, desviando el vector de magnetización un cierto ángulo respecto al campo externo, los espines precesan con la misma fase. Una vez retirado este pulso el sistema tiende a volver a la situación de equilibrio térmico (Fig. 4).

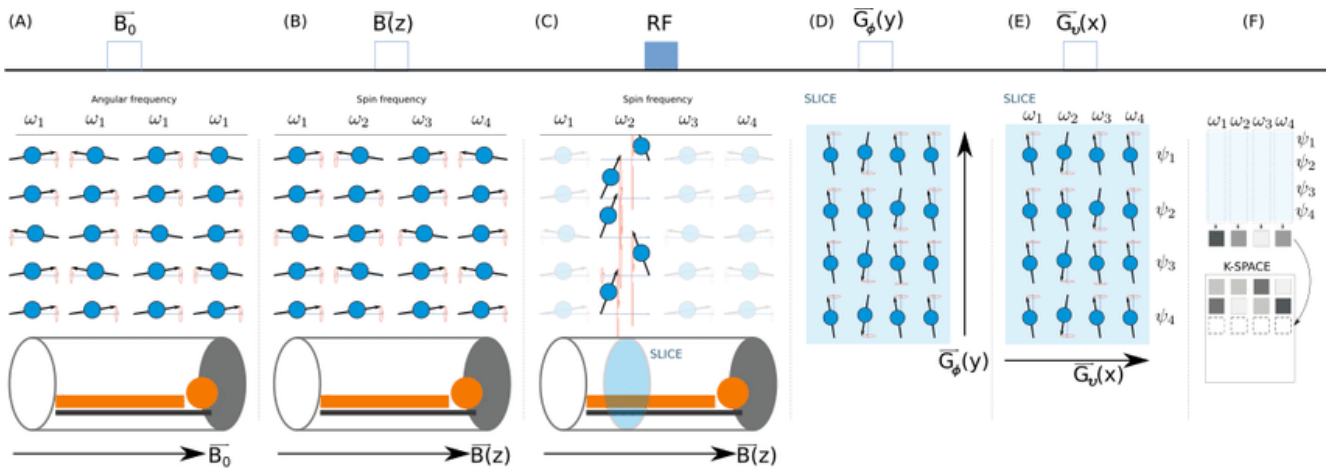


Fig.4. Esquema de adquisición de MRI [6].

La velocidad a la que este hecho sucede está caracterizada por el tiempo de relajación longitudinal ( $T_1$ ), el cual es determinante en la recuperación de la magnetización a lo largo del eje longitudinal z, y por el tiempo de relajación transversal ( $T_2$ ), que recoge la pérdida de magnetización en el plano xy. Esta recuperación hasta el estado basal se traduce en una señal eléctrica, que posteriormente se codifica a imagen mediante un procesamiento matemático.

Aunque se pueden obtener imágenes por MRI con varios elementos químicos, el átomo de hidrógeno es el más utilizado en ámbito clínico, ya que es el más abundante en el cuerpo.

El contraste que se obtiene en las imágenes de los distintos tejidos viene determinado principalmente por diferencias en la concentración del agua en los tejidos y por los diferentes tiempos de relajación mencionados, ya que estos se ven afectados por las características intrínsecas del tejido [7].

A pesar de que la MRI da como resultado imágenes con buenos contrastes, en determinadas situaciones es necesario utilizar agentes de contraste (AC), siendo capaces de disminuir los tiempos de relajación de los protones cercanos. El parámetro que determina la capacidad de una sustancia como AC para MRI es la relajatividad, tanto para la magnetización longitudinal ( $r_1$ ), como la transversal ( $r_2$ )[8]. La relajatividad se calcula como la pendiente del ajuste lineal de la concentración frente a la inversa del tiempo de relajación. El ratio  $r_2/r_1$  indica la capacidad del material para ser usado como AC en  $T_1$  o  $T_2$ . Los valores más bajos de  $r_2/r_1$  (entre 1 y 3) se consideran AC tipo  $T_1$ , los valores más altos ( $> 10$ ) al tipo  $T_2$ , y los valores intermedios, entre 3 y 10, pueden considerarse como AC duales [9].

Los AC más empleados en clínica son los complejos de Gadolinio (Gd) III, pertenecientes al grupo de AC  $T_1$  o positivo. Con siete electrones desapareados, tiene un gran momento magnético (toda carga en movimiento genera un campo magnético). Pero dado que los iones  $Gd^{3+}$  son tóxicos, a menudo, deben ser complejados con quelatos o estructuras macrocíclicas coordinadas con el metal antes de las inyecciones *in vivo*. Asimismo, estos son mal captados y retenidos en las células, ya que su funcionalización con biomoléculas resulta compleja y

por ello, carecen de especificidad diagnóstica. Además, tienen un corto tiempo de circulación ya que se excreta rápidamente a través de la orina. A pesar de la utilización de los macrociclos, hay estudios que demuestran cierta toxicidad, derivada de la liberación de los iones  $Gd^{3+}$ , y su acumulación en el cerebro o en los riñones. Por ello, es necesario el desarrollo de nuevos AC con menor riesgo de toxicidad y mayor especificidad que superen estos problemas[10][11].

El abordaje terapéutico más utilizado para combatir el cáncer es (no siempre en este orden): resección quirúrgica, radioterapia y terapia sistémica (quimioterapia, inmunoterapia...).

La resección quirúrgica es imposible en determinados casos, ya que se provocaría la muerte instantánea del paciente. La radioterapia consiste en el uso de rayos X u otras radiaciones con alta energía para destruir, así, las células cancerosas. El problema es que esta radiación no solo destruye y ralentiza el crecimiento de las células cancerosas, sino que, también afecta a las células sanas de los tejidos que interaccionan con la radiación[12].

Por otro lado, la inmensa mayoría de fármacos utilizados para terapia sistémica en ámbito clínico, tienen como objetivo interferir el ciclo celular de las células tumorales, y por lo tanto, evitar su división celular descontrolada. Sin embargo, estos fármacos no están dirigidos contra dianas celulares específicas, y por lo tanto, presentan un grave problema, afectando de igual forma a las células sanas, que se dividen utilizando el mismo mecanismo que las células tumorales [13]. Además, estos fármacos deben atravesar una elevada cantidad de barreras biológicas (filtrado renal, eliminación hepática, etc).

En consecuencia, las principales aproximaciones terapéuticas actuales, presentan graves efectos secundarios, derivados de las elevadas dosis que se han de administrar para conseguir concentraciones terapéuticas en los tumores, principalmente, por su falta de selectividad. De esta forma, es necesario buscar nuevos métodos terapéuticos más efectivos, que puedan incrementar la supervivencia de los pacientes y mejorar su pronóstico actual[14].

## 1.2. Nanotecnología y nanomedicina

Las características estructurales y electrónicas de un material determinan sus propiedades físico-químicas y por consecuencia, las propiedades magnéticas, mecánicas, ópticas y catalíticas, variarán en función del tamaño del material. Por ello, las propiedades físicas de las partículas que se observan en un sólido de tamaño macroscópico son muy distintas a diferentes escalas, incluso teniendo la misma composición química [15].

La nanotecnología fue descrita por primera vez en 1959 por el Pf. Dr. Richard Feynman, premio Nobel de Física en 1965 [16], y se puede definir como la investigación y desarrollo tecnológico a nivel atómico, molecular y supramolecular de materiales con al menos 1 de sus dimensiones en la escala nanométrica [17]. Al disminuir un material a escalas nanométricas, de 1 a 100 nm, se origina un aumento en proporción de los átomos de la superficie con relación a los que se encuentran en el interior del material. Esto provoca que haya una mayor superficie de contacto del material con el entorno y una mayor reactividad química, ya que aumenta el número de átomos insaturados con una coordinación no satisfecha y por tanto inestables y con gran tendencia a combinarse [18]. Asimismo, estos átomos de superficie presentan una simetría

local distinta y por consecuencia, una anisotropía magnética diferente [15]. Otros efectos derivados del tamaño nanométrico son el incremento de las fuerzas de atracción Van der Waals o el confinamiento cuántico en una dirección determinada [19]. Este confinamiento cuántico, conlleva además variaciones de la densidad de estados al nivel de Fermi y por consecuencia, de las propiedades magnéticas intrínsecas de los materiales [15].

La nanomedicina es una rama de la nanotecnología que proporciona aplicaciones directas en medicina [20]. Basándose en las nuevas propiedades de los materiales a estas escalas y aprovechando que el tamaño “per se” de estos poseen las mismas dimensiones de entidades biológicas con funciones relevantes (anticuerpos, receptores de membrana, etc), permite realizar terapias avanzadas de enfermedades desde el interior del organismo a un nivel celular o molecular [21][22]. Esta ciencia agrupa 3 grandes áreas [23]:

- Nanodiagnóstico: Consiste en el desarrollo de nanosistemas de análisis para la detección de enfermedades, ya sea *in vivo* o *in vitro*.
- Nanoterapia: Cuyo objetivo es proporcionar nuevas terapias avanzadas mediante nanosistemas.
- Nanomedicina regenerativa: Tiene como objetivo la reparación o sustitución de tejidos/órganos dañados mediante herramientas nanotecnológicas.

### 1.3. Nanomateriales magnéticos

El comportamiento magnético es un fenómeno físico por el que los materiales ejercen fuerzas de atracción o repulsión sobre otros materiales. Esto se origina

por el movimiento de los electrones el cual, se puede generar de dos formas distintas: por su movimiento orbital alrededor del núcleo, es decir por un movimiento de traslación, o bien, por un movimiento de rotación del propio electrón sobre su eje. Este último, crea los dipolos magnéticos en la estructura de la materia. Por este hecho, se puede pensar en un material magnético como un conjunto de dipolos magnéticos, que forman una región imantada cada uno con su polo norte y sur, dando lugar a dominios magnéticos orientados aleatoriamente, en ausencia de campo magnético externo [24].

Según las características electrónicas de los átomos que forman un material, su reacción a campos magnético externo es diferente, y puede medirse utilizando curvas de magnetización o de histéresis, y por lo tanto pueden clasificarse, como se observa en la Figura 5.

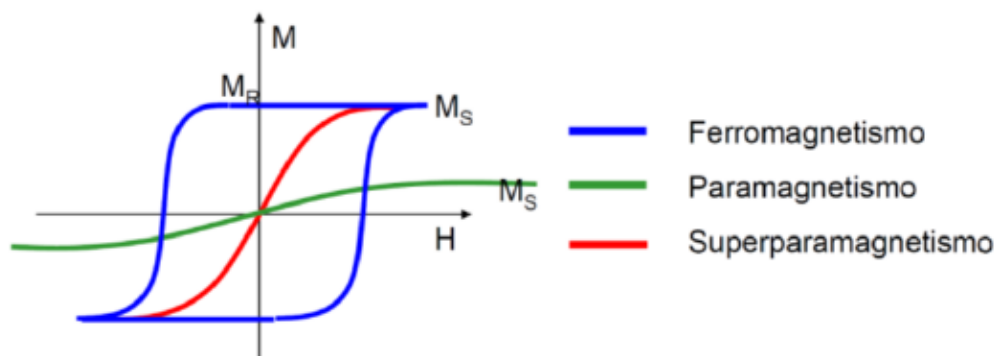


Fig.5. Curvas de magnetización para cada tipo de material.

En un material ferromagnético los dominios se orientarán en la misma dirección que el campo magnético aplicado, reforzándolo. En este caso su imanación aumenta hasta alcanzar un valor máximo, donde quedando el material queda saturado magnéticamente (magnetización de saturación ( $M_s$ )), ya que todos los momentos magnéticos han sido alineados. La característica de estos dominios es

que, una vez retirado el campo externo aplicado, la mayoría quedan orientados en la dirección de este y no vuelven a su estado original, es decir, la imanación decrece, pero manteniendo un valor residual llamado imanación remanente ( $M_r$ ). Finalmente, la coercividad ( $H_c$ ) puede definirse como, el campo magnético necesario para anular la imanación de estos materiales [25].

Por el contrario, los materiales paramagnéticos presentan electrones que se orientan al aplicar un campo magnético en la misma dirección que este, pero en este caso, no hay comportamiento magnético remanente cuando se elimina. Otro tipo de materiales son los superparamagnéticos, los cuales presentan una  $M_s$  similar a los ferromagnéticos, pero, sin embargo, tienen una  $M_r$  muy baja (prácticamente 0) y baja coercitividad. Si se reduce lo suficiente el tamaño de un material ferromagnético (a escala nanométrica), estos materiales pasan a tener dominios magnéticos simples y, como consecuencia, comportarse como materiales superparamagnéticos [26][27]. Cabe resaltar que, por su escasa  $M_r$ , las NPs superparamagnéticas son muy atractivas para aplicaciones biomédicas, ya que el riesgo de formación de aglomerados que pudieran formar trombos sanguíneos, realizando una administración intravenosa, es mínimo [28][29].

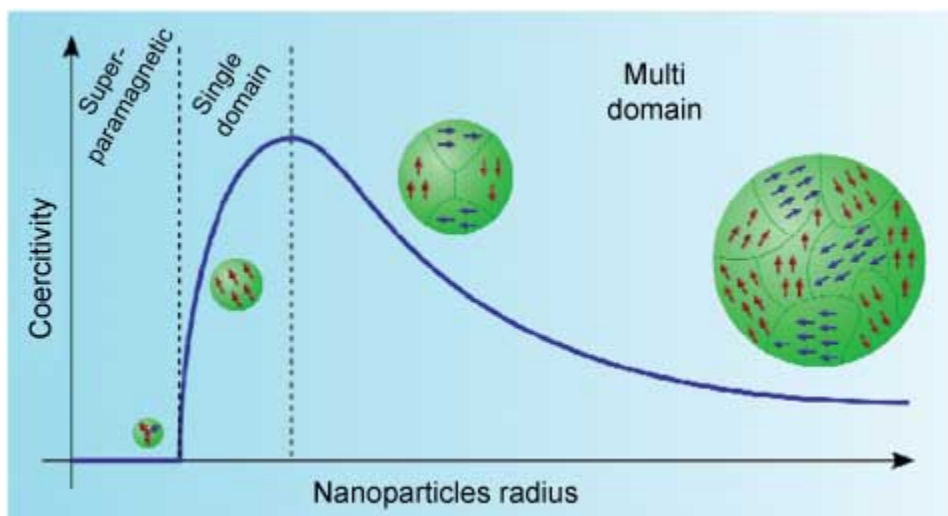


Fig.6. Variación del campo coercitivo en función del tamaño de la partícula[30].



Dentro de la nanomedicina, las nanopartículas magnéticas (NPMs) han surgido como plataformas de interés para el diagnóstico y/o tratamiento de multitud de enfermedades[31]. Como se ha mencionado anteriormente, el comportamiento de una NPM puede ser diseñado mediante el control de su tamaño y la forma, entre otros parámetros, mediante variaciones en el proceso sintético, como por ejemplo, los surfactantes o disolventes escogidos [32].

La síntesis de NPMs es un proceso complejo, del cual existen aún bastantes incógnitas. A pesar de esto, es bastante aceptado por la comunidad científica el mecanismo propuesto por LaMer, donde se establece que, para la formación de NPs tienen que darse dos procesos principales: la nucleación y el crecimiento. Antes del proceso de nucleación, los reactivos se mezclan y reciben un aporte de energía. Cuando se alcanza la concentración de saturación de las especies precursoras, se produce la nucleación. Una vez finalizado este proceso, la concentración de precursores en disolución disminuye, mientras que comienzan fenómenos de difusión de estos en la superficie de los núcleos ya formados, dando lugar al crecimiento [33].

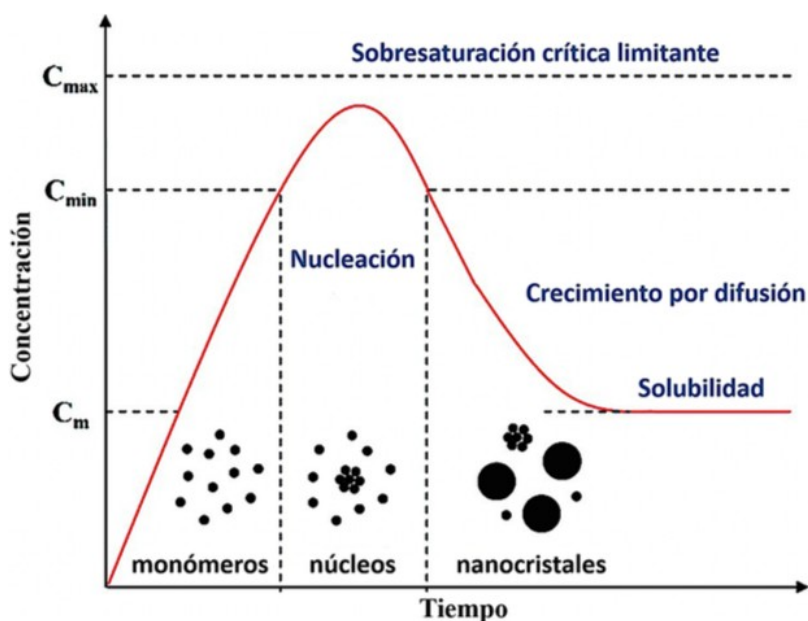


Fig.7. Diagrama de LaMer para la síntesis de NPs [34].

Existen, principalmente, dos procedimientos de síntesis de NPMs de óxido de hierro: 1) la síntesis por descomposición térmica de los precursores y 2) la síntesis por coprecipitación.

- 1) En el caso de la síntesis por descomposición térmica, los precursores orgánicos de hierro, disueltos en un disolvente apolar y con una proporción adecuada de surfactantes, se llevan a altas temperaturas. Este método permite seleccionar (mediante la elección del disolvente de la reacción, la relación hierro-surfactante, la concentración inicial de los reactivos o la temperatura de estabilización de la reacción) el tamaño y la forma de las NPMs. No obstante, el rendimiento de este tipo de síntesis es bajo y la interacción con los surfactantes hace que las NPMs adquieran un carácter apolar, que impide sus aplicaciones biomédicas, y por lo tanto, se deberá realizar un paso extra para poder transferirlas a agua [35][36].
- 2) Para la síntesis por coprecipitación, los iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , en relación molar 1:2, precipitan cuando el pH de la disolución se cambia a básico, por la adición de una solución básica (por ejemplo, hidróxido de sodio), formando el núcleo de óxido de hierro. A diferencia del método anterior, los precursores metálicos son inorgánicos, como pueden ser cloruros, sulfatos, nitratos o percloratos. Este método permite producir NPMs a gran escala y con carácter hidrofílico sin necesidad de tratamientos post-síntesis. Sin embargo, el control sobre el tamaño y la homogeneidad de este no es adecuado.

En concreto, las NPMs más utilizadas y descritas son de magnetita u óxido de hierro (III) ( $Fe_3O_4$ ) debido a su estabilidad química, su alta biocompatibilidad y sobre todo, su alta susceptibilidad magnética [37]. Son muy interesantes en

aplicaciones diagnósticas ya que son excelentes AC para MRI y, asimismo, no presentan las limitaciones descritas anteriormente para los AC que se emplean comúnmente en ámbito clínico. En terapia, las NPMs son utilizados en una amplia variedad de procesos como: liberación controlada de fármacos, vehículos para terapia génica y para el tratamiento por hipertermia magnética [22].

#### 1.4. Direccionamiento de NPs

A pesar de las excelentes propiedades que poseen las NPMs, como AC y agentes terapéuticos, hay otras variables esenciales que se han de tener en cuenta para su aplicación *in vivo*. De esta forma, la funcionalización, el tamaño hidrodinámico, la carga neta global y la carga más externa de la superficie, determinan en gran medida la distribución *in vivo* de las partículas y, son fundamentales para incrementar los tiempos de circulación en el torrente sanguíneo y reducir su acumulación en tejidos no deseados[38][39].

En los tejidos tumorales existe un entramado de vasos sanguíneos desordenado y un pobre drenaje linfático. Esto propicia un proceso mediante el cual, cuando una nanopartícula es administrada de forma intravenosa, se produce una acumulación progresiva a lo largo del tiempo dentro del tumor. Este proceso se denomina como efecto de permeabilidad y retención aumentada (Enhanced Permeability and RetentionEffect, EPR)[17]. Este tipo de acumulación de los nanosistemas ocurre por difusión pasiva y se pueden alcanzar concentraciones de hasta 10 veces más altas en el tumor que en el tejido sano.

Debido a su versatilidad química, los nanosistemas también pueden ser funcionalizados en su superficie con moléculas como péptidos, proteínas y

anticuerpos, capaces de reconocer selectivamente una biomolécula específica de las células tumorales. Por lo tanto, se dirigirá y acumulará, mediante una acumulación activa, en el tejido tumoral donde deberá realizar su actividad terapéutica [13].

### 1.5. Hipertermia

La aplicación de NPMs en hipertermia (HT), fue descrita por primera vez en 1957 por el Dr. Gilchrist, utilizándolas para el tratamiento de tumores sólidos.

La HT se puede definir como una aproximación terapéutica clínica, basada en la elevación local de la temperatura, en un tejido que sufre una alteración de su funcionamiento normal, leve o grave [15]. Por ejemplo, cuando una célula alcanza temperaturas entre 41-46°C, se produce un estrés mediante la activación de procesos extra e intracelulares que conducen a la desnaturalización proteica o al entrecruzamiento erróneo de las hebras de DNA, dando lugar a la muerte celular por apoptosis[40].

Hay diversas aplicaciones de la HT como el caso de la ablación térmica en el ámbito quirúrgico que se ha utilizado en el tratamiento de diferentes patologías como la hiperplasia benigna de próstata; o la diatermia [41].

La aplicación de HT en terapias contra el cáncer se basa en que las células que conforman un tumor sólido son más sensibles a cambios de temperatura. Esta situación se debe a la desorganización de su tejido vascular y a que poseen un drenaje linfático deteriorado, como se ha mencionado anteriormente. De hecho, se ha descrito que un calentamiento local en el tumor hasta 43-45°C. da lugar a una disminución en la tasa de flujo sanguíneo y cambios en los niveles de pH a nivel tisular, en la perfusión y oxigenación del microambiente tumoral [42].

Para conseguir estos incrementos de temperatura, se pueden usar diferentes fuentes de energía como por ejemplo microondas, radiofrecuencias, ultrasonidos y campos magnéticos alternos.

La transformación energética magnetismo→calor, se origina en la pérdida de potencia de materiales sometidos a campos magnéticos alternos. La pérdida total de potencia se compone de tres partes: 1) pérdida por histéresis, 2) pérdidas residuales (debido a la relajación Browniana y relajación de Néel) y 3) pérdidas por corrientes de Foucault [43].

1) Las pérdidas por histéresis vienen determinadas por la siguiente ecuación:

$$A = \int_{-H_{max}}^{+H_{max}} \mu_0 M(H) dH$$

Donde M es la magnetización y H es el campo magnético aplicado.

2) Respecto a las pérdidas residuales, la relajación de Néel viene determinada por la ecuación:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_a V}{K_B T}}$$

Donde  $K_a$  es el coeficiente de anisotropía, V el volumen de la partícula,  $K_B$  la constante de Boltzmann y T la temperatura. Mientras que la relajación Browniana viene dada por la ecuación:

$$\tau_B = \frac{4\pi H_D^3 \rho}{K_B T}$$

Donde  $H_D$  es el diámetro de la NP en el fluido y  $\rho$  es la viscosidad en el fluido.

Con estos dos componentes, el tiempo de relajación efectivo se define como:

$$\tau = \frac{\tau_N \tau_B}{\tau_N + \tau_B}$$

3) Las pérdidas por corrientes de Foucault vienen determinadas por:

$$W_e = K_e B_m^2 t^2 f^2 V$$

Donde  $K_e$  es el coeficiente de cada material,  $B_m$  es el máximo de densidad de flujo,  $t$  es el espesor del material,  $f$  es la frecuencia y  $V$  el volumen del material.

Cabe destacar, sin embargo, que en NPMs superparamagnéticas, las pérdidas por histéresis y por corrientes de Foucault son despreciables, y por lo tanto, la generación de calor vendría determinada principalmente por las pérdidas residuales.

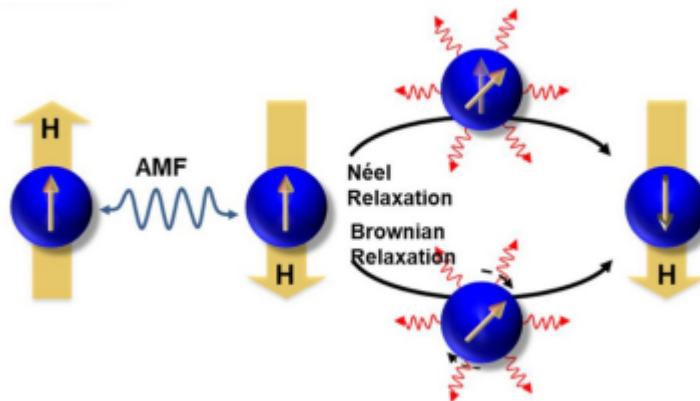


Fig.9. Mecanismos de relajación de Néel y de Brown[44].

Cabe señalar, que la generación de calor mediante la aplicación de campos magnéticos externos de alta frecuencia (CMEAF) presenta grandes ventajas, ya que disminuye los efectos secundarios sobre el tejido sano, debido a que la acción del calor se produce sólo en la zona de acumulación de las NPMs [43]. Además, los CMEAF no son absorbidos por los tejidos y, por lo tanto, se puede aplicar en regiones profundas del cuerpo. Sin embargo, hay que tener en cuenta

los estudios de impedancia bioeléctrica que describen que el rango total de frecuencias resonantes del cuerpo humano es de 62 a 68 Hz aproximadamente[45] y que el cáncer es vulnerable entre las frecuencias 100 kHz y 300 kHz[46]. Asimismo, se establece un máximo de campo magnético alterno para aplicaciones biomédicas donde el producto de la intensidad de campo magnético (H) por la frecuencia (f) debe ser  $H * f < 5 * 10^9$ .

La capacidad de calentamiento de las NPMs sometidas a CMEAF, se expresa mediante la tasa de absorción específica (SAR), la cual es una medida de la energía absorbida por unidad de masa del material (W/g).

## 2. Objetivos

Objetivo general del proyecto:

En el presente trabajo se van a sintetizar nanopartículas de óxido de hierro, por dos métodos de síntesis y diferentes precursores metálicos, para optimizar sus capacidades para el teranóstico tumoral.

Objetivos específicos del proyecto:

- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por co-precipitación de precursores comerciales. Se procederá a optimizar el tamaño y la forma, a los previamente descritos como óptimos.
- Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro por descomposición térmica de precursores tanto comerciales como preparados en el laboratorio. Se procederá a optimizar el tamaño y la forma, a los previamente descritos como óptimos.
- Síntesis de ligandos PEGilados adecuados, que permitirán, mediante un procedimiento de intercambio de ligando, la estabilidad en medios acuosos de las nanopartículas sintetizadas.
- Caracterización físico-química de las nanopartículas obtenidas: Microscopía electrónica (TEM), dispersión dinámica de luz (DLS).
- Caracterización magnética de las nanopartículas mediante: relaxometría en dos campos magnéticos diferentes, evaluación de su incremento de temperatura por hipertermia magnética.



### 3. Materiales y metodología

En este apartado se describen los materiales necesarios, las técnicas empleadas para la obtención los precursores metálicos, las NPMs y su funcionalización, permitiendo su uso en un ambiente fisiológico y los procedimientos de caracterización físico-química y magnética.

#### 3.1. Materiales

Los reactivos empleados durante el transcurso de la fase experimental fueron obtenidos de distintas casas comerciales (Sigma-Aldrich®, Acros Organics®, Fisher Scientific® y Alfa-Aesar®). Éstos se emplearon tal y como se reciben del distribuidor, sin realizarles ningún tratamiento específico.

Se emplearon como reactivos de síntesis: Cloruro de Hierro (III), Cloruro de Hierro (II), Hierro acetyl acetonado (ACAC), ácido oleico, polietilenglicol, ácido gálico, dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y trietilamina (TEA).

Los disolventes que se emplearon fueron agua ultrapura milliQ, 1-octadeceno, acetona, etanol, tolueno, cloroformo, tetrahidrofurano (THF) y diclorometano (DCM)

A continuación, se nombran las síntesis llevadas a cabo. En la Tabla 1 se detallan los precursores utilizados para cada una de ellas, las cantidades de cada reactivo y las condiciones de temperatura ( $T^a$ ):

- Síntesis A: Coprecipitación de los iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ .
- Síntesis B: Descomposición del oleato de hierro con rampa de temperatura a 3 °C.
- Síntesis C: Descomposición del oleato de hierro con rampa de temperatura a 1 °C.

- Síntesis D: Descomposición del acetyl acetato (ACAC) con rampa de temperatura a 3 °C.
- Síntesis E: Descomposición del ACAC con rampa de temperatura a 1 °C.

	Precursor Fe	Cantidad de Fe	Ácido Oleico	1-Octadeceno	Rampa de temperatura
Sín. A	$FeCl_3 / FeCl_2$	1.14 g/ 0.42 g	-	-	-
Sín. B	$Fe(Oleato)_3$	0.9 g	0.142 g	20 ml	30-320 °C(3°C/min) y 1h a esta $T^a$
Sín. C	$Fe(Oleato)_3$	0.9 g	0.142 g	20 ml	30-320 °C(1°C/min) y 1h a esta $T^a$
Sín. D	$Fe(ACAC)_3$	0.9 g	0.142 g	20 ml	30-320 °C(3°C/min) y 1h a esta $T^a$
Sín. E	$Fe(ACAC)_3$	0.9 g	0.142 g	20 ml	30-320 °C(1°C/min) y 1h a esta $T^a$

Tabla 1. Reactivos, cantidades y condiciones de  $T^a$  para realizar las síntesis.

### 3.2. Síntesis de los precursores metálicos

A pesar de que en muchos procedimientos sintéticos de NPs de óxido de hierro se utilizan precursores comerciales, en determinadas síntesis se utilizan precursores que deben de ser sintetizados previamente. Por ejemplo, el

acetilacetonato de hierro ( $Fe(C_5H_7O_2)_3$ ) es un precursor comercial, mientras que el oleato de hierro ( $Fe(C_{18}H_{33}O_2)_3$ ) será sintetizado “de novo”.

Para sintetizar el oleato de hierro se añadieron 5,4 g de cloruro de hierro ( $FeCl_3$ ) y 18,25 g de oleato de sodio ( $C_{18}H_{33}NaO_2$ ) en un matraz de fondo redondo con capacidad para 250 ml. Esta mezcla se disolvió en 40 ml de etanol ( $C_2H_5OH$ ), 30 ml de agua destilada ( $H_2O$ ) y 70 ml de hexano ( $C_6H_{14}$ ). Esta mezcla se mantuvo durante 4 horas a reflujo de hexano ( $\approx 60\text{ }^\circ\text{C}$ ) y en condiciones de atmosfera inerte. Esto último significa que la reacción se da en una atmosfera libre de oxígeno y humedad con el objetivo de evitar oxidaciones o descomposiciones de reactivos y productos. Para ello, se sustituye el aire atmosférico del interior del matraz de reacción por un gas inerte (nitrógeno).

Transcurrido dicho tiempo, se obtuvo un líquido que se separaba en dos fases, una acuosa en la parte inferior y otra orgánica en la parte superior, la cual contiene el oleato de hierro (Fig. 5). Mediante un embudo de decantación se realizaron 3 lavados con agua de la fase orgánica. Posteriormente se evaporó el hexano y se obtuvo el oleato de hierro puro.



Fig.10. Fase acuosa y fase orgánica superior donde se encuentra el oleato de hierro.

### 3.3. Síntesis de las nanopartículas magnéticas

#### 3.3.1. Síntesis por descomposición térmica de precursores

En este trabajo se utilizaron 0,9 g del oleato de hierro ( $Fe(C_{18}H_{33}O_2)_3$ ) sintetizado previamente como precursor; 0,142 g de ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ ) como surfactante y 20 ml de 1-octadeceno ( $C_{18}H_{38}$ ). Posteriormente se repitió esta síntesis cambiando el oleato de hierro por el acetilacetonato de hierro ( $Fe(C_5H_7O_2)_3$ ), utilizando el mismo proceso que se describe a continuación.

Se elevó la temperatura de la solución desde los 23°C hasta los 230°C siguiendo dos rampas de calentamiento constante: una de ellas de 1°C por minuto y la otra de 3°C por minuto. El código desarrollado para controlar este incremento de temperatura será descrito en los anexos. Una vez alcanzada la temperatura, se mantuvo durante 1 hora la reacción.

Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó un proceso de lavado, en el que se añadió una mezcla de acetona ( $C_3H_6O$ ) y etanol ( $C_2H_5OH$ ) en una proporción 1:1 y se centrifugó a 8.000 rpm durante 20 minutos, para hacer precipitar las NPs. En la figura 11 se puede observar el estado de las NPMs antes y después de ser centrifugadas. El sobrenadante se desecha y se repite el proceso, hasta observar un sobrenadante transparente.



a)



b)

Fig.11. a) Muestra antes de ser centrifugada. b) Precipitación de las NPs después de centrifugación.

Finalmente, las partículas fueron resuspendidas en tolueno. Al no ser estables en medios acuosos por su carácter hidrófobo, es preciso un proceso de intercambio de ligando posterior.

#### *3.3.1.1. Controlador de temperatura mediado por Arduino*

La rampa de temperatura de la reacción se aplicó al matraz que contenía los reactivos por medio de un termoagitador magnético. Este proceso estaba automatizado mediante un sistema de control programado por Arduino.

Arduino es una plataforma de desarrollo que se basa en una placa electrónica de hardware libre la cual incorpora un microcontrolador re-programable y una serie de pines que permiten establecer conexiones mediante el microprocesador y diferentes sensores y actuadores que pueda haber en el sistema [47].

Se partió del código ya creado (ver Anexo I) por el ingeniero de Bionand, donde la función principal del programa consistía en ir suministrando temperatura a la placa termoagitadora. Este suministro se daba mediante pulsos discretizados a  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{pulso}$  con una duración de 200 milisegundos por pulso.

Se propuso la introducción de un sensor que tomara el dato de la temperatura en el fluido para un mayor control sobre el sistema (ver Anexo II). Se definieron las entradas y salidas del controlador: Salida en el pin digital 8 al calentador mediante un relé, salida instalada en la misma placa de un LED que indicaba si este calentador estaba activado, y entrada en el pin 9 para el sensor de temperatura, en este caso, un LM35 de señal analógica. Con estos tres elementos se generaba un sistema de calentamiento con un sistema de control mediante un feedback loop negativo en la estabilización de temperatura de tipo ON/OFF.

El programa trabajaba con 4 variables principales que debían ser introducidas por el usuario desde un PC conectado al controlador Arduino: la temperatura inicial, la temperatura final a la que se estabilizará el termoagitador, el tiempo en el que se quiere que se llegue a ésta y por último, el tiempo de mantenimiento a esta temperatura final.

A continuación, se calcularon las variables necesarias para el funcionamiento del programa; diferencia de temperatura a alcanzar, pendiente de la rampa de calentamiento a alcanzar, tiempos entre los pulsos, y total de pulsos del calentamiento. Cuanta menos separación haya entre pulsos, más pulsos por minuto, por lo que la pendiente de la rampa será más grande alcanzando antes la temperatura deseada.

El sensor, además de permitir generar un feedback loop, permitía generar funciones de seguridad en el sistema. En caso de no obtener valores parecidos a

los esperados por el controlador y la rampa generada, ya bien sea por una avería del calentador o del propio sensor, el sistema generaría un aviso y apagaría el aparato para ser reparado. Además, se añadió una fase de precalentamiento, que encendería el calentador hasta llegar al valor inicial deseado percibido por el sensor.

### 3.3.2. Síntesis por coprecipitación de sales de hierro

En esta experiencia se añadieron en un matraz 1,14 g de  $FeCl_3$ , 0,42 g de  $FeCl_2$ , 5 ml de  $H_2O$  y 50  $\mu$ l de  $HCl$  cuya concentración es 2 M. Cuando los reactivos se encuentran bien disueltos, se adicionan 9 mL de NaOH 2 M.

Posteriormente, los reactivos que no han reaccionado, son lavados mediante centrifugación de la muestra a 4000 rpm durante 20 minutos con los filtros “PALL”, de tamaño de poro 100 kDa. Este proceso se repitió hasta que el filtrado fue transparente.

### 3.3. Síntesis del ligando para estabilización en medios acuosos

Tras la obtención de las NPMs, es necesario que sean estables para poder usarlas en aplicaciones biomédicas. Por ello, las NPMs sintetizadas por descomposición térmica son funcionalizadas con un ligando basado en ácido gálico- polietilenglicol. Mediante un enlace ester, utilizando DCC como catalizador de la reacción (Figura 12).

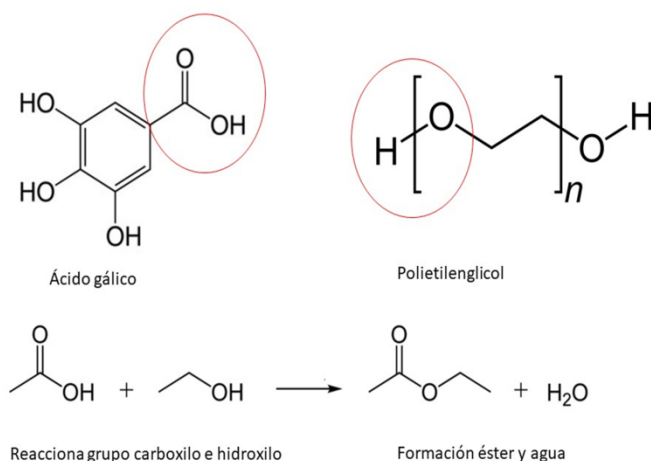


Fig.12. Reacción de esterificación.

En la Figura 13 se muestra la estructura final del ligando.

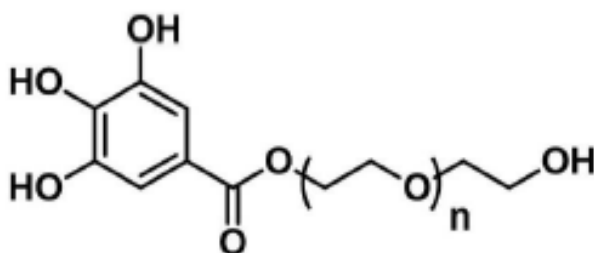


Fig.13. Estructura química del ligando gallol-PEG-OH

En un matraz se añadieron 4,41 g de PEG, 0,24 de ácido gálico y 0,035 g de 4-dimetilaminopirimidina ( $C_7H_{10}N_2$ , DMAP TMP) como precursores y se disolvieron en 50 ml de tetrahidrofurano ( $C_4H_8O$ , THF) en una atmósfera de nitrógeno ( $N_2$ ).

Se preparó una segunda disolución compuesta por 1,5 g de dicitohexilcarbodiimida ( $C_{13}H_{22}N_2$ , DCC) disuelto en 7 ml de THF. Esta se fue añadiendo en un baño de hielo y gota a gota, ya que la reacción de esterificación es exotérmica, y en agitación constante. Como subproducto de la reacción se



obtuvo urea, que debió ser eliminada mediante filtrado de la solución final. Utilizando el rotavapor se eliminó el THF, obteniéndose así el ligando.



a)



b)

Fig.14. a) Filtración de la urea. b) Eliminación del tetrahidrofurano mediante el rotavapor.

### 3.4. Intercambio del ligando

Para realizar este proceso, se disuelven, en un vial de vidrio, 300 mg del ligando gallol-PEG-OH en 1 ml de cloroformo ( $CHCl_3$ ). Una vez disuelto, se añaden 5 ml de tolueno ( $C_7H_8$ ), 100  $\mu$ l de trietilamina ( $C_6H_{15}N$ , TEA) y 1 ml de las NPMs sintetizadas. Estas suspensiones coloidales se sometieron a ultrasonidos durante 1 hora y, posteriormente, se mantuvieron a 50 °C durante 4 horas.

Finalmente, se purificaron las NPMs mediante el proceso descrito anteriormente para las NPMs sintetizadas mediante co-precipitación. Este proceso se repitió hasta observar un filtrado transparente, indicativo de que se había eliminado todo el ligando libre, el cual puede ser tóxico.

### 3.5. Caracterización físico-química

En este apartado se describirán las técnicas seguidas para la caracterización físico-química de las NPMs tras su síntesis y su funcionalización, para seleccionar las óptimas para alcanzar los objetivos propuestos en el presente proyecto.

#### 3.5.4. Recursos tecnológicos empleados

##### MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN (TEM)

La microscopia TEM permite visualizar la morfología de las partículas y su distribución de tamaños. Esta técnica se basa en la aplicación de un haz de electrones con alta energía a través de la muestra. Parte de esos electrones atravesarán la muestra, mientras que otros impactarán en ella. Finalmente, un detector permitirá reconstruir la imagen de estas interacciones.

Las muestras se analizaron en la unidad de microscopía electrónica de Bionand. El microscopio utilizado es el Tecnai G2 20 TWIN (FEI ®) operando a un voltaje de aceleración de 100 kV. Para la preparación de las muestras, se tomó una gota de la disolución de las NPMs con una pipeta Pasteur, se depositó sobre una rejilla de cobre revestida de carbono y se dejó evaporar el disolvente.

Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ, mediante el cual se realizó la medida del diámetro de al menos 100 NPMs. Posteriormente, se calculó su media y su desviación estándar utilizando el Excel.

### DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ (DLS)

Esta técnica utiliza un láser para medir el movimiento Browniano (interacción de partículas de pequeño tamaño en suspensión con moléculas del disolvente), mediante fenómenos de dispersión de luz.

Las medidas se realizaron en Bionand, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern®), y cubetas de plástico ZEN 0118. Estas medidas, proporcionaron los valores del tamaño hidrodinámico de las NPMs.

### ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP)

La presente técnica tiene una gran sensibilidad y es capaz de determinar de forma cuantitativa los elementos que tengan un potencial de ionización menor que el del argón a concentraciones muy bajas, en un rango lineal de 6 órdenes de magnitud (ng/L - mg/L). Esta metodología consta de dos pasos: 1) generar los iones mediante el de plasma acoplado inductivamente y 2) detección de estos iones mediante un espectrómetro de masas. Con esta técnica se determinó la concentración de hierro en las muestras, necesaria para los procesos de caracterización magnética.

Las muestras se enviaron a analizar a los servicios centrales de investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

## RELAXOMETRÍA

Esta técnica permite evaluar la capacidad como AC para MRI de coloides magnéticos.

La relajatividad transversal *in vitro* ( $r_2$ ) se calcula como la pendiente de la recta obtenida a partir de la representación de la concentración de NPMs frente a la inversa del tiempo de relajación ( $T_2$ ). Se utilizaron concentraciones de NPMs en el rango 2-0.125 mM. El  $T_2$  se midió en condiciones fisiológicas (310 K), en dos campos magnéticos diferentes: 1.4 T, utilizando el relaxómetro Minispec (Bruker) y 9.4 T, utilizando el equipo MRI Biospec (Bruker). Para efectuar las medidas de  $T_2$  a 1.4 T se utilizó la secuencia Carl-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG). Para realizar las medidas de  $T_2$  a 9.4 T, se empleó un resonador de jaula en cuadratura de 40 mm, con gradientes de campo de 400 mT/m. Se utilizó una secuencia CPMG de 64 ecos (valores TE de 7.5 ms a 640 ms). Las regiones de interés (ROI) se dibujaron en la primera imagen de la secuencia de imágenes y los valores de intensidad extraídos y ajustados a las siguientes ecuaciones:

$$M_z(t) = M_0 \left(1 - e^{\frac{-TR}{T_1}}\right)$$

$$M_{xy} = M_0 e^{\frac{-TE}{T_2}}$$

Donde  $M_z$  y  $M_{xy}$  son las intensidades de la señal en el tiempo TR o TE, y  $M_0$  es la intensidad de la señal en el equilibrio.

Las muestras se analizaron en la unidad de Nanoimagen de Bionand.

## HIPERTERMIA MAGNÉTICA

Esta técnica cuantifica el incremento de temperatura de un coloide magnético sometido a un campo magnético de alta frecuencia mediante una sonda de temperatura.

Estos experimentos se llevaron a cabo en el aparato D5 series de nanoScale Biomagnetics, equipado con una sonda específica para suspensiones coloidales y el software de análisis MANIAC, que permite el cálculo del SAR automáticamente. Se realizaron 2 tandas de medidas:

- Fijando la densidad de flujo magnético a 304 gauss y utilizando 3 frecuencias diferentes (145.2, 346.3 y 761.1 kHz).
- Fijando la densidad de flujo magnético a 580 gauss y fijando la frecuencia a 145.2 kHz.

El registro de la temperatura se comienza sin aplicar el campo magnético. A los 30 segundos, se comienza a aplicar el campo magnético, con los parámetros indicados anteriormente. Tras 5 minutos, se deja de aplicar el campo magnético, manteniendo el experimento durante 30 minutos más para obtener la recuperación de temperatura al estado basal. Para comprobar la estabilidad térmica de las NPMs, se repite este proceso 4 veces.

Las muestras se analizaron en Bionand.

## 4. Resultados y discusión

En este trabajo se realizaron distintos métodos sintéticos de NPMs, para evaluar cómo afectan diferentes factores, tales como: método de síntesis, precursor metálico y la rampa de temperatura utilizada (estos últimos en el método de descomposición térmica), al tamaño, forma y homogeneidad de las NPMs. Como se comentó anteriormente, estas características van a determinar su posible aplicación como AC para MRI e hipertermia.

### 4.1. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Mediante esta técnica se evaluó la morfología de las NPMs y su homogeneidad. Las imágenes TEM de la muestra obtenida mediante coprecipitación, indican unos agregados de nanopartículas con tamaños heterogéneos. La ausencia de compuestos orgánicos durante este tipo de síntesis, impide un control adecuado del crecimiento de los núcleos, y no permite evitar la agregación por impedimento estérico (Figura 15 a). En cambio, el método de descomposición térmica permite un control adecuado del crecimiento de las nanopartículas, y, por lo tanto, son mucho más homogéneas. Las imágenes TEM de la muestra sintetizada con el precursor oleato de hierro y utilizando una rampa de calentamiento de 3 °C, muestra nanopartículas de forma esferoidal, con un tamaño homogéneo de  $\approx 10$  nm (Figura 15 b). Cuando se cambia la rampa de calentamiento a 1 °C, con el mismo precursor metálico, se obtienen nanopartículas cúbicas de  $\approx 30$  nm, y ligeramente heterogéneas (Figura 15 c). Si lo que se varía es el precursor metálico, se obtienen nanopartículas de forma globular y con una distribución heterogénea de tamaños cuando se utiliza una rampa de calentamiento a 3 °C (Figura 15 d), mientras que con la rampa de

calentamiento de 1 °C, se mantiene la forma globular y la distribución de tamaño se hace más homogénea (Figura 15 e). Además, cabe destacar, que estas nanopartículas, al estar funcionalizadas con el ligando galloI-PEG-OH, se presentan dispersas, por el impedimento estérico. Estos resultados se presentan de forma resumida en la tabla 2. Por lo tanto, basándonos en estos resultados, el precursor metálico afectaría, principalmente, a la forma de la nanopartícula, mientras que un incremento en la rampa de temperatura daría lugar a nanopartículas más grandes. Dada la heterogeneidad mostrada por las síntesis D, esta se descarta para el resto de los experimentos.

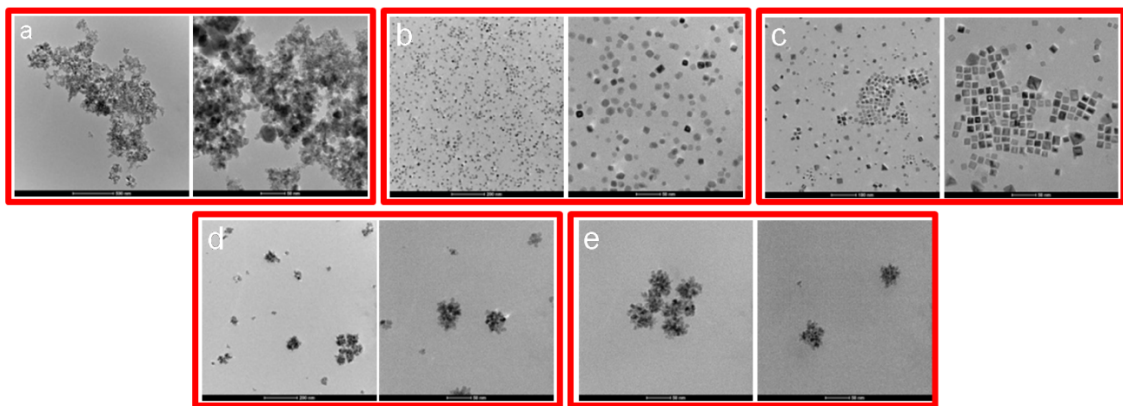


Fig.15. Caracterización de las NPMs mediante TEM a escala 200 nm para las imágenes generales, exceptuando la a) que se encuentra a 500; y 50 nm para las de detalle. a) Síntesis A. b) Síntesis B. c) Síntesis C. d) Síntesis D.

Muestra	Forma	Diámetro NPs(nm)	Distribución de tamaños
Síntesis A	Múltiple	N.D.	N.D.
Síntesis B	Esferoide	10,53 ± 1,76	Homogénea
Síntesis C	Cúbica	28,26 ± 9,04	Ligeramente heterogénea
Síntesis D	Globular	47,29 ± 23,30	Heterogénea
Síntesis E	Globular	49,18 ± 7,48	Homogénea

Tabla 2. Tabla resumen de la caracterización por TEM de las diferentes NPMs.

#### 4.2. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El tamaño del núcleo condiciona cómo los ligandos van a interactuar, pero en lo referente a aplicaciones biomédicas, el tamaño hidrodinámico en medios acuosos determinará su interacción celular, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Como ejemplo, para aplicaciones *in vivo* hay que tener en consideración que, nanopartículas con tamaños hidrodinámicos inferiores a 10 nm serán rápidamente filtradas por los riñones y superiores a 100 nm serán retiradas eficientemente del torrente sanguíneo, principalmente, por el hígado y el bazo[48][49].

Por lo tanto, esta técnica medirá el tamaño del núcleo metálico y su recubrimiento orgánico. Además, permite tener datos orientativos en cuanto a su agregación o estabilidad, ya que se podrá ver un incremento del tamaño con el tiempo, en caso de que agreguen, y la desaparición de la señal, si están precipitando. Como se ha mencionado anteriormente, sin la funcionalización adecuada, las NPMs sintetizadas mediante descomposición térmica no son



estables en medios acuosos. En la tabla 3 se muestran los radios hidrodinámicos de las muestras seleccionadas:

Muestra	Radio hidrodinámico (nm)
Síntesis A	1915,00 ± 255,1
Síntesis B	46,74 ± 2,349
Síntesis C	46,46 ± 7,73
Síntesis E	105,80 ± 6,86

Tabla 3. Medidas de los radios hidrodinámicos de las NPMs.

De estos resultados, se puede concluir que las síntesis B-C-E son adecuadas para aplicaciones biomédicas, mientras que la síntesis A no sería muy adecuada. Sin embargo, las nanopartículas A se continuaron estudiando ya que es ampliamente descrito que, las NPMs ferromagnéticas son las más adecuadas para hipertermia magnética [50].

### 4.3. Relaxometría

Para evaluar las capacidades como AC para MRI, es necesario calcular sus relajatividades  $r_2$  (o transversal) y  $r_1$  (o longitudinal). Los resultados muestran que tanto la síntesis B como la C son excelentes agentes de contraste para MRI, obteniendo valores de  $r_2$  por encima de  $100 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  a 9.4 T (Figura 16). En las imágenes ponderadas en  $T_2$  se observa claramente la caída de la señal, en función de la concentración de Fe. En el caso de la síntesis E, los valores de  $r_2$  obtenidos son aceptables, y sería posible su uso como AC. Con estos resultados, la forma globular sería menos adecuada que las esferas o los cubos. Cabe destacar, que no se muestran resultados de la muestra A debido a las

limitaciones de las medidas realizadas. Cuando las nanopartículas agregan, no es posible medir sus valores de  $T_2$ . Sin embargo, esto no significa que no pudieran dar contraste en experimentos *in vivo*, o introduciéndolas en una resina que evitara su sedimentación.

Respecto a las relajatividades  $r_1$ , en los casos en los que se pudo medir, los valores fueron muy bajos, y por lo tanto, no se muestran las gráficas.

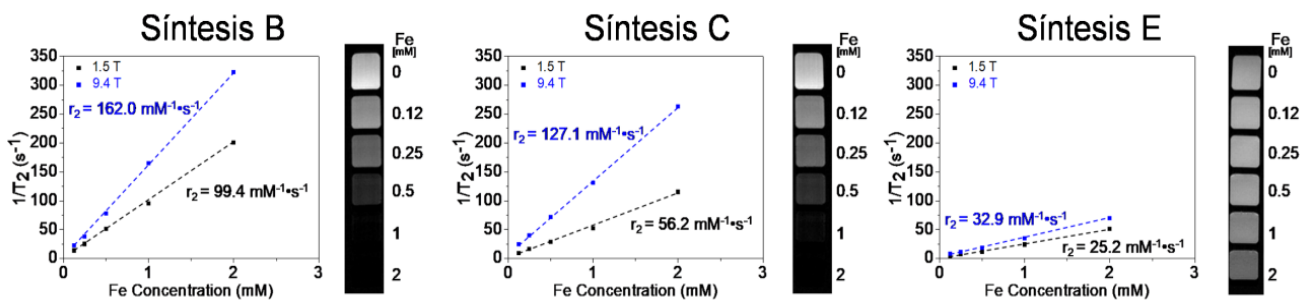


Fig.16. Relajatividad a campo bajo (1.5 T) y alto (9.4 T) de las NPMs. Gráfica concentración frente a velocidad de relajación ( $1/T_2$ ). A la derecha se muestran las imágenes ponderadas en  $T_2$  obtenidas a 9.4 T con las diferentes concentraciones de Fe.

Muestra	$r_2$ ( $mM^{-1} * s^{-1}$ )	
	1.5 T	9.4 T
Síntesis A	N.D.	N.D.
Síntesis B	99.4	162.0
Síntesis C	56.2	127.1
Síntesis E	25.2	32.9

Tabla 4. Cuadro resumen de las relajatividades obtenidas.

#### 4.4. Medidas de hipertermia magnética

La evaluación de potenciales materiales como agentes para hipertermia magnética se basa en, medir las curvas de incremento de temperatura cuando

son sometidos a CMEAF y el cálculo del SAR. Este cálculo se realiza, utilizando los datos derivados las curvas de incremento de temperatura en la ecuación:

$$SAR = \frac{C_{e_p} * m_p + C_{e_l} * m_l}{m_p} \left(\frac{dT}{dt}\right)_{max}$$

Donde la  $C_{e_p}$  y la  $C_{e_l}$  son la capacidad calorífica específica volumétrica de las nanopartículas y del fluido sin tener en cuenta las nanopartículas respectivamente. T es la temperatura y  $m_p$  y  $m_l$  la masa de las nanopartículas y del fluido sin ellas.

Simplificando se obtiene:

$$SAR = \frac{d_l * C_{e_l}}{N_R} \left(\frac{dT}{dt}\right)_{max}$$

Donde  $N_R$  es la concentración de las nanopartículas en el fluido, y  $d_l$  la densidad del fluido.

El software MANIAC, permite el cálculo automático del SAR.

Los primeros experimentos fueron realizados fijando la densidad de flujo magnético a 304 gauss y utilizando 3 frecuencias diferentes: 145.2, 346.3 y 862.1 kHz. Se observa como en todos los casos se produce una variación de temperatura del coloide magnético, alcanzando incluso 2 °C de incremento para la frecuencia 762.1 kHz (Figura 17). Los valores de SAR obtenidos se sitúan entre 300 W/g y 450 W/g, siendo superiores a los descritos para otras nanopartículas de hierro [51]. El SAR suele ser mayor, cuanto mayor es la frecuencia aplicada. Sin embargo, en el caso de la síntesis C no es así y estamos realizando investigaciones más profundas para aclarar este hecho.

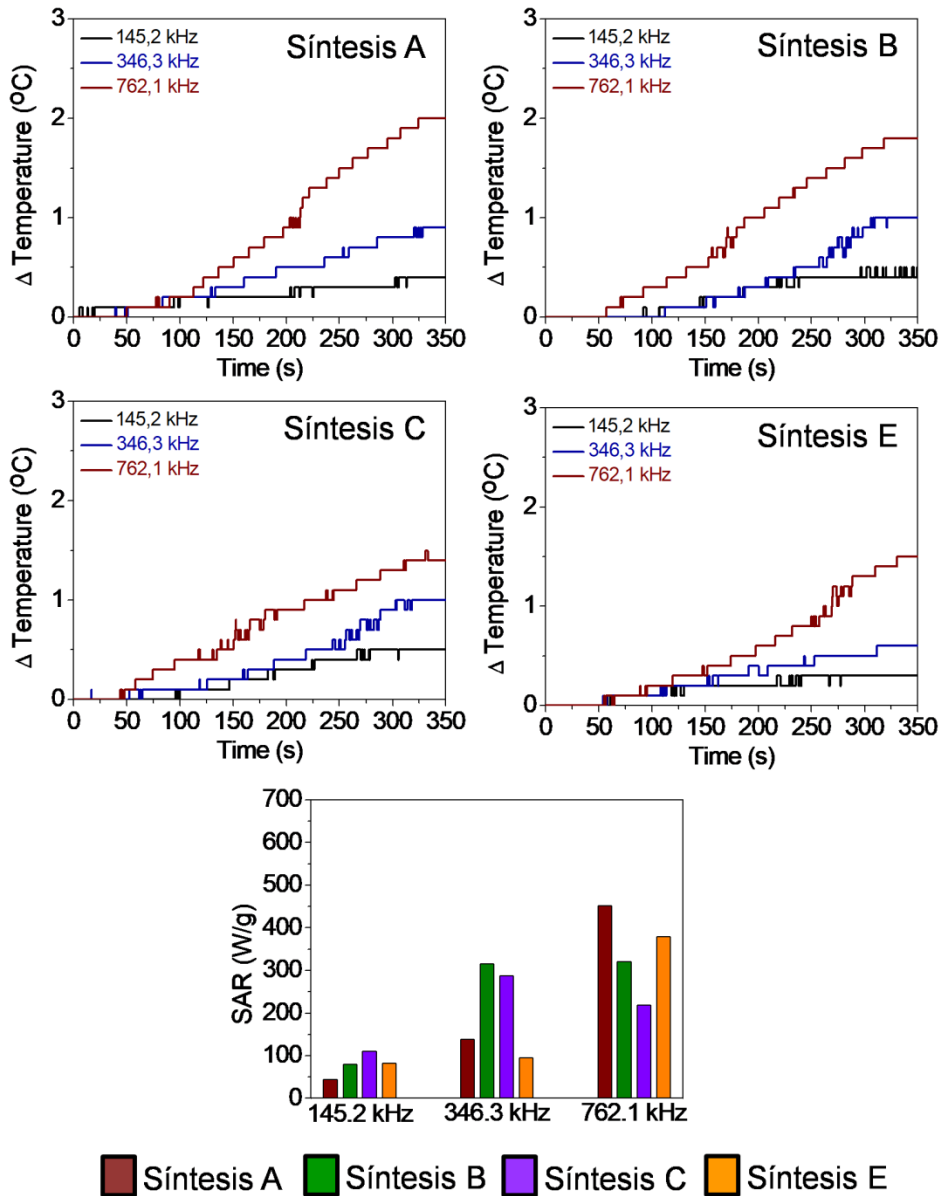


Fig.17. Arriba: Curvas de calentamiento de los diferentes coloides magnéticos sometidos a una densidad de flujo magnético de 304 gauss y frecuencias de 145.2 (negro), 346.3 (azul) y 762.1 kHz (rojo). Abajo: Representación de los SAR calculados utilizando las curvas de calentamiento.

Sin embargo, como se menciona anteriormente, las frecuencias utilizadas en clínica son de  $\approx 100$  kHz. Por lo tanto, se procedió a realizar medidas a 145.2 kHz, pero aumentando la densidad de flujo magnético al máximo permitido por el equipo. Como se observa en la Figura 18, se alcanzan en todos los casos

$\approx 2$  °C de incremento. En particular, es llamativo el comportamiento observado en la curva de la síntesis A, ya que es la que mayor pendiente de subida presenta, pero también es la que mayor pendiente de pérdida de temperatura tiene. Esta característica puede no ser adecuada para terapias, ya que sería conveniente una capacidad superior de mantener el calor remanente. Los SAR calculados muestran que la síntesis C tiene casi el doble que las síntesis B y E, y superior a la síntesis A, que es ferromagnética.

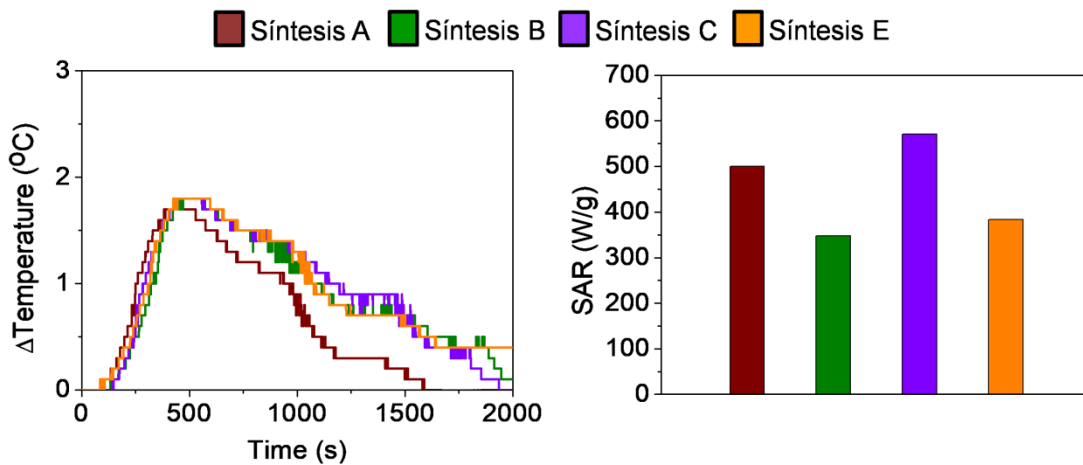


Fig.18. Izquierda: Curvas de calentamiento de los diferentes coloides magnéticos sometidos a una densidad de flujo magnético de 580 gauss y 145.2 kHz. Derecha: Representación de los SAR calculados utilizando las curvas de calentamiento.

Otro parámetro importante que ha de ser evaluado en materiales con potencial aplicación en hipertermia magnética, es su estabilidad térmica, es decir, la respuesta a ciclo de calentamiento-enfriamiento debe ser similar. Todas las síntesis realizadas en este trabajo presentan una excelente estabilidad térmica, mostrando un incremento de temperatura similar en 4 ciclos consecutivos de calentamiento-enfriamiento.

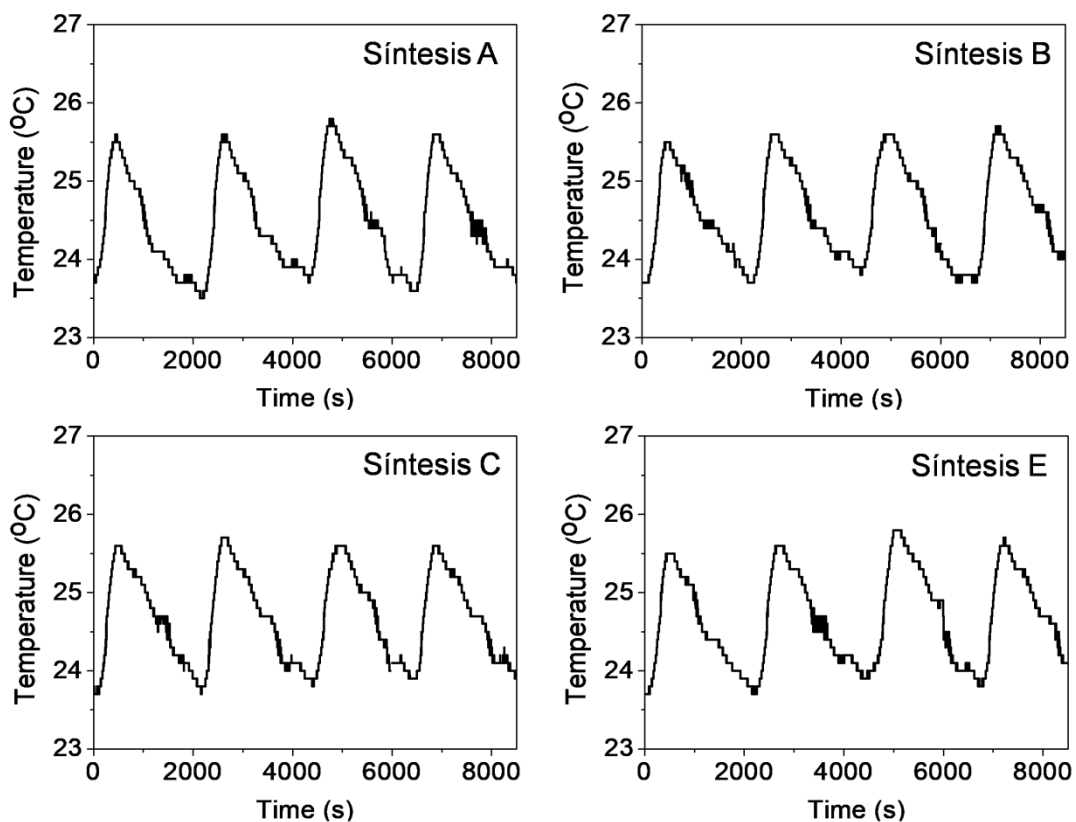


Fig.19. Curvas de calentamiento de los diferentes coloides magnéticos mostrando los ciclos de calentamiento-enfriamiento.

Las diferencias observadas en los valores de SAR pueden tener su explicación en la morfología y el tamaño de las NPMs. Es aceptado por la comunidad científica que la anisotropía magnética ( $K_a$ ) juega un papel fundamental en los fenómenos de nanomagnetismo. Puede definirse como las variaciones en la homogeneidad de las propiedades magnéticas en las diferentes direcciones del espacio, y puede

implicar que se presente facilidad de magnetización para determinados ejes. Para alinearse con el campo externo, las NPMs adquieren energía, impulsando a sus momentos magnéticos a rotar, para vencer la barrera generada por la anisotropía. La energía de anisotropía se describe como:

$$E_a = K_a V \sin^2 \vartheta$$

Con  $K_a$  como constante de anisotropía magnética por unidad de volumen,  $V$  el volumen de la partícula y  $\vartheta$  el ángulo entre el momento magnético de la partícula y el eje de anisotropía paralelo a la dirección  $z$  como en la figura.

Una vez superada la barrera energética de la anisotropía, la recuperación hacia el estado basal se produce mediante los fenómenos de relajación de Néel y/o de Brown.

Además, los resultados obtenidos en este trabajo están en controversia con el modelo teórico de respuesta lineal, que describe como las nanopartículas esféricas como las más eficientes en la conversión campo magnético→calor [43]. Por lo tanto, los fenómenos de nanomagnetismo y especialmente la hipertermia, necesitan ser investigados en profundidad, para aclarar todas las incógnitas existentes.

## 5. Conclusiones

En este proyecto se han obtenido 5 tipos de NPMs de óxido de hierro mediante los métodos propuestos de coprecipitación y descomposición térmica. La forma y el tamaño de las NPMs determinan sus propiedades magnéticas y, por lo tanto, son claves para obtener nanoplataformas con potencial para teranóstico tumoral.

Las conclusiones derivadas de los resultados obtenidos en el presente proyecto son:

- El método de coprecipitación presenta un escaso control sobre el crecimiento de las NPMs, dando lugar a agregados poco estables, con una amplia distribución de tamaños.
- Las síntesis por descomposición térmica permite obtener nanopartículas con diferentes formas y tamaños (homogéneas). El precursor metálico parece tener un efecto predominante sobre la forma, mientras que la rampa de temperatura determina el tamaño. Sin embargo, este tipo de síntesis da lugar a partículas estables en medio orgánico, y por lo tanto necesitan un tratamiento posterior.
- Se sintetizó un ligando químico basado en polietilenglicol, que permitió funcionalizar las nanopartículas sintetizadas por descomposición térmica y obtener partículas estables en ambientes fisiológicos.
- Los estudios de tamaño hidrodinámico mostraron alta estabilidad y tamaños adecuados para aplicaciones biomédicas de las NPMs sintetizadas por descomposición térmicas, siendo al contrario para la síntesis por coprecipitación.
- Solo las NPMs sintetizadas mediante descomposición térmica de oleato de hierro (B y C) presentan  $r_2$  prometedores para estudios posteriores como AC para MRI *in vivo*.



- Las síntesis probadas como potenciales agentes para hipertermia magnética exhibieron SARs de aceptables a muy adecuados, dependiendo de la frecuencia empleada, utilizando un flujo magnético de 304 gauss. En la frecuencia clínica de 145 kHz, los SARs obtenidos a 580 gauss fueron excelentes, especialmente para una de las NPMs probadas. Por lo tanto, son adecuadas para potenciales terapias anti-tumorales.
- Estos resultados presentan cierta controversia con algunos presentados en literatura, lo que demuestra la necesidad de seguir investigando en nanomagnetismo, para resolver las incógnitas aún existentes.
- Respecto al controlador de temperatura, se analizó el código que rige su funcionamiento y se propuso la introducción de un sensor para mantener el control sobre la temperatura real medida. Esta nueva incorporación, no se ha podido implementar físicamente por falta de recursos.

## 6. Referencias

- [1] O. Peralta-Zaragoza, M. Biöl, M. Bahena-Román, C. Díaz-Benítez, and V. Madrid-Marina, “Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas.” .
- [2] “Cáncer: genes y nuevas terapias - Alberto Muñoz - Google Llibres.”  
[https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=d7j9LkCN\\_2QC&oi=fnd&pg=PR4&dq=origen+del+cancer&ots=xaibKK0RFE&sig=w1T6KyDgJWYRz8VwxnjbrhPeRBU&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.es/books?hl=ca&lr=&id=d7j9LkCN_2QC&oi=fnd&pg=PR4&dq=origen+del+cancer&ots=xaibKK0RFE&sig=w1T6KyDgJWYRz8VwxnjbrhPeRBU&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false) (accessed Sep. 21, 2021).
- [3] S. E. de O. Médica, *Las cifras del cáncer en España 2021*. 2021.
- [4] M. Kimberly D. Miller, MPH1; Leticia Nogueira, PhD, MPH2; Angela B. Mariotto, PhD3; Julia H. Rowland, PhD4; K. Robin Yabroff, PhD2; Catherine M. Alfano, PhD5; Ahmedin Jemal, DVM, PhD1, 2; Joan L. Kramer, MD6; Rebecca L. Siegel, “Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2019,” 2019, doi: 10.3322/caac.21565.
- [5] B. S. Andrés O. and D. G. H. David Ladrón, “Imágenes en oncología: generalidades y aplicaciones,” *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 24, no. 4, pp. 571–577, 2013, doi: 10.1016/s0716-8640(13)70197-4.
- [6] G. Gallardo, “Inferring and comparing structural parcellations of the human brain using diffusion MRI,” 2018, [Online]. Available: [https://www.researchgate.net/publication/335462478\\_Inferring\\_and\\_comparing\\_structural\\_parcellations\\_of\\_the\\_human\\_brain\\_using\\_diffusion\\_MRI](https://www.researchgate.net/publication/335462478_Inferring_and_comparing_structural_parcellations_of_the_human_brain_using_diffusion_MRI).
- [7] J. Ahualli, “Aspectos generales de las secuencias de difusión de imagen en resonancia magnética Diffusion-weighted magnetic resonance imaging:

- general concepts,” *Rev. Argentina Radiol.*, vol. 74, no. 3, pp. 227–237, 2010.
- [8] J. Pellico, J. Ruiz Cabello, and F. Herranz, “Nano-radiotrazadores de óxido de hierro: Aproximación multidisciplinar a la imagen molecular,” *Nano-radiotrazadores óxido hierro Aproximación Multidiscip. a la imagen Mol.*, vol. 112, no. 1, pp. 15–23, 2016.
- [9] A. Pandey *et al.*, “Heterogeneous surface architected metal-organic frameworks for cancer therapy, imaging, and biosensing: A state-of-the-art review,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 409, p. 213212, May 2020, doi: 10.1016/J.CCR.2020.213212.
- [10] L. Faucher, A. A. Guay-Bégin, J. Lagueux, M. F. Côté, É. Petitclerc, and M. A. Fortin, “Ultra-small gadolinium oxide nanoparticles to image brain cancer cells in vivo with MRI,” *Contrast Media Mol. Imaging*, vol. 6, no. 4, pp. 209–218, 2011, doi: 10.1002/cmimi.420.
- [11] P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry, and R. B. Lauffer, “Chemical Reviews Volume 99 issue 9 1999 [doi 10.1021%2Fcr980440x] Caravan, Peter; Ellison, Jeffrey J.; McMurry, Thomas J.; Lauffer -- Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents-B Structure, .pdf,” *Chem. Rev.*, vol. 99, no. Iii, pp. 2293–2352, 1999.
- [12] “Qué es la radioterapia | Cancer.Net.”  
<https://www.cancer.net/es/desplazarse-por-atencion-del-cancer/como-se-trata-el-cancer/radioterapia/que-es-la-radioterapia> (accessed Jul. 26, 2021).
- [13] R. Misra, S. Acharya, and S. K. Sahoo, “Cancer nanotechnology:

- Application of nanotechnology in cancer therapy,” *Drug Discov. Today*, vol. 15, no. 19–20, pp. 842–850, 2010, doi: 10.1016/j.drudis.2010.08.006.
- [14] M. E. Davis, Z. Chen, and D. M. Shin, “Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 9, pp. 771–782, 2008, doi: 10.1038/nrd2614.
- [15] V. Programa and C. Cient, “NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS : LA,” vol. 101, pp. 321–327, 2007.
- [16] A. R. Wu and L. Yu, “There’s plenty of room at the bottom of a cell,” *Chem. Eng. Prog.*, vol. 113, no. 10, 2017.
- [17] M. Ferrari, “Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, 2005, doi: 10.1038/nrc1566.
- [18] R. Chytilék, O. Eibl, L. Hrbková, J. Zagraban, and J. Janovský, “Appearance as a cognitive shortcut in political judgment: An experimental study of the impact of stereotypes on politicians’ evaluation in an issue-rich environment,” *Soc. Stud. Stud.*, vol. 11, no. 1, pp. 81–108, 2014, doi: 10.5817/soc2014-1-81.
- [19] “El porqué las diferentes propiedades de las nano partículas - Nuevas Tecnologías y Materiales.” <https://nuevastecnologiasymateriales.com/el-porque-las-diferentes-propiedades-de-las-nano-particulas/> (accessed Sep. 03, 2021).
- [20] K. Ptak, D. Farrell, N. J. Panaro, P. Grodzinski, and A. D. Barker, “The NCI alliance for nanotechnology in cancer: Achievement and path forward,” *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 2, no. 5, pp. 450–460, 2010, doi: 10.1002/wnan.98.

- [21] N. Sanvicens and M. P. Marco, “Multifunctional nanoparticles – properties and prospects for their use in human medicine,” *Trends Biotechnol.*, vol. 26, no. 8, pp. 425–433, Aug. 2008, doi: 10.1016/J.TIBTECH.2008.04.005.
- [22] L. Zhang, F. X. Gu, J. M. Chan, A. Z. Wang, R. S. Langer, and O. C. Farokhzad, “Nanoparticles in medicine: Therapeutic applications and developments,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 83, no. 5, pp. 761–769, 2008, doi: 10.1038/sj.clpt.6100400.
- [23] B. Pelaz *et al.*, “Diverse Applications of Nanomedicine,” *ACS Nano*, vol. 11, no. 3, pp. 2313–2381, 2017, doi: 10.1021/acsnano.6b06040.
- [24] “Magnetismo ¿Como se crea?”  
[http://quintans.webs.uvigo.es/recursos/Web\\_electromagnetismo/magnetismo\\_comosecrea.htm](http://quintans.webs.uvigo.es/recursos/Web_electromagnetismo/magnetismo_comosecrea.htm) (accessed Sep. 06, 2021).
- [25] D. I. Rojas and I. Castellanos, “Optimización del sistema nanoparticulado Fe,” vol. 4, 2019.
- [26] M. Stefan *et al.*, “Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ZnS and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au@ZnS core-shell nanoparticles,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 288, pp. 180–192, 2014, doi: 10.1016/j.apsusc.2013.10.005.
- [27] “Tesis\_Daniel\_Montofre\_Poblete.”  
<https://1library.co/document/y9n2mmdz-tesis-daniel-montofre-poblete.html> (accessed Sep. 03, 2021).
- [28] M. C. García and P. M. Uberman, “Nanohybrid Filler-Based Drug-Delivery System,” *Nanocarriers Drug Deliv.*, pp. 43–79, Jan. 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-814033-8.00002-3.

- [29] “Materiales y propiedades.”  
[http://quintans.webs.uvigo.es/recursos/Web\\_electromagnetismo/magneti smo\\_materiales.htm#paramagneticos](http://quintans.webs.uvigo.es/recursos/Web_electromagnetismo/magneti smo_materiales.htm#paramagneticos) (accessed Sep. 10, 2021).
- [30] K. Marathe and P. Doshi, “Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine,” *IEEE Int. Conf. Intell. Robot. Syst.*, vol. 2015-Decem, pp. 2550–2555, 2015, doi: 10.1109/IROS.2015.7353724.
- [31] S. Kunjachan *et al.*, “Passive versus active tumor targeting using RGD- and NGR-modified polymeric nanomedicines,” *Nano Lett.*, vol. 14, no. 2, pp. 972–981, 2014, doi: 10.1021/nl404391r.
- [32] J. Park, J. Joo, G. K. Soon, Y. Jang, and T. Hyeon, “Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 25, pp. 4630–4660, 2007, doi: 10.1002/anie.200603148.
- [33] J. Chang and E. R. Waclawik, “Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media,” 2014, doi: 10.1039/c4ra02684e.
- [34] J. Chang and E. R. Waclawik, “Colloidal semiconductor nanocrystals: Controlled synthesis and surface chemistry in organic media,” *RSC Adv.*, vol. 4, no. 45, pp. 23505–23527, 2014, doi: 10.1039/c4ra02684e.
- [35] A.-E. Mihai, “Nanopartículas magnéticas alargadas (nanoworms) para transporte y liberación controlada de fármacos a través de la barrera hematoencefálica,” *Zaguan.Unizar.Es*, p. 157, 2014, [Online]. Available: <http://zaguan.unizar.es/TAZ/EUCS/2014/14180/TAZ-TFG-2014-408.pdf>.

- [36] “1: Esquema de una nanopartícula magnética con aplicación biológica. Se... | Download Scientific Diagram.”  
[https://www.researchgate.net/figure/Figura-21-Esquema-de-una-nanoparticulo-magnetica-con-aplicacion-biologica-Se-presenta\\_fig3\\_45529487](https://www.researchgate.net/figure/Figura-21-Esquema-de-una-nanoparticulo-magnetica-con-aplicacion-biologica-Se-presenta_fig3_45529487) (accessed Sep. 24, 2021).
- [37] Z. P. Chen *et al.*, “Preparation and characterization of water-soluble monodisperse magnetic iron oxide nanoparticles via surface double-exchange with DMSA,” *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 316, no. 1–3, pp. 210–216, 2008, doi: 10.1016/j.colsurfa.2007.09.017.
- [38] M. P. Leal, C. Muñoz-Hernández, C. C. Berry, and M. L. García-Martín, “In vivo pharmacokinetics of T2 contrast agents based on iron oxide nanoparticles: Optimization of blood circulation times,” *RSC Adv.*, vol. 5, no. 94, pp. 76883–76891, 2015, doi: 10.1039/c5ra15680g.
- [39] M. Pernia Leal, C. Caro, and M. L. García-Martín, “Shedding light on zwitterionic magnetic nanoparticles: Limitations for in vivo applications,” *Nanoscale*, vol. 9, no. 24, pp. 8176–8184, 2017, doi: 10.1039/c7nr01607g.
- [40] L. S. Goldstein, M. W. Dewhirst, M. Repacholi, and L. Kheifets, “Summary, conclusions and recommendations: Adverse temperature levels in the human body,” *Int. J. Hyperth.*, vol. 19, no. 3, pp. 373–384, 2003, doi: 10.1080/0265673031000090701.
- [41] B. Vicuña Urtasun, P. Villalgordo Ortin, Y. Montes García, and B. Marín Fernández, “Hipertermia: la modificación de la temperatura corporal como terapéutica clínica.” .
- [42] T. Karino, S. Koga, and M. Maeta, “Experimental studies of the effects of

- local hyperthermia on blood flow, oxygen pressure and pH in tumors,”  
*Jpn. J. Surg.*, vol. 18, no. 3, pp. 276–283, 1988, doi: 10.1007/BF02471444.
- [43] P. Guardia *et al.*, “Guardia2012.Pdf,” no. 4, pp. 3080–3091, 2012.
- [44] X. Liu *et al.*, “Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy,” *Theranostics*, vol. 10, no. 8, pp. 3793–3815, 2020, doi: 10.7150/thno.40805.
- [45] P. Dies, “Comportamiento De Campos Electromagnéticos Usados En Medicina Como,” vol. 2, pp. 1–8, 2019.
- [46] J. S. Solutions, “New Cancer Research Angle from a Surprising Source New Cancer Research Angle from a Surprising Source,” vol. 4, no. 2, pp. 2–5, 2009.
- [47] “¿Qué es Arduino? | Arduino.cl - Compra tu Arduino en Línea.”  
<https://arduino.cl/que-es-arduino/> (accessed Sep. 26, 2021).
- [48] Z. Nemati *et al.*, “Improving the Heating Efficiency of Iron Oxide Nanoparticles by Tuning Their Shape and Size,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 122, no. 4, pp. 2367–2381, 2018, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b10528.
- [49] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, “Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles,” doi: 10.1021/mp800051m.
- [50] A. J. GIUSTINI, A. A. PETRYK, S. M. CASSIM, J. A. TATE, I. BAKER, and P. J. HOOPES, “Magnetic Nanoparticle Hyperthermia in Cancer Treatment,” *Nano Life*, vol. 01, no. 01n02, pp. 17–32, 2010, doi: 10.1142/s1793984410000067.
- [51] G. Kandasamy and D. Maity, “Recent advances in superparamagnetic



iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics,” *Int. J. Pharm.*, vol. 496, no. 2, pp. 191–218, 2015, doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.10.058.

## 7. Anexos

### 7.1. Anexo I: Código del controlador de temperatura

```
/* CONTROL DE GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA PLACAS TERMO-AGITADORAS */
/* By Gallardo Gil Roberto
```

```
#include <stdio.h>
#define salida8 8
#define pin9 9
```

```
/* Variables Rampa 1 */
```

```
int tini = 0; /* set temperatura inicio */
int tmax = 0; /* set temperatura alcanzar */
int tpor = 0; /* tiempo para alcanzar temperatura máxima */
int tpop = 0; /* tiempo de mantenimiento de la temperatura */
```

```
/* variables Rampa 2 */
```

```
int tmax2 = 0;
int toff = 0;
```

```
/* variables aritméticas*/
```

```
float tvar = 0;
float seg = 0;
float sep = 0;
float tpp = 0;
float paus = 0;
int pulsos = 0;
```

```
int suma = 0;
int i = 0;
/* declaración de salidas*/
```

```
/*-----
*/
```

```
/* obtención de datos */
```

```
#define DEBUG(a) Serial.println(a);
```

```
void setup()
{
  Serial.begin(9600);
  Serial.setTimeout(50);
```

```

pinMode(salida8, OUTPUT);
digitalWrite(salida8, HIGH);

Serial.print("Enter... [ START TEMP - END TEMP - TIME (min) ]");

}

void loop()
{

    if (Serial.available())
    {
        scanf("%d", tini);
        Serial.println();
        Serial.print("Start Temperature : ");
        tini = Serial.parseInt();
        Serial.println(tini);

        scanf("%d", tmax);
        Serial.print("Max Ramp Temperature : ");
        tmax = Serial.parseInt();
        Serial.println(tmax);
        Serial.print("Ramp Time : ");
        tpor = Serial.parseInt();
        Serial.println(tpor);
        Serial.print("Pause Time : ");
        tpop = Serial.parseInt();
        Serial.println(tpop);
        Serial.println();

        /* ejecución de programa*/

        /* Cálculos para elaboración de rampa 1*/

        Serial.print("^Temperature = ");
        tvar = (tmax - tini);
        Serial.println(tvar);
        tpp = (tvar / tpor);
        Serial.print("Pulse Time = ");
        Serial.println(tpp);
        Serial.print("Seconds between pulses = ");
        sep = (60/tpp);
        Serial.println (sep);
        Serial.print("Total pulses = ");

```

```

    pulsos = (tvar);
    Serial.println (pulsos);
    seg = (sep*1000);

    while (pulsos > 0)
    {
        delay(seg - 200);
        digitalWrite(salida8, LOW);
        delay(200);
        digitalWrite(salida8, HIGH);
        pulsos = (pulsos -1);
        Serial.print ("Remaining Pulses = ");
        Serial.println (pulsos);

    }
    Serial.println ("");
    Serial.println ("");
    Serial.print ("Keeping the Temperature at: ");
    Serial.print (tmax); Serial.print (" degrees");
    Serial.println ("");
    Serial.println ("");
    Serial.print("Enter New Parameters [ START TEMP - END TEMP -
TIME (min) ]");
    }

}

```

## 7.2. Anexo II: Introducción de un sensor

```

/* CONTROL DE GRADIENTE DE TEMPERATURA PARA PLACAS TERMO-AGITADORAS */

/* By Elena de Gomar Vílchez and Ferran Llorente Poblador */

#include <stdio.h>
#define calentador 8
#define LED LED_BUILTIN
#define sensor 9

/* VARIABLES DE TEMPERATURA */

int temp_ini = 0; // Set temperatura inicio (°C)
int temp_setpoint = 0; // Set temperatura a alcanzar (°C)
)

```

```

int temp_max = temp_setpoint + 2;           // Temperatura máxima de respuesta
a (°C)
int temp_min = temp_setpoint -
2;           // Temperatura mínima de respuesta (°C)
float temp_pulse = 0.1;                     // Incremento de temperatura por
r pulso (°C)
int temp_esperada = 0;                       // Temperatura que espera tener e
l aparato (°C)
int sensorValue = 0;                         // Valor del sensor de temperatur
a (°C)
float deltaTemp = 0;                         // Intervalo de temperatura (°C)
int ratio = 0;                               // Ratio de calentamiento(°C/min)

/* VARIABLES DE TIEMPO */

int time_to_value = 0;                       // Tiempo para alcanzar temperatu
ra máxima (s)
int time_maintain = 0;                       // Tiempo de mantenimiento de la
temperatura (s)
int starttime = 0;                           // Temporizador para el tiempo d
e pausa (s)
float interPulse = 0;                         // Tiempo entre pulsos (millis)
float timePulse = 200;                       // Tiempo de duración de un pulso
(millis)
int pulsos = 0;                               // Número de pulsos actuales
int pulsos_esperados = 0;                    // Número de pulsos esperado por
el programa
float seg = 0;                               // Valor de interPulse pasado a s
egundos (s)

#define DEBUG(a) Serial.println(a);

void setup()
{
    Serial.begin(9600);                       // Abre el
puerto de data en serie, fija el valor de lectura en 9600 bits por segund
o
    Serial.setTimeout(50);                   // En caso
de que no lea nada, el controlador en este tiempo cancelará el código
    pinMode(calentador, OUTPUT);             // Definir
el pin 8 como una salida a un relé
    digitalWrite(calentador, HIGH);         // Definir
que al empezar ya caliente
    pinMode(sensor, INPUT);

```

```

    pinMode(LED, OUTPUT); // Definir
el sensor como una entrada de datos
    Serial.print("Enter... [ TEMPERATURA INICIAL - TEMPERATURA FINAL -
    TIEMPO DE RAMPA - TIEMPO TEMPERATURA ESTABILIZADA");

}

void loop()
{

    if (Serial.available()>0) //Comprueba
    si hay datos disponibles a leer

/* INTRODUCCIÓN DE VALORES PERSONALIZADOS */

        scanf("%d", temp_ini); //Introduci
r los el valor de temperatura inicial
        Serial.println(temp_ini);
        Serial.print("Start Temperature : "); //En pantall
la se imprime esto esperando que se introduzca la temperatura inicial
        temp_ini = Serial.parseInt();
        Serial.println(temp_ini);

        scanf("%d", temp_setpoint);
        Serial.print("Max Ramp Temperature : "); //En pantall
la se imprime esto esperando que se introduzca el valor a llegar de tempe
ratura
        temp_setpoint = Serial.parseInt();
        Serial.println(temp_setpoint);

        scanf("%d", time_to_value);
        Serial.print("Ramp Time : "); //En pantalla se imp
rime esto esperando que se introduzca el tiempo en el que se tiene que ll
egar a dicha temperatura
        time_to_value = Serial.parseInt();
        Serial.println(time_to_value);

        scanf("%d", time_maintain);
        Serial.print("Pause Time : "); //En pantall
la se imprime esto esperando que se introduzca el tiempo que quiere mante
ner la temperatura
        time_maintain = Serial.parseInt();
        Serial.println(time_maintain);
        Serial.println();

/* CALCULO DE VARIABLES */
    {

```

```

Serial.print("Delta_T = ");
    deltaTemp = (temp_setpoint -
temp_ini);          // Intervalo de temperatura
    Serial.print(deltaTemp);
    Serial.print("°C");
    Serial.print(" ");

    Serial.print("Rampa de calentamiento = ");          // Ram
pa de calentamiento
    ratio = (deltaTemp/time_to_value);
    Serial.print(ratio);
    Serial.print("°C/s");
    Serial.print(" ");

    Serial.print("Tiempo entre pulsos = ");
    interPulse = (time_to_value-
(timePulse*ratio/temp_pulse));    // tiempo entre pulsos
    Serial.print(interPulse);
    Serial.print("s");
    Serial.print(" ");

    Serial.print("Total de pulsos esperados = ");
    pulsos_esperados = (ratio*time_to_value/temp_pulse);
// Total de pulsos esperados
    Serial.println (pulsos_esperados);

}

/***** BUCLE PRINCIPAL *****/

    seg = (interPulse*1000);
    sensorValue = analogRead(sensor);          //Lectur
a inicial del sensor en la variable sensorValue
    sensorValue = sensorValue * 0.48828125;    //convie
rte el valor analógico en su equivalente en °C

    /* PRECALENTAMIENTO */

    while(temp_ini < sensorValue)          //Si el sensor detecta que es
tamos por debajo de la temperatura inicial de calentamiento, hace pulsos
para precalentar

        digitalWrite(calentador, LOW);
        delay(seg);
        digitalWrite(calentador, HIGH);

```

```

        Serial.println("PRECALENTANDO");
        Serial.print("TEMPERATURA = ");
        Serial.print(sensorValue);
        Serial.print("°C");
        delay(timePulse);

    /*CALENTAMIENTO Y LECTURA DE RAMPА */

    while (sensorValue <= temp_setpoint) //
Una vez precalentado (o no), mientras el sensor no detecte que ha llegado
a la temperatura setpoint
    {

        digitalWrite(calentador, LOW);
        digitalWrite(LED, LOW);
        delay(seg);
        digitalWrite(calentador, HIGH);
        digitalWrite(LED, HIGH);
        pulsos = (pulsos +1); // Añade
un pulso al contador
        temp_esperada = temp_ini + temp_pulse; // Añad
e a la temperatura teórica un ciclo más
        sensorValue = analogRead(sensor); //Lee el
valor del sensor actual y sávalo en la variable sensorValue
        sensorValue = sensorValue * 0.48828125; //convie
rte el valor analógico en su equivalente en °C
        delay(timePulse); //Transc
urre el tiempo de pulso con el calentador encendido

    /* IMPRESIÓN DE RESULTADOS */

        Serial.print ("PULSOS = "); // Pulso
s hechos hasta ahora
        Serial.println (pulsos);
        Serial.println();
        Serial.print ("PORCENTAJE DE CALENTAMIENTO = "); // Porce
ntaje de pulsos hechos hasta ahora
        Serial.println (100*pulsos/pulsos_esperados);
        Serial.print("°C");
        Serial.print("TEMPERATURA = ");
        Serial.print(sensorValue); // Tempe
ratura que mide el sensor
        Serial.print("°C");
        Serial.print("DESVIACIÓN DE TEMPERATURA = ");
        Serial.print(100*sensorValue/temp_esperada);

```



```
Serial.println();

    if (pulsos > pulsos_esperados+10 || 100*sensorValue/temp_esperada >
20) // Un if de seguridad, si se cumple alguno de estos errores con un
margen de seguridad
    {
        Serial.println("Error en el sistema, comprobar calentador y
sensor");

        digitalWrite(calentador, LOW);
        digitalWrite(LED, LOW);
        delay(4000);
        exit(0);
        // Apaga todos los sistemas y apaga el programa
    }
    delay(100);
    // tiempo para dejar que el procesador haga refresh
}

/*FASE DE TEMPERATURA CONSTANTE */

// A la que el sensor detecte que ha llegado a los grados necesari
os, empieza el tiempo de pausa

    starttime =millis(); // Se
crea un contador que cuenta el tiempo que lleva la fase de pausa
        Serial.print ("Keeping the Temperature at: ");
        Serial.print (temp_setpoint);
        Serial.print (" °C");

        while(starttime < time_maintain) { // Mie
ntras el tiempo de mantener la temperatura no acabe se activa el control
ON/OFF

            if (sensorValue >=temp_max){ // Si l
a temperatura es más alta que el valor consigna, apagar el calentador
                digitalWrite(calentador, LOW);
                digitalWrite(LED, LOW);
                delay(interPulse);

                if (sensorValue >= temp_min + 30) // Un if de seguri
dad, si no se consigue reducir la temperatura (porque sigue calentando)
```

```

    {
        Serial.println("Error de temperatura baja, compro
bar calentador y sensor");
        digitalWrite(calentador, LOW);
        digitalWrite(LED, LOW);
        delay(4000);
        Serial.println("Apagando el sistema");
        delay(4000);
        exit(0);
    }

}

    if (sensorValue < temp_min) { // Si l
a temperatura es más baja que el valor consigna, encender el calentador
        digitalWrite(calentador, HIGH);
        digitalWrite(LED, HIGH);
        delay(timePulse);

        if (sensorValue < temp_min -
30) { // Un if de seguridad, si no consigue subir la temperat
ura es que hay un error

            Serial.println("Error de temperatura baja, compr
obar calentador y sensor");
            digitalWrite(calentador, LOW);
            digitalWrite(LED, LOW);
            delay(4000);
            Serial.println("Apagando el sistema");
            delay(4000);
            exit(0);
        }
    }
}

while (sensorValue > temp_ini) {

    Serial.println ("Cooling down... "); //
A la que se ha acabado el tiempo de pausa, apagar el calentador para enfr
iar las muestras
        digitalWrite(calentador, LOW);
        digitalWrite(LED, LOW);
        delay(12000);
}

```

```
Serial.print("Enter... [ TEMPERATURA INICIAL - TEMPERATURA FINAL -  
TIEMPO DE RAMPA - TIEMPO TEMPERATURA ESTABILIZADA");
```

```
}
```



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

| [uma.es](http://uma.es)

E.T.S. DE INGENIERÍA INFORMÁTICA

E.T.S de Ingeniería Informática

Bulevar Louis Pasteur, 35

Campus de Teatinos

29071 Málaga