

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

PROGRAMA DE DOCTORADO DE  
BIOCIENCIAS MOLECULARES



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS DE FERRITA DE ZINC PARA TRATAMIENTOS  
COMBINADOS EN BIOMEDICINA

**María Rivero García**

Madrid, 2018

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

FACULTAD DE CIENCIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**



SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS  
MAGNÉTICAS DE FERRITA DE ZINC PARA TRATAMIENTOS  
COMBINADOS EN BIOMEDICINA

Presentada por:

María Rivero García

Licenciada en Bioquímica y Graduada en Química

Dirigida por:

Dra. Alexandra Muñoz Bonilla

Dr. Jorge Sánchez Marcos

Madrid, 2018

*A mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, la Dra. Alexandra Muñoz y el Dr. Jorge Sánchez, por haber confiado en mí para llevar a cabo este trabajo, por su apoyo, por todo lo que he aprendido gracias a ellos y por esta gran oportunidad que me brindaron hace ya más de tres años.

Mi agradecimiento también a mi tutor académico, el Dr. Domingo F. Barber, por el seguimiento de la tesis durante todo este tiempo y sus aportaciones.

Quiero agradecer al grupo de investigación MATELEC, del departamento de Química Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la UAM, donde se ha llevado a cabo esta tesis prácticamente en su totalidad. A las Dras. Pilar Herrasti y Nieves Menéndez y a todos mis compañeros, gracias por haberme hecho sentir una más desde el momento en que llegué y por haberme acompañado tanto en los buenos como en los malos momentos.

Al Prof. Gaogian Chen, de la Universidad de Soochow (China) y al Dr. Christopher Morris, de la Universidad de East Anglia (Reino Unido), por la buena acogida en sus laboratorios y su gran ayuda durante mis estancias de investigación.

Me gustaría expresar mi agradecimiento también al Ministerio de Ciencia e Innovación, (MINECO), que financió esta investigación en el marco de los proyectos MAT2012-37109-C02-02 y MAT2013-48009-C4-1-P, junto con la convocatoria de proyectos de cooperación universitaria UAM-Banco Santander, en el marco del proyecto 2015/ASIA/09.

Por último, quiero dar las gracias a la Dra. María del Puerto Morales (ICMM, CSIC), a la Dra. Lucía Gutiérrez (Universidad de Zaragoza), al Dr. Daniel Jaque (Dep. Física de Materiales, UAM), a la Dra. Magdalena Cañete (Dep. Biología, UAM), a la Dra. Amalia Ruiz y las chicas de Norwich y a Irene Morales (Instituto de Magnetismo Aplicado, UCM), por su ayuda y colaboración de gran valor en este trabajo. Además, quiero destacar a dos personas, la Dra. Eva Mazarío y el Dr. Jesús García Ovejero, mis compañeros y amigos, por haber sido dos de las personas que más me han apoyado y de las que más he aprendido, dentro y fuera del ámbito científico.

Para terminar, y a modo personal, agradezco a mi familia y amigos, por creer en mis sueños, por estar siempre a mi lado y por demostrarme días tras día que eso nunca va a cambiar.

## RESUMEN

Las nanopartículas (NPs) magnéticas de óxido de hierro, como la magnetita y la maghemita, constituyen uno de los sistemas más prometedores en los campos de la biomedicina y la biotecnología. De entre los numerosos métodos de síntesis de estas NPs, el método electroquímico destaca por su reproducibilidad, robustez, versatilidad, bajo coste y por la posibilidad de obtener NPs de diámetro modulable en un amplio rango de tamaños, de entre 10 y 40 nm aproximadamente.

El estudio en esta Tesis Doctoral consistió, en primer lugar, en la optimización del método electroquímico para la obtención de una serie de NPs de ferrita de zinc de 12 nm de diámetro y diferente estequiometría,  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ). Para ello fue necesario el estudio del efecto de ciertos parámetros de reacción en las características del material sintetizado, tales como la intensidad de corriente aplicada a la celda electroquímica y la temperatura de reacción. El método de síntesis influye en gran medida tanto en las características estructurales como en las propiedades magnéticas de las NPs. Por este motivo, se realizó una caracterización exhaustiva de la serie de ferritas de zinc, definiendo las características del material obtenido mediante este método.

Las NPs obtenidas se recubrieron superficialmente con moléculas de dopamina, generando una plataforma para el posterior anclaje de moléculas biocompatibles, con el objetivo de aportar buena estabilidad coloidal y/o funcionalidad específica para su posterior empleo en biomedicina. En este trabajo las moléculas empleadas fueron los ácidos cítrico y fólico.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio toxicológico *in vitro* e *in vivo* (empleando el modelo animal *Xenopus laevis*) de las NPs. Los resultados indican que estas no son potencialmente tóxicas hasta concentraciones relativamente elevadas. Además, se obtuvieron datos esclarecedores sobre la absorción y el metabolismo de las NPs.

Por último, se evaluó la efectividad de las NPs sintetizadas para su posible empleo en tratamientos térmicos combinados contra el cáncer, concretamente en el tratamiento de tumores sólidos mediante hipertermia magnética y de terapia fototérmica. Los resultados obtenidos para las NPs estudiadas muestran un bajo calentamiento cuando se aplica un campo magnético alterno (SAR), en tratamientos de hipertermia magnética. Por el contrario, las NPs mostraron altos valores de eficiencia de conversión fototérmica, siendo posible su modulación mediante la variación de la composición química de las NPs.

## SUMMARY

Magnetic iron oxide nanoparticles (NPs), such as magnetite and maghemite, constitute one of the most promising systems in the biomedicine and biotechnology fields. Among the numerous methods of synthesis of magnetic ferrite NPs, the electrochemical method stands out for its reproducibility, robustness, versatility, low cost, green chemistry and the possibility of obtaining NPs of tuneable diameter in a wide range of sizes, between 10 and 40 nm, approximately.

The study carried out in this Doctoral Thesis consisted, firstly, in the optimization of the electrochemical method to obtain a series of zinc ferrite NPs of 12 nm in diameter and different stoichiometry,  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ). For this purpose, it was necessary to study the effect of certain reaction parameters on the characteristics of the synthesized material, such as the intensity of the current applied to the electrochemical cell and the reaction temperature. The synthesis method greatly influences the structural characteristics such as the magnetic properties of the NPs. For this reason, an exhaustive characterization of the series of zinc ferrites was carried out, defining the characteristics of the material obtained by the electrochemical method.

The obtained NPs were coated with dopamine molecules, generating a platform for the subsequent anchoring of biocompatible molecules, with the aim of providing good colloidal stability and/or specific functionality for their subsequent use in biomedicine. In this work, the molecules used were citric and folic acids.

Next, a toxicological study was carried out *in vitro* and *in vivo* (using the animal model *Xenopus laevis*). The results indicate that NPs are not potentially toxic up to relatively high concentrations. In addition, clarifying data were obtained on the absorption and metabolism of the NPs.

Finally, the effectiveness of the synthesized NPs for their possible use in combined thermal treatments against cancer was evaluated, specifically in the treatment of solid tumors using magnetic hyperthermia and photothermal therapy. The results indicated that the studied NPs are not suitable for magnetic hyperthermia treatments, due to their low SAR values. On the other hand, the NPs showed high values of photothermal conversion efficiency, being possible their modulation by means of the variation of the chemical composition of the NPs.

# ÍNDICE

CLAVE DE ABREVIATURAS .....	1
1. Introducción .....	3
1.1. Nanopartículas magnéticas .....	4
1.1.1. Propiedades magnéticas .....	4
1.1.2. Nanomagnetismo .....	5
1.1.3. Ferritas.....	7
1.1.3.1. Estructura espinela .....	8
1.1.3.2. Composición química .....	9
1.1.3.2.1. Magnetita .....	9
1.1.3.2.2. Ferrita de zinc .....	10
1.1.3.2.3. $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$ ( $0 < x < 1$ ).....	10
1.1.4. Métodos de síntesis.....	11
1.1.4.1. Método electroquímico.....	12
1.2. Toxicidad.....	13
1.2.1. Distribución de las NPs en el organismo .....	13
1.2.2. Ensayos de toxicidad .....	15
1.2.3. Fe y Zn en el organismo.....	16
1.3. Aplicaciones biomédicas .....	17
1.3.1. Terapias térmicas .....	18
1.3.1.1. Hipertermia magnética.....	19
1.3.1.2. Terapia fototérmica.....	21
2. Objetivos.....	25
3. Materiales y métodos.....	29
3.1. Síntesis electroquímica de NPs de ferrita de zinc .....	29
3.1.1. Efecto de la intensidad de corriente aplicada .....	31
3.1.2. Efecto de la temperatura de reacción .....	31

3.1.3. Estabilidad térmica de las NPs .....	32
3.1.4. Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm .....	32
3.2. Funcionalización superficial de las NPs.....	33
3.2.1. Funcionalización superficial con dopamina .....	33
3.2.2. Anclaje de moléculas biocompatibles.....	34
3.3. Caracterización estructural, morfológica y química .....	35
3.3.1. Difracción de rayos X.....	35
3.3.2. Difracción de neutrones.....	36
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión .....	37
3.3.4. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier.....	38
3.3.5. Espectroscopia Raman .....	38
3.3.6. Espectroscopia de absorción de rayos X.....	40
3.3.7. Espectrometría óptica de emisión por plasma de acoplamiento inductivo .....	41
3.3.8. Análisis termogravimétrico .....	42
3.4. Caracterización magnética.....	42
3.5. Caracterización coloidal .....	43
3.5.1. Potencial Zeta.....	43
3.5.2. Tamaño hidrodinámico .....	44
3.6. Estudio de toxicidad.....	44
3.6.1. Toxicidad <i>in vitro</i> .....	44
3.6.1.1. Internalización de NPs .....	45
3.6.1.2. Ensayos MTT .....	45
3.6.1.3. Ensayo de Griess .....	46
3.6.2. Toxicidad <i>in vivo</i> .....	46
3.6.2.1. Obtención de embriones .....	48
3.6.2.2. Diseño experimental .....	48
3.6.2.3. Análisis histológico.....	49
3.6.2.4. Susceptibilidad magnética con campo alterno .....	49



3.6.2.5. Contenido de Fe y Zn.....	50
3.6.2.6. PCR cuantitativa .....	50
3.7. Aplicaciones biomédicas .....	54
3.7.1. Hipertermia magnética.....	54
3.7.2. Terapia fototérmica.....	54
4. Resultados y discusión.....	59
4.1. Síntesis electroquímica y caracterización estructural de NPs de ferrita de zinc.....	59
4.1.1. Efecto de la intensidad de corriente aplicada .....	59
4.1.2. Efecto de la temperatura de reacción .....	63
4.1.3. Estabilidad térmica de las NPs.....	65
4.1.3.1. Espectroscopia Raman .....	67
4.1.4. Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm .....	71
4.1.4.1. Espectroscopia de absorción de rayos X .....	74
4.1.4.2. Difracción de neutrones .....	78
4.1.4.3. Caracterización magnética .....	81
4.2. Funcionalización superficial de las NPs .....	84
4.3. Caracterización coloidal.....	87
4.3.1. Potencial Zeta .....	87
4.3.2. Tamaño hidrodinámico .....	88
4.4. Ensayos de toxicidad .....	89
4.4.1. Toxicidad <i>in vitro</i> .....	89
4.4.1.1. Viabilidad celular .....	89
4.4.1.2. Internalización celular .....	90
4.4.1.3. Toxicidad celular .....	91
4.4.1.4. Ensayo Griess.....	92
4.4.2. Toxicidad <i>in vivo</i> .....	93
4.4.2.1. Viabilidad .....	94
4.4.2.2. Estudio fenotípico.....	95

4.4.2.3. Evaluación histológica .....	97
4.4.2.4. Cuantificación de Fe y Zn .....	98
4.4.2.5. Metabolismo y biodegradación .....	100
4.4.2.5.1. Acumulación de las NPs .....	105
4.5. Aplicaciones biomédicas .....	106
4.5.1. Hipertermia magnética .....	106
4.5.2. Terapia fototérmica .....	109
5. Conclusiones .....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	121
PUBLICACIONES .....	137

## CLAVE DE ABREVIATURAS

**ACN** Acetonitrilo

**BSA** Albúmina de suero bovino

**CA** Campo alterno

**cDNA** Ácido desoxirribonucleico complementario

**DA** Dopamina

**D<sub>c</sub>** Diámetro crítico

**D<sub>H</sub>** Diámetro hidrodinámico

**DLS** Dispersión de luz dinámica ("Dynamic Light Scattering")

**DMF** Dimetilformamida

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**DRX** Difracción de rayos X

**E<sub>a</sub>** Anisotropía magnética

**EDC** 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

**EPR** Efecto de aumento de la permeabilidad y la retención ("Enhanced Permeability and Retention")

**EXAFS** Estructura Fina Extendida de Absorción de rayos X ("Extended X-ray Absorption Fine Structure")

**FBS** Suero fetal bovino

**FCC** Red cúbica centrada en las caras

**FDA** Administración de alimentos y drogas ("Food and Drug Administration")

**FM** Ferromagnético

**FT-IR** Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier

**GADPH** Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**H<sub>c</sub>** Campo coercitivo

**M<sub>s</sub>** Magnetización de saturación

**M<sub>R</sub>** Magnetización de remanencia

**MMR** Disolución "Marc's Modified Ringer's"

**η** Eficiencia de conversión fototérmica

**nBu<sub>4</sub>NBr** Bromuro de tetrametil amonio

**NIR** Infrarrojo cercano

**NHS** N-hidroxisuccinimida

**NPs** Nanopartículas

**PBS** Tampón fosfato salino

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction")

**PDI** Índice de polidispersidad

**pI** Punto isoeléctrico

**r<sub>c</sub>** Radio crítico

**r<sub>SPM</sub>** Radio superparamagnético

**RNA** Ácido ribonucleico

**SAR** Tasa de absorción específica ("Specific Absorption Rate")

**SEM** Microscopía electrónica de barrido

**SPM** Superparamagnético

**SQUID** Dispositivo de interferencia cuántica de superconducción ("Superconducting Quantum Interference Device")

**T<sub>B</sub>** Temperatura de bloqueo

**T<sub>c</sub>** Temperatura de Curie

**T<sub>irr</sub>** Temperatura de irreversibilidad

**T<sub>N</sub>** Temperatura de Néel

**T<sub>v</sub>** Temperatura de Verwey

**τ<sub>B</sub>** Tiempo de relajación de Néel

**τ<sub>N</sub>** Tiempo de relajación de Brown

**TEM** Microscopía de electrónica de transmisión

**TGA** Análisis termogravimétrico

**UV-Vis** Ultravioleta-Visible

**VSM** Magnetómetro de muestra vibrante  
("Vibrating-Sample Magnetometer")

**XAS** Espectroscopía de Absorción de rayos X  
("X-ray Absorption Spectroscopy")

**XANES** Absorción de Rayos X Cercana al Borde  
("X-ray Absorption Near Edge Structure")

**ZFC/FC** Curvas "Zero Field Cooling/Field Cooling"

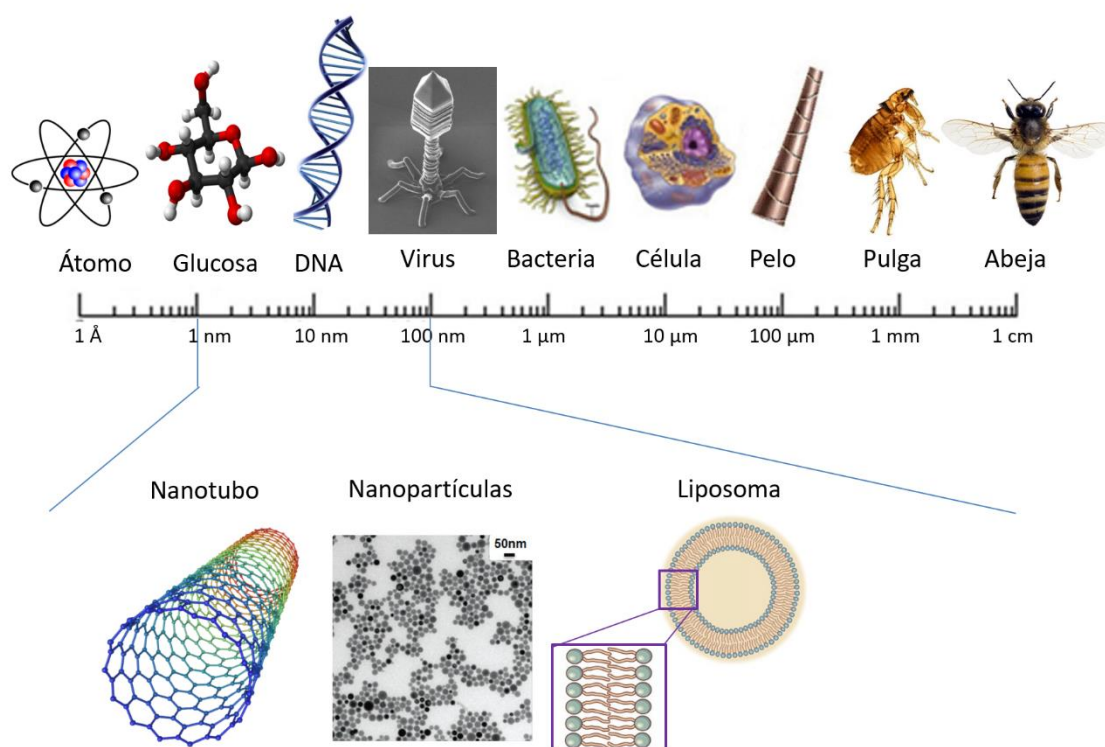
---

# 1. INTRODUCCIÓN

---

## 1. Introducción

La nanociencia se define como el estudio y control de la materia a escala nanométrica y la explotación de los fenómenos y propiedades singulares como consecuencia de su reducido tamaño [1], entendiéndose como nanomaterial a aquel que consta de al menos una de sus dimensiones en la escala de 1 a 100 nm [2] (**Figura 1. 1**). Esta disciplina ha sufrido un desarrollo exponencial desde el inspirador discurso de Richard Feynman, “There’s plenty of room at the bottom” [3] en 1959, hasta la actualidad, presentando un sin fin de aplicaciones en diversas ramas científicas y tecnológicas. Los nanomateriales ya se encuentran en productos de uso cotidiano como pinturas, materiales de construcción, cosméticos o en la industria alimentaria, ejerciendo un gran impacto en la sociedad de hoy en día [4] [5] [6].



**Figura 1. 1.** Escala comparativa de diferentes estructuras y organismos en el rango de tamaño de 1 Å y 1 cm. En la parte inferior se resaltan algunas estructuras nanométricas utilizadas hoy en día con aplicaciones tecnológicas y/o biomédicas.

# 1. INTRODUCCIÓN

---

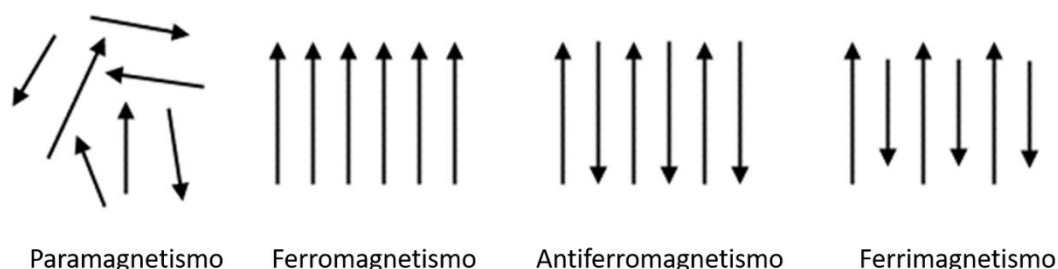
## 1.1. Nanopartículas magnéticas

Los materiales en la nanoescala presentan una elevada relación superficie/volumen, lo que les confiere una mayor reactividad y unas propiedades físico-químicas diferentes en relación al material másico (“*bulk*”). Estas características son especialmente interesantes en el ámbito de las nanopartículas (NPs) magnéticas, ya que además ofrecen las ventajas propias de los materiales magnéticos y la posibilidad de manipular estas propiedades en función de necesidades concretas.

### 1.1.1. Propiedades magnéticas

Atendiendo al comportamiento de los materiales en presencia de un campo magnético externo, estos se clasifican como ferro(ferri)magnéticos, antiferromagnéticos, paramagnéticos y diamagnéticos.

Un material ferromagnético es aquel en el que todos los momentos magnéticos atómicos se encuentran alineados en la misma dirección y sentido. Debido a ello, este tipo de materiales presentan un momento magnético permanente en ausencia de un campo magnético externo. Por el contrario, los materiales antiferromagnéticos se caracterizan por tener sus momentos magnéticos alineados en la misma dirección, pero con el 50 % de ellos orientados en sentido inverso, dando lugar a un momento magnético total nulo. Los materiales ferrimagnéticos tienen un comportamiento intermedio, es decir, presentan momentos magnéticos con la misma dirección y sentido opuesto, de forma similar a los materiales antiferromagnéticos, pero de diferente magnitud. Por este motivo, los momentos magnéticos quedan anulados parcialmente, dando lugar a un momento magnético permanente, de forma similar a los materiales ferromagnéticos (**Figura 1. 2**).



**Figura 1. 2.** Orientación de los momentos magnéticos en las diferentes estructuras magnéticas.

En el caso de los materiales paramagnéticos, los momentos magnéticos se encuentran orientados al azar, es decir, no se encuentran ordenados magnéticamente. Al aplicar un campo

magnético externo, los momentos quedarán orientados en el sentido y dirección del campo aplicado. Se caracterizan por tener una susceptibilidad magnética positiva y de pequeño valor. Todos los materiales que presentan orden magnético se comportan como paramagnéticos por encima de una temperatura característica, a partir de la cual la energía térmica impide el orden de sus momentos magnéticos. Este valor de temperatura se denomina “Temperatura de Curie” ( $T_C$ ) en el caso de los materiales ferro/ferrimagnéticos y “Temperatura de Néel” ( $T_N$ ) en el caso de los antiferromagnéticos.

### 1.1.2. Nanomagnetismo

En general, los materiales ferromagnéticos en tamaño masivo y en ausencia de campo magnético externo, se organizan en dominios magnéticos delimitados por las denominadas “paredes de Bloch” [7], donde los momentos magnéticos se encuentran alineados entre sí, pero orientados al azar con respecto al resto de dominios que conforman el material (**Figura 1. 3a**). Como resultado de este ordenamiento, el balance energético global del sistema queda reducido al mínimo y el momento magnético global se hace cero. En presencia de un campo magnético externo, se produce el desplazamiento progresivo de las paredes de Bloch, aumentando el tamaño de los dominios magnéticos en primera instancia, hasta llegar a desaparecer por completo. Llegado a este punto, todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la dirección del campo magnético externo aplicado, alcanzando el valor de magnetización de saturación ( $M_S$ ). Este proceso es irreversible, lo que significa que en ausencia de dicho campo magnético los momentos no retornan a su estado original, dando lugar a una magnetización remanente ( $M_R$ ). Será necesario aplicar un campo magnético externo en dirección opuesta para anular dicha  $M_R$ , denominado campo coercitivo ( $H_C$ ) (**Figura 1. 3b**).

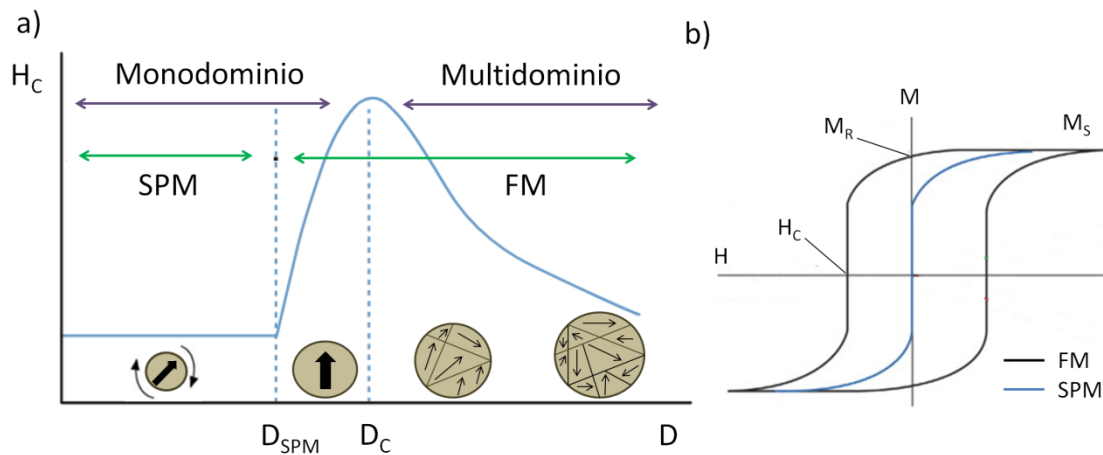
A medida que el tamaño se reduce, el número de dominios magnéticos disminuye hasta un punto en el cual la generación de dominios magnéticos no es energéticamente favorable. El diámetro en el cual se produce este fenómeno se denomina diámetro crítico ( $D_C$ ) y se encuentra en el orden de los nanómetros [8]. El material, por lo tanto, está formado por un único dominio, en el cual todos los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección, rotando de forma coherente (macroespín) (**Figura 1. 3a**). La energía de anisotropía magnética,  $E_a$  (Ecuación 1.1), es la responsable de mantener dichos momentos magnéticos alineados en la dirección de fácil imanación, es decir, la dirección cristalográfica energéticamente favorable en torno a la cual los momentos magnéticos tienden a orientarse de forma espontánea. Esta energía actúa como una barrera energética que impide el giro de los momentos magnéticos y está directamente relacionada con la coercitividad del material.



## 1. INTRODUCCIÓN

$$E_a = KV\text{sen}^2\theta \quad (\text{Ec. 1.1})$$

donde  $K$  es la constante de anisotropía magnética,  $V$  es el volumen de la partícula y  $\theta$  es el ángulo entre el momento magnético y el eje de fácil imanación.



**Figura 1. 3.** a) Dependencia del campo coercitivo ( $H_c$ ) y la organización en dominios magnéticos del material, con respecto al diámetro de partícula ( $D$ ), siendo  $D_c$  el diámetro crítico y  $D_{SPM}$  el diámetro superparamagnético. b) Curvas de magnetización características de un material ferromagnético (FM) y otro superparamagnético (SPM) y la representación de los valores típicos de magnetización de saturación ( $M_s$ ), magnetización de remanencia ( $M_R$ ) y campo coercitivo ( $H_c$ ) para cada régimen magnético.

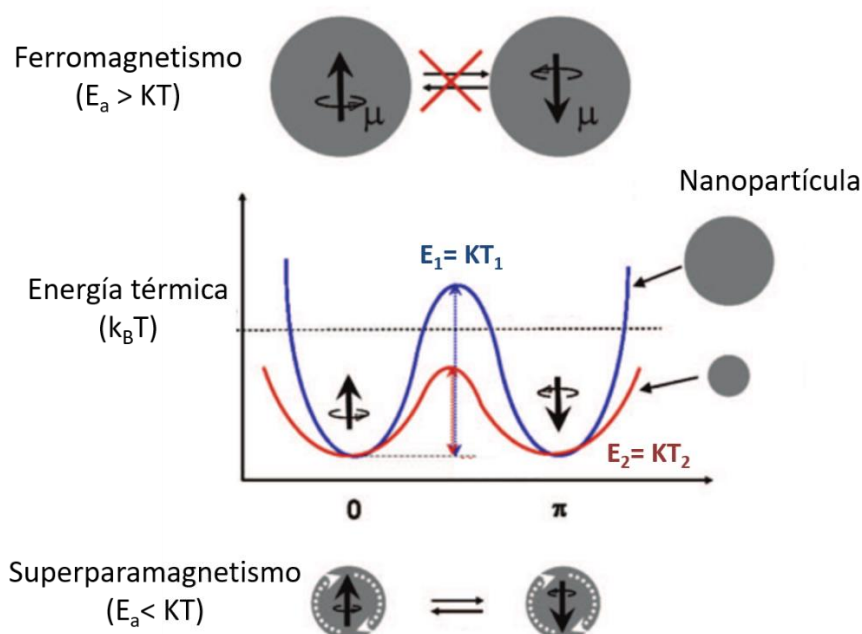
La  $E_a$  es directamente proporcional al tamaño de partícula (Ec. 1.1). A tamaños por debajo del  $D_c$ , su valor se hace comparable al de la energía térmica,  $k_B T$  (donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann), provocando una disminución de la coercitividad. Llegado a un determinado tamaño, ( $D_{SPM}$ ), la energía térmica sobrepasa la barrera de energía de anisotropía y los momentos magnéticos comienzan a fluctuar aleatoriamente. Dicha fluctuación magnética conduce a un valor nulo de magnetización neta y, por ende, de coercitividad, dando lugar un fenómeno denominado superparamagnetismo (**Figura 1. 4**).

La temperatura de transición del comportamiento ferromagnético al superparamagnético se denomina temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) [9]:

$$T_B = \frac{KV}{25k_B} \quad (\text{Ec. 1.2})$$

donde  $K$  es la constante de anisotropía magnética,  $V$  es el volumen de la partícula y  $k_B$  es la constante de Boltzmann.

Por debajo de la  $T_B$ , los momentos magnéticos se encuentran bloqueados o congelados, es decir, es necesaria la presencia de un campo magnético externo para invertir la dirección de fácil imanación de dichos momentos magnéticos y el material presenta comportamiento ferromagnético. Por encima de la  $T_B$ , la energía térmica es capaz de superar la energía de anisotropía y los espines giran libre y aleatoriamente en todas direcciones, presentando entonces un comportamiento superparamagnético [10]. Esta característica es esencial para el empleo de NPs magnéticas en biomedicina, ya que hace posible el aprovechamiento de sus propiedades magnéticas evitando la agregación de las mismas.



**Figura 1. 4.** Diagrama de energía de NPs magnéticas con diferente alineación del espín magnético, representando un comportamiento ferromagnético en una partícula de mayor tamaño (arriba) y un comportamiento superparamagnético en una partícula de menor tamaño (abajo). Modificado de referencia [11].

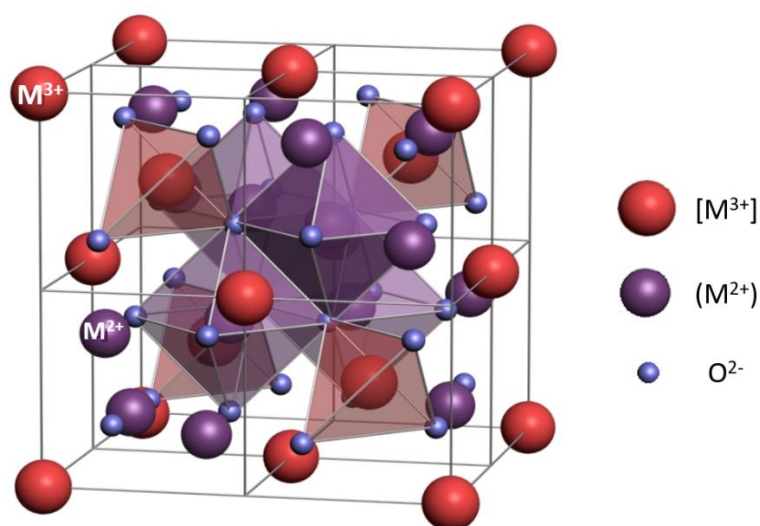
### 1.1.3. Ferritas

De entre las NPs magnéticas destacan las basadas en óxido de hierro, como la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y demás ferritas cuya fórmula general se define como  $\text{M}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$ , siendo M cationes divalentes de los elementos de transición 3d. Estos óxidos mixtos de hierro poseen excelentes propiedades magnéticas y eléctricas, con elevados valores de magnetización y resistividad [11]. Además, su baja toxicidad, en la mayoría de los casos, y elevada estabilidad tanto química como térmica [12], hacen que este tipo de NPs sean candidatos ideales para un gran número de aplicaciones tecnológicas y biomédicas [13] [14].

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1.3.1. Estructura espinela

La estructura tipo espinela, la cual debe su nombre al mineral homónimo  $\text{MgAl}_2\text{O}_4$ , tiene como fórmula general  $(\text{A}^{2+})[\text{B}^{3+}]_2\text{O}_4$ , donde  $\text{A}^{2+}$  representa cationes divalentes ocupando posiciones tetraédricas, representadas entre paréntesis y  $\text{B}^{3+}$ , cationes trivalentes situados en posiciones octaédricas, representadas entre corchetes. La celda unidad consta de un total de 56 átomos, de los cuales 32 son átomos de oxígeno, organizados en una red cúbica centrada en las caras (FCC). En los intersticios de esta red aniónica, 96 en total, se alojan los cationes A y B, ocupando únicamente 24 de estas posiciones. Concretamente, los cationes A se encuentran ocupando 1/8 de los 64 huecos tetraédricos de la estructura, mientras que los cationes B ocupan 1/2 de los 32 huecos octaédricos [15] (**Figura 1. 5**).



**Figura 1. 5.** Estructura de una espinela directa, en la cual los cationes  $\text{M}^{2+}$  se localizan en posiciones tetraédricas, indicadas mediante paréntesis (), y los cationes  $\text{M}^{3+}$  se encuentran situados en posiciones octaédricas, indicadas mediante corchetes [].

Existen diferentes tipos de espinelas en relación a la ordenación catiónica en el interior de la estructura. Se denomina “espinela directa” a la estructura en la cual los cationes divalentes ocupan las posiciones tetraédricas y los trivalentes las octaédricas,  $(\text{A}^{2+})[\text{B}^{3+}]_2\text{O}_4$ , como por ejemplo en el caso de  $\text{Mn}_3\text{O}_4$  [16] o  $\text{FeCr}_2\text{O}_4$  [17] (**Figura 1. 5**). En cambio, la “espinela inversa” se caracteriza por tener la mitad de los cationes trivalentes localizados en las posiciones tetraédricas, ocupándolas en su totalidad, mientras que los divalentes ocupan la mitad de las posiciones octaédricas,  $(\text{B}^{3+})[\text{A}^{2+}\text{B}^{3+}]\text{O}_4$ . Este tipo de ordenamiento es el que presentan la mayoría de las ferritas, por ejemplo  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [18],  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  [19] o  $\text{NiFe}_2\text{O}_4$  [20]. Además, existen órdenes intermedios, en los cuales los dos tipos de cationes ocupan las posiciones tetraédricas,

denominadas “espinelas mixtas”, como por ejemplo  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  [21], de fórmula general  $(\text{A}^{2+}_{1-\alpha}\text{B}^{3+}_{\alpha})[\text{A}^{2+}_{\alpha}\text{B}^{3+}_{1-\alpha}]\text{O}_4$  ( $0 < \alpha < 1$ ), donde  $\alpha$  es el grado de inversión [22]. Este grado de inversión está determinado por el radio iónico de los cationes, la configuración de éstos, sus energías de estabilización del campo cristalino, así como por el método de preparación [23] [24] y juega un papel fundamental en las propiedades magnéticas de estos materiales.

### 1.1.3.2 Composición química

#### 1.1.3.2.1. Magnetita

La magnetita, de fórmula química  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , es el mineral de hierro más abundante y con mayor contenido en este elemento (72.3%) en la naturaleza. Se encuentra presente, de forma natural en numerosos organismos tanto procariotas como eucariotas, capaces de sintetizar NPs de magnetita mediante un proceso denominado biomineralización [25]. Estos aprovechan las propiedades magnéticas de este mineral para orientarse interaccionando con el campo magnético terrestre, mediante el desarrollo de un sentido denominado magnetorrecepción [26]. Algunos ejemplos de ello son las bacterias magnetotácticas [27], ciertos tipos de aves como las palomas mensajeras [28], peces como los atunes o salmones [29], murciélagos [30] e insectos como las abejas [31].

El origen magnético de la magnetita, como del resto de ferritas, viene dado por la interacción entre los espines mediante interacciones de superintercambio,  $J_{AA}$ ,  $J_{BB}$  y  $J_{AB}$ , que tienen lugar entre dos iones metálicos vía un ion diamagnético, en este caso el oxígeno, donde A y B representan las posiciones tetraédricas y octaédricas, respectivamente. La efectividad de la interacción de superintercambio está descrita mediante la magnitud de J, cuyo valor será mayor a menores distancias de interacción y a menores ángulos entre Fe-O-Fe. De modo que el orden de magnitud de las interacciones será  $J_{AB} \gg J_{BB} > J_{AA}$  [32].

La magnetita forma parte de las denominadas espinelas inversas, descrita por la fórmula  $(\text{Fe}^{3+})[\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}]\text{O}_4$ , situándose la mitad de los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  de la subred A (o tetraédrica) y el resto de cationes  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  en la subred B (u octaédrica) [18]. Dentro de cada subred, (A) y [B], los momentos magnéticos se encuentran alineados en la misma dirección, mientras que ambas subredes se encuentran alineadas antiparalelamente, con los momentos magnéticos de los octaedros en un sentido y los de los tetraedros en sentido contrario, lo que origina un comportamiento ferrimagnético.

### 1.1.3.2.2. Ferrita de zinc

El dopaje de la estructura cristalina de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con diferentes elementos como tierras raras [33] [34] [35] o con metales de transición [36] [37] [38], es una práctica comúnmente realizada con el objetivo de modificar/mejorar las propiedades de la magnetita. Concretamente, el dopaje con Zn dando lugar a ferritas de  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  ( $0 < x < 1$ ), destaca por la naturaleza no magnética del elemento Zn y su baja toxicidad, en comparación con otros elementos.

La ferrita de zinc estequiométrica ( $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ ), es un óxido de hierro mixto de origen sintético, de gran estabilidad tanto química como térmica y reducida toxicidad [39]. Estas características hacen posible su aplicación tanto en el campo tecnológico, como materiales magnéticos o dispositivos de grabación magnética [40] [41], sensores de gas [42] [43] y catalizadores [44] [45], como en el campo de la biomedicina, como agentes de contraste para resonancia magnética nuclear de imagen [47] [47] o en tratamientos de hipertermia magnética [48] [49].

La estructura cristalina de la ferrita de zinc en *bulk*, corresponde a una espinela directa, es decir, los cationes divalentes  $\text{Zn}^{2+}$  se sitúan en la subred (A), mientras que los cationes trivalentes  $\text{Fe}^{3+}$  están localizados en la subred [B] [50]. Debido a la naturaleza no magnética de los átomos de zinc, esta ferrita muestra un comportamiento antiferromagnético, con una  $T_N$  de 10 K [51]. Este valor tan bajo en la temperatura de orden se debe a las débiles interacciones de superintercambio  $J_{BB}$  entre los cationes  $\text{Fe}^{3+}$ , en comparación a las fuertes interacciones  $J_{AB}$  de otras ferritas [52]. Sin embargo, la distribución catiónica de esta ferrita es dependiente del tamaño, produciéndose una reordenación de la misma a escala nanométrica, es decir, aumentando el grado de inversión. Esta reordenación catiónica conduce a la formación de dos subredes magnéticas, (A) y [B], que debido al aumento de las interacciones  $J_{AB}$  entre ambas, dan lugar a un aumento en la magnetización en comparación con la ferrita de zinc de tamaño másico [53].

### 1.1.3.2.3. $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$ ( $0 < x < 1$ )

Como se ha comentado previamente, la ferrita de zinc ( $\text{ZnFe}_2\text{O}_4$ ) posee una estructura de espinela directa debido a la tendencia de los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  a ocupar las posiciones tetraédricas (A). Aunque el momento magnético del  $\text{Zn}^{2+}$  es igual a cero, el dopaje de la magnetita con este catión puede dar lugar a un incremento en la magnetización hasta alcanzar un cierto nivel de dopaje, a partir del cual la magnetización comience a disminuir. Este comportamiento se explica debido a que, inicialmente, los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  tienden a situarse en posiciones (A) en sustitución de cationes  $\text{Fe}^{3+}$ , ya que la magnetita tiene estructura de espinela inversa. Por este motivo y para mantener el balance de cargas, se produce un aumento en el número de  $\text{Fe}^{3+}$  en posiciones [B]

[54]. Por lo tanto, el momento magnético de los  $\text{Fe}^{3+}$  en las diferentes posiciones (A) y [B], acopladas antiferromagnéticamente, no se cancela, dando lugar a un aumento de la magnetización [55]. En el caso de que todo el  $\text{Zn}^{2+}$  se situase en (A), a valores de  $x > 0.4$  comenzaría a darse la interacción antiferromagnética entre los  $\text{Fe}^{3+}$  cercanos en posiciones [B], con la consecuente disminución del momento magnético neto, hasta llegar a anularse por completo [56].

Todo ello hace de la ferrita  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  ( $0 < x < 1$ ) un sistema muy versátil, que permite el diseño y control de sus propiedades magnéticas, haciendo posible la adaptación de dichas propiedades en función de las necesidades requeridas.

### 1.1.4. Métodos de síntesis

Además del tamaño y la composición química, otros factores determinantes de las propiedades magnéticas del material son la forma, homogeneidad, estructura cristalina o microestructura, que eventualmente están influenciados por el método empleado en la síntesis de las NPs. Actualmente, existe una gran variedad de métodos de síntesis de NPs magnéticas, presentando cada uno de ellos ciertas ventajas e inconvenientes con respecto al resto. Todos ellos persiguen un objetivo común, que es el diseño de un proceso de síntesis que conduzca a la obtención de NPs magnéticas monodispersas y de forma y tamaño adecuados, según las necesidades. Además, el proceso debe ser reproducible y no requerir procesos posteriores de purificación, aparte de ser simple, económico y respetuoso con el medio ambiente [57].

En general, los métodos de síntesis de NPs magnéticas, principalmente derivadas de óxido de hierro, se dividen en dos grandes grupos: “*top-down*” o descendentes, o “*bottom-up*” o ascendentes. Los métodos *top-down* se basan en la transformación del material másico en nanométrico mediante métodos simples, reproducibles, no contaminantes y fácilmente escalables. Como inconvenientes, presentan dificultad en el proceso de funcionalización de las NPs y una amplia distribución de tamaños [58], incompatibles generalmente para su aplicación en biomedicina. Por el contrario, los métodos *bottom-up* consisten en la síntesis química de las NPs dividida en las etapas de nucleación y crecimiento [59]. Este tipo de síntesis permite la obtención de NPs monodispersas y de forma y tamaño controlado, siempre y cuando ambas etapas estén controladas y lo suficientemente separadas en el tiempo [60]. Por último, la síntesis de NPs en reactores microfluídicos y la síntesis biogénica son métodos ampliamente estudiados en los últimos años, dada la buena calidad de las NPs obtenidas mediante ellos [61].

## 1. INTRODUCCIÓN

---

De todos los métodos nombrados, los más comúnmente utilizados son métodos *bottom-up*. Dentro de ellos se puede hacer una división dependiendo del medio de reacción empleado, acuoso u orgánico. Los llevados a cabo en medio acuoso y, por lo tanto, a temperaturas menores de 100 °C, ofrecen las ventajas de proporcionar mayores rendimientos de reacción, ser más sencillos y menos contaminantes que los métodos que utilizan un medio orgánico, aunque se obtienen NPs con mayor dispersión de tamaños. Algunos ejemplos de métodos de síntesis de NPs en disolución acuosa, concretamente de ferrita de zinc, son la síntesis por coprecipitación [62], sol-gel [53], por microemulsiones [63] o por microondas [64]. Por otra parte, las llevadas a cabo en medio orgánico ofrecen la posibilidad de obtener un mayor control en la distribución de tamaños. Sin embargo, presenta el inconveniente de que, debido a la hidrofobicidad del medio orgánico, será necesario un tratamiento posterior para que las NPs adquieran carácter hidrófilo, necesario para su empleo en biomedicina. Ejemplos de este tipo de síntesis son la descomposición térmica [65], o el método de polioles [66].

### 1.1.4.1. Método electroquímico

La síntesis de NPs llevada a cabo en este trabajo se basa en un método electroquímico que consiste en la electro-oxidación de láminas de metal, en medio acuoso, por la aplicación de corriente o potencial eléctrico sobre las mismas [67].

Las principales ventajas que presenta esta síntesis electroquímica con respecto al resto de métodos, son su alta reproducibilidad y versatilidad. Este método permite sintetizar NPs de ferrita de diferente composición mediante el empleo de electrodos de diferentes metales (Co [68], Mn [69], Ni [70]), ajustando finamente su estequiometría variando la corriente aplicada a los electrodos. Además, mediante la regulación de la temperatura de reacción, es posible controlar el diámetro de partícula en un amplio rango de tamaños (10-40 nm).

Por otro lado, la síntesis permite la obtención directa de NPs coloidales en medio acuoso [71], evitando etapas posteriores de transferencia de medio necesarias en las síntesis realizadas en medio orgánico.

Por último, estudios recientes llevados cabo por el grupo de investigación demuestran que el proceso es potencialmente escalable, mediante el empleo de un sistema de síntesis de flujo continuo que permite obtener hasta 1 g/h de NPs [72].

### 1.2. Toxicidad

Mientras que la nanotecnología y la producción de NPs crecen exponencialmente, queda mucho por investigar sobre su impacto toxicológico y el posible peligro para la salud humana y el medio ambiente [73] [74] [75]. La gran relación superficie/volumen de las NPs se traduce en un aumento de la reactividad de las mismas, de particular importancia en los mecanismos de interacción con los sistemas biológicos, que están lejos de ser completamente dilucidados dada su complejidad. Incluso NPs del mismo material pueden mostrar diferentes toxicidades debido a, por ejemplo, pequeñas diferencias en el tamaño, forma, grado de agregación, recubrimiento o carga superficial [76]. Además, tan pronto como las NPs entran en contacto con el medio biológico, comienza la adsorción de biomoléculas y la formación de la denominada “corona proteica”, modificando las propiedades de las NPs y haciendo que su comportamiento sea difícil de predecir [77]. Por último, el grado de toxicidad varía en función de la dosis de NPs empleada, el tiempo de exposición y la línea celular estudiada [78]. Por todo ello y por su gran diversidad, es necesario el estudio individualizado y exhaustivo para cada sistema concreto.

#### 1.2.1. Distribución de las NPs en el organismo

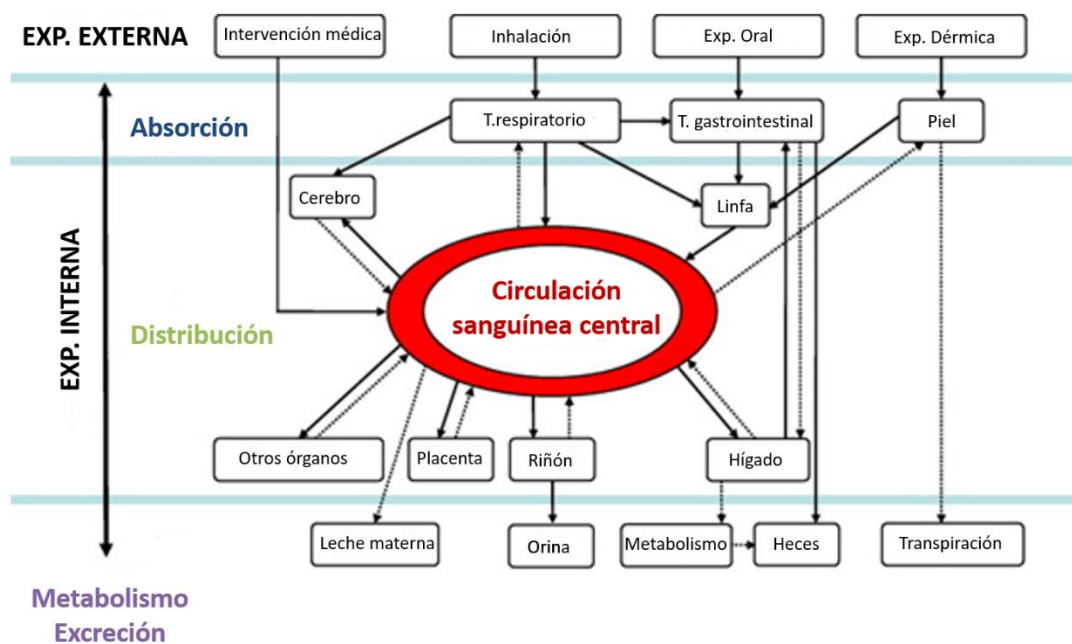
La absorción de las NPs por parte del cuerpo humano se produce principalmente a través de las vías respiratorias, el tracto gastrointestinal, la piel y mediante vía parenteral. Una vez introducidas en el organismo, son capaces de distribuirse por el cuerpo alcanzando diferentes órganos, ya sea de forma directa o a través del flujo sanguíneo [79] [80]. Como muestra la **Figura 1. 6**, las NPs provenientes de diferentes vías de exposición pueden dirigirse al mismo órgano, lo que hace necesario el estudio detallado de cada ruta individual.

Por otro lado, tanto la localización final de las NPs en el interior celular, como la posible citotoxicidad ejercida por las mismas, serán función del mecanismo de entrada a la célula a través de la membrana, que a su vez dependerán de las características superficiales de las NPs y de su tamaño [81].

Las NPs se introducen en la célula principalmente mediante endocitosis (**Figura 1. 7**). A través de este proceso, las células son capaces de introducir en su interior moléculas de diferentes tamaños generando invaginaciones de la membrana plasmática, dando lugar a vesículas capaces de ser transportadas a través del interior celular. El proceso de endocitosis puede llevarse a cabo mediante fagocitosis o pinocitosis.



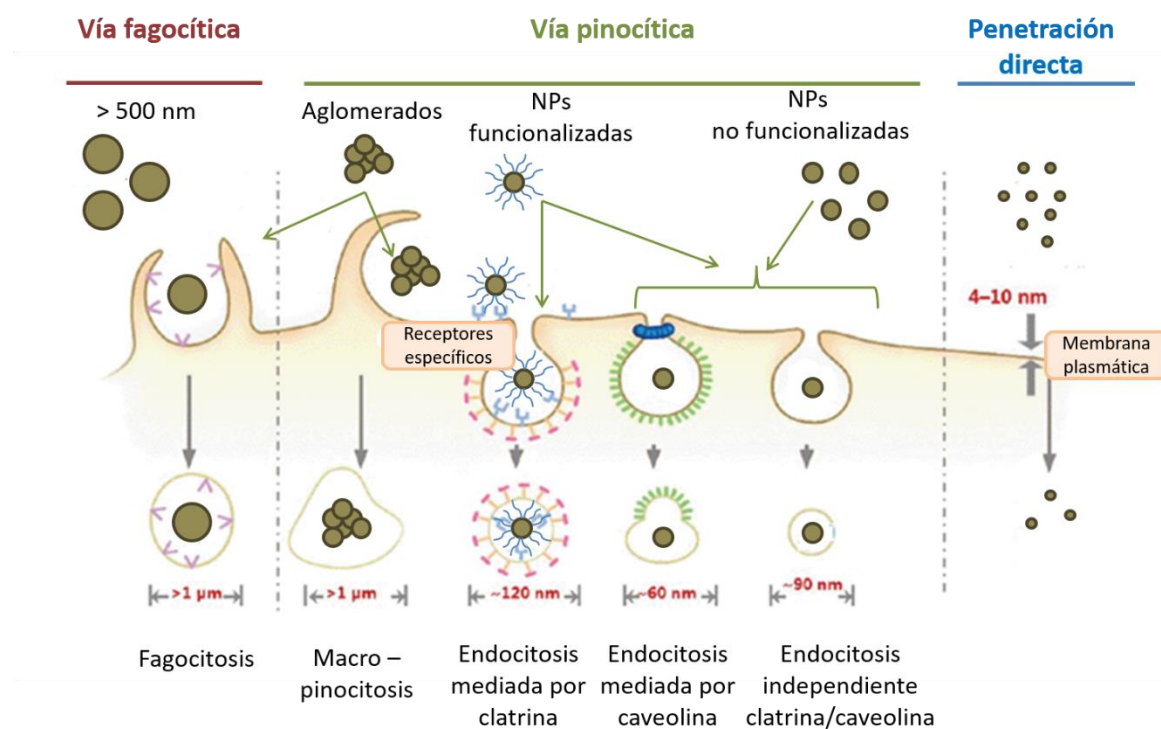
## 1. INTRODUCCIÓN



**Figura 1. 6.** Esquema representativo de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las NPs en el organismo. Las líneas continuas representan rutas previamente demostradas, mientras que las líneas discontinuas representan rutas hipotéticas. Modificado de referencia [79].

La fagocitosis, mediada por células especializadas como macrófagos, monocitos o neutrófilos, se encarga de la incorporación de grandes partículas (> 500 nm), como agregados de NPs o NPs opsonizadas, patógenos o restos de células muertas. Por otro lado, la pinocitosis se encarga del transporte de fluidos y partículas de menor tamaño al interior celular. En función del tamaño y del tipo de interacción de las partículas con la membrana, los procesos de pinocitosis se dividen en endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolina, macropinocitosis o endocitosis independiente de clatrina y caveolina [82] (**Figura 1. 7**).

Por último, las partículas son transportadas a los diferentes orgánulos celulares tales como el citoplasma, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplasmático o incluso el núcleo. La interacción de las NPs con los diferentes orgánulos puede inducir citotoxicidad debido a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o influyendo negativamente en diferentes funciones celulares como la actividad mitocondrial, el citoesqueleto, la adhesión celular, el ciclo celular o la integridad del material genético [81].



**Figura 1. 7.** Mecanismos endocíticos de entrada de las NP a través de la membrana celular de mamífero, en función del tamaño, estado de agregación o funcionalización superficial, entre otros factores. En la parte inferior de la figura se indican los tamaños de las vesículas endocíticas, tanto en fagocitosis como en las vías de pinocitosis, para la internalización de las partículas. Modificado de referencia [81].

### 1.2.2. Ensayos de toxicidad

Generalmente, la toxicidad de las NP se investiga en primer lugar, mediante una serie de pruebas *in vitro*. Si los resultados muestran una baja o nula toxicidad, el siguiente paso es la realización de experimentos *in vivo*. No es raro obtener resultados contradictorios *in vitro* e *in vivo*, dado el gran número de funciones y procesos biológicos que se dan en el organismo, imposibles de reproducir *in vitro* [83]. En último lugar, es necesario llevar a cabo ensayos clínicos en seres humanos para la aprobación del uso de las NP de manera segura [84].

Los experimentos *in vitro* ofrecen un medio rápido y simple de obtener datos preliminares de toxicidad, de menor coste y con menores problemas éticos que los experimentos *in vivo*. En general, las técnicas *in vitro* empleadas actualmente incluyen ensayos de viabilidad y/o proliferación celular, evaluación microscópica de la internalización y localización intracelular de las NP, análisis de la expresión génica, evaluación de la hemólisis y genotoxicidad [76]. Dichas técnicas tienen como inconveniente que a menudo proporcionan poca información sobre el mecanismo de toxicidad originado por las NP.

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Los experimentos de toxicidad *in vivo* se centran en el estudio de la farmacocinética de las NPs en el organismo, es decir, la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de las mismas. Este tipo de estudios permite obtener información sobre la toxicidad sistémica de las NPs, como efectos inmunológicos, neurológicos, reproductivos, cardiovasculares, del desarrollo o efectos carcinógenos [83].

### 1.2.3. Fe y Zn en el organismo

El Fe es un elemento esencial de vital importancia para el correcto funcionamiento del organismo, implicado en diversos procesos biológicos. Tanto su deficiencia como su exceso tienen graves consecuencias, dando lugar a diferentes patologías [85]. La deficiencia de hierro es la principal causa de anemia y juega un papel fundamental en la eritropoyesis (producción de glóbulos rojos), siendo esencial para la correcta función mitocondrial, la síntesis y reparación del DNA y en múltiples reacciones enzimáticas necesarias para la supervivencia celular [86]. Además, puede ser causa de defectos en el desarrollo cognitivo y físico de los niños, o de problemas durante el embarazo [87]. El exceso de Fe es también un hecho común e igualmente perjudicial para la salud. Se da principalmente en personas con enfermedades genéticas, como la hemocromatosis hereditaria y demás talasemias [88]. Este tipo de enfermedades da lugar a la acumulación de hierro en órganos parenquimatosos, como el hígado, el corazón o el páncreas, originando complicaciones como cirrosis hepática, cáncer, diabetes, hipogonadismo, insuficiencia cardíaca y artritis [89].

De igual manera, el Zn es otro elemento esencial implicado en un gran número de procesos biológicos. Es necesario para mantener la estructura y actividad catalítica de más de 300 enzimas, implicadas en la mayoría de las rutas metabólicas del cuerpo y es un componente estructural de más de 1000 factores de transcripción, teniendo un papel clave en la regulación de la expresión génica [90]. También juega un importante papel en la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, integridad de las membranas celulares y en el buen funcionamiento del sistema inmune [91] [92] [93]. Además, estudios recientes demuestran que la deficiencia de este elemento en la nutrición infantil tiene graves consecuencias en el crecimiento y desarrollo, aumentando la incidencia de enfermedades infecciosas como diarrea, neumonía o malaria, entre otras [94].

Debido a la gran implicación de ambos elementos en diferentes procesos celulares, los organismos presentan diversos mecanismos para su transporte y almacenaje de forma no tóxica [95] [96], de modo que las NPs de ferrita de zinc podrían ser absorbidas por el organismo e incorporadas a las reservas de Fe y Zn del cuerpo de forma segura [97]. Además, las dosis diarias

de Fe y Zn recomendadas por la *Food and Drug Administration* (FDA) son de 18 y 15 mg/día [46], respectivamente, que son mucho más altas que las correspondientes a cualquier otro material biocompatible [98].

### 1.3. Aplicaciones biomédicas

Las NPs magnéticas de óxido de hierro constituyen uno de los sistemas más prometedores en el campo de la biomedicina. Su baja toxicidad, biocompatibilidad, excelentes propiedades magnéticas (superparamagnetismo) y la fácil y versátil funcionalización de su superficie, abren un amplio abanico de posibles aplicaciones biomédicas. Estas aplicaciones cubren funciones tanto de diagnóstico, como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen [99], biosensores [100] o marcaje celular [101]; como funciones terapéuticas, como hipertermia [102], liberación dirigida de fármacos [103], regeneración de tejidos [104] o terapia génica [105]. Los recientes avances en nanomedicina han dado lugar al desarrollo de nanomateriales que combinan las funciones terapéutica y de diagnóstico, proporcionando efectos sinérgicos en el tratamiento del cáncer a través de la combinación de diferentes modalidades, lo que se conoce como “teragnosis” [106] [107] [108].

Para que las NPs magnéticas sean aptas para su aplicación en biomedicina deben cumplir una serie de requerimientos, como ser biocompatibles, o tener una estrecha distribución de tamaños. Además, las NPs deben presentar comportamiento superparamagnético, evitando así la interacción magnética entre ellas, su consecuente agregación y la posible obstrucción de los conductos capilares [57].

Una vez dispersas en el torrente sanguíneo, las NPs tienden a acumularse selectivamente en tejidos tumorales debido al efecto de aumento de la permeabilidad y la retención (EPR). El efecto EPR se debe a las deficiencias en la vascularización y en el sistema de drenaje linfático de los tumores, causando un aumento en el tamaño de los poros de la pared endotelial, en comparación con el tejido sano [106]. Este tipo de direccionamiento de las NPs se denomina pasivo. Por otra parte, las técnicas de direccionamiento activas se basan en la adecuada funcionalización superficial de las NPs con, por ejemplo, moléculas cuyos receptores estén sobreexpresados en células tumorales [109] o en dirigir magnéticamente las NPs hacia la zona a tratar con la ayuda de un campo magnético. Por este motivo, el correcto diseño del recubrimiento de las NPs juega a su vez un papel fundamental en la eficacia del tratamiento. Diferentes factores como la carga superficial o el tipo de moléculas que recubren las NPs

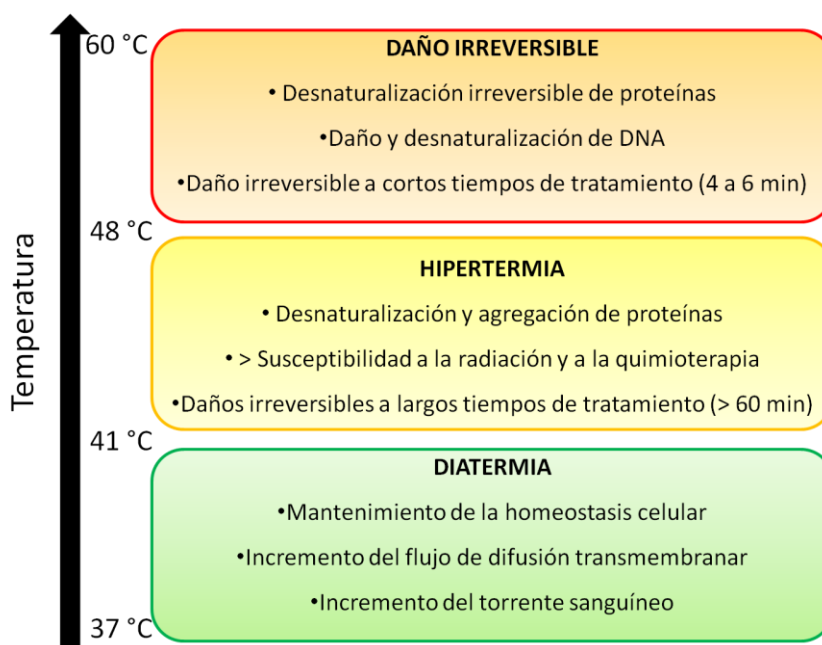
## 1. INTRODUCCIÓN

determinarán, por tanto, su estabilidad coloidal, el tiempo de residencia en sangre, la efectividad de la internalización por parte de las células y aportarán funciones específicas en su interior [110].

Por último, cabe decir que las NPs de óxido de hierro son capaces de generar calor en respuesta a ciertos estímulos externos, concretamente a la aplicación de luz o un campo magnético alterno (CA) externo. Este incremento controlado y localizado de temperatura puede ser utilizado como terapia térmica, o combinado, por ejemplo, para liberación de fármacos en respuesta a estímulos [111].

### 1.3.1. Terapias térmicas

Los efectos beneficiosos de la terapia térmica en el tratamiento del cáncer han sido demostrados recientemente por un gran número de investigadores [112], generando un incremento exponencial en el número de artículos de investigación publicados en relación a este tema de estudio. El aumento de la temperatura de forma controlada y localizada, da lugar a una gran cantidad de procesos biológicos [113] (**Figura 1. 8**), que en general son función del incremento de temperatura y de la duración del tratamiento [114], pudiendo variar entre los diferentes tipos celulares.



**Figura 1. 8.** Diagrama esquemático de los diferentes efectos originados a consecuencia de tratamientos térmicos, en función de la temperatura de operación. Adaptado de referencia [115].

Además, el efecto se ve incrementado en el caso de las células tumorales, ya que éstas son más susceptibles a los cambios de temperatura que las células sanas [116]. La combinación de los

tratamientos tradicionales de quimioterapia con la terapia térmica resulta en una mejora de la efectividad de éstos, junto a una reducción de los efectos secundarios asociados [117] [118].

En este trabajo se ha estudiado la viabilidad las NPs de ferrita de zinc sintetizadas para su posible empleo en tratamientos térmicos combinados contra el cáncer, concretamente en el tratamiento de tumores sólidos mediante hipertermia magnética y de terapia fototérmica.

### 1.3.1.1. Hipertermia magnética

La hipertermia magnética se basa en la capacidad que tienen ciertas NPs magnéticas de transformar energía magnética en calor, bajo la influencia de un campo magnético alterno. Las NPs superparamagnéticas tienden a alinear sus momentos magnéticos en la misma dirección que el campo magnético externo aplicado. Cuando este campo magnético cesa, los momentos de las NPs se relajan, retomando su posición inicial. Este proceso de relajación puede llevarse a cabo mediante dos mecanismos diferentes: la relajación tipo Néel y tipo Brown [119] (**Figura 1. 9a**).

La relajación de Néel implica la rotación interna del momento magnético, con un tiempo característico,  $\tau_N$ , definido como:

$$\tau_N = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (\text{Ec. 1. 3})$$

donde  $\tau_0 = 10^{-9}$  s,  $K$  es la constante de anisotropía,  $V$  es el volumen de la nanopartícula magnética,  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura.

Por otro lado, la relajación browniana se refiere a la rotación física de la propia NP en el medio en el que se encuentre dispersa, estando su tiempo de relajación característico,  $\tau_B$ , definido por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (\text{Ec. 1. 4})$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio,  $V_H$  es el volumen hidrodinámico de la nanopartícula,  $k_B$  es la constante de Boltzmann y  $T$  es la temperatura.

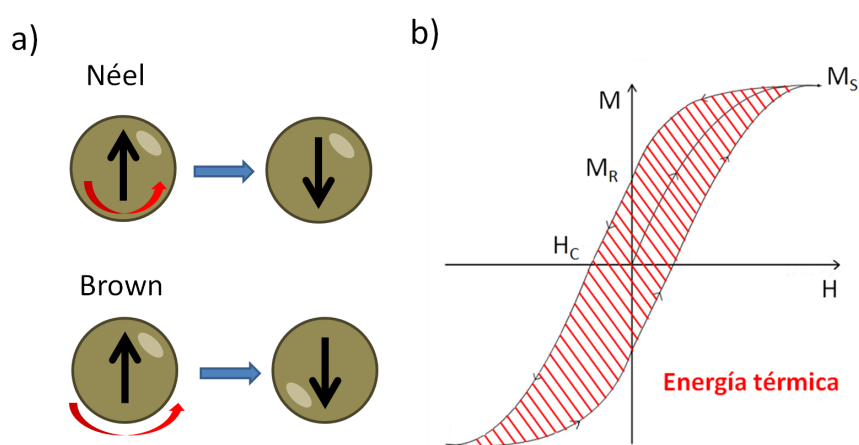
El tiempo de relajación efectivo resulta de la combinación de ambos mecanismos:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (\text{Ec. 1. 5})$$

Ambos mecanismos son dependientes del tamaño de partícula, aunque por lo general, la disipación de energía mediante el mecanismo de relajación de Néel prevalecerá en NPs pequeñas, mientras que la relajación Browniana será dominante en NPs de mayor tamaño.

## 1. INTRODUCCIÓN

Cuando la frecuencia del campo magnético alterno aplicado supera al tiempo de relajación de las NPs ( $\tau$ ), estas pasan a tener un comportamiento ferromagnético, presentando histéresis. La energía disipada en forma de calor por parte de las NPs será equivalente al área del ciclo de histéresis generado (**Figura 1. 9b**). Por este motivo, las NPs que posean altos valores de magnetización de saturación ( $M_s$ ) y campo coercitivo ( $H_c$ ), serán buenos candidatos para ser utilizados en tratamientos de hipertermia magnética. Aparte de las propiedades magnéticas de las NPs, otros parámetros como el tamaño y su polidispersidad, la forma, la composición química, viscosidad del medio y la funcionalización superficial de las mismas serán determinantes en su capacidad para generar calor.



**Figura 1. 9.** a) Mecanismos de relajación tipo Néel y Brown. b) Área del ciclo de histéresis (rojo) equivalente a la energía disipada en forma de calor por parte de las NPs.

Las interacciones dipolares entre NPs son otro parámetro clave en la eficacia de calentamiento de las mismas. Estas interacciones serán función de la estabilidad coloidal de las NPs y de la concentración a la que se encuentren. Los datos encontrados en la literatura indican que las interacciones dipolares pueden ejercer un papel favorecedor [120] [121] [122] o perjudicial [123] [124] [125] en el proceso de disipación de calor, dependiendo de la disposición relativa en la que se encuentren las NPs.

Por último, cuanto mayor sean la frecuencia,  $f$ , y amplitud,  $H$ , del campo magnético alterno aplicado, mayor será el calor disipado. Trabajando a mayores frecuencias, se producirá un mayor número de ciclos de histéresis por segundo y a mayor campo magnético alterno aplicado, mayor será el área de cada ciclo, hasta llegar a la saturación. Sin embargo, para garantizar la seguridad de los pacientes durante los tratamientos de hipertermia magnética, evitando dañar el tejido sano debido a la exposición a la radiación electromagnética, se ha establecido un límite experimental en el factor  $Hf$  de  $5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$  [126].

Una de las principales limitaciones de esta técnica es la dificultad para ejercer un control preciso de la temperatura alcanzada en el tejido tumoral. Como se ha comentado previamente, si la temperatura alcanza ciertos valores, el tratamiento podría tener efectos perjudiciales y dañar el tejido sano cercano al tumor. El candidato ideal para ser utilizado como agente termosensibilizador en terapias de hipertermia sería aquel que, aparte de ser biocompatible, posea unas propiedades magnéticas adecuadas y presente una  $T_c$  justo por encima de la temperatura terapéutica,  $\sim 43$  °C. De esta forma el agente dejaría de calentar una vez alcanzada la temperatura deseada, evitando el sobrecalentamiento de la zona a tratar [127] [128].

A pesar de que las NPs metálicas presentan las mejores propiedades magnéticas, las NPs de óxido de hierro son las más estudiadas para aplicaciones de hipertermia, debido a su baja toxicidad, buena biocompatibilidad, facilidad de síntesis y funcionalización superficial, lo que abre un gran abanico de posibilidades. Concretamente, la ferrita de zinc reúne todas esas cualidades y, además, como se comentó previamente, sus propiedades magnéticas pueden ser modificadas de forma controlada mediante la variación de su tamaño y composición. A priori, mediante un minucioso diseño, sería posible la síntesis de NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  dopadas con Zn,  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  ( $0 < x < 1$ ), con una  $T_c$  lo suficientemente baja para ejercer un control de temperatura autorregulado, óptimo para tratamientos de hipertermia magnética.

### 1.3.1.2. Terapia fototérmica

Algo más novedosa es la terapia fototérmica inducida con luz láser en el infrarrojo cercano (NIR) que, mediante el empleo de nanomateriales adecuados, se está abriendo camino hoy en día como uno de los tratamientos no invasivos más efectivos.

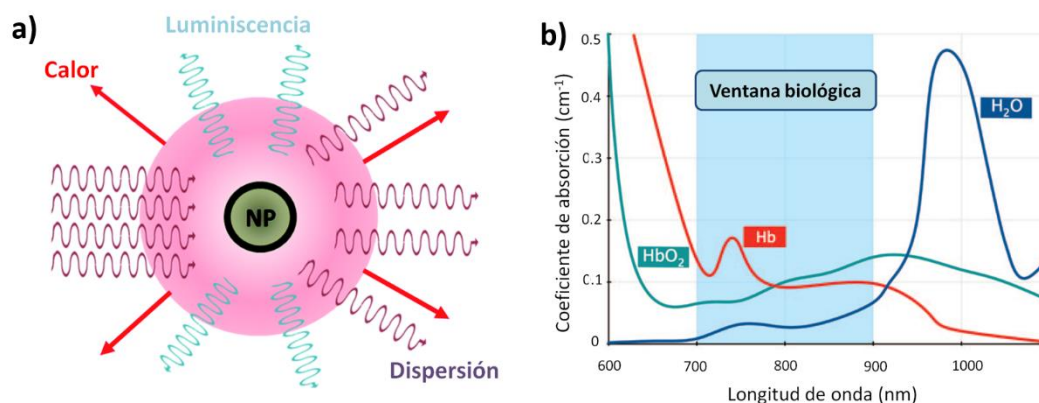
La técnica se basa en el empleo de un transductor fototérmico capaz de absorber y convertir eficazmente la luz NIR en calor, de forma no radioactiva [129]. Cuando una NP es irradiada por un haz de luz, parte de los fotones incidentes serán dispersados, mientras que otra parte serán absorbidos por las NP. La energía absorbida puede ser liberada mediante la emisión de fotones, de energía diferente a la incidente, dando lugar al fenómeno de luminiscencia, o mediante la emisión de fonones, originando calor [115] (**Figura 1. 10a**). Cuanto mayor sea la eficiencia de absorción de las NPs y más bajo sea el rendimiento cuántico de luminiscencia, mayor será su eficacia en la conversión de luz en calor.

Las longitudes de onda comprendidas entre los 650 y los 900 nm de la región NIR, también denominada como “ventana biológica”, son las más adecuada en terapias contra el cáncer ya que en esta región la absorción por parte del agua y de la sangre (concretamente, de la



## 1. INTRODUCCIÓN

hemoglobina) es mínima, mientras que la transmitancia por parte los tejidos es máxima (**Figura 1. 10b**). Esto permite la penetración no invasiva de la luz, alcanzando tejidos relativamente profundos, hasta 10 cm [130] [131]. Paralelamente, el límite conservativo recomendado para la intensidad del láser de 808 nm, longitud de onda más comúnmente utilizada en terapias fototérmicas, para la exposición de la piel humana está establecido en  $0.33 \text{ W/cm}^2$  [132].



**Figura 1. 10.** a) Representación esquemática de los diferentes procesos de disipación de energía, originados al irradiar una NP con un haz de luz. Modificado de referencia [115] b) Espectro de absorción de la hemoglobina y del agua en la región del NIR, en la cual los tejidos se consideran ópticamente transparentes. Modificado de referencia [133].

Se han desarrollado diferentes tipos de agentes para terapia fototérmica que satisfacen todas las características previamente descritas. Ejemplos de ello son nanomateriales basados en oro [134] [135] [136] y en sulfuro de cobre [137] [138], nanoestructuras de carbono como óxido de grafeno [139] [140] [141], "quantum dots" [142] [143] o nanotubos de carbono [144] y NPs dopadas con tierras raras [145] [146] [147]. Recientemente, se está investigando el empleo de materiales magnéticos como las NPs de óxido de hierro, dada su demostrada capacidad de conversión de luz en calor [148] [149] [150]. Los estudios Sadat et al. y Zhao et al. identificaron el efecto fototérmico de NPs de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en términos de emisión de fotoluminiscencia en la región NIR [151] [152]. Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados, los mecanismos que gobiernan este fenómeno están aún lejos de ser completamente comprendidos.

---

## 2. OBJETIVOS

---

### 2. Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en desarrollar un nanomaterial magnético para su empleo como agente termosensibilizador en tratamientos biomédicos contra el cáncer y que a su vez sea autolimitante en la generación de calor, reduciendo así los posibles efectos secundarios del tratamiento.

Para cubrir dicho objetivo, fue necesaria la realización de las tareas descritas a continuación:

- Optimización de un método de síntesis electroquímico para la obtención de una serie de NPs de ferrita empleando elementos de baja toxicidad, concretamente Fe y Zn, con diferente estequiometría,  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ).
- Caracterización estructural y magnética de las NPs sintetizadas mediante técnicas generales como difracción de rayos X, microscopía electrónica de transmisión, espectrometría óptica de emisión de plasma, análisis termogravimétrico, SQUID, magnetometría de muestra vibrante y mediante técnicas más específicas como difracción de neutrones, absorción de rayos X o espectroscopia Raman.
- Selección de la estequiometría y tamaño adecuados de las NPs para la obtención de un material que presente una temperatura de orden magnético en torno al límite terapéutico, llegando a un compromiso en cuanto a la magnetización de saturación y un diámetro en el cual las NPs presenten comportamiento superparamagnético, evitando así la agregación de las mismas.
- Funcionalización superficial de las NPs con moléculas biocompatibles, con el fin de generar una superficie activa y dotar a las NPs de buena estabilidad coloidal. Evaluación de la calidad de la funcionalización mediante medidas de potencial Zeta y dispersión de luz dinámica.
- Estudio de la toxicidad de las NPs *in vitro* en diversas líneas celulares e *in vivo*, trabajando con embriones en el estadio 38 del modelo animal *Xenopus laevis*.
- Evaluación de la efectividad de las NPs para su posible empleo en biomedicina, en tratamientos térmicos combinados contra el cáncer. Concretamente, el estudio se centra en evaluar la viabilidad de las NPs como posibles agentes en tratamientos de hipertermia magnética y de terapia fototérmica.

---

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

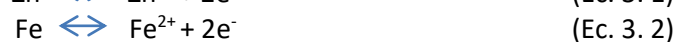
### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Síntesis electroquímica de NPs de ferrita de zinc

La síntesis electroquímica de NPs de ferrita de zinc se llevó a cabo siguiendo un método previamente desarrollado y optimizado para la obtención de NPs de ferritas de diferente composición con cationes divalentes de Fe, Co, Ni o Mn [67] [70] [68] [69]. El método consiste en la electro-oxidación galvanostática de láminas de hierro y zinc en medio acuoso, en una celda electroquímica de tres electrodos, empleando dos ánodos de hierro y zinc y un cátodo de hierro.

Las reacciones de oxidación (Ecuaciones 3.1-3.4), reducción (Ecuación 3.5) y la reacción global de la síntesis (Ecuación 3.6) se detallan a continuación:

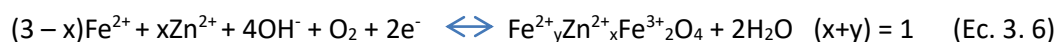
Reacciones anódicas:



Reacción catódica:

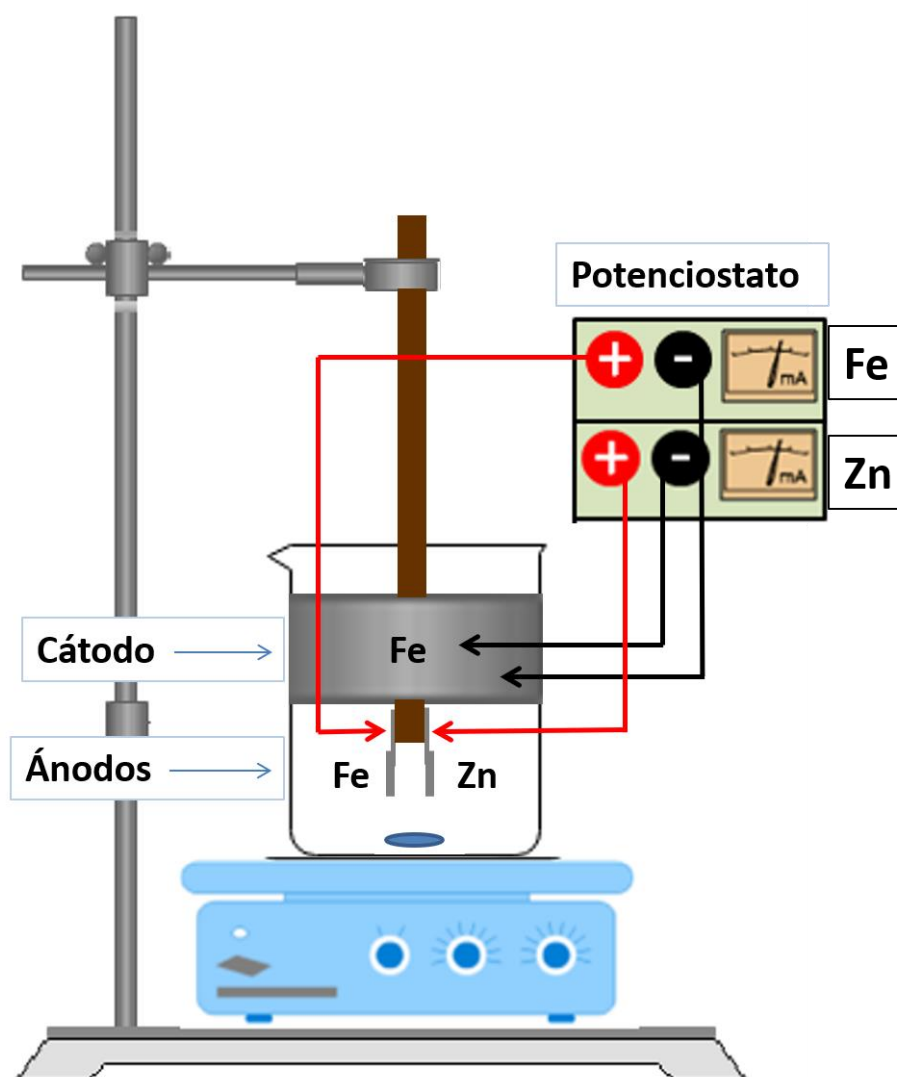


Reacción global:



El mecanismo de reacción propuesto para la formación de las NPs de ferrita de zinc transcurre mediante la generación de cationes Fe y Zn en la disolución debido a la oxidación de las láminas metálicas o ánodos. Estos cationes reaccionan con los aniones  $\text{OH}^-$  generados en el cátodo mediante la reducción del agua, formando los correspondientes hidróxidos. Finalmente, dichos hidróxidos se combinan entre sí, en presencia de oxígeno, dando lugar a la ferrita de zinc [72].

Para la fabricación de los ánodos se emplearon láminas de hierro y zinc de  $2 \text{ cm}^2$  de área, 0.25 y 0.20 mm de espesor y una pureza de 99.5 y 99.9%, respectivamente (Goodfellow). Para la fabricación del cátodo se empleó el mismo material del ánodo de hierro, con un área de  $120 \text{ cm}^2$ . Los ánodos se dispusieron enfrentados el uno al otro, con una separación de 1 cm de distancia, colocando al cátodo cilíndrico alrededor de los mismos, como muestra la **Figura 3. 1**.



**Figura 3. 1.** Esquema del montaje experimental utilizado para la síntesis electroquímica de las NPs de ferrita de zinc.

La reacción se llevó a cabo en un reactor termostático con un volumen de 100 mL, empleando una disolución acuosa 0.04 M de bromuro de tetrabutilamonio ( $n\text{Bu}_4\text{NBr}$ ) (Sigma-Aldrich,  $\geq 99.0\%$ ) como electrolito soporte. Dicho electrolito actúa simultáneamente como agente surfactante, evitando la agregación de las NPs durante el proceso de síntesis.

La reacción se llevó a cabo en un tiempo de 30 minutos, con una agitación magnética constante de 1100 rpm. El material sintetizado se decantó magnéticamente con ayuda de un imán de neodimio de 0.6 T y se lavó con agua desionizada hasta obtener un sobrenadante libre de impurezas. Por último, el sólido obtenido se secó a vacío, a una temperatura de 60 °C durante 12 horas, para su posterior caracterización.

### 3.1.1. Efecto de la intensidad de corriente aplicada

La reacción de electro-oxidación de las láminas metálicas se realiza galvanostáticamente, es decir, haciendo pasar una densidad de corriente fija y definida a la celda electroquímica. La cantidad de cationes de Fe y Zn generada y, por consiguiente, la cantidad relativa de iones o fracción [Fe/Zn] presente en el medio de reacción, está directamente relacionada con la velocidad de oxidación de los ánodos, que depende a su vez de la intensidad de corriente aplicada a la celda. Atendiendo a la estequiometría de la ferrita de zinc,  $ZnFe_2O_4$ , se observa que la relación molar entre el hierro y el zinc es 2:1 y de acuerdo a lo comentado previamente, la intensidad de corriente aplicada al ánodo de hierro debe ser el doble a la aplicada al ánodo de zinc. La variación de dicha relación posibilita la obtención de ferritas de zinc de diferente estequiometría, con contenidos de Zn entre 0-1, y contenidos de Fe entre 2-3. Para ello, la intensidad de corriente aplicada al ánodo de hierro se fijó en 100 mA en todos los casos, mientras que la aplicada al ánodo de zinc se varió en el rango de 5–50 mA, obteniéndose materiales con diferente composición ( $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$ ,  $0 < x < 1$ ). Las intensidades de corriente se generaron utilizando un potencióstato/galvanostato Amel 549. La temperatura de reacción fue, inicialmente, de 25 °C en todos los casos. La nomenclatura de las muestras se realizó en función de la intensidad de corriente aplicada al ánodo de zinc:  $ZnFe(X)25^\circ C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ) y queda resumida en la **Tabla 3. 1**.

**Tabla 3. 1.** *Condiciones experimentales empleadas en la síntesis electroquímica de las NPs de ferrita de zinc, donde I es la intensidad de corriente aplicada y  $T_R$  es la temperatura de reacción.*

I (mA)		$T_R = 5^\circ C$	$T_R = 25^\circ C$	$T_R = 40^\circ C$	$T_R = 60^\circ C$
Fe	Zn				
100	5	ZnFe(5)5°C	ZnFe(5)25°C	ZnFe(5)40°C	ZnFe(5)60°C
100	10	ZnFe(10)5°C	ZnFe(10)25°C	ZnFe(10)40°C	ZnFe(10)60°C
100	20	ZnFe(20)5°C	ZnFe(20)25°C	ZnFe(20)40°C	ZnFe(20)60°C
100	30	ZnFe(30)5°C	ZnFe(30)25°C	ZnFe(30)40°C	ZnFe(30)60°C
100	40	ZnFe(40)5°C	ZnFe(40)25°C	ZnFe(40)40°C	ZnFe(40)60°C
100	50	ZnFe(50)5°C	ZnFe(50)25°C	ZnFe(50)40°C	ZnFe(50)60°C

### 3.1.2. Efecto de la temperatura de reacción

Con el objetivo de estudiar la influencia de la temperatura de reacción en el tamaño y composición de las NPs sintetizadas, se realizaron experimentos a 5, 25, 40 y 60 °C, para cada relación de intensidades de corriente aplicada detallados en el apartado 3.1.1. *Efecto de la*

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

*intensidad de corriente aplicada* La nomenclatura de las muestras se realizó en función de la intensidad de corriente aplicada al ánodo de zinc (X) y la temperatura de reacción ( $T_R$ ): ZnFe(X)( $T_R$ ) (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50) ( $T_R$  = 5, 25, 40, 60) y queda resumida en la **Tabla 3. 1**.

#### 3.1.3. Estabilidad térmica de las NPs

Para evaluar la estabilidad térmica de las NPs y estudiar posibles cambios en su microestructura, se realizó un tratamiento térmico de la serie de NPs sintetizadas descrita en el apartado 3.1.1. *Efecto de la intensidad de corriente aplicada.*, es decir, aquellas sintetizadas a 25 °C con diferente intensidad de corriente en el ánodo de zinc. El proceso consistió en un tratamiento térmico de 580 °C durante 12 horas en un horno. La serie de muestras se denominan como: ZnFe(X)580°C (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50).

#### 3.1.4. Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm

Tras la caracterización de las NPs obtenidas mediante los protocolos descritos en los apartados 3.1.1. *Efecto de la intensidad de corriente aplicada* y 3.1.2. *Efecto de la temperatura de reacción*; se optimizaron las condiciones de reacción con el objetivo de obtener NPs de ferrita de zinc con diferente contenido en Zn y mismo diámetro (~12 nm). Para ello, se aplicaron las intensidades de corriente a los ánodos de hierro (100 mA) y zinc (5, 10, 20, 40, 50 mA) previamente descritas, optimizando la temperatura de reacción para cada una de ellas. El resto de parámetros de reacción como volumen del reactor, disposición de los electrodos, tiempo de reacción, velocidad de agitación y proceso de lavado, se mantuvieron invariables respecto a los descritos en el apartado 3.1. *Síntesis electroquímica de NPs de ferrita de zinc*. La nomenclatura de las muestras y las condiciones de síntesis óptimas quedan resumidas en la **Tabla 3. 2**.

**Tabla 3. 2.** *Nomenclatura de la serie de muestras de NPs sintetizadas con diferente estequiometría y mismo tamaño (12 nm), donde I es la intensidad de corriente aplicada y  $T_R$  es la temperatura de reacción.*

$Zn_xFe_{(3-x)}O_4$	I (mA)		$T_R$ (°C)
	Fe	Zn	
Zn <sub>0.17</sub> Fe <sub>2.83</sub> O <sub>4</sub>	100	5	5
Zn <sub>0.24</sub> Fe <sub>2.76</sub> O <sub>4</sub>	100	10	5
Zn <sub>0.53</sub> Fe <sub>2.47</sub> O <sub>4</sub>	100	20	40
Zn <sub>0.67</sub> Fe <sub>2.33</sub> O <sub>4</sub>	100	30	55
Zn <sub>0.80</sub> Fe <sub>2.20</sub> O <sub>4</sub>	100	40	70
Zn <sub>0.93</sub> Fe <sub>2.07</sub> O <sub>4</sub>	100	50	80

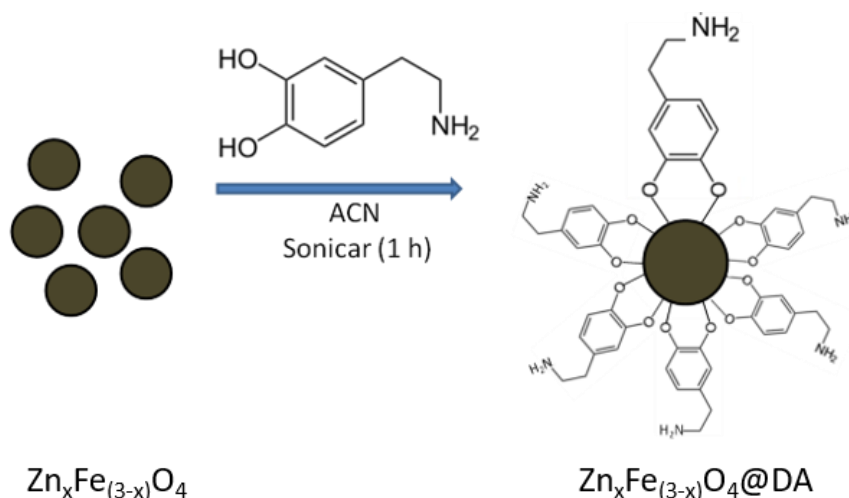


### 3.2. Funcionalización superficial de las NPs

#### 3.2.1. Funcionalización superficial con dopamina

La funcionalización superficial de las NPs con moléculas de dopamina (DA) permite mejorar la estabilidad coloidal de las mismas. Al mismo tiempo, genera una superficie activa de grupos amino libres que pueden servir como puntos de anclaje de otras moléculas de interés en procesos posteriores de funcionalización [153] [154].

El anclaje de las moléculas de DA se produce mediante la unión del grupo catecol de las mismas con los cationes de hierro presentes en la superficie de las nanopartículas [155] [156]. Para ello, se resuspendió una cantidad de 20 mg de muestra  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) en un volumen de 3 mL de acetonitrilo (ACN) (Sigma-Aldrich). A continuación, se añadieron 250 mg de clorhidrato de dopamina (Sigma-Aldrich) y la mezcla se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 1 hora (**Figura 3. 2**). Posteriormente, la muestra se lavó de nuevo con ACN con el fin de eliminar el exceso de DA sin reaccionar del medio, separando el sólido del líquido magnéticamente. Finalmente, las NPs se llevaron de nuevo a medio acuoso mediante diversos lavados con agua desionizada, separando en este caso el sólido del sobrenadante mediante centrifugación, 15 minutos a 9000 rpm, empleando una centrífuga Hettich Universal 320. Inmediatamente, la muestra se sonicó durante 15 minutos y se conservó a una temperatura de 4 °C. La muestra se denominó como  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@DA$  ( $0 < x < 1$ ).



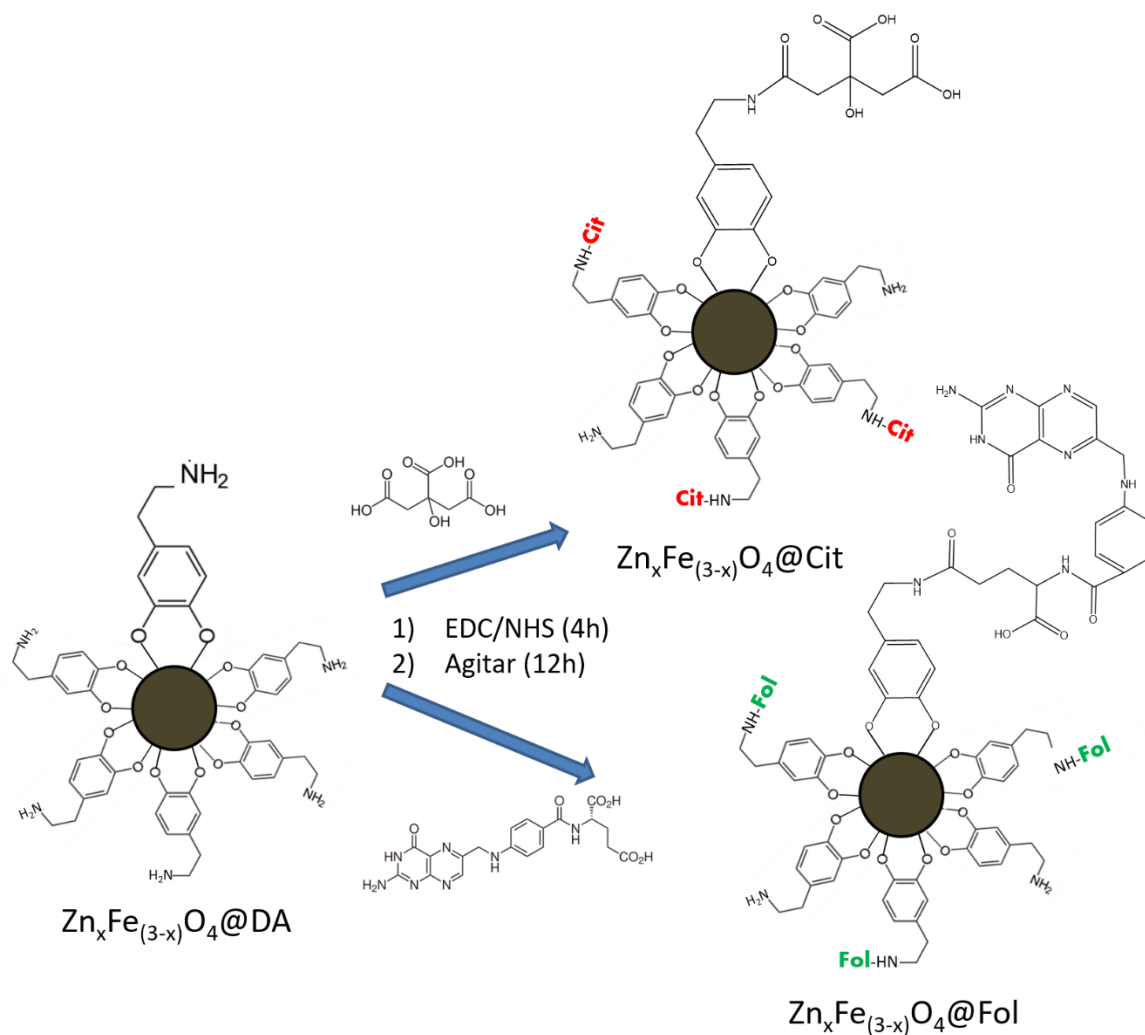
**Figura 3. 2.** Esquema de funcionalización superficial de las NPs de  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) con DA mediante química del catecol.

#### 3.2.2. Anclaje de moléculas biocompatibles

Como se comentó en el apartado 3.2.1. *Funcionalización superficial con dopamina.*, la funcionalización superficial de las NPs con moléculas de DA permite el anclaje de nuevas moléculas mediante los grupos amino libres, aportando funciones específicas a las mismas. Las moléculas biocompatibles elegidas para su anclaje a los grupos amino aportados por la DA fueron los ácidos cítrico y fólico. El ácido cítrico aporta excelentes propiedades coloidales, al igual que el ácido fólico, que además favorece la internalización de las NPs en la mayoría de las células tumorales, ya que estas presentan receptores de folatos sobre-expresados en su membrana plasmática [109].

El anclaje de las moléculas se realizó mediante la formación de un enlace amida entre el grupo amina aportado por la DA y los grupos carboxílicos de los ácidos cítrico y fólico (Sigma-Aldrich). La formación del enlace se llevó a cabo a través de una reacción de acoplamiento mediada por los reactivos clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hydroxisuccinimida (EDC/NHS) [157] (Sigma-Aldrich) (**Figura 3. 3**).

Para ello, se disolvieron 0.16 mmol de ácido (fólico o cítrico) en un volumen de 10 mL de *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich) y agua desionizada en proporción 1:1. Se ajustó el pH a un valor de 8 con NaOH (Sigma-Aldrich). A continuación, se añadieron 0.32 mmol de EDC y NHS a la disolución, se reajustó el pH a 8 y la mezcla se agitó magnéticamente y en oscuridad durante 4 horas para la activación de los grupos carboxílicos de ambos ácidos. Por último, se añadieron 40 mg de  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@DA$  y la mezcla se dejó agitando mecánicamente 12 horas para la reacción de conjugación. Pasado este tiempo, las NPs se lavaron repetidamente con agua desionizada, separando la fase sólida del sobrenadante mediante centrifugación durante 15 minutos a 9000 rpm. Las muestras se sonicaron durante 15 minutos y se conservaron a una temperatura de 4 °C para su posterior uso. Las muestras funcionalizadas con ácido cítrico se denominaron  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Cit$ , nombrando como  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Fol$  a las funcionalizadas con ácido fólico.

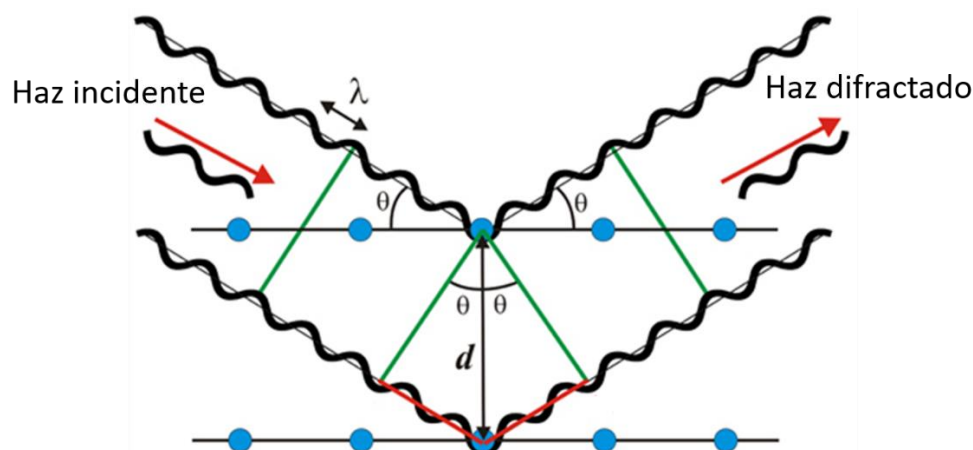


**Figura 3. 3.** Esquema de reacción de funcionalización superficial de las NPs de  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@DA$  ( $0 < x < 1$ ) mediante anclaje de los ácidos cítrico (Cit) y fólico (Fol) a las moléculas de DA.

### 3.3. Caracterización estructural, morfológica y química

#### 3.3.1. Difracción de rayos X

La estructura cristalina de las NPs se caracterizó mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX). Esta técnica se basa en la dispersión elástica del haz de rayos X al entrar en contacto con la nube electrónica de los átomos que forman parte de la estructura cristalina. El factor de dispersión, por tanto, depende directamente del número de electrones del átomo que dispersa. Los rayos X difractados en ciertas direcciones, son amplificados por interferencia constructiva (Figura 3. 4).



**Figura 3. 4.** Ejemplo de difracción con interferencia constructiva.

Aplicando la Ley de Bragg (Ecuación 3.6) que relaciona los ángulos de interferencia constructiva con las distancias entre planos cristalinos, es posible generar un patrón de difracción,

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen}\theta \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde  $n$  son números enteros,  $\lambda$  es la longitud de onda del haz de rayos X incidente,  $d$  es la distancia interplanar de la red cristalina y  $\theta$  es el ángulo entre los rayos incidentes y los planos de dispersión.

El equipo utilizado fue un difractómetro X'Pert PRO (Panalytical) con geometría  $\theta/2\theta$ , con radiación  $\text{Cu}(K\alpha) = 1.5418 \text{ \AA}$ , equipado con un monocromador secundario y un detector Si-Li SOL-X (Bruker). El difractómetro se encuentra en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIdI) de la UAM. Los difractogramas se registraron entre  $10^\circ$  y  $80^\circ$  ( $2\theta$ ), con un incremento angular de  $0.04^\circ$  y un tiempo de adquisición de 4 s/paso. El ensanchamiento instrumental se corrigió utilizando un patrón de Si medido en las mismas condiciones.

Los difractogramas se analizaron mediante el método de refinamiento Rietveld [158], utilizando el programa Fullprof Suite [159]. Este método de refinamiento genera un modelo matemático ajustado al patrón de difracción obtenido experimentalmente, mediante el método de mínimos cuadrados. Esto nos permite conocer detalles estructurales de los cristales, como son el tamaño de cristal, los parámetros de red o la distribución catiónica.

#### 3.3.2. Difracción de neutrones

Al igual que la DRX, la difracción de neutrones se basa en la dispersión elástica de la radiación proveniente de estos. Debido a su naturaleza sin carga, los neutrones tienen una mayor capacidad de penetración en la materia, interaccionando con el núcleo atómico. En este caso la dispersión de la radiación se debe a propiedades del núcleo atómico y no del número atómico.

Este hecho nos permite discernir entre elementos ligeros y/o de similar número atómico, lo cual supone una ventaja frente a DRX donde es complicado distinguir entre átomos de parecido número atómico. Adicionalmente, los neutrones poseen momento magnético, permitiéndonos obtener además de información cristalográfica, información sobre la estructura magnética del material.

Los experimentos se realizaron en el difractómetro de neutrones de dos ejes D1B de alto flujo, del reactor nuclear de investigación de Instituto Laue-Langevin (Grenoble, Francia). Los difractogramas se registraron en un rango de temperaturas de 10 K a 300 K, utilizando una  $\lambda$  de 1.286 Å. El análisis de los difractogramas se llevó a cabo mediante el método de Rietveld, descrito previamente en el apartado 3.3.1. *Difracción de rayos X.*, utilizando para ello el programa Fullprof Suite.

### 3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión

En la microscopía electrónica de transmisión (TEM), una muestra delgada es irradiada con un haz de electrones de alta energía. Al entrar en contacto con la muestra, parte de los electrones son dispersados, parte son transmitidos y otra parte da lugar a diversos fenómenos, como la emisión de rayos X. La transmisión y dispersión de los electrones se emplea para reconstruir imágenes, obteniéndose micrografías con distintas intensidades en función del grado de dispersión de los electrones. De modo que, esta técnica nos permite principalmente observar la morfología de las NPs y determinar su tamaño de partícula.

Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio JEOL JEM 1010 operando con una velocidad de voltaje de 100 kV equipado con una cámara digital Gatan modelo 200 SC. El equipo se encuentra en el SIdI de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Además, se tomaron micrografías de alta resolución de las NPs utilizando un microscopio con corrección de aberración esférica FEI Titan XFEG, operando con una velocidad de voltaje de 300 kV. El microscopio está equipado con un monocromador, un detector EDAX EDS, un filtro de energía Gatan Tridiem y un corrector CEOS para la alineación del flujo de electrones. El equipo se encuentra en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (LMA) de la Universidad de Zaragoza. Este microscopio permite obtener una resolución de imagen de 0.8 Å, que combinado con estudios espectroscópicos de pérdida de energía de electrón (EELS) [160] y modo de campo oscuro anular de alto ángulo (STEM-HAADF) [160], permiten además la obtención de mapas y perfiles de composición química del material.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

La preparación de las muestras se realizó en ambos casos a partir de suspensiones acuosas diluidas de NPs, añadiendo una gota de las mismas sobre rejillas de cobre recubiertas de carbono. Para el análisis de las micrografías se utilizó el programa ImageJ [161]. Tras medir el tamaño de partícula de al menos 100 NPs, se hizo el análisis estadístico de los datos obteniendo el tamaño medio de NP y su dispersión.

#### 3.3.4. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

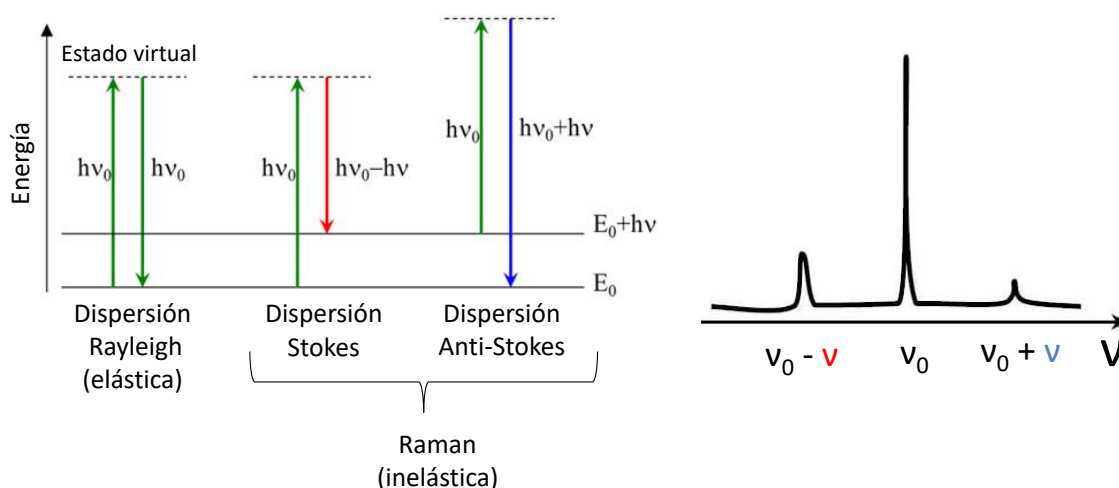
Mediante la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) se obtiene información sobre modos vibracionales y rotacionales de las moléculas, a consecuencia de la absorción de radiación infrarroja por parte del material a analizar. Algunos de estos modos vibracionales dan lugar a cambios en el momento dipolar de las moléculas, originando espectros de absorción característicos que permiten la identificación de las mismas.

Para el análisis de las muestras se prepararon pastillas de NPs en polvo y KBr. Las medidas se hicieron en el rango de frecuencias  $7000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ , utilizando un espectrofotómetro FT-IR Bruker IFS 66V del SIdI de la UAM.

#### 3.3.5. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica basada en la dispersión inelástica de la luz monocromática, por lo general un láser. Los fotones de la luz del láser incidente son absorbidos por la muestra, excitándola a un estado virtual. Ésta, al relajarse, puede reemitir la luz a la misma frecuencia que la original, lo que se conoce como dispersión Rayleigh, o puede reemitirla a valores de mayor o menor frecuencia, denominándose efecto Raman. En el caso de que la molécula sea excitada desde el estado fundamental y se relaje a un estado vibracional excitado, los fotones serán reemitidos a una menor frecuencia, denominándose dispersión Raman Stokes. En cambio, si la molécula ya se encontraba en un estado de vibración excitado, los fotones emitidos tendrán mayor frecuencia, dándose el proceso de dispersión Raman Anti-Stokes. Este desplazamiento en la frecuencia proporciona información sobre modos vibracionales, rotacionales y otras transiciones de baja frecuencia características de las moléculas, dando lugar a un espectro único o “huella dactilar” que permite la identificación las mismas (**Figura 3. 5**).

A diferencia de la espectroscopia de IR, para que el efecto Raman sea posible los modos vibracionales o rotacionales deben generar cambios en la polarizabilidad de la molécula. Debido a esto, habrá modos activos tanto en IR como en Raman, o que únicamente sean activos en uno de los dos casos. Por este motivo ambas técnicas se consideran complementarias.



**Figura 3. 5.** Esquema de las transiciones Rayleigh (elástica) y Raman (inelástica) de la luz.

Para la obtención de los espectros Raman se utilizó un microscopio CRM-Alpha 300 RA (WITec, Ulm, Alemania) que consta de un microscopio Raman confocal equipado con un láser Nd:YAG de 50 mW de máxima potencia, a una longitud de onda de 532 nm. Este equipo permite además realizar mapeos de espectros Raman pudiéndose obtener imágenes con información química y estructural. El equipo se encuentra en el Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV) (CSIC, Madrid).

Mediante esta técnica se caracterizó la serie de muestras ZnFe(X)25°C (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50) descrita en el apartado 3.1.1. *Efecto de la intensidad de corriente aplicada* Las medidas de las muestras se realizaron seleccionando la potencia del láser incidente a 0.2 mW, de manera que el material no sufriera modificaciones debido al aumento de temperatura. Para cada muestra se tomaron 2 espectros de 5 acumulaciones de 20 s cada una, que después se promediaron. El análisis de los espectros se realizó con el software WITec Control Plus, ajustando los modos Raman de vibración a una función Lorentziana.

También se realizó un estudio en función de la temperatura de la muestra ZnFe(30)25°C. Las condiciones de medida fueron las mismas previamente descritas, tomando los diferentes espectros en un rango de temperaturas de 100-773 K.

Por último, se caracterizó la serie de muestras ZnFe(X)580°C (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50) descrita en el apartado 3.1.3. *Estabilidad térmica de las NPs*, para el estudio del efecto del tratamiento térmico aplicado en la estructura del material. En este caso, en vez de tomar espectros puntuales se hicieron barridos más amplios, obteniendo imágenes de 7x7  $\mu\text{m}$  para cada muestra con 440 espectros por imagen y un tiempo de integración de 10 s cada uno.

### 3.3.6. Espectroscopia de absorción de rayos X

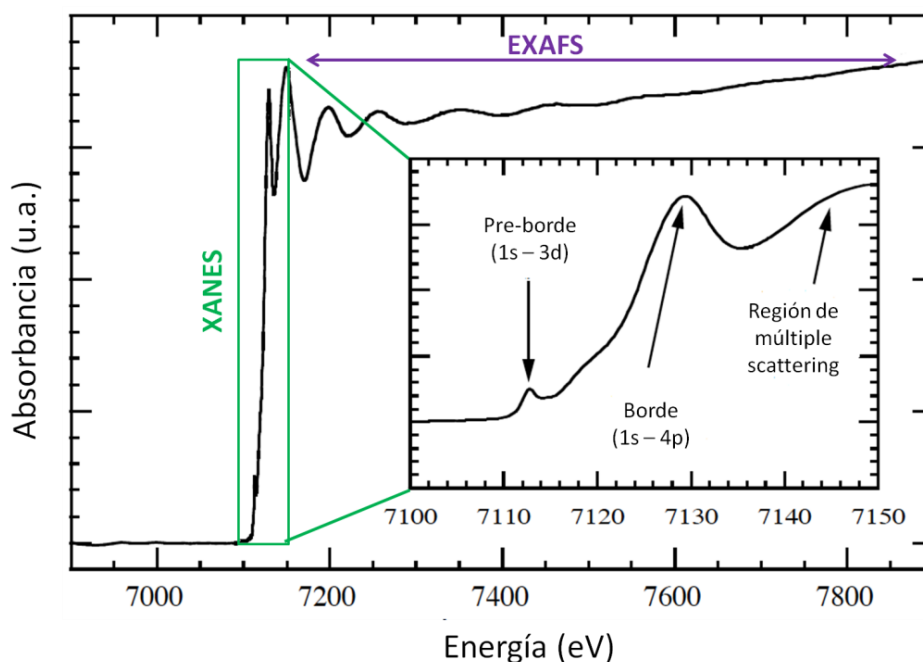
La espectroscopia de absorción de rayos X ha mostrado ser una potente herramienta para el estudio de nanomateriales complejos, siendo capaz de discernir entre los diferentes elementos constituyentes del material, así como del entorno en el que se encuentran. Por ello, resulta una técnica muy útil para la determinación de la distribución catiónica o grado de inversión de las ferritas.

El principio de esta técnica se basa en la interacción de la radiación electromagnética con el material a analizar. Las energías de los rayos X empleados para la mayoría de aplicaciones en XAS se encuentran entre aproximadamente 1 y 40 keV, que se corresponden con longitudes de onda entre 0.3 y 12 Å. Los mecanismos que contribuyen a la atenuación de la radiación en este rango de energía son la dispersión elástica o inelástica de los fotones incidentes al colisionar con electrones atómicos y la absorción fotoeléctrica de la radiación, predominando este último en dicho rango energético. Cuando la energía de los fotones incidentes es lo suficientemente grande, provoca la emisión de electrones internos del átomo absorbente (fotoelectrones), dando lugar a los denominados “bordes de absorción” característicos de cada elemento [162].

El espectro de absorción de rayos X representa la variación del coeficiente de absorción ( $\mu$ ) en función de la energía del fotón incidente ( $\mu(E)$ ), pudiendo diferenciar dos zonas: la región XANES (“*X-ray Absorption Near Edge Structure*”) y la región EXAFS (“*Extended X-ray Absorption Fine Structure*”) (**Figura 3. 6**). La región XANES corresponde al máximo de absorción y aporta información sobre el estado de oxidación y la simetría del átomo absorbente. La región EXAFS es la región del espectro en la que se producen ciertas modulaciones debidas a las interferencias entre las ondas propias del fotoelectrón emitido y las retrodispersadas por los átomos vecinos al absorbente, aportando información sobre las distancias de enlace y el número de coordinación de dicho átomo [163]. Por lo tanto, el estudio combinado de las regiones XANES y EXAFS de las NPs de ferrita, permite la determinación del grado de inversión con gran precisión.

Las medidas se realizaron en los bordes *K* de absorción del Fe y Zn. Estos bordes de absorción son los de mayor energía y corresponden a la extracción de un electrón desde el nivel más profundo (nivel 1s). Para ello se utilizó un cristal de Si (111) como monocromador, fijando la intensidad del haz de rayos X al 70%. Los espectros fueron analizados mediante el programa Athena [164]. Los experimentos se realizaron en el modo de transmisión en la línea española SpLine BM25 A, del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) (Grenoble, Francia).





**Figura 3. 6.** Representación de las dos regiones del espectro de absorción de rayos X, XANES (verde) y EXAFS (morado).

### 3.3.7. Espectrometría óptica de emisión por plasma de acoplamiento inductivo

El análisis químico elemental de las muestras nos permite cuantificar el contenido de Zn y Fe en cada una de las muestras, siendo posible la determinación de la estequiometría de las NPs. Además, permite calcular un valor preciso de la concentración de las mismas cuando éstas se encuentran en forma de coloide.

Dicho análisis se llevó a cabo mediante espectrometría óptica de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES), que es una técnica espectroscópica cuantitativa con un límite de detección al nivel de trazas, para un gran número de elementos. Esta técnica básicamente consiste en transformar la muestra líquida en un aerosol que es ionizado en un plasma a altas temperaturas. Los átomos o iones en estado excitado, al volver a su estado original, emiten radiaciones de una longitud de onda característica para cada elemento. Se mide la intensidad de cada una de las radiaciones con un detector y se relaciona con la concentración de cada elemento en la muestra. Para los experimentos se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Optima 2100 DV, del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM) (CSIC).

Para la preparación de las muestras se digirió una pequeña cantidad de muestra en 1 mL de HCl (37%) durante media hora. Este proceso se realizó de la misma forma, independientemente de si la muestra se encuentra en forma de polvo o en suspensión coloidal, aunque en el último caso

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

se digiere un volumen conocido de muestra, de modo que es posible calcular la concentración de NPs en la disolución. Una vez digerido el material, la disolución se llevó a un volumen total de 10 mL de agua desionizada.

#### 3.3.8. Análisis termogravimétrico

La termogravimetría es una técnica que consiste en la medida de cambio de masa de un material en función de la temperatura y/o del tiempo, en una atmósfera controlada. Estos cambios de masa pueden ser debidos a diferentes procesos, como reacciones de oxidación o reducción, transiciones de fase o procesos de descomposición térmica, entre otros. En este caso, la degradación del material orgánico que recubre las NPs se produce dentro del rango de temperaturas medido en el experimento, de modo que, mediante esta técnica se cuantificó la cantidad de materia orgánica presente en la superficie de las NPs funcionalizadas.

Las medidas se realizaron partiendo de temperatura ambiente hasta 800 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en atmósfera de aire. El equipo utilizado para las medidas fue una termobalanza TGA Q500 (TA Instruments) ubicado en el SIdI de la UAM.

#### 3.4. Caracterización magnética

La caracterización magnética de los materiales se realizó mediante el estudio del comportamiento de la magnetización ( $M$ ) en función del campo magnético externo aplicado ( $H$ ). Para ello se registraron curvas de magnetización  $M(H)$  medidas a 5 y 290 K, aplicando campos magnéticos de hasta un 1 T. Mediante estas curvas se obtienen los valores de magnetización de saturación ( $M_s$ ), magnetización de remanencia ( $M_r$ ) y campo coercitivo ( $H_c$ ).

Además, se estudió el comportamiento de la susceptibilidad en función de la temperatura, registrando las curvas “Zero Field Cooling” (ZFC) y “Field Cooling” (FC). Para la obtención de la curva ZFC, la muestra se enfría hasta 5 K en ausencia de campo magnético externo. Posteriormente, se aplica un campo magnético (concretamente de 1000 Oe en las medidas de este trabajo) y se registra el valor de la magnetización en función de la temperatura, hasta los 400 K. A continuación, la muestra se enfría nuevamente hasta 5 K, pero en este caso en presencia del mismo campo magnético que ya estaba aplicado. De nuevo, se registra el valor de la magnetización en función de la temperatura, hasta los 400 K, obteniendo en este caso la curva FC. Este tipo de medidas aporta datos sobre la dispersión de tamaño de las NPs, la temperatura de bloqueo ( $T_B$ ) o la temperatura de orden magnético del material, entre otros.

Las medidas magnéticas se realizaron utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) MLVSM9 MagLab 9T (Oxford Instruments) del ICMM (CSIC, Madrid). Este equipo mide el momento magnético de la muestra al vibrar en presencia de un campo magnético estático, a partir del cual se puede determinar la magnetización y la susceptibilidad magnética.

También se empleó un dispositivo de interferencia cuántica de superconducción (SQUID) (Quantum Design MPMS XL) del Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza. El SQUID es un magnetómetro que mide el voltaje inducido por una variación de flujo magnético generado por la muestra en un sistema de bobinas captadoras.

En primer lugar, se realizó un estudio magnético de la serie de muestras  $\text{ZnFe}(X)\text{O}_4$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ) descrita en el apartado 3.1.1. *Efecto de la intensidad de corriente aplicada*. Las NPs de esta serie difieren entre ellas en tamaño y composición o estequiometría, por lo tanto, el análisis de las propiedades magnéticas se hizo en base a esas dos variables.

Posteriormente, se realizó la caracterización magnética de la serie  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  ( $x = 0.17, 0.24, 0.53, 0.67, 0.80, 0.93$ ) descrita en el apartado 3.1.4. *Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm*. Las NPs de esta serie cuentan todas con el mismo tamaño de cristal ( $\sim 12$  nm), de modo que, en este caso esa variable queda eliminada y se puede hacer un estudio más preciso de las propiedades magnéticas de las NPs teniendo como única variable su composición.

### 3.5. Caracterización coloidal

Con el fin de evaluar la efectividad y calidad de la funcionalización superficial de las NPs y su estabilidad coloidal, se realizaron medidas de potencial Zeta y tamaño hidrodinámico. Ambas medidas se realizaron en un equipo Zetasizer Nano del ICMM (CSIC, Madrid).

#### 3.5.1. Potencial Zeta

El potencial Zeta es el potencial eléctrico generado alrededor de la NP debido a la carga superficial de esta y la interacción con los iones de carga opuesta del medio en el que se encuentra. El valor de dicho potencial determinará la interacción entre las partículas en suspensión y, por lo tanto, la estabilidad coloidal de las mismas. Si el valor del potencial Zeta es lo suficientemente positivo o negativo, siendo aproximadamente  $\pm 30$  mV como regla general, las NPs se repelerán entre sí dando lugar a una dispersión estable [165]. Por el contrario, si el potencial eléctrico no es lo suficientemente elevado, las NPs tenderán a agregarse. En este caso, el valor del potencial Zeta depende directamente del pH del medio, definiéndose como punto

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

isoeléctrico el pH al cual la NP posee carga neutra y por lo tanto el sistema no es coloidalmente estable [166].

Las medidas se realizaron barriendo un rango de pH de 2 a 12, de suspensiones de NPs diluidas (< 0.5 mg/mL) en medio KNO<sub>3</sub> 0.01 M, ajustando el pH con HNO<sub>3</sub> y KOH. Para ello se utilizó un equipo Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, UK), ubicado en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC).

### 3.5.2. Tamaño hidrodinámico

Como se ha comentado en el apartado 3.5.1. *Potencial Zeta*, las NPs en suspensión interactúan dinámicamente con el disolvente en el que se encuentran dispersas, mediante fuerzas de atracción o repulsión de las diferentes especies presentes en el medio. Las NPs cargadas, por tanto, se mueven junto con su nube de contraiones y su esfera de solvatación y debido a esto, el tamaño aparente o diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) que presentarán será mayor que el determinado mediante otras técnicas, como por ejemplo el TEM.

La determinación del  $D_H$  de las NPs funcionalizadas superficialmente se llevó a cabo mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (en inglés "*Dynamic Light Scattering*", DLS). Esta técnica se basa en la medida de la luz dispersada en tiempos muy breves por las NPs en movimiento Browniano en suspensión. Las fluctuaciones de la intensidad de luz son inversamente proporcionales al coeficiente de difusión traslacional de las NPs. Las partículas pequeñas se mueven más rápidamente que las grandes y, por tanto, las fluctuaciones son de mayor frecuencia. Esta técnica mide las fluctuaciones en la intensidad de dispersión con el tiempo para determinar el coeficiente de difusión traslacional y posteriormente, el  $D_H$ . La temperatura y viscosidad del medio son factores determinantes en este tipo de medidas.

Las medidas se realizaron a partir de suspensiones acuosas diluidas de NPs (< 0.5 mg/mL) a pH 7 y temperatura ambiente, utilizando un equipo Zetasizer Nano S (Malvern Instruments, UK), ubicado en el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (CSIC).

## 3.6. Estudio de toxicidad

### 3.6.1. Toxicidad *in vitro*

Para los experimentos de toxicidad *in vitro* se trabajó con cultivos de diferentes líneas celulares: HeLa (carcinoma cérvico uterino humano), Raw 264.7 (macrófago de roedor), Hep G2 (carcinoma hepatocelular humano), Caco-2 (adenocarcinoma colorrectal humano), SKNAS

(neuroblastoma humano), MDCK (células de riñón canino Madin-Darby), CaLu-3 (carcinoma de pulmón humano), todas ellas proporcionadas por la American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Para su cultivo se empleó medio DMEM Glutamax (Dulbecco's modified Eagle medium), suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% v/v de aminoácidos no esenciales y un 2% v/v de penicilina/estreptomicina. Para el cultivo de la línea celular CaLu-3 se empleó medio DMEM F12 igualmente suplementado, al que además se le añadió un 1% v/v de L-glutamina. Los cultivos celulares se realizaron en una incubadora a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.6.1.1. Internalización de NPs

Para la visualización de la internalización celular de las NPs, se sembraron células HeLa sobre cubreobjetos y se incubaron con diferentes concentraciones de NPs durante 24 horas. Pasado este tiempo, se lavaron 3 veces con tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich) y se fijaron con etanol frío al 70% durante 5 minutos. Posteriormente, las células se tiñeron con azul de metileno (Sigma-Aldrich) y se secaron al aire. Los cubreobjetos se montaron en portamuestras con DePeX (Serva) para su posterior visualización en el microscopio de campo claro.

### 3.6.1.2. Ensayos MTT

La citotoxicidad de las líneas celulares nombradas en el apartado 3.6.1. se determinó mediante ensayos colorimétricos MTT (Sigma-Aldrich). Este ensayo es un indicativo de la actividad metabólica celular tras su incubación con las NPs. Consiste en la reducción de la molécula bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), que da nombre al ensayo, por parte de deshidrogenasas y otros agentes reductores presentes en células metabólicamente activas, dando lugar a cristales de formazán de color morado e insolubles en agua. La cantidad de formazán generada es proporcional a la cantidad de células vivas en el medio [167].

Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos, sembrando aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 200  $\mu$ L/pocillo. Una vez que estas alcanzaron un 70-80% de confluencia se incubaron durante 24 h con diluciones seriadas de NPs, en un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/mL, a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se eliminó el medio con las NPs, las células se lavaron tres veces con PBS y se añadió una disolución de 50  $\mu$ g/mL de MTT (200  $\mu$ L/pocillo), dejándolo reaccionar durante 2 horas a 37 °C. A continuación, se eliminó la disolución de MTT, y posteriormente se añadió 200  $\mu$ L/pocillo de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán formados y 25  $\mu$ L/pocillo de buffer Sorensen (pH = 7.4, Merck). La absorbancia de cada pocillo se midió a  $\lambda = 550$  nm en un lector de placas Multiskan FC

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

(Thermo Scientific). La supervivencia celular se expresó como el porcentaje de absorbancia de las células tratadas en comparación con la de las células control, sin incubar con NPs. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

#### 3.6.1.3. Ensayo de Griess

Uno de los métodos más comunes para la detección de óxido nitroso (NO) a partir de una amplia variedad de matrices es la reacción de diazotación o ensayo de Griess [168]. Se trata de un método colorimétrico para la detección indirecta de NO a partir de ácido nítrico (NO<sup>2</sup>), un subproducto originado debido a la alta reactividad del NO en presencia de oxígeno, motivo por el cual éste método no es adecuado para la detección de NO en tiempo real [169].

El objetivo del empleo de este método es la detección de NO a consecuencia de la activación de los macrófagos [170]. Este hecho se relaciona directamente con la activación de la respuesta inmune a consecuencia de la exposición de las células a las NPs.

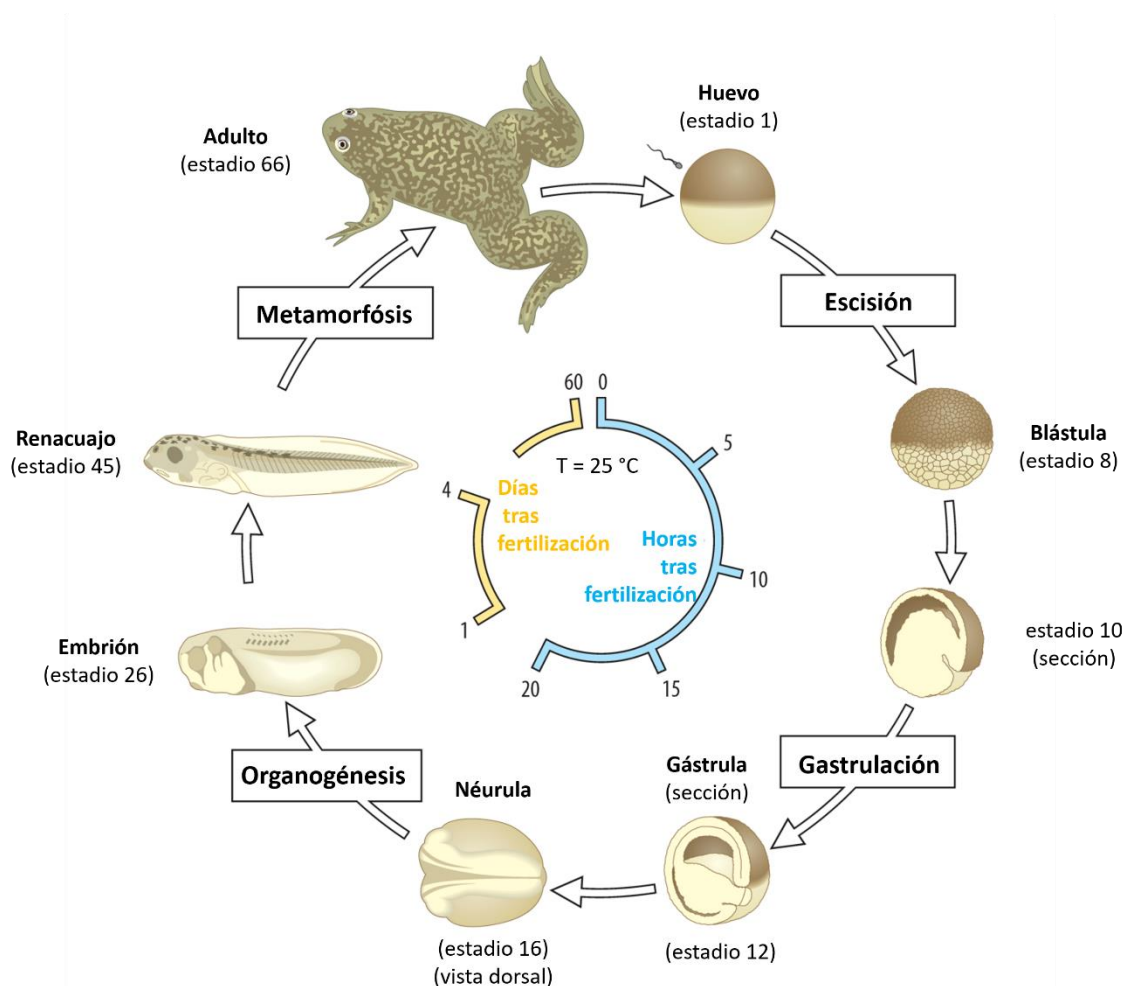
Los experimentos se realizaron sobre la línea celular Raw 264.7, en placas de 96 pocillos, sembrando aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo en un volumen de 200  $\mu$ L/pocillo. Tras alcanzar un 70-80 % de confluencia se incubaron durante 24 h con diluciones seriadas de NPs, utilizando medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Thermo Fisher Scientific) sin rojo fenol, suplementado con un 10% v/v de suero fetal bovino (FBS). Pasado este tiempo, el sobrenadante de cada pocillo se traspasó a otra placa y se incubó durante 15 minutos en oscuridad con 50  $\mu$ L de sulfanilamida (Sigma-Aldrich) (1% en 0.1 M de HCl). Posteriormente, se añadieron 50  $\mu$ L de dihidrocloruro de *N*-1-naftiletilendiamina (Merck) (0.1% en 0.1 M de HCl) a cada pocillo y se incubó de nuevo durante 15 minutos en oscuridad. A continuación, se midió la absorbancia de cada pocillo a  $\lambda = 550$  nm. La equivalencia entre absorbancia y concentración de NO en el medio se calculó a partir de una recta patrón de NaNO<sub>2</sub> preparada previamente.

#### 3.6.2. Toxicidad *in vivo*

Todos los experimentos de toxicidad *in vivo* se llevaron a cabo en la Universidad de East Anglia (UEA), Norwich (UK), por lo que su realización se llevó a cabo de acuerdo a las leyes y directrices de esta Universidad. La investigación se aprobó por el comité local de revisión ética de acuerdo a las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido.

Los estudios de toxicidad *in vivo* se realizaron utilizando el modelo animal *Xenopus laevis* [171]. El empleo de este modelo presenta ciertas ventajas con respecto a otros modelos animales. En primer lugar, los embriones se desarrollan externamente, permitiendo realizar los experimentos

antes o después de la fertilización de los huevos. El crecimiento y desarrollo de los embriones es muy rápido, del orden de días, lo que permite llevar a cabo experimentos en un breve espacio de tiempo (**Figura 3. 7**). Además, los renacuajos en el estadio 38 cuentan con un conjunto de órganos completamente funcional, siendo posible determinar los efectos de los experimentos realizados [97].



**Figura 3. 7.** Ciclo de vida del modelo animal *Xenopus laevis*. Modificado de referencia [174].

Es posible obtener resultados contradictorios *in vitro* e *in vivo*, dada la gran cantidad de procesos biológicos que se dan en el organismo, imposibles de reproducir *in vitro*. El modelo animal *Xenopus laevis* ha sido propuesto recientemente como una potencial herramienta capaz de cerrar la brecha entre los ensayos basados en células *in vitro* y los modelos de evaluación de la toxicidad en mamíferos [172]. El uso de este modelo animal en combinación con pruebas *in vitro* en líneas celulares de mamíferos constituye una herramienta eficaz, rápida y económica de evaluar la nanotoxicidad antes de realizar pruebas en mamíferos *in vivo*.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Para los ensayos de toxicidad *in vivo* se utilizaron embriones del modelo animal *Xenopus laevis* en el estadio 38, según la tabla de desarrollo de Nieuwkoop y Faber [173]. Los protocolos para la obtención de los embriones y demás experimentos llevados a cabo, se describen a continuación.

#### 3.6.2.1. Obtención de embriones

Para la obtención de embriones, hembras adultas de *Xenopus Laevis* se trataron hormonalmente, inyectándoles 100 unidades de PMSG (gonadotropina sérica de yegua preñada) en el saco pericárdico, en un periodo de 5 a 10 días previo a la puesta de huevos. Durante ese periodo, los animales se mantuvieron aislados, a temperatura ambiente y sin ser alimentados. De 12 a 18 horas antes a la puesta de huevos, las hembras fueron inducidas inyectando 250 unidades de Chorulon® de nuevo en el saco pericárdico, manteniéndolas a una temperatura de 18 °C durante la noche. Posteriormente, los huevos se recolectaron ejerciendo una ligera presión en el abdomen de las ranas, depositándolos en una placa Petri de 25 mL, y repitiendo este proceso cada hora, en un periodo de 6 horas.

Paralelamente y previo a la recolección de los huevos, se sacrificó un macho adulto, sumergiéndolo en 1 g de metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo al 1.6% (Sigma-Aldrich) en 300 mL de agua desionizada, en un vaso de precipitados de 500 mL. El vaso cerrado, se mantuvo en la oscuridad y a una temperatura de 4 °C durante una hora. Una vez que el macho hubo muerto, se le extirparon los testículos, conservándolos en una disolución de FBS al 80% en 1 x MMR (Marc's Modified Ringer's) (100 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, pH 7.5) a una temperatura de 4 °C.

Una vez recogidos los huevos y colocados en una placa Petri de 25 mL, se disolvió una porción de testículo en 1 mL de 1 x MMR y se distribuyó sobre los huevos, incubándolos durante 5 minutos, a 18 °C. Posteriormente, se sumergieron en 0.1 x MMR durante 20 minutos a 18 °C, favoreciendo la fertilización. La capa de gelatina que recubre los huevos de *Xenopus laevis* se elimina tras la fertilización. Para ello el medio 0.1 x MMR se reemplazó por L-cisteína al 2% y pH 8, durante aproximadamente 7 minutos y, por último, se lavaron en 1 x MMR y 0.1 x MMR. Finalmente, los embriones se incubaron a 23 °C durante aproximadamente 3 días, hasta alcanzar el estadio 38.

#### 3.6.2.2. Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos de exposición de los embriones a las NPs a diferentes tiempos de incubación. Para el primer experimento, se expusieron grupos de 20 embriones a



concentraciones de NPs de entre 0.5 a 2 mg/mL (disolución 0.1 x MMR), dejando un grupo de ellos sin tratar para su empleo como control. Los embriones se incubaron durante 72 horas a 23 °C hasta alcanzar el estadio 45. Para el segundo experimento, grupos de 20 embriones se expusieron a las mismas concentraciones de NPs, incubándolos a 18 °C para retrasar su desarrollo hasta el estadio 45 y de esta manera poder realizar un estudio comparativo a mayores tiempos de exposición a las NPs, concretamente a 120 horas. Se realizaron conteos de embriones muertos cada 24 horas. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

### 3.6.2.3. Análisis histológico

Una vez pasados los tiempos de incubación de los embriones con las NPs detallados en el apartado 3.6.2.2. *Diseño experimental.*, y que por lo tanto éstos hubieron alcanzado el estadio 45, se fijaron en MEMFA (formaldehído al 3.7%, 1 x sales MEM) durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con PBST (PBS, Tween al 0.1%), se deshidrataron y se conservaron en etanol 100%.

Se determinaron los diferentes fenotipos presentes para cada condición experimental, tras la observación de los embriones supervivientes bajo el microscopio. Las imágenes se capturaron con una cámara Q Imaging 01-MP3.3-RTV-CLR-10, montada en un microscopio Zeiss Stemi 5V6 y se procesaron posteriormente mediante el programa Inkscape [175].

Además, una selección de embriones se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Para ello, los embriones se embebieron en cera lavándolos sucesivamente con HistoClear, 1:1 HistoClear:cera y finalmente cera. Por último, se cortaron secciones de 10 µm y se montaron en portaobjetos.

### 3.6.2.4. Susceptibilidad magnética con campo alterno

Con el objetivo de evaluar la acumulación de NPs en el organismo de los embriones tras los experimentos, se realizaron medidas de susceptibilidad magnética bajo un campo alterno (CA) de baja intensidad. Se utiliza una notación compleja para describir dicha susceptibilidad magnética, definida por la Ecuación 3.7 [176]:

$$\chi_{CA} = \chi' - i\chi'' \quad (\text{Ec. 3.7})$$

donde  $\chi'$  y  $\chi''$  son los componentes en fase o real, y fuera de fase o imaginaria de la susceptibilidad, respectivamente.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Este tipo de medidas tienen una alta sensibilidad, tres órdenes de magnitud por encima de las medidas descritas en el apartado 3.4. *Caracterización magnética.*, y son capaces de diferenciar entre la contribución magnética proveniente de las NPs y la endógena propia del organismo por parte de especies portadoras de hierro [176]. Estas especies, por lo general, se encuentran en mayor concentración, pero la señal magnética generada es más débil que la correspondiente a las NPs. La presencia de las NPs se identifica por la aparición de un máximo en la medida de susceptibilidad magnética en fase ( $\chi'$ ), junto con la presencia de otro máximo a temperaturas algo más bajas, en la medida susceptibilidad magnética fuera de fase ( $\chi''$ ). La temperatura a la que aparecen los máximos dependerá de las características de las NPs, del material del cual están compuestas, su tamaño, grado de agregación, etc. A su vez, la altura de dicho máximo o intensidad de la señal, es dependiente de la concentración de las NPs [97].

Para ello, se seleccionó un grupo de embriones supervivientes de cada condición experimental, se liofilizaron y se colocaron en cápsulas de gelatina para su caracterización magnética. Las medidas se realizaron en un SQUID (Quantum Design MPMS XL) en la opción de susceptibilidad de CA, con una amplitud del campo alterno de 0.41 Oe y una frecuencia de 11 Hz, en un rango de temperatura de 1.8 y 300 K. El equipo se encuentra en la Universidad de Zaragoza.

#### 3.6.2.5. Contenido de Fe y Zn

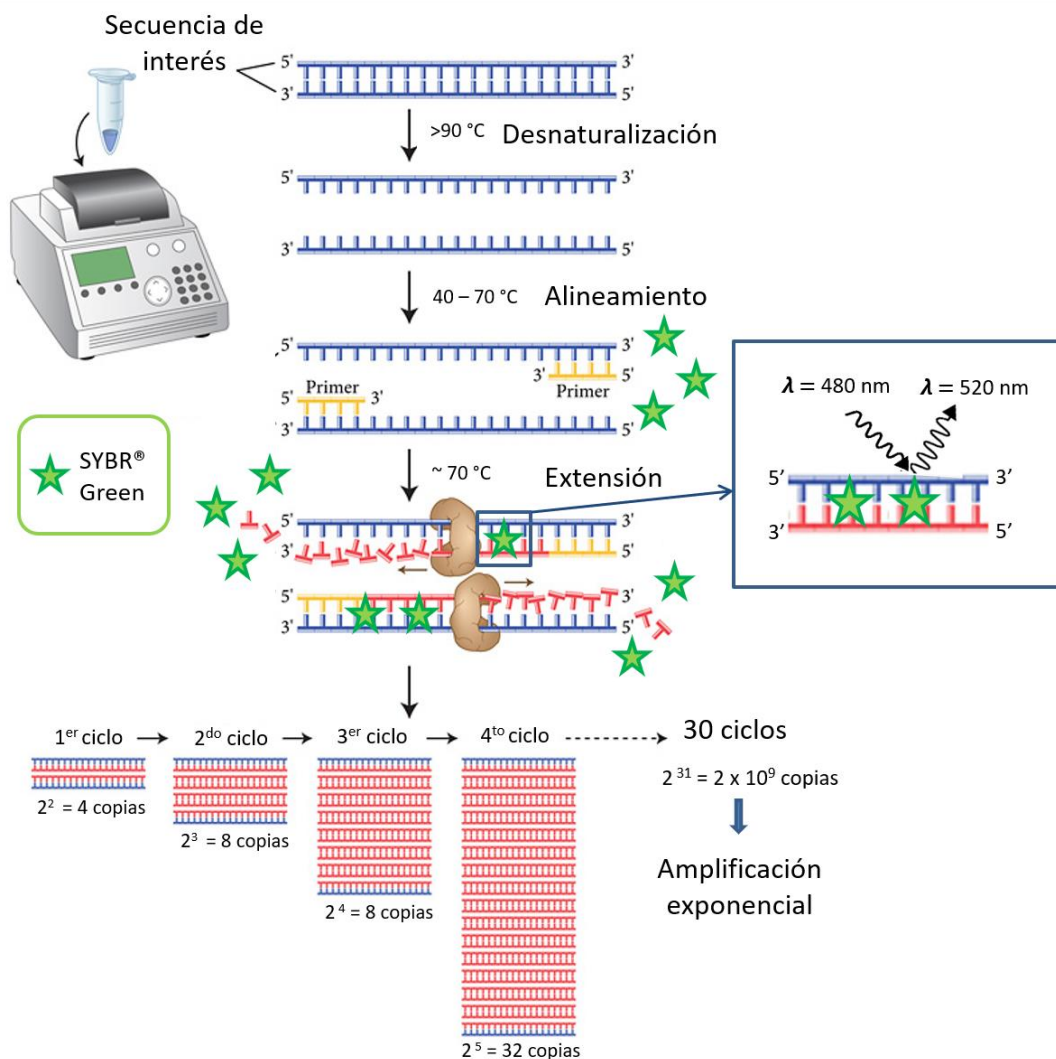
Complementariamente a las medidas de susceptibilidad magnética descritas en el apartado 3.6.2.4, la cantidad de hierro y zinc presente en el organismo de los embriones tras la exposición a las NPs se cuantificó mediante la técnica ICP-OES, descrita previamente. Las medidas se realizaron utilizando las mismas muestras empleadas en el apartado anterior, es decir, grupos seleccionados de embriones supervivientes de cada condición experimental.

#### 3.6.2.6. PCR cuantitativa

La técnica de PCR cuantitativa (en inglés "*Quantitative Polymerase Chain Reaction*", q-PCR) o PCR en tiempo real, es una variante de la típica reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que tiene como objetivo amplificar y cuantificar simultáneamente secuencias definidas de ácido desoxirribonucleico (DNA).

Los principios en los que se basa la técnica son los mismos que en la típica PCR, perfeccionada por Kary Mullis et al. en la década de los 80 [177]. Básicamente, la amplificación de DNA implica el empleo de dos oligonucleótidos cebadores o "*primers*", denominado amplicón, de secuencia complementaria a los extremos 5'-3' del segmento de DNA de interés. Para que la hibridación

entre los *primers* y el DNA y su amplificación sea posible, se realizan cambios sucesivos de temperatura, denominados ciclos. Cada ciclo consta de tres etapas: la desnaturalización del DNA mediante el aumento de temperatura ( $> 90\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), la hibridación de los *primers* a los extremos 5'-3' de las hebras de DNA a temperaturas de entre  $40$  y  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , seguido de la elongación del DNA a partir de los *primers* por acción de una enzima DNA polimerasa termoestable, a una temperatura óptima de  $\sim 70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (**Figura 3. 8**). Como peculiaridad, la q-PCR permite la monitorización y cuantificación de la amplificación, mediante el empleo de fluoróforos que se intercalan en el DNA de doble hélice generado en cada ciclo, siendo la señal de fluorescencia emitida proporcional a la cuantificación de DNA obtenida [178] [179].



**Figura 3. 8.** Esquema de reacción de la PCR cuantitativa. Modificado de referencia [180].

Mediante esta técnica se cuantificó la expresión génica de genes implicados en el metabolismo del hierro y del zinc, cuya expresión hubiera podido verse afectada tras la exposición de los embriones a las NPs de ferrita de zinc (**Tabla 3. 3**).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño de los *primers* se llevó a cabo utilizando el software Primer3Plus [181], a partir de las secuencias de mRNA de los genes de interés, obtenidas de la base de datos *Xenbase* [182]. El diseño se realiza teniendo en cuenta varios factores: que los *primers* anclen en las versiones S y L del gen (ya que el modelo *Xenopus laevis* es alotetraploide), que el amplicón cuente con 50-150 pb, que la  $T_m$  de los *primers* sea de 59-61 °C y por último que el porcentaje de Guanina y Citosina sea de un 40-60%.

Concretamente, los genes estudiados implicados en el metabolismo del hierro fueron los siguientes: *dmt1*, *fth1* y *tf*. El gen *dmt1* es codificador del transportador de metales divalentes-1, principalmente de cationes  $Fe^{2+}$ , localizado en la membrana apical de los enterocitos, cuya función consiste en el transporte de cationes divalentes desde el lumen intestinal al interior celular [183]. El gen *fth1* es codificador de la subunidad pesada de ferritina, la proteína principal de almacenamiento de Fe en procariontes y eucariotes [184]. Por último, el gen *tf* es codificador de la proteína transferrina, glicoproteína transportadora de  $Fe^{3+}$  en plasma [184].

**Tabla 3. 3.** Secuencias 5'-3' de los primers diseñados para el estudio mediante RT-qPCR de la expresión génica en *Xenopus laevis*. Los genes sombreados en azul corresponden a los implicados en el metabolismo del Fe, los sombreados en verde a los implicados en el metabolismo del Zn y el sombreado en naranja es el gen normalizador empleado.

Gen	Primers (Secuencia 5' – 3')	
	Directo	Inverso
<i>dmt1</i>	cagaggatgaaacgcactca	atcctgccactgatccagac
<i>fth1</i>	tggagtaacaccctggaagc	aggatcaaccttgctcgatg
<i>tf</i>	agaaagggcaagtgggtttt	tctggcaaagtgacaacagc
<i>znt1</i>	cagaaagagcggccatagac	atgcgagttgccgtaattct
<i>mt4</i>	aaagctgctgttctgctgt	tgcttccctttcacagtgg
<i>hspa9</i>	tggagggaaaacaagcaaag	gtagtgaccgcctgtcgtt
<i>gadph</i>	ctttgatgctgatgctggaa	gaagaggggttgacaggtga

Los genes analizados implicados en el metabolismo del zinc fueron el gen *znt1*, el *mt4* y el *hspa9*. El gen *znt1* es codificador del transportador de membrana de zinc ZnT1, perteneciente a la familia de transportadores ZnT, responsable de la disminución de la concentración de zinc en el interior celular mediante su salida desde el citoplasma al exterior celular o mediante su captación por parte de vesículas intracelulares [185]. Concretamente, el ZnT1 es el único

transportador de su familia localizado en la membrana plasmática, de acuerdo a su función como principal regulador de la salida de zinc en la célula [186]. También se analizó la expresión del gen *mt4*, perteneciente a la familia de las metalotieninas, que son proteínas de bajo peso molecular ricas en cisteína, implicadas en la regulación de la homeóstasis del zinc en el citoplasma celular [93]. Por último, se analizó la expresión del gen *hspa9*, codificador de la proteína de choque térmico mitocondrial Hspa9. Se trata de una proteína de 70 kDa involucrada en procesos celulares encargados de regular la proliferación celular, tumorigénesis o procesos derivados de situaciones de estrés celular [187].

Para la cuantificación de la amplificación de material genético se empleó el fluoróforo de unión inespecífica SYBR® Green, realizando una cuantificación relativa de la expresión génica mediante el empleo de un gen normalizador, comúnmente denominado “*Housekeeping*”, de expresión constitutiva y constante en todos los tejidos del organismo [188]. Concretamente, el gen utilizado fue el codificador de la proteína *gadphh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) [189].

En primer lugar, se realizó la extracción de ácido ribonucleico (RNA) de los embriones necesario para la síntesis del DNA complementario (cDNA), a partir del cual se realizó la amplificación y cuantificación génica [188]. Para ello, los embriones se congelaron con ayuda de nitrógeno líquido, manteniéndolos a una temperatura de -80 °C hasta el momento de la extracción del material genético. Dicha extracción se realizó mediante el empleo del kit “High Pure RNA Isolation” (Roche). La concentración de RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoFisher). La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA y mediante el empleo del kit “Maxima First Strand cDNA” (ThermoFisher). Ambos kits se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los sucesivos ciclos de temperatura se llevaron a cabo utilizando un termociclador modelo 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher). Para la mezcla de reacción de la PCR cuantitativa se emplearon 2 µL de cDNA, 1 µL de diluciones 2.5 µM de cada primer, directo e inverso, 5 µL de SYBR® Green y 2 µL de agua desionizada. La reacción transcurrió a una temperatura de 50 °C durante 2 minutos, a 95 °C durante 10 minutos y 40 ciclos sucesivos de 15 segundos a 95 °C, seguidos de 1 minuto a 60 °C.

### 3.7. Aplicaciones biomédicas

Una vez realizado el estudio toxicológico de las NPs de ferrita de zinc, se evaluó su posible empleo en biomedicina, concretamente en tratamientos térmicos combinados contra el cáncer: hipertermia magnética y de terapia fototérmica.

#### 3.7.1. Hipertermia magnética

Se realizaron medidas de hipertermia magnética con el objetivo de determinar la tasa de absorción específica (en inglés “*Specific Absorption Rate*”, SAR), que se define como la potencia absorbida por las partículas por unidad de masa (W/g). Para su cálculo se aplicó la Ecuación 3. 8 [191]:

$$SAR = \frac{\sum_i C_{pi} m_i}{m_{NPs}} \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{W}{g} \quad (\text{Ec. 3. 8})$$

donde  $C_{pi}$  y  $m_i$  son la capacidad calorífica específica y masa de cada componente, respectivamente,  $m_{NPs}$  la masa de las NPs,  $\Delta T$  el incremento de temperatura y  $\Delta t$  el tiempo de medida. El parámetro  $\Delta T/\Delta t$  se obtiene de la pendiente del ajuste lineal de los datos experimentales en los primeros 30 s de medida.

Las medidas se realizaron en un equipo Magnetherm 1.5 (Nanotherics), situado en el Instituto de Magnetismo Aplicado (IMA) (UCM, Madrid). El equipo para ensayos de hipertermia magnética permite evaluar la capacidad de calentamiento en un amplio intervalo de frecuencias a diferentes amplitudes de campo. Para el estudio se utilizó la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  descrita en el apartado 3.2.2. *Anclaje de moléculas biocompatibles*. Los experimentos se realizaron tomando 1 mL de la suspensión coloidal a diferentes concentraciones (15, 10 y 5 mg/mL), frecuencias de trabajo (111.7, 468 y 331 KHz) y amplitudes de campo magnético (232, 127 y 80 Oe). La temperatura de las muestras se registró durante 300 s a partir de la aplicación del campo magnético.

Con el fin de determinar el mecanismo de calentamiento de las NPs, descritos en la introducción, se realizaron experimentos utilizando agar-agar al 10% como disolvente, que presenta una alta viscosidad comparado con el agua [191].

#### 3.7.2. Terapia fototérmica

El estudio de la respuesta de calentamiento fototérmico de las NPs de ferrita de zinc, al ser irradiadas con un láser en el infrarrojo cercano (NIR), se llevó a cabo en función de dos variables: la composición de las NPs y la densidad de potencia del láser aplicada.

Para ello, se prepararon suspensiones coloidales acuosas de 0.25 mg/mL de NPs de tres muestras de NPs de diferente composición, funcionalizadas superficialmente con ácido cítrico. Concretamente el estudio se realizó con las NPs de composición  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Cit$  ( $x = 0.17, 0.53, 0.80$ ), con un bajo, medio y alto contenido de zinc en la estructura cristalina, respectivamente. Cada suspensión coloidal se irradió con un láser de 800 nm, con densidades de potencia de 0.6, 0.8, 1.1 and 1.4 W/cm. Las medidas se realizaron registrando las variaciones de temperatura de las disoluciones durante 10 minutos de irradiación con el láser y otros 10 minutos sin irradiación, utilizando una cámara térmica FLIR E40. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software FLIR Tool+ [192].

Además, se obtuvieron los espectros de extinción óptica de disoluciones coloidales de NPs en un rango de longitudes de onda desde el inicio del espectro visible (400 nm) hasta el infrarrojo cercano (1200 nm) mediante espectrometría Visible-Infrarroja. El número total de fotones que interaccionan con las NPs está determinado por el coeficiente de extinción, que equivale a la suma de los coeficientes de absorción y dispersión. Para su obtención, la disolución coloidal se irradia con un haz de luz de longitud de onda determinada y se registra la cantidad de luz que ha logrado traspasar la muestra. Finalmente, esta se compara con una muestra de referencia que contiene únicamente el medio de dispersión del coloide. Los espectros de extinción de las disoluciones coloidales de NPs se realizaron en un espectrómetro Perkin Elmer Precisely Lambda 35.

Por último, se calculó la eficiencia de conversión fototérmica ( $\eta$ ) para cada composición de NPs, de acuerdo a la Ecuación 3. 9 [193]:

$$\eta = \frac{hA (T_{max} - T_o) - Q_o}{I (1 - 10^{-OD})} \quad (\text{Ec. 3. 9})$$

donde  $h$  es el coeficiente de transferencia de calor del agua,  $A$  es el área del porta muestras,  $T_{max}$  es la temperatura máxima alcanzada tras la irradiación de la muestra con el láser,  $T_o$  es la temperatura ambiente,  $Q_o$  es la energía disipada por parte del disolvente,  $I$  es la potencia del láser incidente (5.5, 6, 6.5 y 7 A) y  $OD$  es la densidad óptica de la muestra a  $\lambda = 800$  nm determinada a partir de los espectros de extinción. El valor de  $hA$  se deduce de la Ecuación 3. 10 [193]:

$$\tau_s = \frac{m_s - C_s}{hA} \quad (\text{Ec. 3. 10})$$

Donde  $\tau_s$  es la constante de tiempo de cada sistema,  $m_s$  es la masa de la muestra y  $C_s$  la capacidad calorífica del agua utilizada como disolvente (4.185 J/gK).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

Con el fin de determinar el efecto que tiene la composición química sobre las propiedades ópticas de las NPs, se llevaron a cabo experimentos de microscopía de campo oscuro. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio equipado con un campo oscuro condensado (NA 0.8) y un objetivo 50x, con una apertura numérica de 0.65. Para la preparación de la muestra se depositó una gota de solución coloidal de NPs en el cubreobjetos del microscopio y se dejó evaporar por completo. La dependencia de la composición en la eficacia de dispersión de las NP en el rango visible se calculó cuantitativamente, determinando la intensidad de luz dispersa promediada por NP individual.

Las medidas se realizaron en el Departamento de Física de Materiales de la UAM (Madrid).



---

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Síntesis electroquímica y caracterización estructural de NPs de ferrita de zinc

Uno de los objetivos marcados de este trabajo es la optimización de la síntesis de NPs de ferrita de zinc mediante el método electroquímico. Para ello, se sintetizó una serie de NPs estudiando el efecto de dos parámetros de reacción variables en las características del material obtenido: la intensidad de corriente aplicada a la celda electroquímica y la temperatura de reacción.

#### 4.1.1. Efecto de la intensidad de corriente aplicada

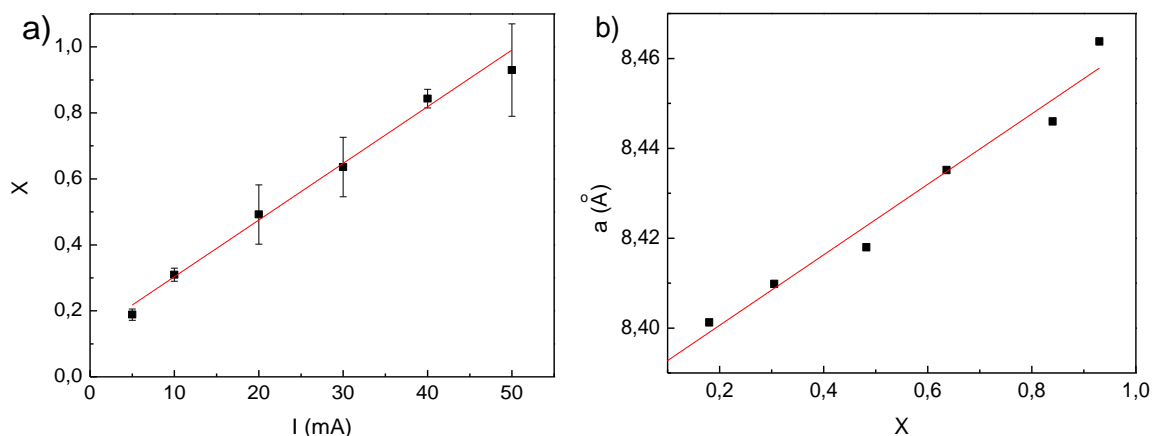
Como se comentó previamente en el apartado 3.1.1. *Efecto de la intensidad de corriente aplicada.*, la cantidad de cationes de Fe y Zn liberada al medio de reacción depende de la intensidad de corriente aplicada a la celda. Mediante la variación de la relación de intensidades aplicadas a los ánodos de Fe y Zn, es posible controlar la cantidad de estos cationes en el medio y por tanto, la obtención de NPs de diferente composición química. Por consiguiente, en primer lugar, se llevó a cabo el estudio del efecto de la intensidad de corriente aplicada a la celda electroquímica. Para ello, se sintetizó una serie de NPs de ferrita de zinc fijando la intensidad de corriente aplicada al ánodo de Fe en 100 mA, variando la intensidad de corriente aplicada al ánodo de Zn de 5 a 50 mA, a una temperatura de reacción de 25 °C. Mediante el análisis químico elemental de las muestras, obtenido por ICP-OES, se determinó la estequiometría de cada ferrita de zinc obtenida (**Tabla 4. 1**).

**Tabla 4. 1.** Intensidades de corriente aplicadas (*I*) a los ánodos de Fe y Zn, composición de las ferritas calculada mediante ICP-OES y valores de parámetro de red (*a*) y tamaño de cristal (*D*) obtenidos mediante el refinamiento de los difractogramas de rayos X de la serie de muestras ZnFe(*X*)(25°C) (*X* = 5, 10, 20, 30, 40, 50).

Muestra	<i>I</i> (Fe) (mA)	<i>I</i> (Zn) (mA)	Zn <sub><i>x</i></sub> Fe <sub>(3-<i>x</i>)</sub> O <sub>4</sub>	<i>a</i> (Å)	<i>D</i> (nm)
ZnFe(5)25°C	100	5	Zn <sub>0.18</sub> Fe <sub>2.82</sub> O <sub>4</sub>	8.401 (1)	18.7 (1)
ZnFe(10)25°C	100	10	Zn <sub>0.30</sub> Fe <sub>2.70</sub> O <sub>4</sub>	8.409 (1)	11.8 (1)
ZnFe(20)25°C	100	20	Zn <sub>0.50</sub> Fe <sub>2.50</sub> O <sub>4</sub>	8.418 (1)	8.4 (1)
ZnFe(30)25°C	100	30	Zn <sub>0.64</sub> Fe <sub>2.36</sub> O <sub>4</sub>	8.435 (1)	9.2 (1)
ZnFe(40)25°C	100	40	Zn <sub>0.84</sub> Fe <sub>2.16</sub> O <sub>4</sub>	8.445 (1)	5.9 (1)
ZnFe(50)25°C	100	50	Zn <sub>0.93</sub> Fe <sub>2.07</sub> O <sub>4</sub>	8.463 (2)	5.2 (1)

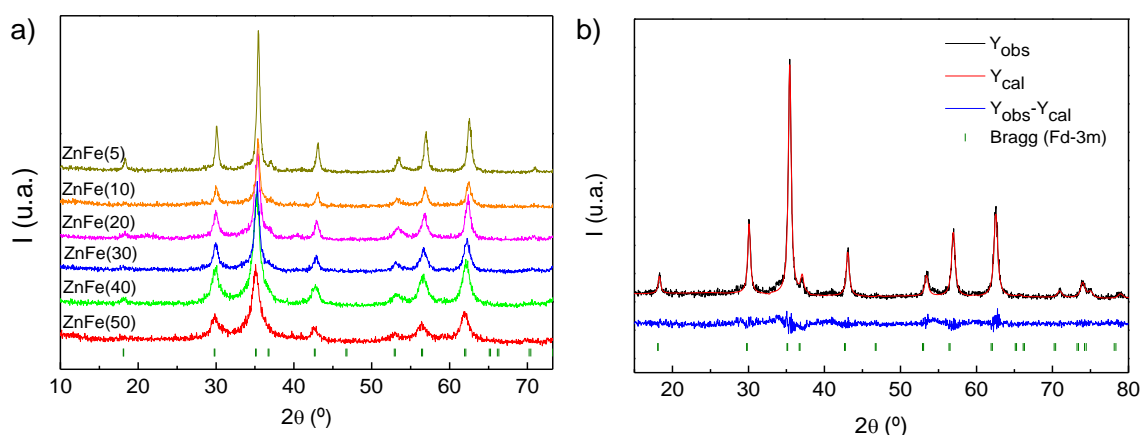
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran una dependencia lineal entre la intensidad de corriente aplicada al ánodo de Zn y la cantidad del elemento incorporada el material, tal y como se aprecia en la **Figura 4. 1a**, indicando la posibilidad de controlar la composición química de las NPs simplemente variando la intensidad de corriente aplicada a la celda electroquímica.



**Figura 4. 1.** a) Representación de la dependencia entre la cantidad de Zn<sup>2+</sup> incorporada en la ferrita (X) con la intensidad de corriente aplicada (I) al ánodo de Zn y b) con el valor del parámetro de red (a), en la fórmula general Zn<sub>x</sub>Fe<sub>(3-x)</sub>O<sub>4</sub> (0 < x < 1).

Los resultados de DRX revelan la presencia de una única fase cristalina en todas las composiciones sintetizadas, cuyos máximos de difracción pueden ser indexados de acuerdo a la estructura tipo espinela de la magnetita (JCPDS No. 19-0629) y de la ferrita de zinc (JCPDS No. 22-1012) y grupo espacial *Fd-3m*: 227 (**Figura 4. 2**).



**Figura 4. 2.** a) Patrones de difracción de rayos X de la serie de muestras ZnFe(X)(25°C) (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50). Posiciones de Bragg (I) correspondientes a las estructura *Fd-3m*. b) Refinamiento del difractograma de la muestra ZnFe(5)25°C.  $R_{Bragg} = 7.51$ ,  $R_f = 5.4$ .

Además, con el refinamiento de los difractogramas de rayos X se obtuvieron los valores de los parámetros de red y del tamaño de cristal de la serie de muestras. Los resultados se muestran en la **Tabla 4. 1** y en la **Figura 4. 1b**, pudiéndose observar un aumento lineal de los valores de los parámetros de red a medida que aumenta el contenido de Zn en la muestra, de acuerdo con la ley de Vegard [194]. Este aumento del parámetro de red puede explicarse si se considera que el Zn está formando parte de la red. El catión  $Zn^{2+}$  es de mayor radio iónico que los cationes  $Fe^{3+}$ , tanto si se encuentra en posiciones tetraédricas ( $Zn^{2+} = 0.6 \text{ \AA}$ ,  $Fe^{3+} = 0.49 \text{ \AA}$ ), como en octaédricas ( $Zn^{2+} = 0.74 \text{ \AA}$ ,  $Fe^{3+} = 0.55 \text{ \AA}$ ) [195] [196] [197], lo que explica el aumento del parámetro de red.

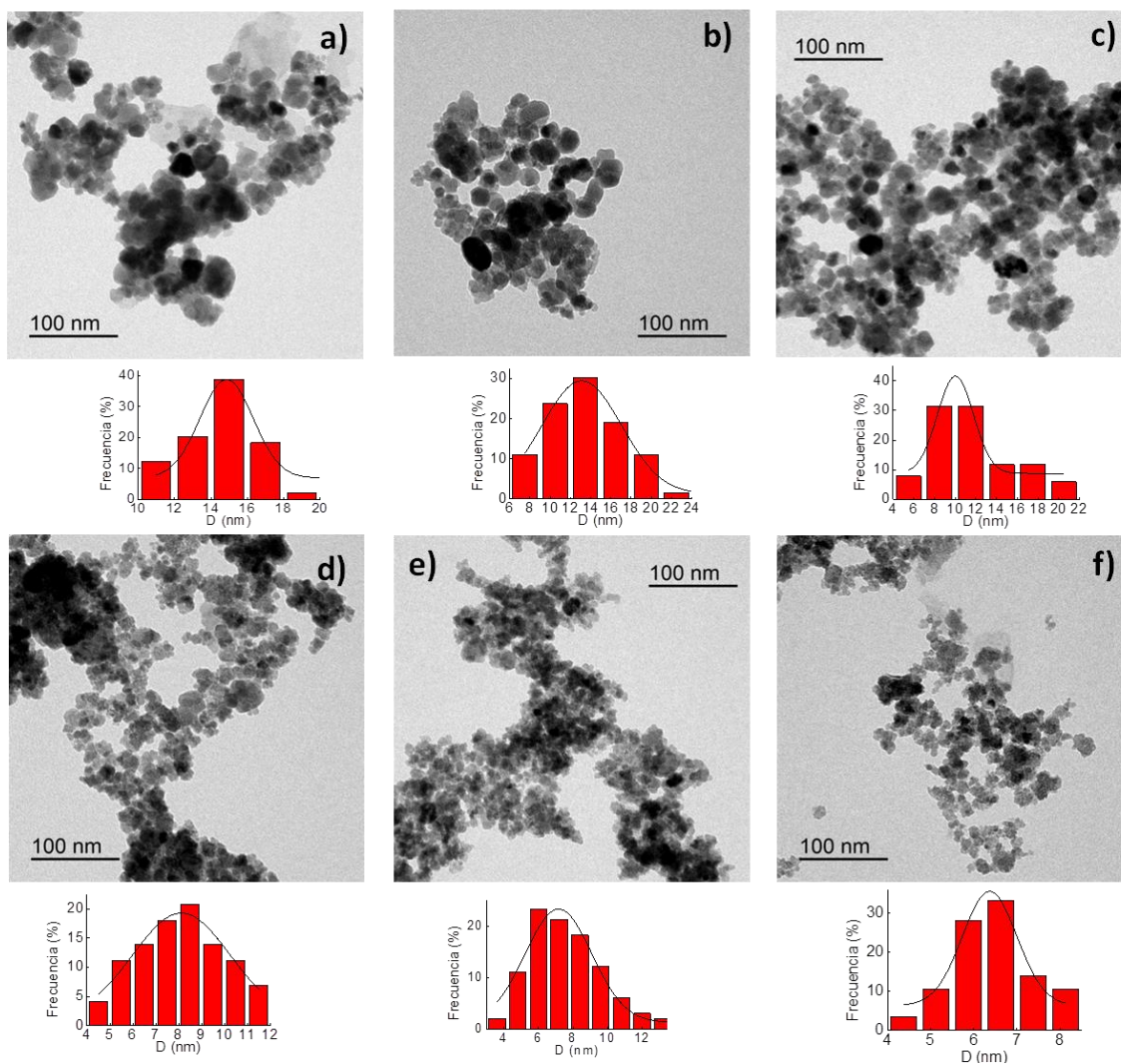
En la **Figura 4. 3** pueden verse las micrografías TEM obtenidas para la serie de muestras  $ZnFe(X)_{25}C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), con la distribución de tamaño de partícula correspondiente debajo de cada imagen. Se observa que las NPs poseen geometría cuasiesférica y una dispersión de tamaños relativamente estrecha para cada una de las composiciones preparadas. Además, se observa como tendencia general, una disminución de tamaño a medida que aumenta contenido de Zn en la estructura cristalina, pasando de aproximadamente 15 nm para  $X = 5$  a 6.5 nm para  $X = 50$ . Este efecto ha sido descrito previamente en ferritas de zinc [195] [55] [198] [48] y otros tipos de ferritas mixtas en las cuales el zinc es uno de los componentes [24] [199] [200]. Aunque no existe aún una explicación corroborada al respecto, algunas investigaciones apuntan a que esta disminución de tamaño con el contenido de zinc se debe a una posible influencia de su distribución en las redes tetraédrica u octaédrica en los procesos de nucleación [200]. Otros trabajos, sin embargo, lo atribuyen a factores termodinámicos en lugar de cinéticos[11].

Por otro lado, se observa en todos los casos una concordancia entre los tamaños de partícula determinados por TEM y los de cristal, calculados mediante el ajuste por el método Rietveld de los difractogramas de rayos X (**Tabla 4. 1**), lo cual indica que las NPs son monocristalinas.

Una vez comprobado que los cationes Zn entran a formar parte de la estructura cristalina espinela, provocando cambios en los parámetros de red, se estudió la homogeneidad en su distribución dentro de los cristales formados. La **Figura 4. 4** recoge las imágenes de Cs corregidas STEM-HAADF de una pequeña población de NPs de la muestra  $ZnFe(30)_{25}C$ , tomadas, como se ha comentado, con el fin de corroborar la incorporación homogénea de los cationes  $Zn^{2+}$  en la estructura y el grado de cristalinidad del material sintetizado. En la **Figura 4. 4a** se muestra el análisis composicional de un grupo de NPs de ferrita de zinc obtenido por EELS. Este conjunto de imágenes permite visualizar la distribución de cada uno de los elementos constituyentes de las NPs, indicándose el O en color rojo, el Fe en verde y el Zn en azul. Adicionalmente, la

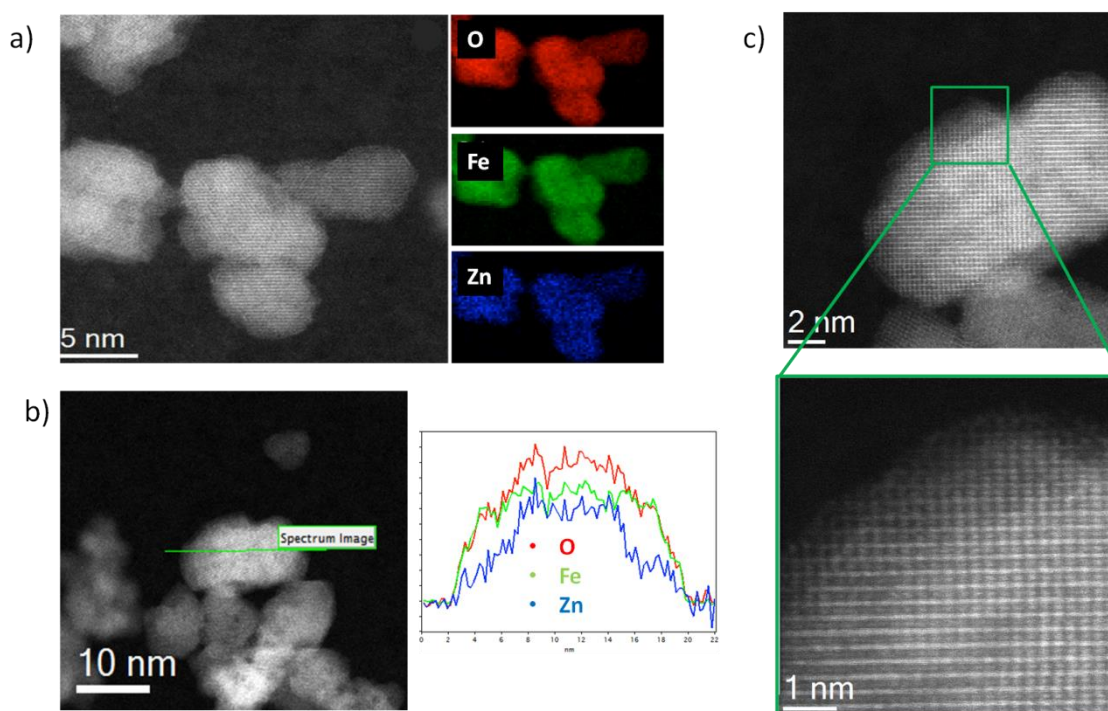
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Figura 4. 4b** muestra el perfil de composición química realizado sobre la diagonal indicada en la imagen, en color verde. Ambos análisis muestran una distribución homogénea de cada uno de los elementos en la estructura cristalina. Las intensidades, tanto de la **Figura 4. 4a** como de la **Figura 4. 4b** no son proporcionales a la cantidad o abundancia del elemento.



**Figura 4. 3.** Micrografías TEM de la serie de NPs ZnFe(X)25°C, siendo: a) ZnFe(5)25°C, b) ZnFe(10)25°C, c) ZnFe(20)25°C, d) ZnFe(30)25°C, e) ZnFe(40)25°C y f) ZnFe(50)25°C. Debajo de cada micrografía se encuentra la distribución de tamaños correspondiente a cada composición.

En la micrografía de la **Figura 4. 4c** puede verse una imagen de alta resolución de un grupo pequeño de NPs y la ampliación de la región recuadrada en color verde. En ella se observa una distancia interplanar de 1.62 Å correspondiente a la dirección 511 de la estructura espinela de la ferrita de zinc. La orientación y periodicidad de los planos cristalinos observada en todo el volumen de las NPs de la imagen, confirman la buena cristalinidad de las mismas y su carácter monocristalino.



**Figura 4. 4.** Micrografías Cs corregidas STEM-HAADF correspondientes a una población de NPs de la muestra ZnFe(30)25°C. a) Mapa composicional obtenido por EELS. b) Perfil de la composición química de las NPs. c) Imágenes a alta magnificación donde se observa la estructura cristalina de las NPs.

La caracterización estructural y morfológica de las NPs demuestra que el método electroquímico permite obtener ferritas de zinc de tamaño nanométrico, con una estructura cristalina definida y una distribución de cationes homogénea. Además, es posible controlar la composición química de las NPs simplemente variando la intensidad de corriente aplicada en la síntesis.

#### 4.1.2. Efecto de la temperatura de reacción

Con el objetivo de estudiar el efecto de la temperatura de reacción en la síntesis de las NPs, se realizaron experimentos de acuerdo a lo descrito en el apartado 3.1.2. *Efecto de la temperatura de reacción* Se sintetizaron NPs con temperaturas de reacción de 5, 25, 40 y 60 °C, para cada relación de intensidades de corriente aplicadas a los ánodos, detallada en la **Tabla 4. 1**.

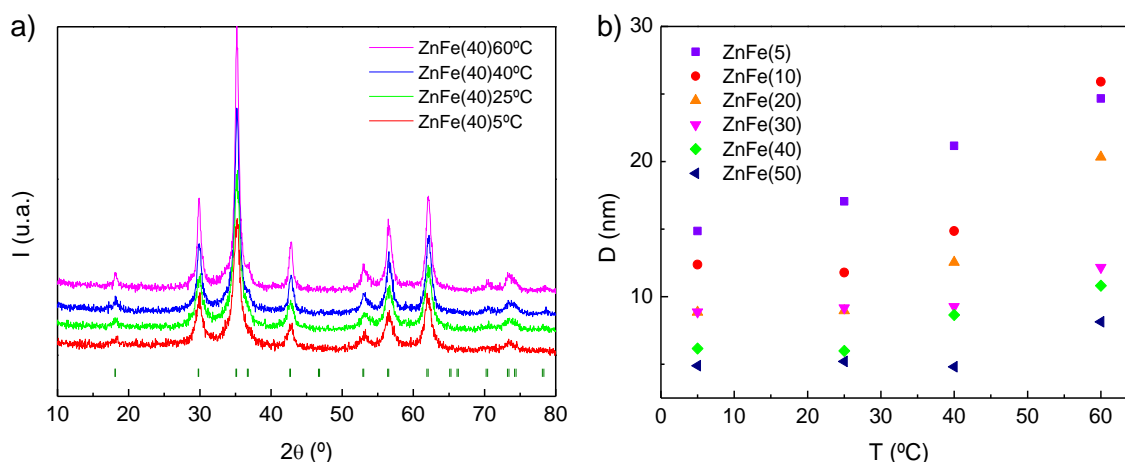
Mediante DRX se corroboró de nuevo la presencia de una única fase cristalina, correspondiente a la estructura espinela en todos los casos. En la **Figura 4. 5a** se muestran, a modo de ejemplo, los difractogramas obtenidos para las muestras ZnFe(40) sintetizadas a diferentes temperaturas. Los parámetros de red se calcularon mediante el refinamiento por el método Rietveld de los difractogramas, obteniéndose valores similares para cada estequiometría a las diferentes temperaturas de reacción (**Tabla 4. 2**).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 4. 2.** Composición media de las ferritas calculada mediante ICP-OES y parámetros de red,  $a$  (nm), calculados a partir de los refinamientos de los difractogramas de DRX, de la serie de muestras ZnFe( $X$ ) ( $X = 5, 10, 20, 30, 40$  y  $50$ ), sintetizadas a temperaturas de reacción ( $T_R$ ) de 5, 25, 40 y 60 °C.

Muestra	Zn <sub>x</sub> Fe <sub>3-x</sub> O <sub>4</sub> X	a (nm)			
		T <sub>R</sub> = 5°C	T <sub>R</sub> = 25°C	T <sub>R</sub> = 40°C	T <sub>R</sub> = 60°C
ZnFe(5)	0.18 (2)	8.400 (1)	8.401 (1)	8.394 (1)	8.399 (1)
ZnFe(10)	0.29 (3)	8.407 (1)	8.409 (1)	8.405 (1)	8.404 (1)
ZnFe(20)	0.52 (3)	8.415 (1)	8.418 (1)	8.414 (1)	8.420 (1)
ZnFe(30)	0.66 (2)	8.430 (1)	8.435 (1)	8.431 (1)	8.430 (1)
ZnFe(40)	0.82 (3)	8.456 (1)	8.445 (1)	8.443 (1)	8.448 (1)
ZnFe(50)	0.90 (7)	8.470 (2)	8.463 (2)	8.470 (2)	8.454 (1)

Las composiciones de las diferentes muestras se determinaron mediante ICP-OES, obteniendo valores similares para cada temperatura de reacción (**Tabla 4. 2**). Esto indica que la cantidad de Zn<sup>2+</sup> incorporada en la estructura cristalina no se ve afectada por el efecto de la variación de la temperatura de reacción, es decir, esta es únicamente dependiente de la relación de intensidades aplicada a los ánodos de la celda electroquímica.



**Figura 4. 5.** a) Patrones de difracción de rayos X de NPs de la muestra ZnFe(40), sintetizadas a temperaturas de reacción ( $T_R$ ) de 5, 25, 40 y 60 °C. Posiciones de Bragg ( $I$ ) correspondientes a la estructura  $Fd-3m$ . b) Variación del tamaño de cristal de las NPs con la temperatura de reacción, calculados a partir de los refinamientos de los difractogramas de DRX.

La **Figura 4. 5b** muestra la variación de tamaño de cristal obtenido para las diferentes muestras de la serie. Se aprecia una tendencia general de aumento del tamaño de cristal a medida que

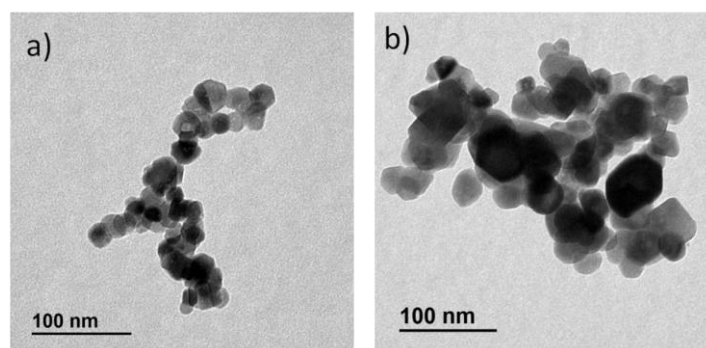


aumenta la temperatura de reacción, que se hace más evidente a temperaturas mayores de 30 °C. Este aumento de tamaño de cristal con la temperatura ya había sido descrito previamente en NPs de magnetita [12] y de ferritas de cobalto [202] [13] sintetizadas mediante el mismo método.

### 4.1.3. Estabilidad térmica de las NPs

Con el objetivo de evaluar la estabilidad térmica de las NPs y estudiar posibles cambios en la microestructura de las mismas, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico de 580 °C durante 12 horas, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 3.1.3. *Estabilidad térmica de las NPs*. La serie de muestras se denominó como ZnFe(X)580°C (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50).

Las micrografías TEM de las NPs muestran, en todos los casos, un aumento del tamaño de partícula tras el tratamiento térmico. Este aumento de tamaño se atribuye al crecimiento de las NPs por coalescencia, a través de un mecanismo de difusión en estado sólido mediante el cual, el sistema reduce su energía libre al reducir el área superficial de las NPs [203] [204]. En la **Figura 4. 6** se pueden ver las muestras ZnFe(20)580°C y ZnFe(50)580°C a modo de ejemplo. El aumento de tamaño de partícula es evidente en comparación a sus equivalentes ZnFe(20)25°C y ZnFe(50)25°C, mostradas en la **Figura 4. 3c** y **Figura 4. 3f**, respectivamente.

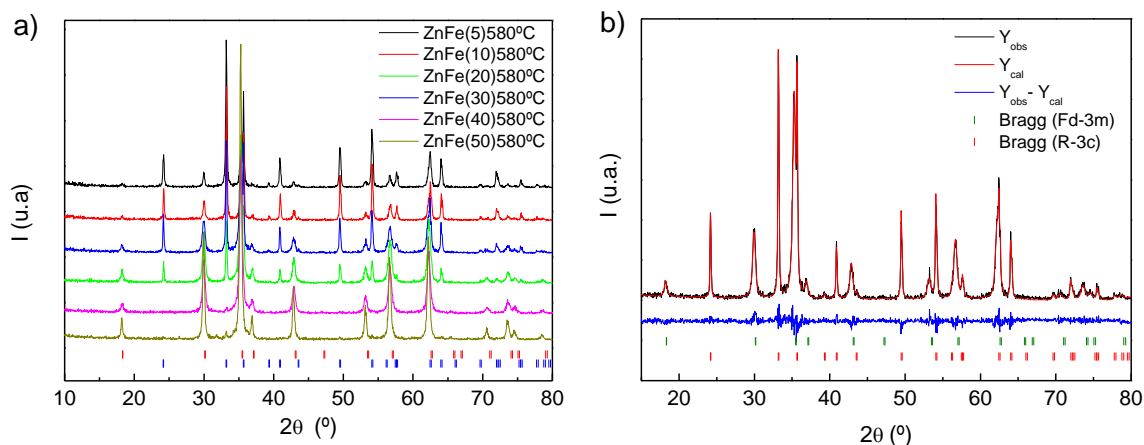


**Figura 4. 6.** Imágenes TEM de las muestras a) ZnFe(20)580°C y b) ZnFe(50)580°C.

Los difractogramas de rayos X obtenidos para esta serie de muestras quedan recogidos en la **Figura 4. 7**. En todos ellos se observan los máximos de difracción correspondientes a la estructura tipo espinela, mucho más estrechos y definidos que los obtenidos antes del tratamiento térmico, indicando el aumento de tamaño de los cristales. Además, se observa la aparición progresiva de máximos correspondientes a la estructura de la hematita ( $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), con grupo espacial *R-3c*, ganando intensidad a medida que disminuye la proporción de Zn en la estructura cristalina. Este cambio no fue detectado en el caso de la muestra con mayor cantidad de zinc, ZnFe(50)580°C. Esta muestra mantiene la estructura espinela, como ya había sido

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

observado previamente en ferritas estequiométricas tratadas térmicamente en condiciones similares [205] [206].



**Figura 4. 7.** a) Patrones de difracción de rayos X de la serie de NPs ZnFe(X)580°C (X = 5, 10, 20, 30, 40, 50) tratadas térmicamente a 580 °C durante 12 horas. Posiciones de Bragg (I) correspondientes a la estructura espinela de la ferrita de zinc (grupo espacial Fd-3m). Posiciones de Bragg (I) correspondientes a la estructura de la hematita (grupo espacial R-3c). b) Refinamiento de la muestra ZnFe(20)580°C. Fase Fd-3m:  $R_{Bragg} = 6.44$ ,  $R_f = 4.9$ . Fase R-3c:  $R_{Bragg} = 6.35$ ,  $R_f = 5.8$ .

Mediante el refinamiento de los difractogramas se calculó el porcentaje de cada fase (ferrita y hematita) presente en cada muestra y los parámetros de red de cada una de ellas. Los resultados quedan resumidos en la **Tabla 4. 3**. Se observó que el porcentaje de Zn presente en la estructura cristalina, expresado como (x) en  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$ , es prácticamente equivalente al porcentaje de fase de ferrita de zinc obtenido en el refinamiento de rayos X tras el tratamiento térmico.

Atendiendo a los parámetros de red, se observó un cambio en los valores de la fase de ferrita de zinc en comparación con los calculados antes del tratamiento térmico. Tras dicho tratamiento, el valor del parámetro de red tiende a adquirir un valor similar al de la ferrita de zinc estequiométrica ( $ZnFe_2O_4$ ), 8.44 Å [207], en todos los casos. Los valores de los parámetros de red calculados para la fase  $\alpha$ - $Fe_2O_3$  generada tras el tratamiento térmico también son comparables con los correspondientes a los de la estructura en *bulk*,  $a = 5.04$  Å y  $c = 13.75$  Å [208] (JCPDS No. 33-0664).

**Tabla 4. 3.** Porcentaje de Zn (obtenido mediante ICP-OES), porcentaje de  $ZnFe_2O_4$ , parámetros de red de  $ZnFe_2O_4$  (a) y  $\alpha-Fe_2O_3$  (a y c) de la serie de muestras  $ZnFe(X)580^\circ C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), todo ello calculado mediante el refinamiento de los difractogramas de rayos X.

Muestra	Zn (%)	$ZnFe_2O_4$ (%)	$\alpha-Fe_2O_3$		
			$ZnFe_2O_4$ a (Å)	a (Å)	c (Å)
<b>ZnFe(5)580°C</b>	19 (2)	22 (11)	8.440 (9)	5.036 (4)	13.749 (14)
<b>ZnFe(10)580°C</b>	31 (2)	32 (10)	8.440 (6)	5.035 (2)	13.749 (9)
<b>ZnFe(20)580°C</b>	49 (9)	55 (7)	8.439 (3)	5.035 (1)	13.750 (6)
<b>ZnFe(30)580°C</b>	64 (9)	78 (7)	8.439 (2)	5.035 (2)	13.751 (7)
<b>ZnFe(40)580°C</b>	84 (3)	98 (10)	8.438 (4)	5.039 (1)	13.738 (6)
<b>ZnFe(50)580°C</b>	93 (14)	100 (3)	8.439 (1)	-	-

Todo esto parece indicar que, en un principio, el material se sintetiza con el Zn distribuido homogéneamente a lo largo de la estructura cristalina, como muestra la **Figura 4. 4**. Durante el tratamiento térmico, se produce una segregación del Zn, generando un material compuesto de dos fases cristalinas,  $ZnFe_2O_4$  y  $\alpha-Fe_2O_3$ , y de mayor tamaño. Además, el porcentaje final de cada fase depende del porcentaje inicial de Zn en la muestra.

#### 4.1.3.1. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman aporta información característica de cada tipo de estructura, haciendo posible su identificación y la detección de posibles cambios inducidos por el aumento de temperatura.

En primer lugar, se realizó el estudio de la serie de muestras  $ZnFe(X)25^\circ C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ). Los resultados previos de DRX indican que las NPs obtenidas están compuestas de una única fase cristalina, correspondiente a la estructura espinela. Dicha estructura cristalina pertenece al grupo espacial  $O_h^7 (Fd-3m)$  con ocho moléculas por celda unidad. De acuerdo a la teoría de grupos, hay cinco modos Raman activos detectables a temperatura ambiente ( $A_{1g} + E_g + 3F_{2g}$ ) [209] [210] [211].

La **Figura 4. 8a** muestra los espectros Raman recogidos para la serie de muestras  $ZnFe(X)25^\circ C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), en el rango de frecuencias entre 200 y 1000  $cm^{-1}$ . En ellos únicamente se observan los modos  $F_{2g}(2)$ ,  $F_{2g}(3)$  y  $A_{1g}$  en torno a 333-357, 495-503 y 667-685  $cm^{-1}$ , respectivamente, correspondientes a la ferrita de zinc. No se detectaron picos

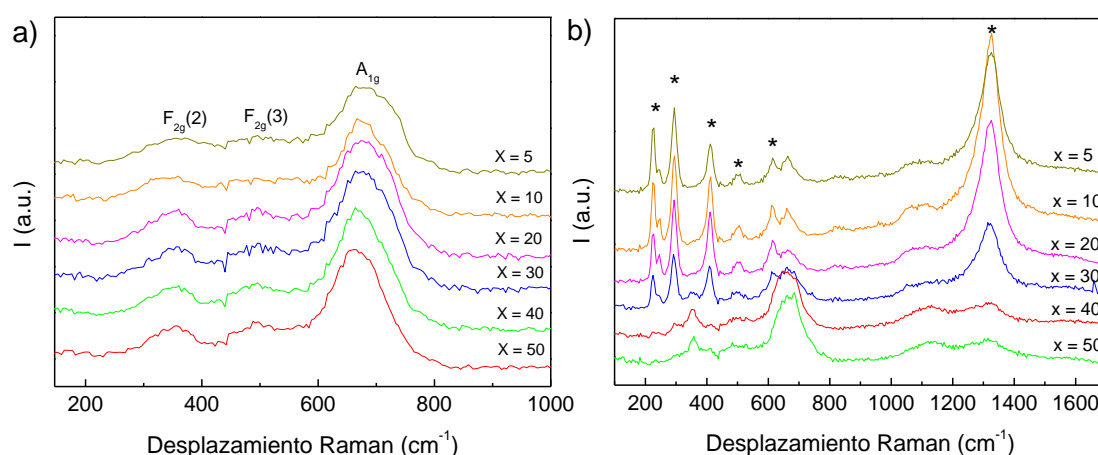
## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

correspondientes a la fase metaestable de maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) [212] [213]. Las frecuencias exactas de los modos de vibración quedan resumidas en la **Tabla 4. 4**.

Curiosamente, se observa un desplazamiento progresivo del modo de vibración  $A_{1g}$  hacia frecuencias más bajas, de 685 a 667  $\text{cm}^{-1}$ , a medida que la cantidad de Zn aumenta en la muestra. Por otro lado, el modo  $F_{2g}(3)$  no parece verse afectado por la composición de la muestra y el modo  $F_{2g}(2)$  sí varía en relación al contenido de Zn en la ferrita, pero sin seguir ninguna tendencia (**Figura 4. 8a** y **Tabla 4. 4**).

**Tabla 4. 4.** Modos Raman de vibración observados de la serie de muestras  $\text{ZnFe}(X)25^\circ\text{C}$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), obtenidos mediante el ajuste de los espectros a una función Lorentziana, comparados con valores encontrados en la bibliografía [209].

Modos	ZnFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Modos Raman ( $\text{cm}^{-1}$ ) de ZnFe(X)25°C					
	Ref [209]	x = 50	x = 40	x = 30	x = 20	x = 10	x = 5
$F_{2g}(1)$	221	-	-	-	-	-	-
$E_g$	246	-	-	-	-	-	-
$F_{2g}(2)$	355	336	336	357	333	333	342
$F_{2g}(3)$	451	500	496	495	501	502	503
$A_{1g}$	647	667	673	673	680	680	685



**Figura 4. 8.** a) Espectros Raman obtenidos para la serie de muestras  $\text{ZnFe}(X)25^\circ\text{C}$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ) y b) para la serie de muestras  $\text{ZnFe}(X)580^\circ\text{C}$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ). Los picos marcados con (\*) corresponden a la fase hematita.

En las espinelas cúbicas, como son las ferritas, los modos vibracionales a frecuencias por encima de  $600\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen al movimiento del oxígeno en los grupos tetraédricos  $\text{AO}_4$ , mientras que el resto de modos a frecuencias más bajas, son característicos de los grupos octaédricos  $\text{BO}_6$  [211] [214]. Por ello, se deduce que los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  están localizados preferentemente en posiciones de geometría tetraédrica, relacionando el desplazamiento progresivo del modo  $\text{A}_{1g}$  con el aumento del contenido de Zn incorporado en la estructura. La incorporación de Zn, además, da lugar a un aumento progresivo en los parámetros de red, como demostraron los resultados de DRX (**Figura 4. 2** y **Tabla 4. 2**). Esto provoca una reducción en la fortaleza de los enlaces y en consecuencia, un debilitamiento en las frecuencias Raman de vibración [215] [216]. Aun así, no puede descartarse la contribución de la variación del tamaño de cristal en la posición de la banda mencionada. Los resultados de DRX y TEM revelaron que la incorporación de Zn en las muestras disminuye el tamaño de cristal y de las NPs, que en consecuencia, podría aumentar el desorden cristalino y la presencia de límites de grano [217]. Sin embargo, esta explicación parece ser menos consistente ya que los modos  $\text{F}_{2g}$  no siguen dicha tendencia.

Una vez estudiada esta serie de muestras, se hizo un análisis de las NPs tratadas térmicamente a  $580\text{ °C}$  durante 12 horas, con el objeto de investigar el efecto de la composición química en la transición de fase cristalina. La **Figura 4. 8b** recoge los espectros Raman correspondientes a esta serie de muestras, donde puede observarse la aparición de nuevos picos asociados a los modos Raman activos correspondientes a la estructura hematita (\*). Estos picos sólo se aprecian en las muestras con menor contenido en Zn, mientras que en las muestras con mayor cantidad,  $\text{ZnFe}(40)$  y  $\text{ZnFe}(50)$ , no es posible su detección. De igual manera, puede observarse la presencia de una banda intensa a  $1320\text{ cm}^{-1}$  asociada también a  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , que puede ser asignada a un sobretono o un proceso de dispersión de segundo orden [209] [213] [218].

En la **Tabla 4. 5** quedan resumidos los modos Raman de vibración observados para la serie de muestras  $\text{ZnFe}(X)580\text{ °C}$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ). Cabe destacar que los desplazamientos Raman obtenidos son muy similares entre ellos, independientemente de la composición química de las NPs. Estos resultados están de acuerdo con las conclusiones obtenidas tras el análisis de los resultados de DRX (**Figura 4.7**).

Se puede concluir que las NPs de ferrita de zinc sintetizadas,  $\text{ZnFe}(X)25\text{ °C}$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), se componen de una única fase correspondiente a la estructura tipo espinela, en la cual el parámetro de red aumenta a medida que lo hace la proporción de Zn incorporado en la estructura. A su vez, esto provoca un desplazamiento en el modo Raman de vibración  $\text{A}_{1g}$  hacia menores frecuencias. Todo ello parece indicar que existe una distribución homogénea de los

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

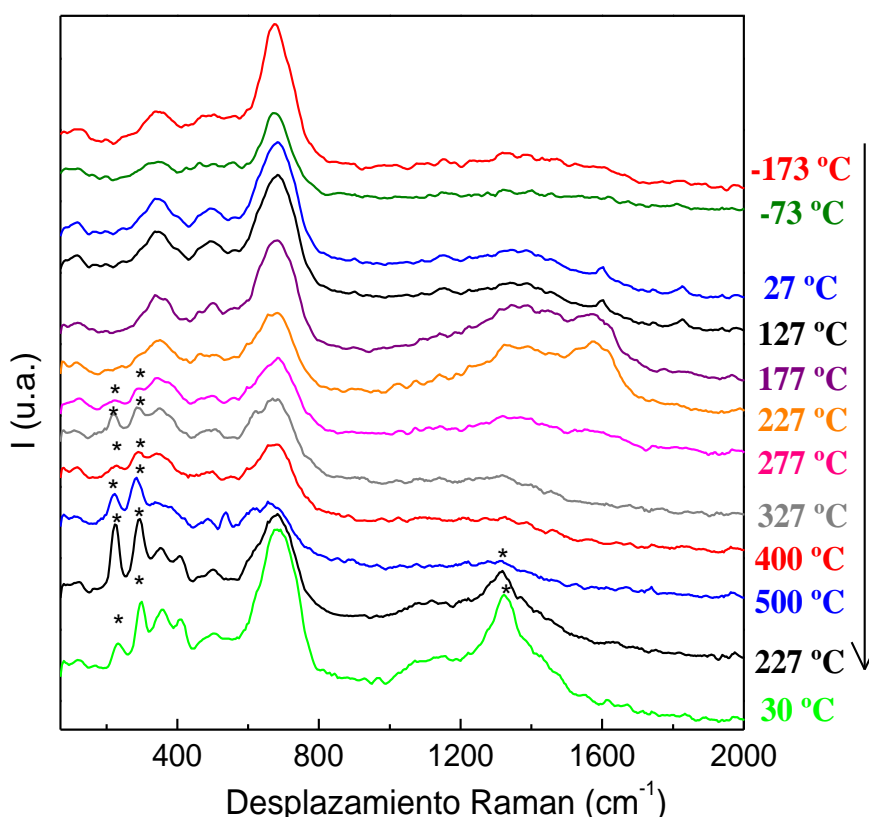
cationes  $Zn^{2+}$  a lo largo de la estructura cristalina. No obstante, tras tratar el material térmicamente, se produce una migración y redistribución de estos cationes, dando lugar a la formación de dos fases cristalinas diferenciadas,  $ZnFe_2O_4$  y  $\alpha-Fe_2O_3$ . Sin embargo, en la muestra  $ZnFe(50)25^\circ C$ , de composición cercana a la estequiométrica, el tratamiento térmico provoca únicamente un aumento de tamaño de las NPs, en lugar de una transición de fase detectable, como ocurre en el resto de muestras de la serie.

**Tabla 4. 5.** Modos Raman de vibración observados de la serie de muestras  $ZnFe(X)580^\circ C$  ( $X = 5, 10, 20, 30, 40, 50$ ), obtenidos mediante el ajuste de los espectros a una función Lorentziana, comparados con valores encontrados en la bibliografía [209] [219].

Modos	Ref [209], [219]	Modos Raman ( $cm^{-1}$ ) de $ZnFe(X)580^\circ C$					
		x = 50	x = 40	x = 30	x = 20	x = 10	x = 5
$F_{2g}(2)$ ( $ZnFe_2O_4$ )	355	354	357	354	356	-	-
$F_{2g}(3)$ ( $ZnFe_2O_4$ )	451	444	450	448	443	441	444
$A_{1g}$ ( $ZnFe_2O_4$ )	647	660	668	668	668	665	665
$A_{1g}$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	225	-	-	225	225	225	225
$E_g$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	247	-	-	245	245	245	245
$E_g$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	293	-	-	294	294	294	294
$E_g$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	412	-	-	410	410	410	410
$A_{1g}$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	498	-	-	500	500	500	500
$E_g$ ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	613	-	-	613	613	613	613
Sobretono ( $\alpha-Fe_2O_3$ )	1320	-	-	1320	1320	1320	1320

Por último, se realizó un estudio para determinar el efecto que tiene el dopaje con zinc de la magnetita en la temperatura de transición a la fase  $\alpha-Fe_2O_3$ . Para ello se tomaron espectros Raman de la muestra  $ZnFe(30)25^\circ C$  a diferentes temperaturas, aumentando la temperatura progresivamente en un rango de  $-173^\circ C$  a  $500^\circ C$  y enfriando la muestra hasta temperatura ambiente (**Figura 4. 9**). Se observa la aparición picos correspondientes a la fase  $\alpha-Fe_2O_3$  en torno a los  $300^\circ C$ , siendo esta transformación irreversible, ya que la estructura permanece presente al

disminuir de nuevo la temperatura. De forma general, la aparición de  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  en partículas nanométricas suele producirse en un rango de temperaturas de 300 °C a 450 °C [220] [221], aunque esta transición puede verse desplazada a temperaturas mayores, es decir, la estabilidad térmica del material puede ser mejorada, mediante el dopaje de la estructura cristalina con diversos metales, incluido el zinc [221] [222] [223] [224]. En el caso de la muestra ZnFe(30)25°C, la energía de activación necesaria para la transición de fase no parece verse afectada, ya que es posible apreciar picos correspondientes a la  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a temperaturas relativamente bajas ( $\sim 300$  °C). De modo que, en el método de síntesis electroquímico, la estabilidad térmica de la magnetita no se ve incrementada mediante el dopaje con zinc.



**Figura 4. 9.** Espectros Raman obtenidos para la muestra ZnFe(30)25°C, realizados en un rango de temperatura de -173 °C a 500 °C. La dirección de la flecha indica el orden ascendente de la temperatura. Los picos marcados con (\*) corresponden a la fase  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .

#### 4.1.4. Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm

Una vez estudiado el efecto de la intensidad de corriente aplicada a los ánodos de la celda electroquímica y la temperatura de reacción, el proceso de síntesis se optimizó para la obtención de una serie de NPs de ferrita de zinc de diferente composición y tamaño similar, en torno 12 nm de tamaño. Muchas de las propiedades físico-químicas y magnéticas de las NPs magnéticas

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

dependen de ambos parámetros, composición y tamaño, y como se ha observado un cambio en la composición química conlleva un cambio en el tamaño de partícula. Por ello, con el objetivo de estudiar únicamente la influencia de la composición en sus propiedades se procedió a su síntesis manteniendo el mismo tamaño. Se realizó la síntesis siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.4 *Síntesis de NPs de ferrita de zinc de 12 nm.*, aplicando las mismas relaciones de intensidad de corriente y variando la temperatura de reacción para cada composición hasta conseguir el tamaño deseado de ~12 nm.

La composición de las muestras se determinó mediante ICP-OES y quedan resumidas en la **Tabla 4. 6.** Como se comprobó previamente, la estequiometría de las ferritas no varía significativamente por el efecto de la temperatura de reacción y como era de esperar, el contenido de zinc en las ferritas aumenta linealmente a medida que aumenta la intensidad de corriente aplicada al ánodo de Zn (**Figura 4. 10a**). Se observa que, para contenidos altos de Zn, se necesitaron temperaturas de reacción más elevadas para conseguir tamaños de partícula mayores de 10 nm.

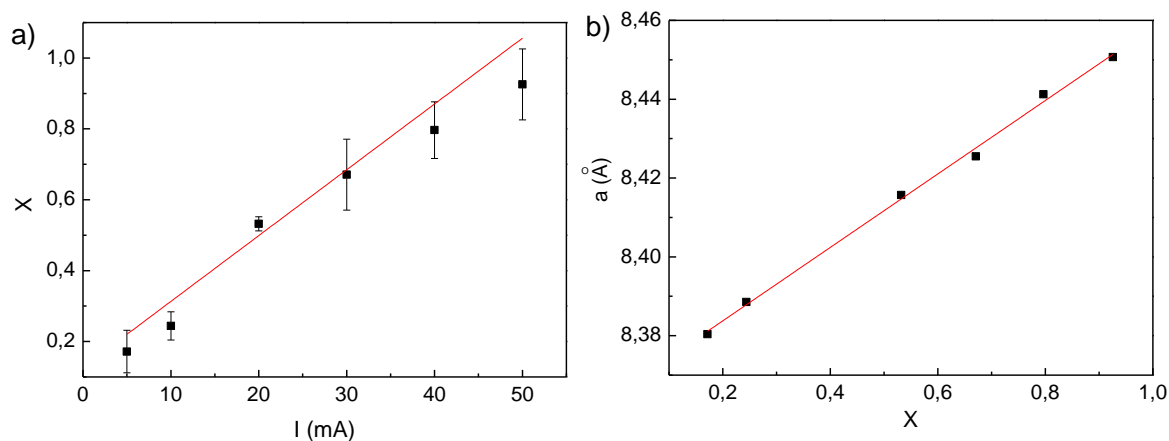
**Tabla 4. 6.** *Intensidades de corriente aplicadas (I) a los ánodos de Fe y Zn, temperatura de reacción ( $T_R$ ), composición de las ferritas determinada mediante ICP-OES, parámetro de red (a) y tamaño de cristal determinados mediante el refinamiento de los difractogramas de rayos X y tamaño de partícula determinado por TEM.*

I (mA)		$T_R$ (°C)	$Zn_xFe_{(3-x)}O_4$	a (Å)	T. de cristal Rietveld (nm)	T. de partícula (nm)
Fe	Zn					
100	5	5	$Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$	8.39(2)	11.614(4)	11(2)
100	10	5	$Zn_{0.24}Fe_{2.76}O_4$	8.41(1)	12.332(8)	9(2)
100	20	40	$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$	8.42(1)	12.125(3)	11(2)
100	30	55	$Zn_{0.67}Fe_{2.33}O_4$	8.43(1)	11.058(3)	11(3)
100	40	70	$Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4$	8.44(1)	12.126(8)	10(2)
100	50	80	$Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$	8.45(1)	11.328(6)	10(2)

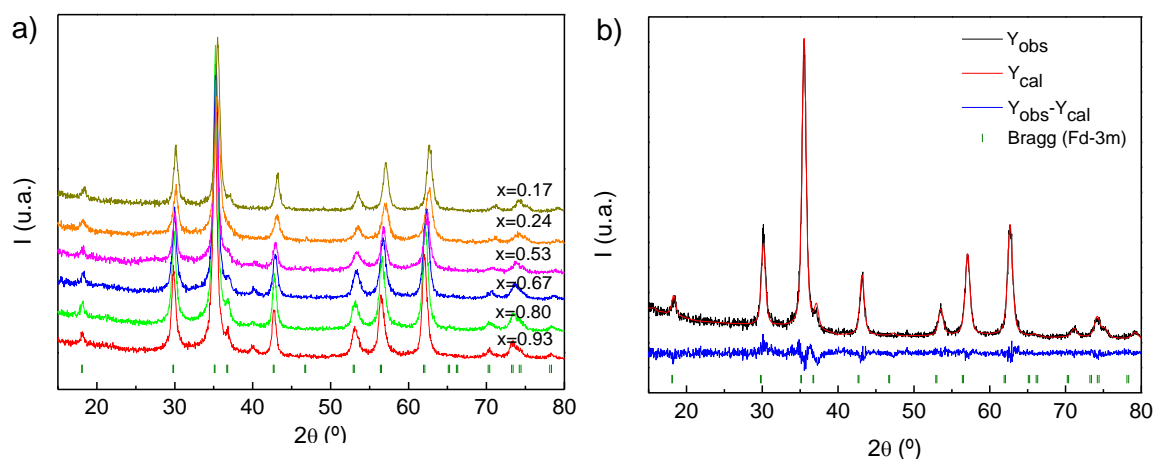
Así mismo, los resultados de DRX muestran la existencia de una fase cristalina del tipo espinela y grupo espacial  $Fd-3m$ : 227 (**Figura 4. 11**). Además, en las muestras sintetizadas a temperaturas de reacción mayores de 40 °C, se detecta la presencia de una impureza en torno a  $2\theta = 40^\circ$ , correspondientes a la estructura del oxihidróxido de hierro ( $\delta$ -FeOOH) [225], residual del proceso de síntesis.



Los parámetros de red, determinados mediante el refinamiento de los difractogramas, aumentan linealmente con el contenido de Zn en las muestras (**Figura 4. 10b**), como ya se vio previamente (**Figura 4. 1b**), confirmando la eficaz incorporación de los cationes  $Zn^{2+}$  dentro de la estructura cristalina [196].



**Figura 4. 10.** Representación de la dependencia de la cantidad de  $Zn^{2+}$  incorporada en la estructura cristalina de la ferrita ( $X$ ) con a) la intensidad de corriente aplicada ( $I$ ) al ánodo de Zn y b) con el valor del parámetro de red, en la fórmula general  $Zn_xFe_{3-x}O_4$  ( $0 < x < 1$ ).

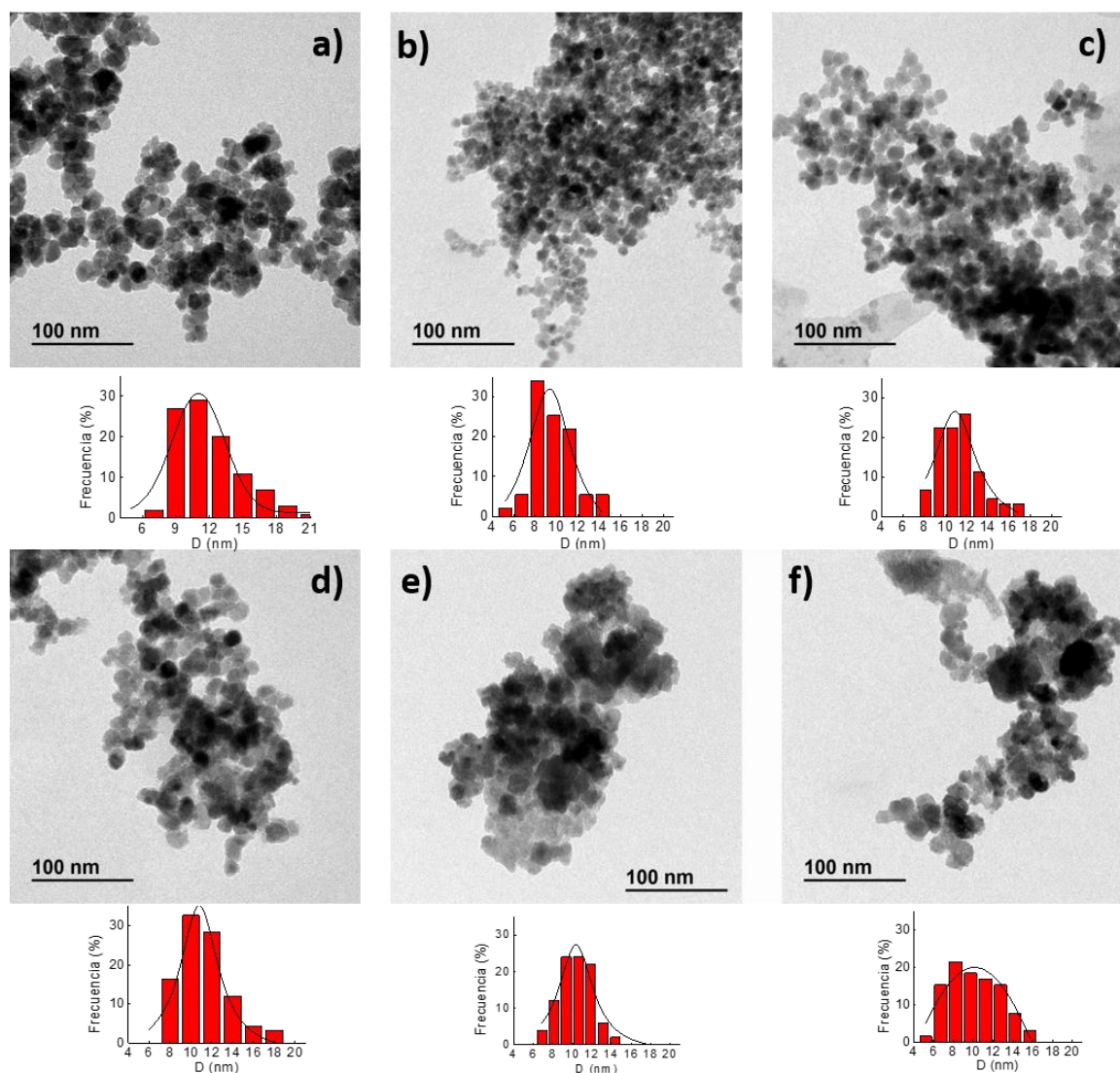


**Figura 4. 11.** a) Difractogramas de rayos X de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ). Posiciones de Bragg ( $I$ ) correspondientes a las estructura Fd-3m. b) Refinamiento de rayos X de la muestra  $ZnFe(5)25^\circ C$ .  $R_{Bragg} = 5.71$ ,  $R_f = 5.4$ .

Todas estas observaciones dejan en evidencia la robustez y reproducibilidad del método de síntesis electroquímico.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 4. 12** pueden verse las micrografías TEM de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ), junto a las distribuciones de tamaño obtenidas para cada composición. De nuevo se observan NPs de geometría cuasiesférica y de tamaños similares entre sí. Igualmente, las partículas presentan carácter monocristalino, dada la similitud entre los tamaños de partícula y los tamaños de cristal calculados mediante DRX.



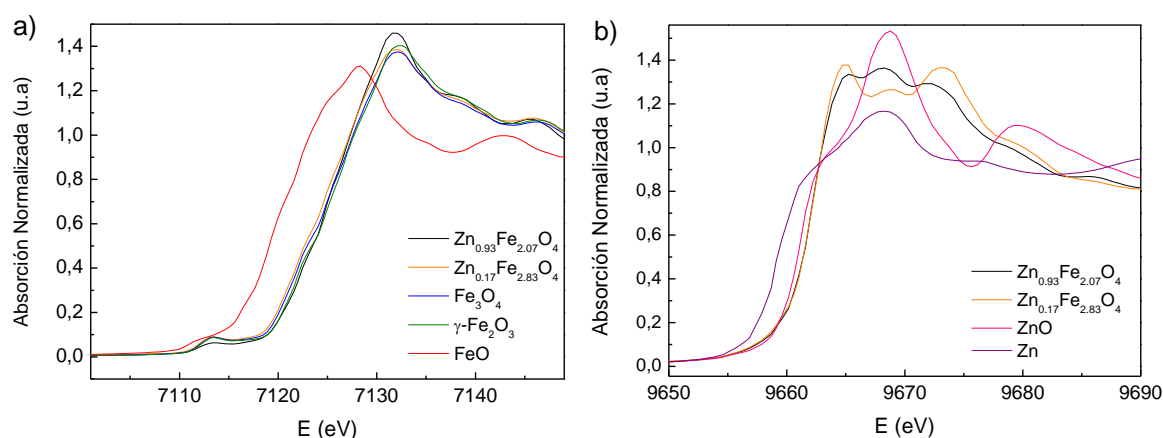
**Figura 4. 12.** Micrografías TEM de la serie de NPs  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ), siendo: a)  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$ , b)  $Zn_{0.24}Fe_{2.76}O_4$ , c)  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$ , d)  $Zn_{0.67}Fe_{2.33}O_4$ , e)  $Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4$  y f)  $Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$ . Debajo de cada micrografía se encuentra la distribución de tamaños calculada para cada composición.

### 4.1.4.1. Espectroscopia de absorción de rayos X

Mediante el análisis de la región XANES del espectro de absorción, es posible obtener información sobre el estado de oxidación del átomo absorbente, la energía del borde de absorción y la simetría de su entorno [163] [226] [227] [228]. Para ello, se registraron los

espectros de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) en los bordes de absorción K del Fe y del Zn. La determinación del estado de oxidación del átomo absorbente se llevó a cabo mediante la comparación entre la posición del borde de absorción de los resultados experimentales y de los diferentes compuestos de referencia.

La **Figura 4. 13** muestra los espectros en el borde K del Fe de las muestras  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$  y  $Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$  y de las referencias de compuestos de Fe con diferentes estados de oxidación: FeO (2+),  $Fe_3O_4$  (2+ y 3+) y  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (3+). Un aumento en el estado de oxidación del elemento de 2+ a 3+ se refleja en un desplazamiento del borde de absorción de aproximadamente 3 eV hacia valores de energía más altos [163]. Es posible observar dicho desplazamiento entre los bordes de absorción de las referencias FeO (2+) y  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (3+). Por el contrario, los bordes de absorción de la referencia  $Fe_3O_4$  (2+ y 3+) y de las muestras de ferrita de zinc no difieren mucho entre sí y se encuentran en el entorno de la referencia  $\gamma$ - $Fe_2O_3$  (3+), no siendo posible detectar experimentalmente la presencia de ambos estados de oxidación.



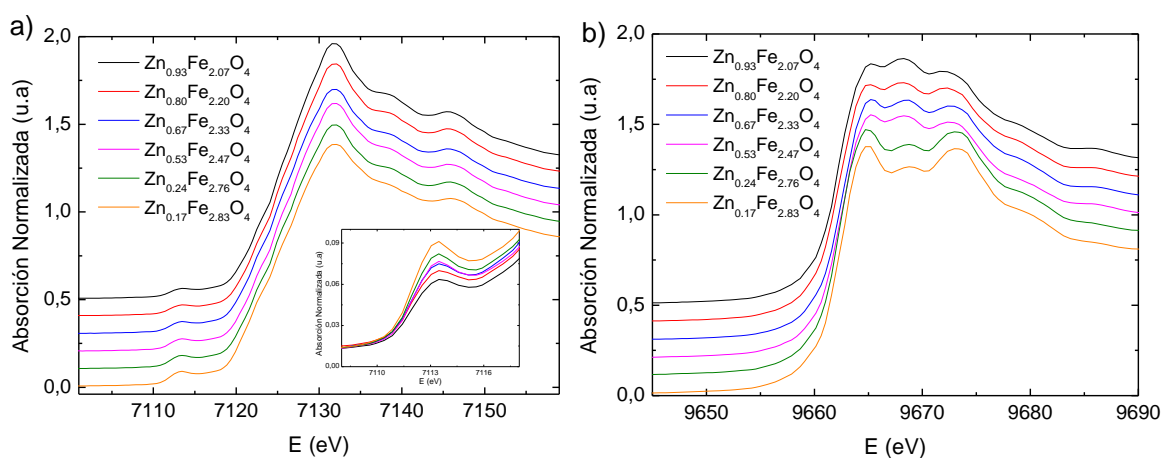
**Figura 4. 13.** Espectros XANES de las muestras  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$  y  $Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$  en el borde K del Fe (a) y del Zn (b), comparados con compuestos de referencia con diferentes estados de oxidación.

De forma similar, el estado de oxidación 2+ de los cationes de Zn se confirmó mediante la obtención de los espectros en el borde K del Zn de las mismas muestras que en el caso anterior y comparándolos con los compuestos de referencia de Zn metálico, con estado de oxidación 0 y ZnO, con estado de oxidación 2+ (**Figura 4. 13b**).

En la **Figura 4. 14** se muestran los espectros XANES en los bordes de absorción K del Fe (a) y del Zn (b) de toda la serie de ferritas de zinc sintetizadas, presentando todas ellas perfiles muy parecidos.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El recuadro interior de la **Figura 4. 14a** muestra el pre-borde típico del borde K del Fe, alrededor de 7113 eV, asociado a la transición electrónica de cuadrupolo  $1s \rightarrow 3d$  y a la transición electrónica de dipolo  $1s \rightarrow 4p$  [229] [230] [231]. La intensidad y estrechez del máximo del pre-borde aportan información sobre la simetría del entorno del átomo absorbente. El máximo se vuelve más intenso y estrecho a medida que aumenta la proporción de Fe en posiciones tetraédricas. Este hecho se debe al solapamiento de los orbitales  $3d$  y  $4p$ , lo que sólo está permitido en la simetría tetraédrica [231]. Es posible observar que a medida que aumenta la proporción de  $Zn^{2+}$  en la composición de la muestra, el pre-pico va perdiendo intensidad y volviéndose más ancho, lo que indica que el  $Zn^{2+}$  se coloca preferentemente en posición tetraédrica. El pico principal del borde de absorción K del Fe se atribuye a transiciones electrónicas  $1s \rightarrow 4p$  [228]. En la **Figura 4. 14a** se encuentran representados el conjunto de espectros de todas las muestras, centrados en torno a la misma posición, 7131 eV. Sin embargo, puede apreciarse un ligero y progresivo aumento en la intensidad, a medida que aumenta la proporción de  $Zn^{2+}$  en la muestra. Este comportamiento está asociado a una mayor ocupación de cationes  $Fe^{3+}$  en posiciones octaédricas [232], lo que es coherente con la información obtenida del pre-borde.

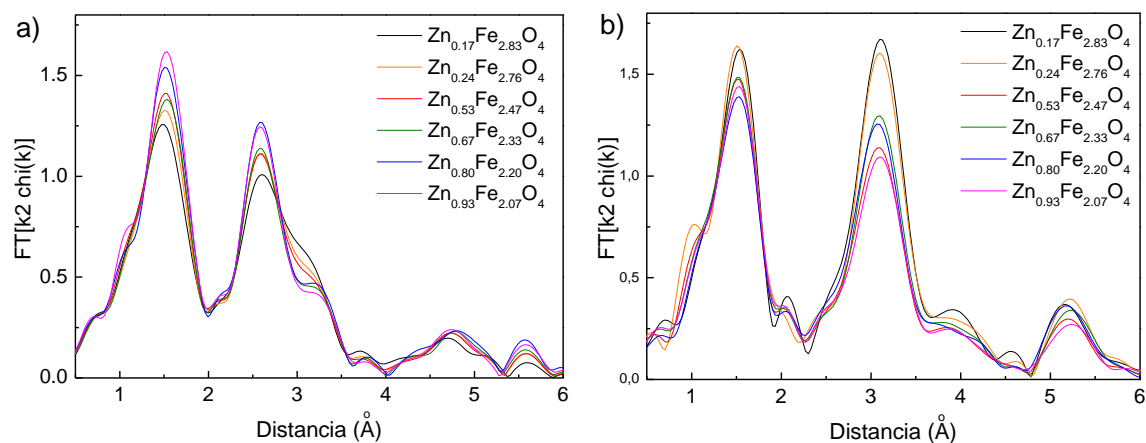


**Figura 4. 14.** Espectros XANES de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) en los bordes de absorción K del Fe (a) y del Zn (b). El recuadro interior de la figura (a) muestra el pre-borde del borde K del Fe.

La **Figura 4. 14b** muestra los espectros XANES en el borde K del Zn de la serie de muestras. En este caso no se distingue la presencia del pre-pico típico de los metales de la primera línea de transición, debido a su estructura electrónica ( $d^{10}$ ) [229]. Todas las curvas presentan un comportamiento muy similar y en ellas se pueden distinguir tres máximos principales en torno a 9666, 9669 y 9673 eV, junto con un hombro centrado a 9681 eV, generados por transiciones electrónicas  $1s \rightarrow$  estados electrónicos no ocupados tipo p [233]. El estudio de la evolución de

estos máximos aporta información sobre la distribución catiónica de la estructura cristalina [233] [234]. Sin embargo, debido a la baja concentración de zinc en algunas de las muestras de la serie resulta complicado realizar dicho análisis con los resultados experimentales obtenidos.

A continuación, se analizaron los espectros en la región EXAFS de la serie de muestras. La **Figura 4. 15a** muestra la transformada de Fourier de la absorción de rayos X en el borde K del Fe, en la que se aprecia un primer máximo en torno a 1.5 Å. Este valor está asociado a las distancias del Fe situado tanto en posiciones tetraédricas como octaédricas con su primer átomo vecino, concretamente el oxígeno, siendo ambas de valor muy similar. La intensidad de dicho máximo es función del número de átomos vecinos, estando el Fe rodeado por cuatro oxígenos en posición tetraédrica y por seis en posición octaédrica. Se observa que este máximo crece a medida que aumenta la proporción de Zn en la estructura. Este hecho es indicativo de que cada vez más átomos de Fe tienen más primeros vecinos, es decir, se encuentran en posiciones octaédricas. Esto, a su vez, indica que el Zn se sitúa preferentemente en las posiciones tetraédricas. El segundo máximo se sitúa a una distancia en torno a 2.6 Å, correspondiente a la distancia de los átomos de Fe con sus segundos vecinos, es decir, átomos de Fe situados tanto en posición octaédrica como en tetraédrica.



**Figura 4. 15.** Transformada de Fourier de las oscilaciones de EXAFS del borde K del Fe (a) y del Zn (b).

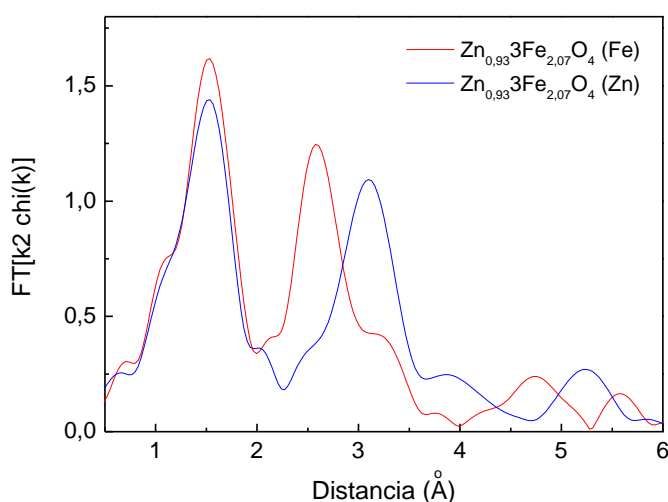
Por último, se aprecia la presencia de un hombro en torno a 3.2 Å, equivalente a la distancia entre cationes de Fe situados en posiciones octaédricas y segundos vecinos del mismo elemento situados en posiciones octaédricas. Se observa que el máximo centrado a 2.6 Å aumenta a medida que aumenta la proporción de Zn y que, a su vez, el hombro centrado a 3.2 Å disminuye

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en intensidad, indicando nuevamente que el Zn se sitúa preferentemente en posición tetraédrica, aumentando la proporción de Fe en posiciones octaédricas.

En la **Figura 4. 15b** se puede ver la región EXAFS de la absorción de rayos X en el borde del Zn. Al igual que en el caso del Fe, el primer máximo está centrado en 1.5 Å. Esta distancia puede corresponder tanto a las distancias de los átomos de Zn situados tanto en posiciones tetraédricas como en octaédricas con su primer átomo vecino, el oxígeno. El segundo máximo se sitúa a una distancia en torno a 3.1 Å, detectándose la presencia de un pequeño hombro en torno a 2.5 Å. Esto es de nuevo indicativo de que los segundos vecinos de los átomos de Zn se sitúan principalmente en posiciones tetraédricas, existiendo una pequeña proporción de ellos en posición octaédrica.

Comparando las transformadas de Fourier obtenidas de los espectros EXAFS del Fe y del Zn de una misma muestra (**Figura 4. 16**) puede verse con más claridad cómo la distancia de ambos elementos con su primer átomo vecino, el oxígeno, es equivalente, mientras que las distancias con su segundo átomo vecino difieren entre sí, coincidiendo en el caso de Zn con el tercer vecino del Fe. Este hecho, una vez más, evidencia la preferencia de los átomos de Zn a colocarse en posiciones tetraédricas.

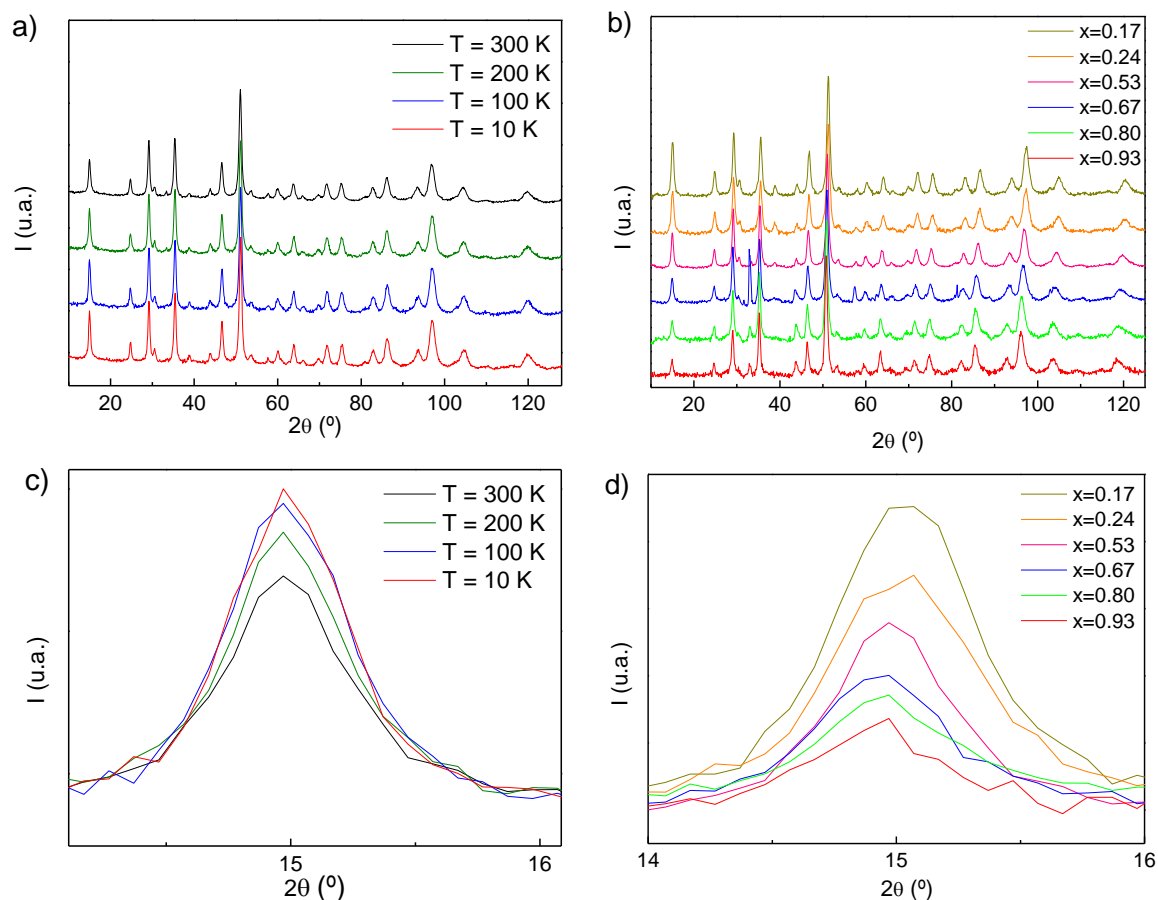


**Figura 4. 16.** Transformada de Fourier de las oscilaciones de EXAFS del borde K del Fe y del Zn de la muestra  $Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$ .

### 4.1.4.2. Difracción de neutrones

Se realizaron medidas de difracción de neutrones de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) a diferentes temperaturas, concretamente a 10, 100, 200 y 300 K, según lo descrito en el apartado 3.3.2. Difracción de neutrones. La **Figura 4. 17** muestra, a modo de ejemplo, los difractogramas

obtenidos para las diferentes temperaturas de la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  (**Figura 4. 17a**), así como los difractogramas medidos a 300 K de toda la serie de muestras (**Figura 4. 17b**).



**Figura 4. 17.** a) Difractogramas de neutrones de la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  medidos a diferentes temperaturas. b) Difractogramas de neutrones de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) medidos a 300 K. c) y d) Ampliación del máximo de difracción a más bajo ángulo de las figuras a) y b), respectivamente.

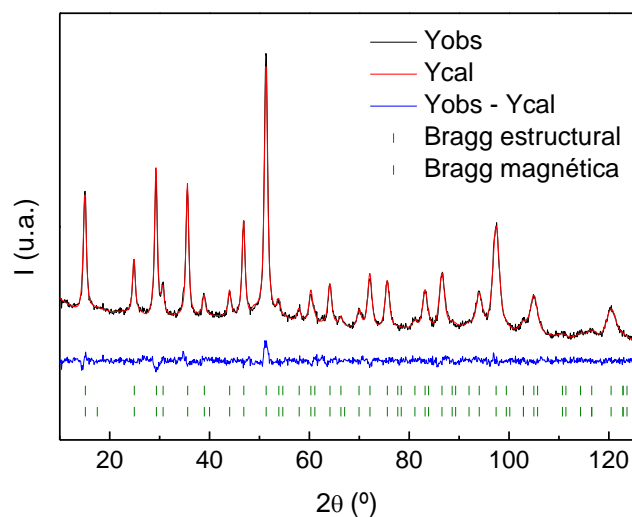
La **Figura 4. 17c** muestra la reflexión de más bajo ángulo de la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$ , de los difractogramas medidos a las diferentes temperaturas indicadas previamente. Se observa la disminución progresiva de la intensidad del máximo a medida que aumenta la temperatura. Existen diversos motivos por los cuales un máximo de difracción puede perder intensidad al aumentar la temperatura. En este caso, al no producirse cambios estructurales en dicho rango de temperaturas, se debe a la disminución del momento magnético de los átomos de hierro. Por otro lado, hay que tener en cuenta que el factor de dispersión o de “scattering” magnético decae rápidamente a medida que aumenta el ángulo de difracción (**Figura 4. 17a**), haciendo que sólo este primer máximo tenga una componente magnética representativa. Además, se produce un ligero desplazamiento de los máximos de difracción hacia ángulos menores al incrementar la

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

temperatura, debido al aumento del parámetro de red por la dilatación del material (Figura 4. 17c).

De modo similar, la Figura 4. 17d muestra una comparativa de la reflexión de más bajo ángulo de toda la serie de muestras, a 300 K, siendo evidente la disminución progresiva de la componente magnética a medida que aumenta la cantidad de zinc en la muestra.

El refinamiento de los difractogramas permite determinar los parámetros cristalográficos del material, dado que, mediante esta técnica, el factor de *scattering* del Fe y del Zn es lo suficientemente diferente, a diferencia que en difracción de rayos X. Dado que la componente magnética está directamente correlacionada con las ocupaciones de los átomos en las diferentes posiciones (A) y [B] y que, como se comentó previamente, la contribución magnética es fuertemente dependiente del ángulo, decayendo rápidamente a medida que este aumenta, los refinamientos se realizaron por encima de  $80^\circ$  en  $2\theta$ . De esta forma, sólo se obtiene información puramente estructural. La Figura 4. 18 muestra, a modo de ejemplo, el ajuste del difractograma de neutrones de la muestra  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$ , a 300 K, cuyos máximos de difracción pueden ser indexados de acuerdo al grupo espacial  $Fd-3m$ : 227.



**Figura 4. 18.** Refinamiento del difractograma de neutrones de la muestra  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$ , a 300 K, tanto de su parte estructural (marcas verdes superiores), como magnética (marcas verdes inferiores).  $R_{Bragg} = 1.85$ ,  $R_f = 0.9$  (estructural).  $R_{Magnetic} = 1.83$  (magnética).

La Tabla 4. 7. muestra los parámetros de red y el porcentaje de cationes  $Zn^{2+}$  situado en posiciones tetraédricas de la estructura espinela. Se observa un aumento progresivo del parámetro de red al aumentar la cantidad de zinc en la estructura, de acuerdo a los resultados



obtenidos previamente mediante DRX (**Tabla 4. 6**). Además, los resultados muestran la tendencia de los cationes  $Zn^{2+}$  a ocupar preferentemente posiciones tetraédricas. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante el estudio de absorción de rayos X.

Por último, no fue posible resolver el valor de los momentos magnéticos de los átomos de Fe dado que, como ya se ha dicho al comienzo de este apartado, tan sólo el primer máximo de difracción presenta una contribución magnética apreciable. Este dato no es suficiente para la resolución de dos incógnitas, los valores de los momentos magnéticos de Fe en cada una de las posiciones (tetraédrica y octaédrica). Aun así, fue posible realizar un ajuste en todo el rango de ángulos medido (**Figura 4. 18**), pero sin poder obtener valores físicamente coherentes de dichos momentos magnéticos.

**Tabla 4. 7.** *Parámetros de red (a) y porcentaje de cationes  $Zn^{2+}$  ocupando posiciones tetraédricas (A) en la estructura espinela, ambos obtenidos mediante el método de refinamiento Rietveld de los difractogramas de neutrones de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ).*

Muestra	a (Å)	$Zn^{2+}$ (A) (%)
$Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$	8.339 (1)	65 (28)
$Zn_{0.24}Fe_{2.76}O_4$	8.345 (1)	97 (13)
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$	8.362 (1)	83 (10)
$Zn_{0.67}Fe_{2.33}O_4$	8.366 (1)	99 (8)
$Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4$	8.407 (1)	99 (4)
$Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$	8.416 (1)	88 (6)

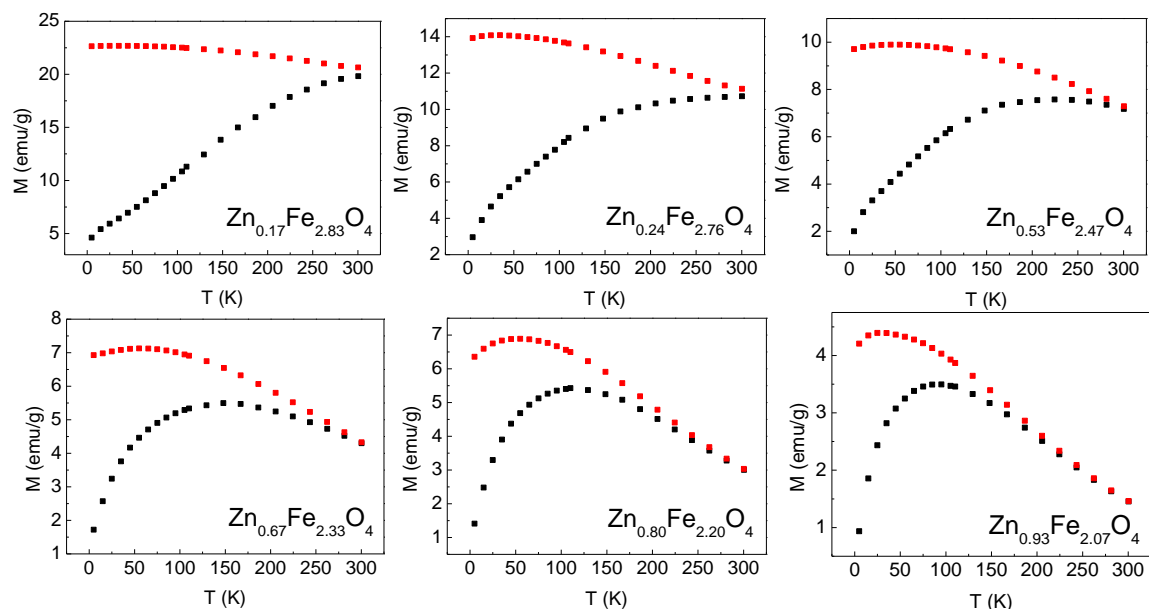
#### 4.1.4.3. Caracterización magnética

Una vez que las muestras fueron química y estructuralmente caracterizadas, se procedió al estudio más en profundidad de sus propiedades magnéticas, ya iniciado mediante los ensayos de difracción de neutrones. Esta caracterización se realizó mediante medidas ZFC/FC y curvas de magnetización de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ).

La **Figura 4. 19** recoge las curvas ZFC/FC, medidas entre 5 y 300 K y bajo un campo magnético externo de 100 Oe. En todos los casos las curvas muestran un comportamiento similar, con la presencia de un máximo en la curva ZFC, correspondiente al valor promedio de la temperatura

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

de bloqueo del sistema ( $T_B$ ), relacionado con el proceso congelación de los momentos magnéticos de las NPs. A temperaturas superiores a la  $T_B$ , las NPs presentarán comportamiento superparamagnético [235]. El punto en el cual las curvas ZFC y FC comienzan a separarse ( $T_{irr}$ ), corresponde a la temperatura de bloqueo de las partículas de mayor tamaño de modo que, la diferencia entre  $T_{irr}$  y  $T_B$  aporta información cualitativa sobre la polidispersidad de las NPs [236].



**Figura 4. 19.** Curvas ZFC/FC de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ), medidos a 100 Oe. Notar la diferencia de escala en la magnetización.

En el caso de las dos muestras con menor cantidad de Zn,  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$  y  $Zn_{0.24}Fe_{2.76}O_4$ , no se alcanzó la  $T_B$  en el rango de temperaturas en el que se realizaron los experimentos. Esto indica un comportamiento ferromagnético o superparamagnético, con una temperatura de transición magnética superior a los 300 K. El resto de muestras se encuentran en régimen superparamagnético a temperatura ambiente. Los valores de  $T_B$  están todos muy por encima de la  $T_N$  correspondiente a la ferrita de zinc en bulk (10 K [237]) y decrecen progresivamente a medida que aumenta la cantidad de zinc en la muestra (**Tabla 4. 8**). El valor de la  $T_B$  es directamente proporcional al volumen de las NPs y la constante de anisotropía del sistema. Teniendo en cuenta que todas las NPs tienen el mismo tamaño, los valores pueden ser comparados concluyendo que la presencia de Zn en la estructura disminuye la anisotropía magnética del sistema [238]. De igual manera, los valores de susceptibilidad magnética disminuyen de forma gradual con el aumento de Zn.

**Tabla 4. 8.** Parámetros magnéticos de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ).

Muestra	$T_B$	$M_S$	$M_R$	$H_c$
	(K)	(emu/g)	(emu/g)	(Oe)
$Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4$	>300	69	0.4	2.3
$Zn_{0.24}Fe_{2.76}O_4$	>300	51	0.2	1.7
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$	148	42	0.1	2.2
$Zn_{0.67}Fe_{2.33}O_4$	205	30	0.1	1.1
$Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4$	110	27	0.1	2.8
$Zn_{0.93}Fe_{2.07}O_4$	85	17	0.3	4.9

Además, el máximo de la curva ZFC se va estrechando progresivamente con el aumento de Zn. Esta serie de NPs tiene el mismo diámetro y según las distribuciones de tamaño calculadas por TEM, todas las muestras presentan valores comparables de polidispersidad. De modo que, este comportamiento se atribuye a la presencia de interacciones dipolares entre las NPs [239], siendo más notables a menores concentraciones de Zn en la estructura, estando en concordancia con las tendencias observadas para los valores de  $T_B$  y de susceptibilidad magnética.

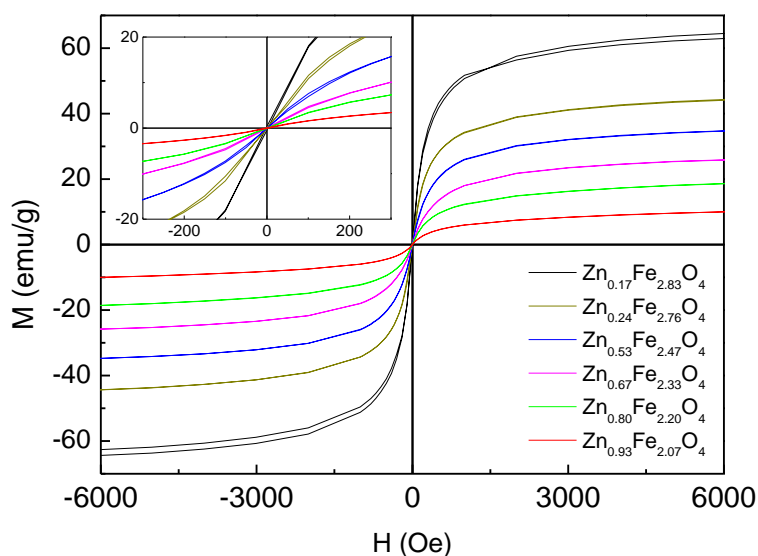
Por último, las curvas FC, en las que se espera una saturación a bajas temperaturas del momento magnético, presentan un inusual máximo a bajas temperaturas, previamente descrito en la literatura en ferritas nanométricas [240], incluidas las de zinc [235] [239] [241] [242] [243], que se atribuye de nuevo a la presencia de interacciones dipolares entre las NPs. Este comportamiento también es atribuible a la transición de vidrio de spin, en la que, por debajo de cierta temperatura, los spines magnéticos de los átomos se congelan en una determinada posición, dando lugar a una disminución de la magnetización [244] [245] [47] [65].

Por otro lado, en la **Figura 4. 20** se representan las curvas de magnetización con campo, o ciclos de histéresis magnéticos, medidos a 290 K. Se aprecia la ausencia de histéresis como característica común a todas las curvas, siendo los valores de coercitividad y remanencia prácticamente nulos en todos los casos (**Tabla 4. 8**). Además, todas las curvas presentan forma de "S". Estas características indican que todas las muestras se encuentran en régimen superparamagnético a esa temperatura [246]. Además, se observa una disminución progresiva de los valores de  $M_S$  a medida que aumenta el contenido de Zn en la muestra, como se observó previamente en las curvas ZFC/FC (**Figura 4. 19**). Sin embargo, estudios previos reportan el incremento de  $M_S$  a bajas concentraciones de dopaje con cationes  $Zn^{2+}$ , de naturaleza no

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

magnética. Estos cationes tienden a ocupar posiciones (A), en sustitución de cationes  $\text{Fe}^{3+}$ , disminuyendo el momento magnético de la subred (A) y aumentando inicialmente el momento magnético neto. Este comportamiento se observa hasta alcanzar un cierto grado de dopaje, en torno a  $x = 0.3$  en  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  [227] [235] [55] [198] [247] [48]. Por encima de este punto, los cationes  $\text{Zn}^{2+}$  ocupan también las posiciones [B], en sustitución de los cationes  $\text{Fe}^{2+}$ , ejerciendo un efecto contrario sobre la  $M_s$ , disminuyendo su valor rápidamente. Además, la inclusión de átomos no magnéticos dentro de una red magnética ordenada produce la disminución de las interacciones magnéticas y, por tanto, una disminución de momento magnético neto.

Sin embargo, no se observa dicho incremento en la  $M_s$  en la serie de ferritas de zinc sintetizadas mediante el método electroquímico, ni a bajos porcentajes de dopaje. Todos los valores de  $M_s$  se encuentran por debajo del correspondiente a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de tamaño similar, obtenido también mediante el método electroquímico (82 emu/g).



**Figura 4. 20.** Curvas de magnetización a 290 K de la serie de muestras  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4$  ( $0 < x < 1$ ). La gráfica interior muestra una ampliación de las curvas.

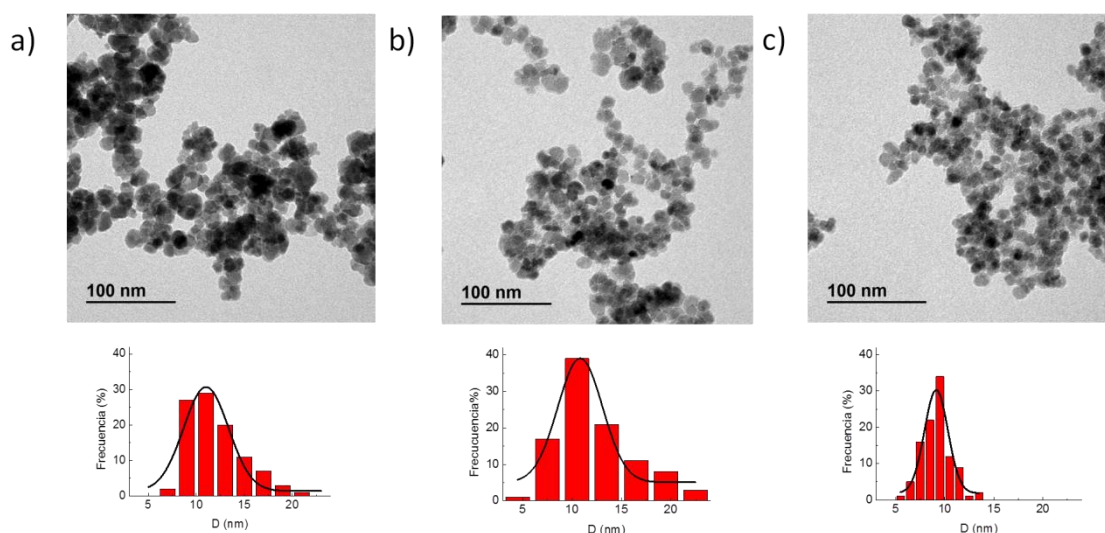
### 4.2. Funcionalización superficial de las NPs

La funcionalización superficial de las NPs con moléculas biocompatibles se llevó a cabo mediante los protocolos descritos en el apartado 3.2. *Funcionalización superficial de las NPs*. En primer lugar, se realizó un recubrimiento con moléculas de DA unidas a la superficie de las NPs mediante química del catecol, generando una plataforma de grupos amino libres que pueden servir como puntos de anclaje de otras moléculas de interés. Posteriormente, se anclaron a

dichos grupos aminos los ácidos cítrico y fólico, los cuales aportan funcionalidad y estabilidad coloidal.

La evaluación de la efectividad y calidad de la funcionalización superficial se llevó a cabo mediante técnicas como TEM, TGA y FT-IR, además de la caracterización coloidal, mediante medidas de potencial Zeta y tamaño hidrodinámico.

La **Figura 4. 21** muestra las micrografías TEM de la ferrita de composición  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  recubierta con DA ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ ) y posteriormente funcionalizada con los ácidos cítrico ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ ) y fólico ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ ). Se observa que las NPs mantienen su forma cuasiesférica y un tamaño similar al previo (**Figura 4. 12**), lo que indica que el proceso de funcionalización no es dañino para el material. Además, puede apreciarse un menor grado de agregación de las NPs gracias al recubrimiento.

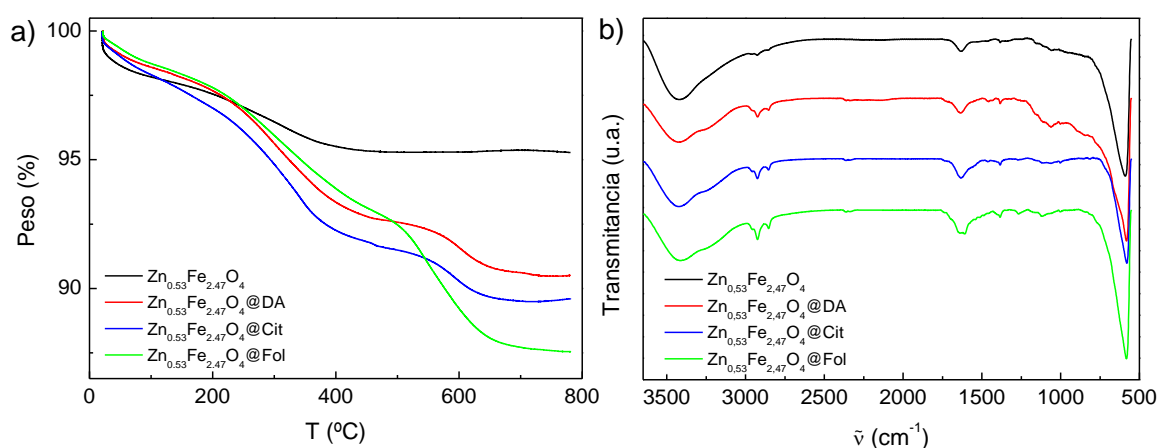


**Figura 4. 21.** Micrografías TEM de las muestras a)  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ , b)  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y c)  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ . Debajo de cada micrografía se encuentra la distribución de tamaño de partícula calculada para cada muestra.

En la **Figura 4. 22a** se puede ver una comparativa de los análisis termogravimétricos de la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  sin funcionalizar, tras la primera funcionalización con DA,  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ , y tras el posterior anclaje de los ácidos cítrico ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ ) y fólico ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ ) a los grupos amino de la DA. La muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  presenta una pérdida de masa en dos etapas. Muestra una pequeña pérdida de aproximadamente 1.5% en peso en torno a los 100 °C, correspondiente a la deshidratación y pérdida de moléculas de agua adsorbidas a la superficie de las NPs y posteriormente otra pérdida de peso hasta el 5% alrededor de los 500 °C asociada a la descomposición térmica del surfactante ( $nBu_4NBr$ ) utilizado

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

durante la síntesis [68]. La pérdida de masa en las muestras de NPs funcionalizadas se produce en tres etapas, correspondiendo la primera al proceso de deshidratación y las otras dos, asociadas a la combustión del material orgánico presente en su superficie. Se estima una pérdida del 9.5% del peso total en el caso de la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@DA}$ , un 11% para la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@Cit}$  y un 13% en la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@Fol}$ . La menor pérdida de masa en la muestra recubierta únicamente con DA, en comparación con las funcionalizadas posteriormente con los ácidos cítrico y fólico, confirman el efectivo anclaje de dichos ácidos a los grupos aminos libres de la DA. Por último, las NPs funcionalizadas con moléculas de ácido fólico presentan el mayor porcentaje de pérdida de masa probablemente asociado con el mayor peso molecular de las mismas, en comparación con las de ácido cítrico.



**Figura 4. 22.** *Análisis termogravimétrico (a) y espectros de absorción FT-IR de las muestras  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4$ ,  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@DA}$ ,  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@Cit}$  y  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4\text{@Fol}$  (b).*

Paralelamente, se realizó una comparativa de las mismas muestras mediante espectroscopia infrarroja (**Figura 4. 22b**). Se observa la presencia de una gran banda a  $590\text{ cm}^{-1}$  en todas las muestras, característica de la vibración de tensión simétrica  $M_{(A)}\leftrightarrow O$  en ferritas, asignada a las vibraciones de Fe y Zn situados en posiciones tetraédricas [248], junto con una banda ancha centrada en  $3420\text{ cm}^{-1}$  atribuida a vibraciones N-H y/o O-H [154]. Esta última banda, junto con la centrada a  $1632\text{ cm}^{-1}$ , de menor intensidad, se asocian además a moléculas de agua adsorbidas a la superficie de las NPs [249].

La presencia del recubrimiento con DA queda confirmada mediante la presencia de las principales bandas características de dicha molécula, como vibraciones de grupos C-O arílicos ( $\sim 1290\text{ cm}^{-1}$ ), las propias de anillos aromáticos ( $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ ) y flexión de grupos N-H de aminas primarias ( $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ ). Además, la presencia de grupos C-H propios de las moléculas orgánicas

queda en evidencia por el aumento de intensidad en las bandas en el rango de frecuencias de 2800-2950  $\text{cm}^{-1}$  [250] [251].

Por último, la funcionalización con los ácidos cítrico y fólico se confirma mediante bandas características a la vibración del grupo carbonilo C=O en ácidos carboxílicos ( $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$ ) y en amidas ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ), junto con modos vibracionales en torno a  $1380 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1260 \text{ cm}^{-1}$  y  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , atribuibles a los grupos COO, C-O y OH presentes en ambos ácidos [252] [69].

### 4.3. Caracterización coloidal

Una vez confirmada la presencia de los recubrimientos superficiales de las NPs, se procedió a evaluar la estabilidad coloidal de las mismas. Para ello, se realizaron medidas de potencial Zeta y tamaño hidrodinámico de las NPs en disolución acuosa.

#### 4.3.1. Potencial Zeta

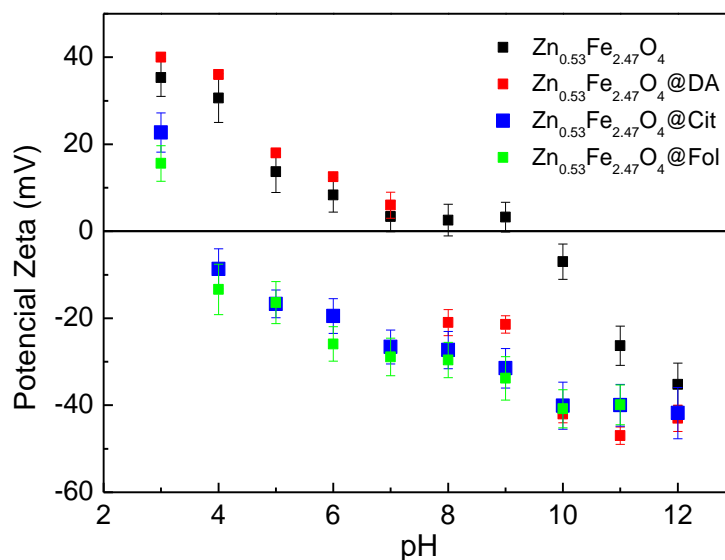
En la **Figura 4. 23** puede observarse la comparativa de los valores de potencial Zeta obtenidos en función del pH de la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4$  sin funcionalizar y de las muestras  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{DA}$ ,  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{Cit}$  y  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{Fol}$ , recubiertas con DA, ácido cítrico y fólico, respectivamente. Las diferencias entre los valores obtenidos para las distintas muestras dejan en evidencia la efectiva funcionalización superficial de las NPs, de acuerdo a lo observado previamente mediante TGA y FT-IR.

La muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4$  presenta valores de potencial Zeta dentro del intervalo de  $\pm 35 \text{ mV}$ , debido al estado protonado o desprotonado de los oxígenos presentes en la superficie de las NPs en función del valor del pH. El valor a pH 7 es de  $3.4 \text{ mV}$  y el punto isoeléctrico, en el cual la carga neta de las NPs es igual a cero, se encuentra en torno a pH 9.3, debido a la ausencia de recubrimiento orgánico.

En el caso de la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{DA}$ , el valor del potencial Zeta a pH neutro es de  $6 \text{ mV}$ , similar a los descritos en la literatura [250] [253] [254]. Suponiendo que las moléculas de DA estuvieran unidas a la superficie de las NPs mediante el grupo catecol y según los valores de pKa de la DA ( $\text{pKa}_1 = 9.05$ ,  $\text{pKa}_2 = 10.58$ ,  $\text{pKa}_3 = 12.07$ ) [255], los valores de potencial Zeta deberían ser muy positivos ( $> 30 \text{ mV}$ ) [256] [257] hasta pH 9, observando un cambio brusco en torno a ese pH, coincidente con la desprotonación del grupo amino. Por el contrario, en el caso de que la unión de la DA a la superficie de las NPs se produjera mediante el grupo amino, se obtendrían valores muy negativos de potencial Zeta ( $< -40 \text{ mV}$ ) [258] [259]. Las NPs presentan el punto isoeléctrico, en el cual la carga neta de las NPs es igual a cero, a un pH de 7.2 y bajos valores de potencial Zeta, en valor absoluto, en un rango de pH de 5 a 9. Estos datos parecen indicar que

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

las moléculas de DA se unen a la superficie de las NPs a través de ambos grupos, mediante el grupo catecol y mediante el grupo amina.



**Figura 4. 23.** Medidas de potencial Zeta en función del pH, de las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$ ,  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ ,  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ .

Los valores de potencial Zeta a pH neutro de las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ , varían significativamente en comparación a la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$  (6 mV), justificando el anclaje de dichas moléculas a los grupos amino de la DA. Se observa que los valores se van haciendo más negativos a medida que aumenta el pH, a causa de la desprotonación de los ácidos carboxílicos presentes en ambas moléculas, apreciándose cambios más acusados en los valores correspondientes a los pKas de ambos ácidos, cítrico ( $pK_{a1} = 3.15$ ,  $pK_{a2} = 4.77$ ,  $pK_{a3} = 6.40$ ) y fólico ( $pK_{a1} = 2.3$ ,  $pK_{a2} = 8.3$ ). Los valores de potencial Zeta a pH 7 son -26.6 mV para la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y -28.9 mV para la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ , que son lo suficientemente negativos como para considerar ambas muestras coloidalmente estables a pH fisiológico [260].

### 4.3.2. Tamaño hidrodinámico

Las medidas de tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ) obtenidas para los diferentes coloides en solución acuosa, quedan recogidas en la **Tabla 4. 9**. Los valores de  $D_H$  de las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$  presentan valores similares, 147.5 nm y 162.4 nm, respectivamente.



En todos los casos los valores de PDI indican un moderado grado de polidispersidad [261], observándose una notable mejoría en las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ , con respecto a la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ . Estos resultados están en concordancia a lo observado previamente en las medidas de potencial Zeta (**Tabla 4. 9**), mediante las cuales se intuye una pobre estabilidad coloidal para la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ .

**Tabla 4. 9.** *Propiedades coloidales de suspensiones acuosas a pH 7 de las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$ ,  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ . Potencial Zeta (mV), tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ) e índice de polidispersidad (PDI).*

Muestra	Potencial Zeta (mV)	$D_H$ (nm)	PDI
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@DA$	6.0	165.1	0.223
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$	-26.6	147.5	0.142
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$	-28.9	162.4	0.131

#### 4.4. Ensayos de toxicidad

Se llevó a cabo un estudio de toxicidad de las NPs tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello se utilizaron las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ , cuyas propiedades coloidales quedan resumidas en la **Tabla 4. 9**. El motivo de la elección de esta composición química de la ferrita en concreto, se debe a que presenta una cantidad de zinc intermedia en su estructura, en comparación al resto de muestras de la serie.

##### 4.4.1. Toxicidad *in vitro*

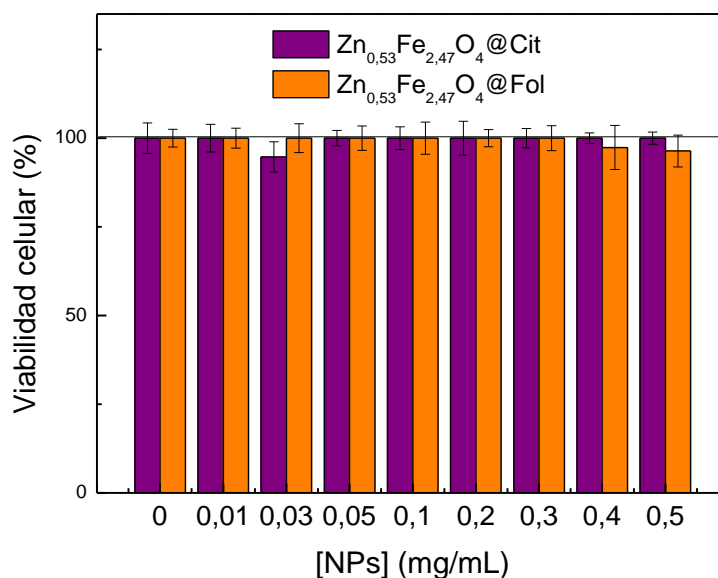
Para los estudios de toxicidad *in vitro* se trabajó con varias líneas celulares, descritas en el apartado 3.6.1. *Toxicidad in vitro*, realizando estudios de viabilidad y toxicidad celular mediante ensayos MTT, de internalización en la línea celular HeLa y de la activación de la respuesta inmune en macrófagos mediante el ensayo Griess.

##### 4.4.1.1. Viabilidad celular

En primer lugar, se realizó un análisis preliminar de viabilidad celular en células HeLa mediante ensayos MTT, a tiempos de exposición a las NPs de 24 horas. Para los experimentos se utilizaron las muestras  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$ , de similar potencial Zeta y  $D_H$  (**Tabla 4. 9**), cuya principal diferencia radica en el recubrimiento superficial. Se analizó un rango de concentraciones de 0 a 0.5 mg/mL de NPs, observando una viabilidad celular en torno al 100%

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en todos los casos (**Figura 4. 24**). Por este motivo se concluye que no hay toxicidad por parte de las NPs en el rango de concentraciones utilizado.

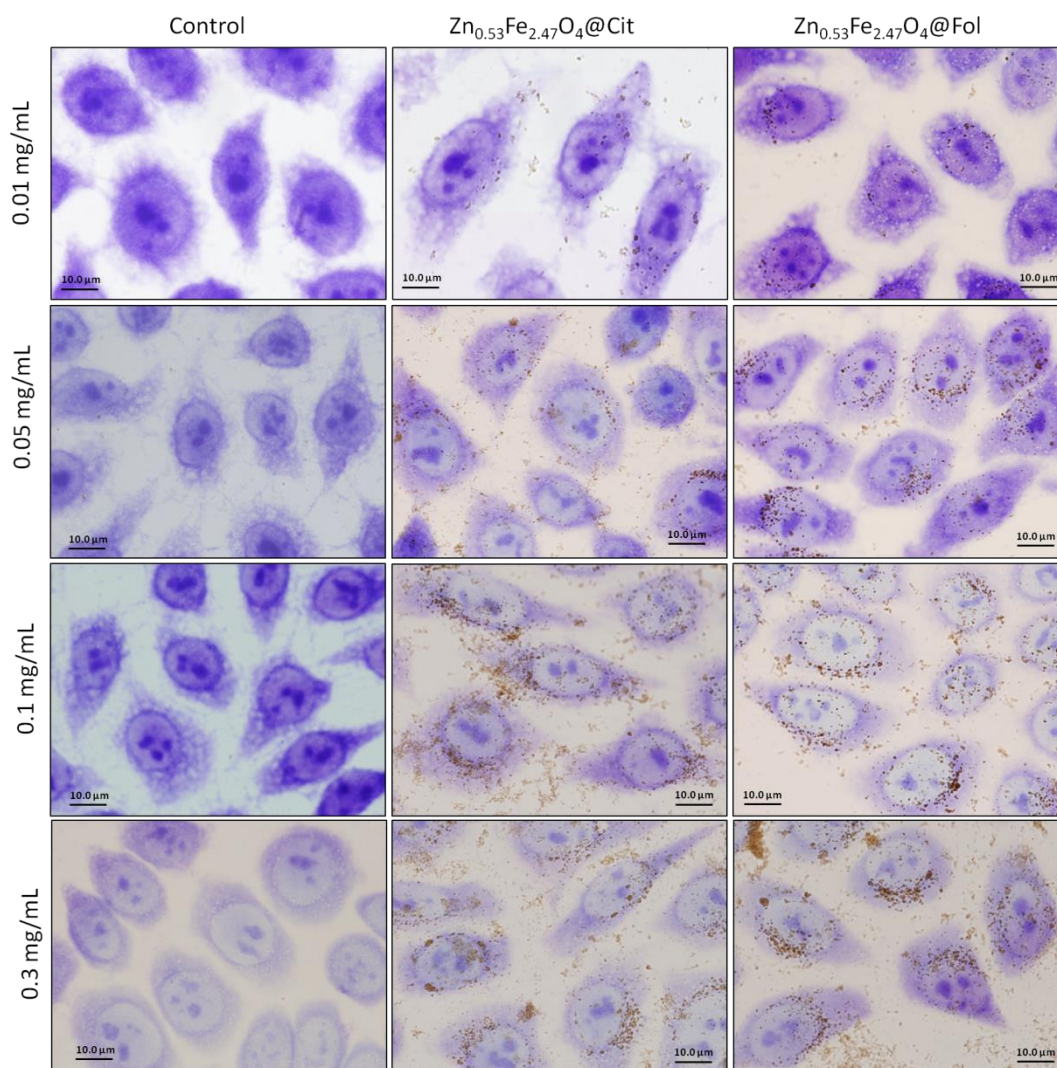


**Figura 4. 24.** Evaluación de viabilidad celular mediante el ensayo MTT, en la línea celular HeLa, tras 24 horas de exposición a las muestras de NPs Zn<sub>0,53</sub>Fe<sub>2,47</sub>O<sub>4</sub>@Cit y Zn<sub>0,53</sub>Fe<sub>2,47</sub>O<sub>4</sub>@Fol.

### 4.4.1.2. Internalización celular

A continuación, se hizo un estudio de internalización en la misma línea celular (HeLa), con el objetivo de comprobar si las NPs son capaces de entrar efectivamente en el interior celular. La **Figura 4. 25** muestra una comparativa entre las dos muestras utilizadas, a diferentes concentraciones.

Se observa un patrón de internalización común en ambos casos. Los dos tipos de NPs son capaces de internalizar en la célula, observando un aumento progresivo en la concentración de NPs en el citoplasma con el aumento de la concentración utilizada. La morfología celular se mantiene similar a la de las células control en todos los experimentos, corroborando la ausencia de toxicidad de las NPs en el rango de concentraciones utilizado y estando en concordancia con los resultados previos obtenidos mediante los ensayos de MTT.



**Figura 4. 25.** Estudio de internalización de las muestras de NPs  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Fol$  a concentraciones de 0.01, 0.05, 0.1 y 0.3 mg/mL, en la línea celular HeLa.

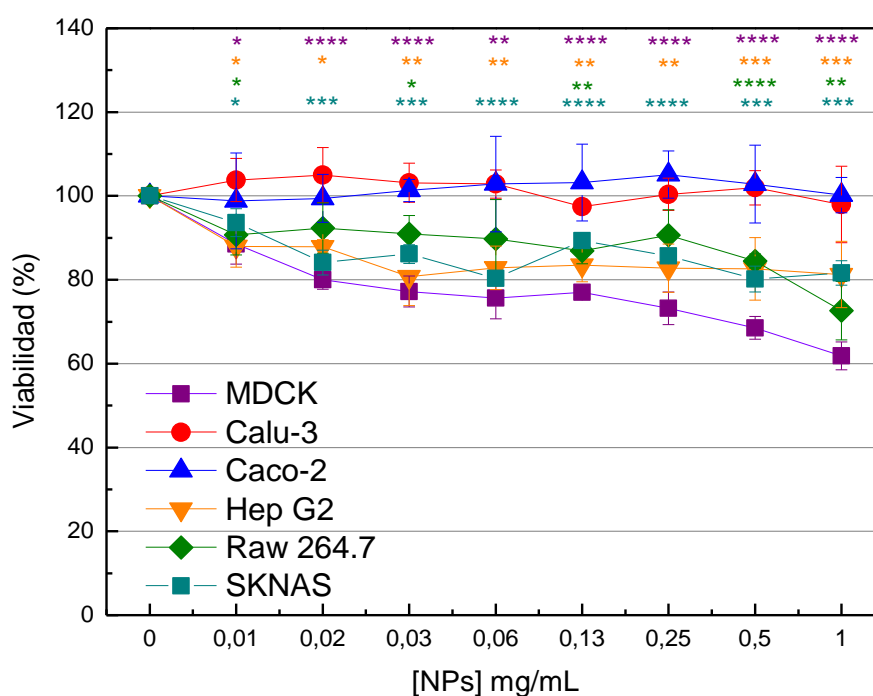
#### 4.4.1.3. Toxicidad celular

Debido a la similitud de los datos obtenidos de estos estudios previos de viabilidad e internalización celular, se decidió realizar los siguientes experimentos de toxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando únicamente la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ .

La **Figura 4. 26** resume el estudio toxicológico realizado mediante ensayos MTT en diversas líneas celulares, incubadas con NPs durante 24 horas en un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/mL. No se observaron evidencias de toxicidad en las líneas celulares CaLu-3 (pulmón) y CaCo-2 (intestino), manteniendo valores de viabilidad celular alrededor del 100% en todo el rango de concentraciones estudiado. En el caso de las líneas celulares Hep G2 (hígado) y SKNAS (sistema nervioso) se observó un ligero descenso de la viabilidad, con valores de en torno a un

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

85% para todo el rango de concentraciones. Por lo tanto, se puede concluir que la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  no es potencialmente tóxica a concentraciones de NPs de hasta 1 mg/mL en dicha línea celular, ya que los valores de viabilidad se mantienen en el rango del 80 al 100%, en comparación con el control. Por último, las líneas celulares Raw 264.7 (macrófagos) y MDCK (riñón) muestran un progresivo descenso de la viabilidad celular con el aumento de la concentración de NPs, llegando a un valor mínimo de 72% y 62% respectivamente, a 1 mg/mL de NPs. Esto parece indicar que las NPs ejercen una moderada toxicidad en estos tipos de líneas celulares en concreto, estando ambos implicados en el proceso de eliminación de las NPs del organismo.



**Figura 4. 26.** Estudio toxicológico mediante ensayos MTT, en las líneas celulares MDCK, CaLu-3, CaCo-2, Hep G2, Raw 264.7 y SKNAS, tras 24 horas de exposición a la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ , en un rango de concentraciones de 0 - 1 mg/mL de NPs. Los valores representan la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba *t* de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

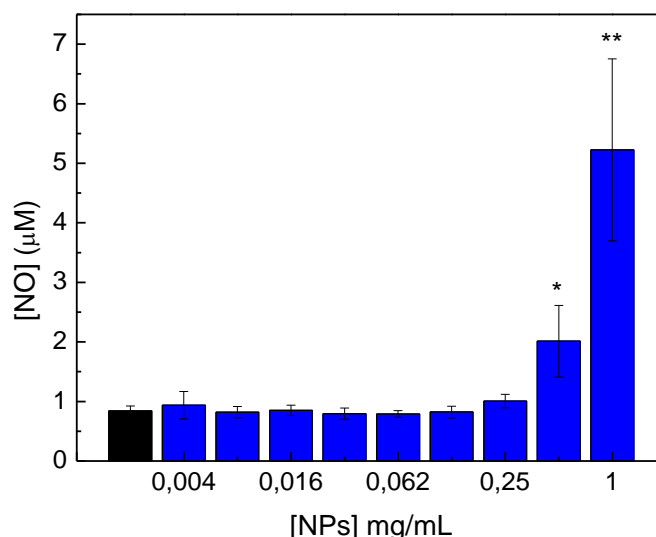
### 4.4.1.4. Ensayo Griess

Los macrófagos son células fagocíticas capaces de reconocer patógenos o partículas extrañas al organismo, en este caso concreto las NPs, activándose y consecuentemente secretando diversos

mediadores químicos involucrados en el proceso de inflamación. Estas moléculas son muy agresivas, no sólo contra moléculas o partículas extrañas, sino también contra los tejidos del órgano en el que se encuentren [262]. Entre ellos, el óxido nítrico (NO) es un marcador clave de la activación de la inflamación [263].

Por ello, se realizó un ensayo Griess de detección de NO en la línea celular Raw 264.7, señal de la activación de la respuesta inmune en macrófagos a consecuencia de la exposición durante 24 horas de éstos a las NPs.

Los resultados se muestran en la **Figura 4. 27**, indicando una activación del sistema inmune a partir de concentraciones de 0.5 mg/mL de NPs, manteniéndose niveles basales para el resto de concentraciones estudiadas.



**Figura 4. 27.** Ensayo Griess de detección de NO en la línea celular Raw 264.7, tras 24 horas de exposición a la muestra  $Zn_{0,53}Fe_{2,47}O_4@Cit$ , en un rango de concentraciones de 0 a 1 mg/mL de NPs. Los valores representan la media  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba t de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

#### 4.4.2. Toxicidad *in vivo*

No es raro obtener resultados contradictorios *in vitro* e *in vivo*, dada la gran cantidad de procesos biológicos que se dan en el organismo, imposibles de reproducir *in vitro*. El modelo animal *Xenopus laevis* ha sido propuesto recientemente como una potencial herramienta capaz de cerrar la brecha entre los ensayos basados en células *in vitro* y los modelos de evaluación de la toxicidad en mamíferos [172]. El uso del modelo de *Xenopus laevis* en combinación con

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

pruebas *in vitro* en líneas celulares de mamíferos constituye una herramienta eficaz, rápida y económica de evaluar la nanotoxicidad antes de realizar pruebas en mamíferos *in vivo*.

Otro punto a tener en cuenta es que, en nanotoxicología, es imprescindible evaluar tasas de exposición de NPs realistas para extraer conclusiones edificantes de los experimentos *in vitro* e *in vivo*. Mientras que la exposición a altas dosis de NPs conduce a una rápida detección y cuantificación del límite de toxicidad, el principal problema de salud pública relacionada con los nanomateriales debería referirse a exposiciones crónicas a dosis más bajas [80].

De acuerdo a ello, se realizó un estudio de toxicidad y biodegradación de NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  *in vivo*, utilizando el modelo animal *Xenopus laevis*, tras la administración vía oral de las NPs. El estudio consiste en una comparativa entre exposiciones a NPs a corto y a largo plazo, proporcionando información sobre los posibles efectos adversos debidos al contacto puntual y crónico con las NPs.

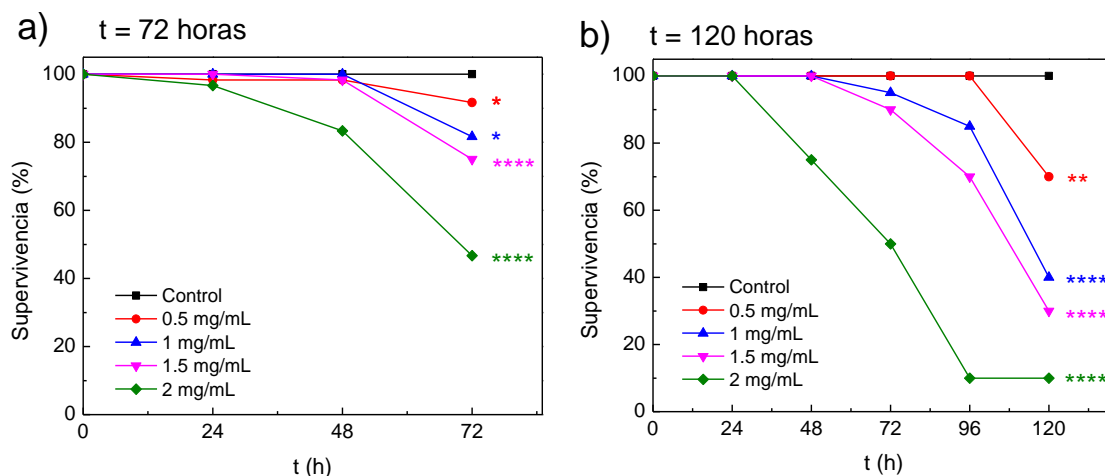
### 4.4.2.1. Viabilidad

Se realizaron dos experimentos de exposición de embriones a diferentes concentraciones de NPs de la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ , concretamente de 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/mL, dejando un grupo de embriones sin tratar a modo de control. En ambos experimentos la exposición de los embriones a las NPs se inició en el estadio 38, hasta alcanzar el estadio 45, previo al proceso de metamorfosis (**Figura 3. 7**). En el primer caso, los embriones se incubaron a una temperatura de 23 °C, alcanzando el estadio 45 en aproximadamente 72 horas. El segundo experimento se llevó a cabo a más baja temperatura, 18 °C, con el objetivo de retrasar su desarrollo. De esta manera, el estadio 45 se alcanza en aproximadamente 120 horas, pudiendo realizar un estudio comparativo a mayores tiempos de exposición a las NPs.

Para determinar el porcentaje de supervivencia tras la exposición a las NPs, se hicieron conteos de embriones muertos cada 24 horas de experimento. En la **Figura 4. 28**, se muestra la evolución de la mortalidad de ambos experimentos, a corto plazo, tras 72 horas y a largo plazo, tras 120 horas de exposición. No se cuantificó ningún embrión muerto en los grupos control de ambos experimentos.

En el experimento a corto plazo (**Figura 4. 28. a**), no se observa una disminución significativa de la viabilidad tras 48 horas de exposición para las diferentes concentraciones de NPs, excepto en el caso de la concentración más alta. Para esta condición experimental, 2 mg/mL, el factor de supervivencia disminuyó hasta un 83% tras 48 horas de exposición y hasta un 48% pasadas 72 horas. El resto de condiciones experimentales mostraron una menor toxicidad, aumentando

progresivamente a medida que se incrementa la concentración de NPs, sin que la tasa de mortalidad sea superior al 25%.



**Figura 4. 28.** Porcentaje de supervivencia de los embriones de *Xenopus laevis* durante los experimentos de exposición a las NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ , tras 72 horas (a) y tras 120 horas (b). Los conteos de embriones muertos se realizaron cada 24 horas. El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba t de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

El experimento a largo plazo (**Figura 4. 28.** reportó resultados similares al experimento previo, hasta las 72 horas. Tras 96 horas, se detectó un aumento drástico de la mortalidad de los embriones en el caso de la concentración más alta, de 2 mg/mL de NPs, con una supervivencia únicamente del 10%. Las NPs mostraron una moderada toxicidad en el caso de la concentración de 1.5 mg/mL, con una supervivencia del 70% y una baja toxicidad para las concentraciones de 1 y 0.5 mg/mL, aumentando progresivamente al aumentar la concentración de NPs. Finalmente, tras 120 horas de exposición a las NPs, se observó una mortalidad significativa en todos los casos, siendo el valor de supervivencia menor al 80% para todas las condiciones experimentales y aumentando la toxicidad de las NPs de una manera dependiente de la dosis.

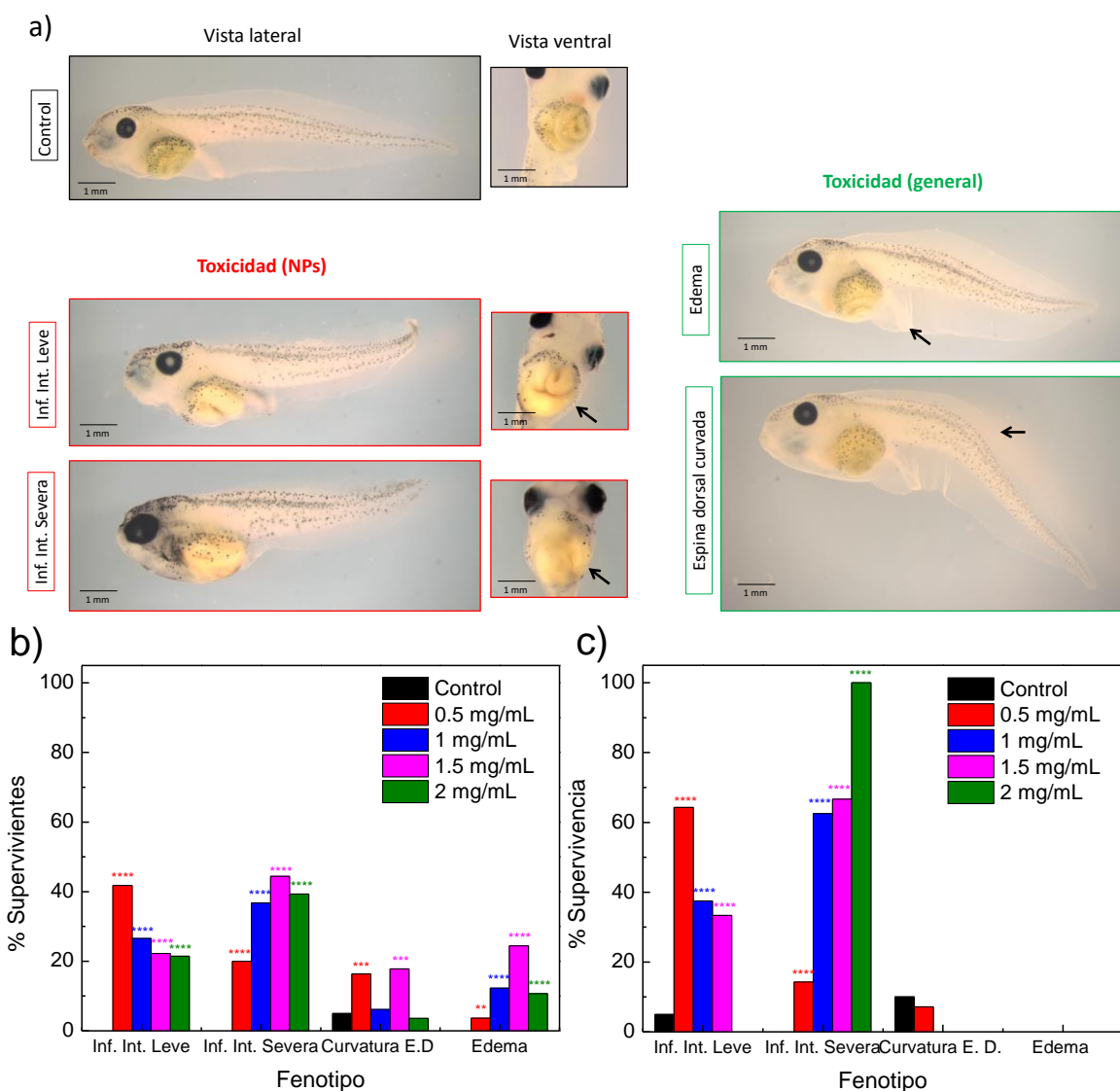
#### 4.4.2.2. Estudio fenotípico

Se realizó un estudio fenotípico de los renacuajos supervivientes tras los experimentos de exposición a las NPs a tiempo corto (72 horas) y a tiempo largo (120 horas), con el objetivo de cuantificar la presencia de fenotipos anormales debido a dicha exposición y su incidencia como consecuencia de la duración del experimento.

En la **Figura 4. 29a** se recogen imágenes representativas de los diferentes fenotipos anormales detectados, en comparación a un embrión control de fenotipo normal. Estos fenotipos consisten

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

en una moderada o severa inflamación intestinal, una curvatura acusada en la espina dorsal y un agrandamiento en la aleta ventral a causa de la presencia de edema.



**Figura 4. 29.** a) Imágenes representativas de los diferentes fenotipos detectados en los ensayos de toxicidad en los embriones de *Xenopus laevis*. b) Cuantificación de fenotipos anormales detectados en los embriones supervivientes de *Xenopus laevis*, tras 72 horas y c) tras 120 horas de exposición a las NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ . El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba Chi-cuadrado, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

La **Figura 4. 29** muestra la cuantificación de la incidencia de los diferentes fenotipos tras las 72 horas (**Figura 4. 29b**) y tras las 120 horas de experimento (**Figura 4. 29c**). La comparación de los fenotipos detectados entre ambos experimentos se hace complicada ya que la cuantificación



está hecha sobre los embriones supervivientes, siendo el índice de supervivencia entre ambos experimentos notablemente diferente (**Figura 4. 28**).

En ambos experimentos se observa inflamación del intestino, ya sea moderada o severa, en todas las condiciones experimentales. El único caso en el que no se detectó inflamación intestinal moderada fue en el experimento de larga duración, a la concentración más alta de NPs (**Figura 4. 29c**), probablemente debido al alto índice de mortalidad de esa condición experimental en concreto. En el resto de condiciones y en ambos experimentos se observa un mismo patrón de inflamación intestinal. Se observa una disminución de la inflamación moderada a medida que aumenta la concentración de NPs, mientras que, de modo contrario, la inflamación severa aumenta con el incremento en la concentración de NPs.

Se detectaron casos de embriones con la espina dorsal curvada en ambos experimentos, sin una tendencia clara asociada a la dosis de exposición a las NPs. Además, también se detectaron casos en los embriones control en un porcentaje similar, no pudiendo asociar este fenotipo a una posible toxicidad por parte de las NPs.

Únicamente se observaron renacuajos con agrandamiento de la aleta ventral a causa de la presencia de edema, en los supervivientes del experimento a corto tiempo de exposición, aumentando el número de casos con el incremento en la concentración de las NPs. Se observa una disminución en el caso de la concentración más alta, de nuevo asociado al aumento en el índice de mortalidad de esa condición experimental.

### 4.4.2.3. Evaluación histológica

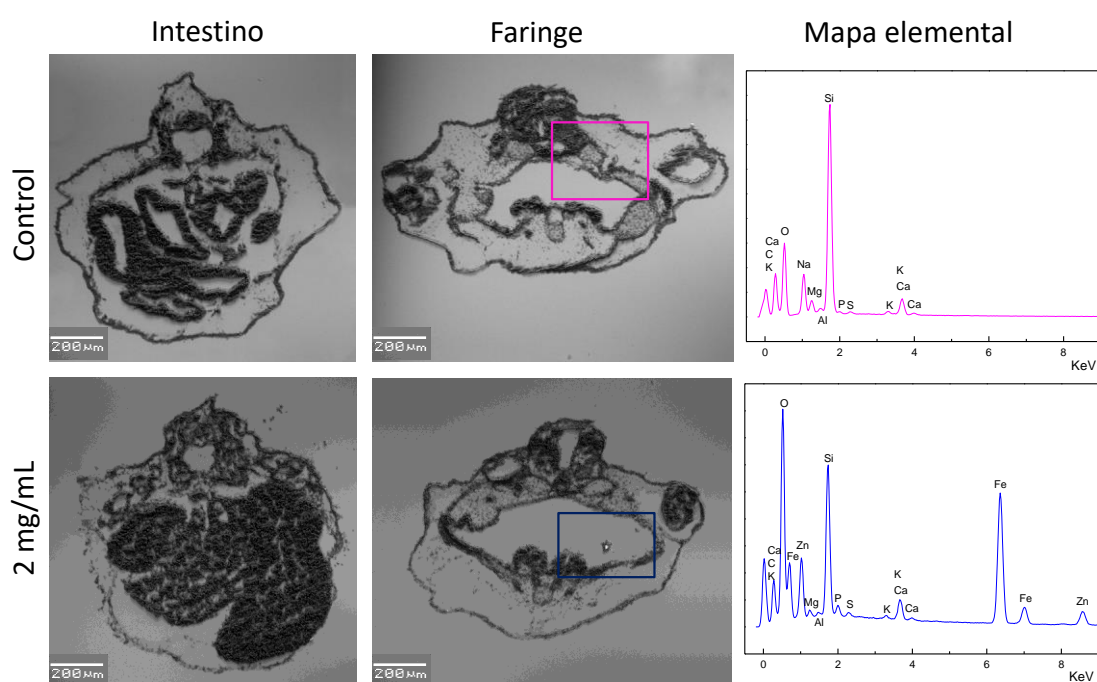
Se realizó un análisis histológico mediante la observación de secciones intestinales y de faringe de diferentes embriones, con un microscopio electrónico de barrido (SEM). La **Figura 4. 30** muestra la comparación entre un embrión control y otro expuesto a una concentración de NPs de 2 mg/mL durante 72 horas, junto a los mapas elementales obtenidos mediante energía dispersiva de rayos X (EDS) de las regiones recuadradas en las secciones de faringe.

Tanto la sección tisular intestinal como la de faringe correspondientes al embrión control, muestran la morfología normal de ambos órganos, es decir, la correspondiente a un individuo sano. En la micrografía del intestino de este individuo es posible distinguir claramente la estructura tubular del órgano, siendo imposible de observar en la micrografía correspondiente al embrión expuesto a las NPs. Como se indicó en el estudio fenotípico, un alto porcentaje de los embriones supervivientes presentaron moderada o severa inflamación intestinal (**Figura 4. 29**).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ejemplo de la **Figura 4. 30** se muestra un embrión con inflamación intestinal severa, presentando dicho órgano deformado y/o no bien desarrollado.

La micrografía correspondiente a la sección de la faringe del embrión expuesto a las NPs no muestra diferencias morfológicas en comparación con el embrión control. En cambio, es posible visualizar la presencia de puntos de mayor contraste, correspondientes a áreas de acumulación de NPs. La composición de las mismas fue analizada haciendo mapeos elementales, detectando la presencia de Fe y Zn en los espectros EDS, no siendo posible su detección en los embriones control. De esta forma queda evidenciada la efectiva ingesta de NPs por parte de los embriones durante los experimentos.



**Figura 4. 30.** Imágenes SEM de secciones de intestino y de faringe de un embrión control y de un embrión expuesto a una concentración de NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  de 2 mg/mL, tras 72 horas de experimento. Los mapas elementales obtenidos mediante SEM-EDS, corresponden a las áreas recuadradas en las imágenes de las secciones de la faringe.

### 4.4.2.4. Cuantificación de Fe y Zn

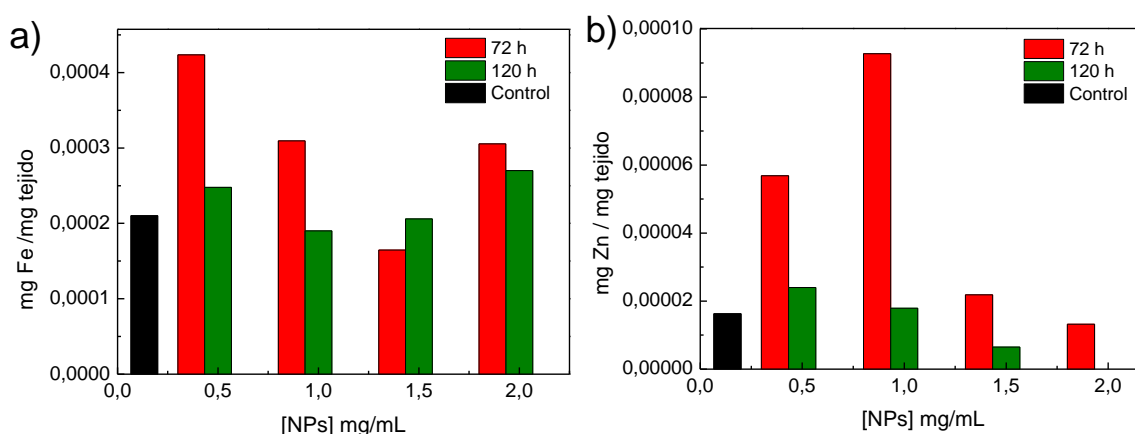
Con el objetivo de cuantificar la cantidad de Fe y Zn acumulada en el organismo de los embriones tras la ingesta de NPs y la comparación entre ambos experimentos a diferentes tiempos de exposición, se llevó a cabo el análisis elemental del tejido embrionario mediante ICP-OES.

La **Figura 4. 31** contiene la cuantificación de Fe y Zn obtenida por ICP-OES de muestras de tejido embrionario de las diferentes condiciones experimentales (concentración de NPs y tiempo de exposición a las mismas), en comparación a los niveles fisiológicos de ambos elementos detectados en los embriones control.

En términos generales, se observa un claro incremento de los niveles de Fe y Zn tras la exposición a las NPs a corto plazo en comparación con los niveles fisiológicos, mientras que la concentración de ambos elementos se mantiene en torno a los niveles basales tras la exposición a largo plazo.

Más concretamente, el experimento a corto plazo muestra un incremento en las cantidades de Fe y Zn en los embriones expuestos a 0.5 y 1 mg/mL de NPs, disminuyendo dichos valores en embriones expuestos a mayores concentraciones de NPs, 1.5 y 2 mg/mL. Este hecho puede ser un signo indicativo de la activación de las rutas metabólicas del Fe y del Zn, junto con el comienzo del proceso de excreción de ambos elementos.

En el experimento a largo plazo, los niveles de Fe y Zn se mantienen en torno a los valores fisiológicos en todas las condiciones experimentales. Esto indica que tras 120 horas de exposición a las NPs, éstas han sido completamente metabolizadas y excretadas, sin evidencias de acumulación de las mismas en el organismo de los embriones.



**Figura 4. 31.** Contenido de Fe (a) y Zn (b), obtenido mediante ICP-OES, presente en el tejido embrionario de *Xenopus Laevis* expuestos a las diferentes concentraciones de NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ , tras 72 horas (rojo) y tras 120 horas (verde) de experimento, en referencia a los contenidos detectados en embriones sin tratar (negro).

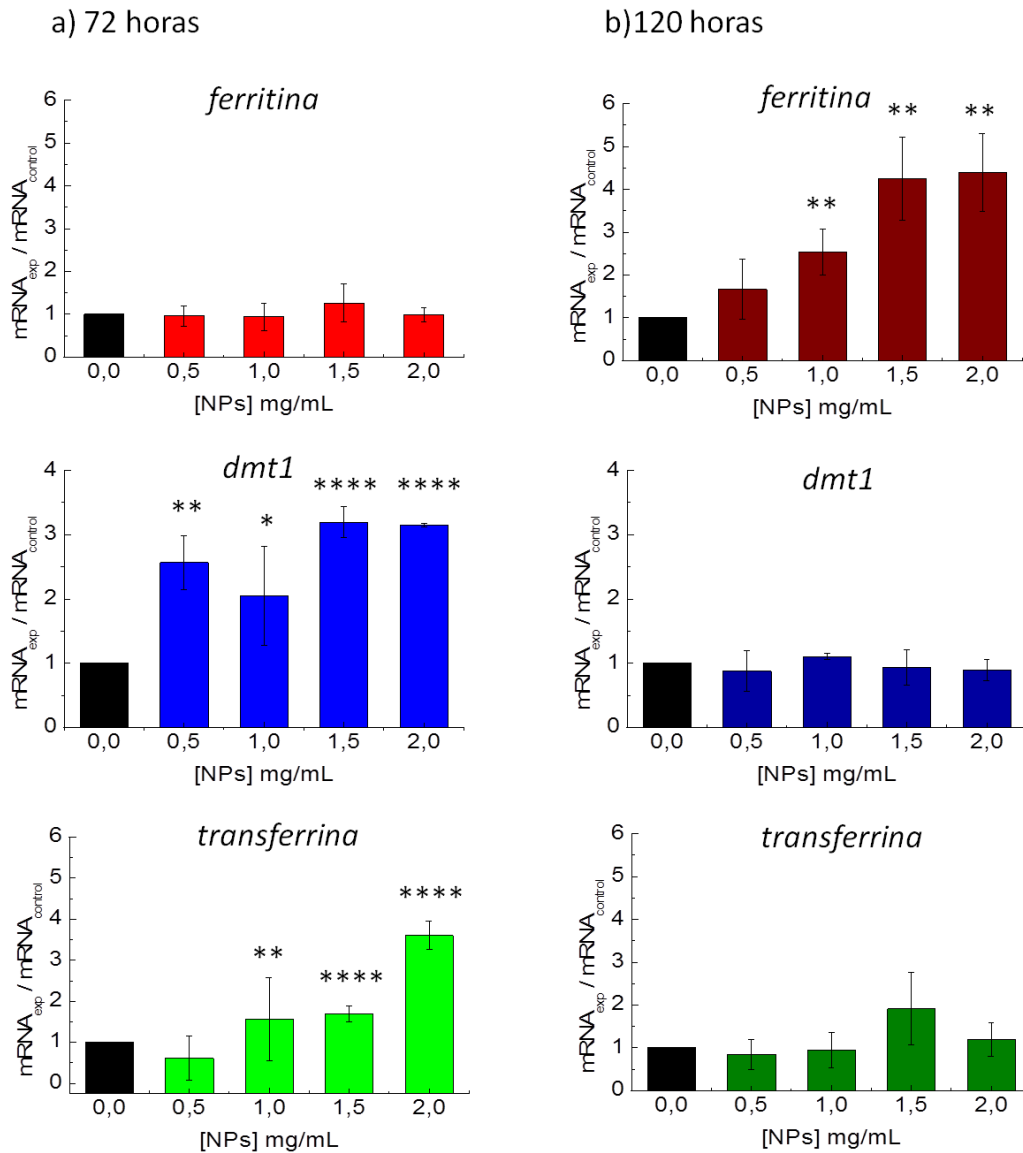
### 4.4.2.5. Metabolismo y biodegradación

Dada la implicación del hierro y del zinc en un gran número de procesos celulares, los organismos presentan diversos mecanismos para su transporte y almacenamiento de forma no tóxica [95] [96]. Debido a esto, existe la posibilidad de que ambos elementos sean incluidos y procesados por las rutas metabólicas tras la degradación de las NPs. Por este motivo, se analizó la expresión de algunos de los principales genes implicados en el metabolismo del Fe y del Zn mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), realizando un estudio comparativo de los niveles de expresión génica tras los experimentos de exposición de los embriones de *Xenopus laevis* a corto (72 horas) y a largo plazo (120 horas), a las diferentes concentraciones de NPs.

La **Figura 4. 32** muestra la expresión génica de *ferritina*, *dmt1* y *transferrina*, todas ellas proteínas implicadas en el metabolismo del Fe. Los niveles de expresión de *ferritina* permanecieron constantes a tiempos cortos de exposición a las NPs. Por el contrario, su expresión se vio incrementada a tiempos largos de exposición, hasta 4 veces más en comparación con el control, de una forma dependiente a la dosis de NPs. Las expresiones de *dmt1* y de *transferrina* presentaron un comportamiento opuesto, estando reguladas positivamente tras la exposición a corto plazo y recuperando niveles basales tras la exposición a largo plazo. Concretamente, los niveles de expresión de *dmt1* aumentaron alrededor de 3 veces en comparación con el control, independientemente de la concentración de NPs suministrada, mientras que los niveles de expresión de *transferrina* se incrementaron progresivamente con el aumento de la dosis de NPs.

Los resultados obtenidos en el experimento a corto plazo muestran que, en una primera etapa posterior a la ingesta de las NPs, se produce la sobre-expresión del transportador de metales divalentes DMT1, localizado en la membrana apical de los enterocitos y el principal responsable de la absorción de Fe proveniente de la dieta [183]. Cabe mencionar que el transportador DMT1 no es selectivo de  $\text{Fe}^{2+}$  y que debido a la presencia de  $\text{Zn}^{2+}$  en la composición de las NPs, la regulación positiva de este gen puede estar a su vez influenciada por dicho elemento. Después de transitar la célula, el Fe sale de ella a través del transportador Ferroportina, ubicado en la membrana basolateral de los enterocitos, para ser posteriormente unido a la proteína Transferrina, una glicoproteína transportadora de Fe en plasma [184]. La expresión de esta última proteína, Transferrina, está también regulada positivamente tras la exposición a corto plazo a las NPs, de una manera dependiente de la dosis, permitiendo el transporte de Fe a través del torrente sanguíneo para alcanzar los diferentes órganos. Por el contrario, la expresión de Ferritina, la principal proteína de almacenamiento del Fe en el interior celular [184] mantiene

niveles basales, lo que indica la incompleta metabolización de dicho elemento tras este periodo de tiempo.

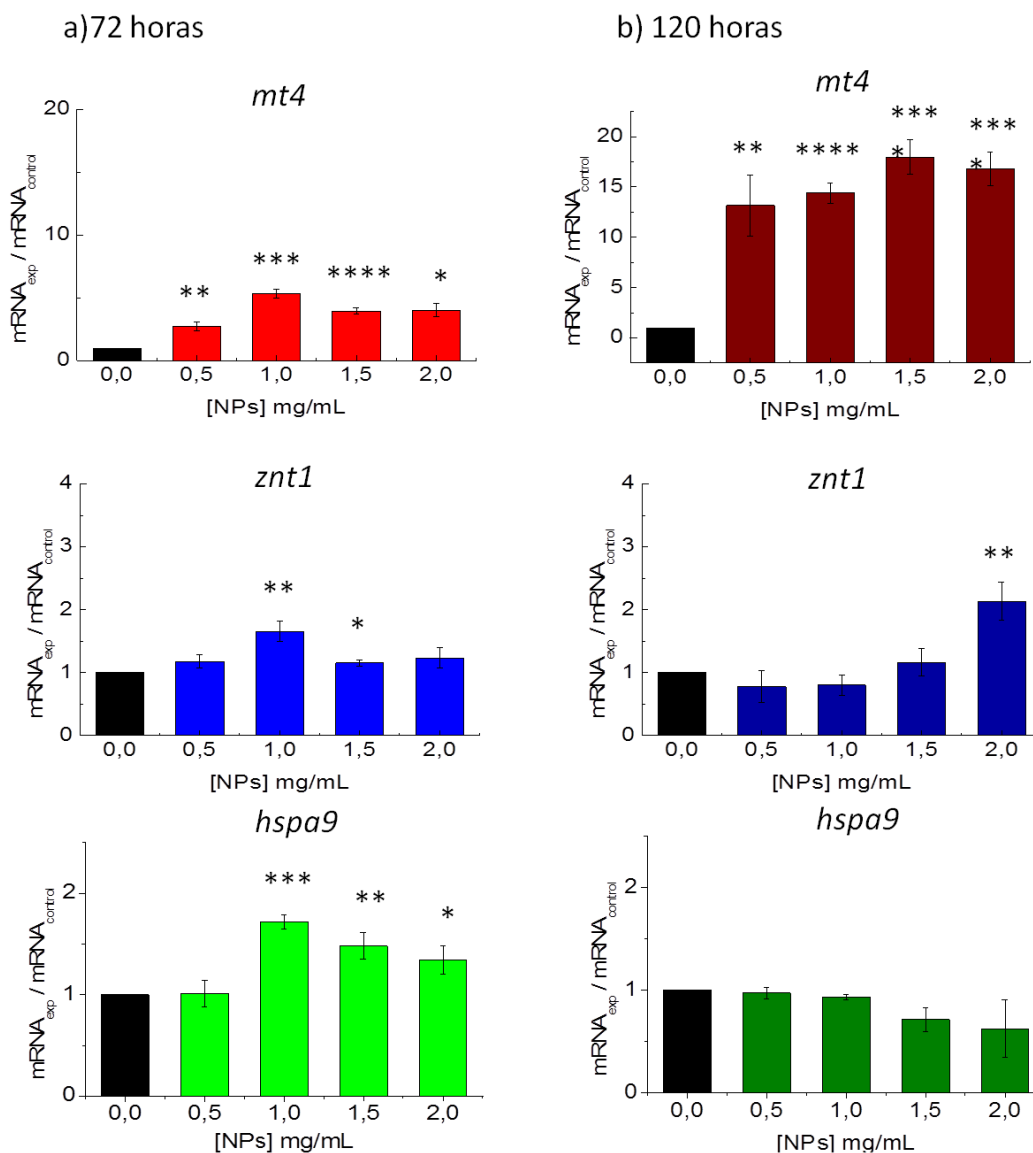


**Figura 4. 32.** Cuantificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo del hierro en embriones de *Xenopus Laevis*, tras 72 horas (a) y tras 120 horas (b) de exposición a las NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ . El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba t de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

La **Figura 4. 33** muestra la expresión de los genes *mt4*, *znt1* y *hspa9*, relacionados con el metabolismo del Zn. Se observa la sobre-expresión de todos ellos tras la exposición a las NPs de los embriones a corto plazo, alcanzando los valores máximos de 5.3, 1.6 y 1.7 veces más en comparación con el control, en la condición experimental de 1 mg/mL de NPs. Este valor máximo de sobre-expresión génica coincide con la concentración de Zn máxima detectada mediante

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ICP-OES (**Figura 4. 31b**) para la misma concentración de NPs. Por el contrario, la expresión génica disminuye al aumentar la dosis de NPs. El experimento a largo plazo muestra la notable sobreexpresión de *mt4*, alrededor de 15 veces más en comparación con el control, para todas las condiciones experimentales. La expresión de *znt1* se ve incrementada de forma representativa, 2 veces en comparación con el control, únicamente tras la exposición a la concentración más alta de NPs, 2 mg/mL, mientras que la expresión de *hspa9* mantiene los niveles basales en todo el rango de NPs utilizado.



**Figura 4. 33.** Cuantificación de la expresión de genes implicados en el metabolismo del zinc en embriones de *Xenopus Laevis*, tras 72 horas (a) y tras 120 horas (b) de exposición a las NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ . El símbolo (\*) muestra la significación estadística en comparación con el control. (Prueba t de Student, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

La proteína ZnT1 es un transportador de membrana perteneciente a la familia de las proteínas ZnT, responsable de disminuir la cantidad de Zn intracelular mediando la salida de éste al exterior celular o su entrada a vesículas intracelulares [185]. Después de la absorción de Zn proveniente de la dieta en el intestino a través del transportador Zip4, ubicado en la membrana apical de los enterocitos [186], ZnT1, que parece ser el único transportador de la familia ZnT localizado en la membrana plasmática, actúa como el principal regulador de la salida de Zn de la célula [264]. En el experimento a corto plazo, su expresión se ve incrementada a partir de la condición experimental de 1 mg/mL de NPs, disminuyendo ligeramente a dosis mayores de NPs y siguiendo un patrón similar a los resultados obtenidos mediante ICP-OES (**Figura 4. 31b**). Este comportamiento parece ser un signo de la activación del metabolismo del Zn y del comienzo del proceso de excreción, con la consiguiente disminución de Zn en el organismo. Tras la exposición de las NPs a largo plazo, sólo se detectó un aumento significativo en la expresión de este gen a la concentración más alta de NPs, lo que indica que en este punto, pasadas 120 horas tras la exposición de los embriones a las NPs, el organismo se encuentra en la etapa final del proceso de excreción.

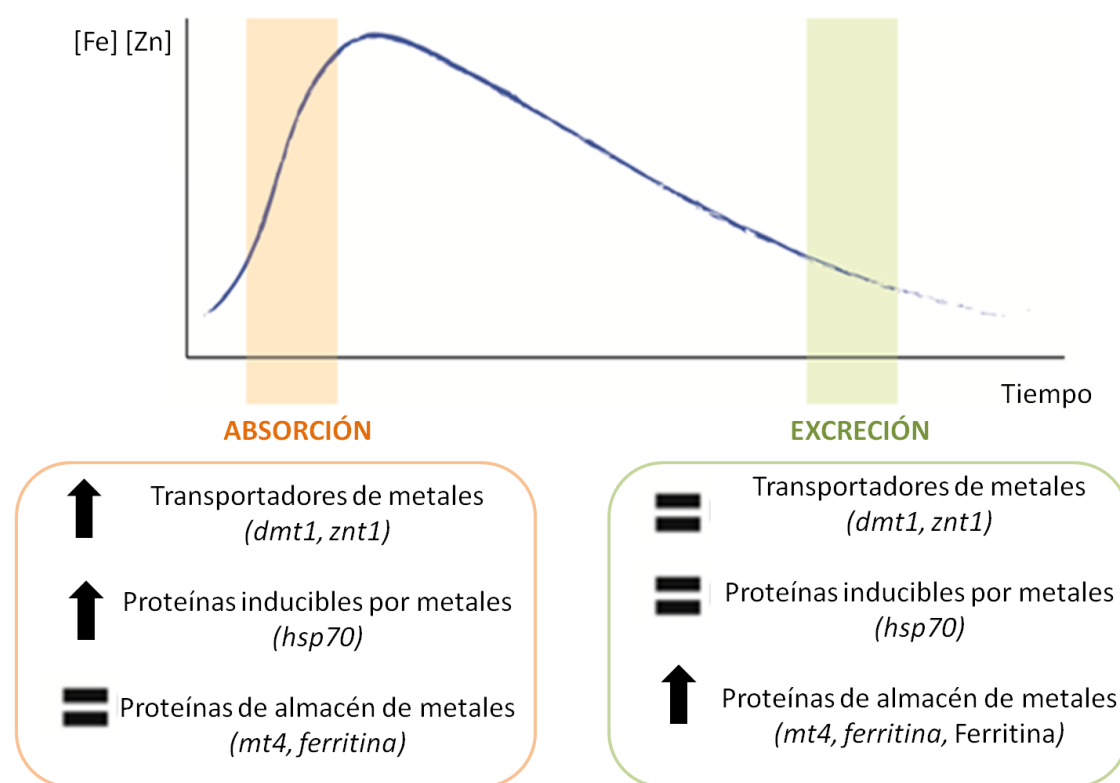
Hspa9 es una proteína de choque térmico mitocondrial de 70 kDa (mtHsp70) que participa en diversas rutas celulares regulando procesos como la proliferación celular, la tumorigénesis o la respuesta al estrés [187]. Esta proteína se encuentra altamente expresada en la etapa más temprana de desarrollo del sistema renal en *Xenopus laevis* [265] y su regulación está inducida por la proteína Zim17 [265], que contiene un motivo “dedo de Zn” [266] en su estructura. Su expresión parece estar regulada en concordancia a los niveles de concentración de Zn: se sobre-expresa a corto plazo y no se induce tras una exposición prolongada a las NPs, lo que corrobora el proceso completo de excreción del Zn en esta etapa.

Por último, la expresión del gen *mt4* se encuentra regulada positivamente tras las exposiciones a las NPs, tanto a corto como a largo plazo, con un mayor incremento de la expresión en esta última condición experimental. La proteína Mt4 pertenece a la familia de las metalotieninas, que son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína, implicadas en la regulación de la homeostasis de Zn en el citoplasma celular [93]. Su sobre-expresión confirma la efectiva absorción de Zn en la etapa de exposición a las NPs a corto plazo, alcanzando valores de saturación tras largos tiempos de exposición. Estos resultados están en concordancia con la regulación positiva del gen *znt1*, promoviendo la salida del exceso de Zn al exterior celular para su posterior eliminación.

En resumen, los patrones de expresión de los genes relacionados con el metabolismo de Fe y Zn parecen indicar que, tras un corto periodo de exposición (72 horas) de los embriones de

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Xenopus laevis* a las NPs de ferrita de zinc, se produce una activación de los mecanismos de absorción de Fe y Zn por parte del organismo, con la consecuente sobre-expresión de proteínas transportadoras e inducibles por dichos metales. Tras un largo periodo de exposición (120 horas), dichas proteínas recuperan sus niveles de expresión basal, mientras que se produce la sobre-expresión de proteínas encargadas del almacenamiento de Fe y Zn, hecho indicativo de la completa absorción y metabolización de ambos elementos. En este punto, los resultados de ICP-OES indican que las concentraciones de ambos metales se encuentran a su vez en torno a los niveles basales, señal de que, tras este periodo de tiempo, el proceso de excreción del exceso de Fe y Zn se encuentra en su última etapa (**Figura 4. 34**). En el caso concreto del metabolismo de Zn, existe una superposición parcial entre ambos procesos en el experimento a corto plazo, lo que sugiere que estas rutas metabólicas tienen lugar más rápidamente que las equivalentes para el Fe. De modo que, sería necesario realizar un experimento en una escala de tiempo intermedia para poder determinar el comienzo y fin de ambos procesos con mayor precisión.



**Figura 4. 34.** Representación esquemática de la variación en la concentración de Fe y Zn en el organismo de los embriones de *Xenopus laevis* en función del tiempo. En la parte inferior se indican los niveles de expresión de los transportadores y proteínas implicados en el metabolismo de ambos elementos, en función de la etapa de absorción (*naranja*) y de excreción (*verde*).



### 4.4.2.5.1. Acumulación de las NPs

Con el objetivo de evaluar la acumulación de las NPs en el organismo, se realizaron medidas de susceptibilidad magnética en campo alterno de tejido embrionario de cada condición experimental. Esta técnica, debido a su gran sensibilidad, permite discriminar entre la contribución magnética de las NPs de la proveniente de las especies endógenas portadoras de Fe. Estas especies se encuentran generalmente a una mayor concentración, pero dan lugar a una señal magnética más débil que la de las NPs. No es posible la detección de Zn mediante esta técnica debido a su naturaleza no magnética.

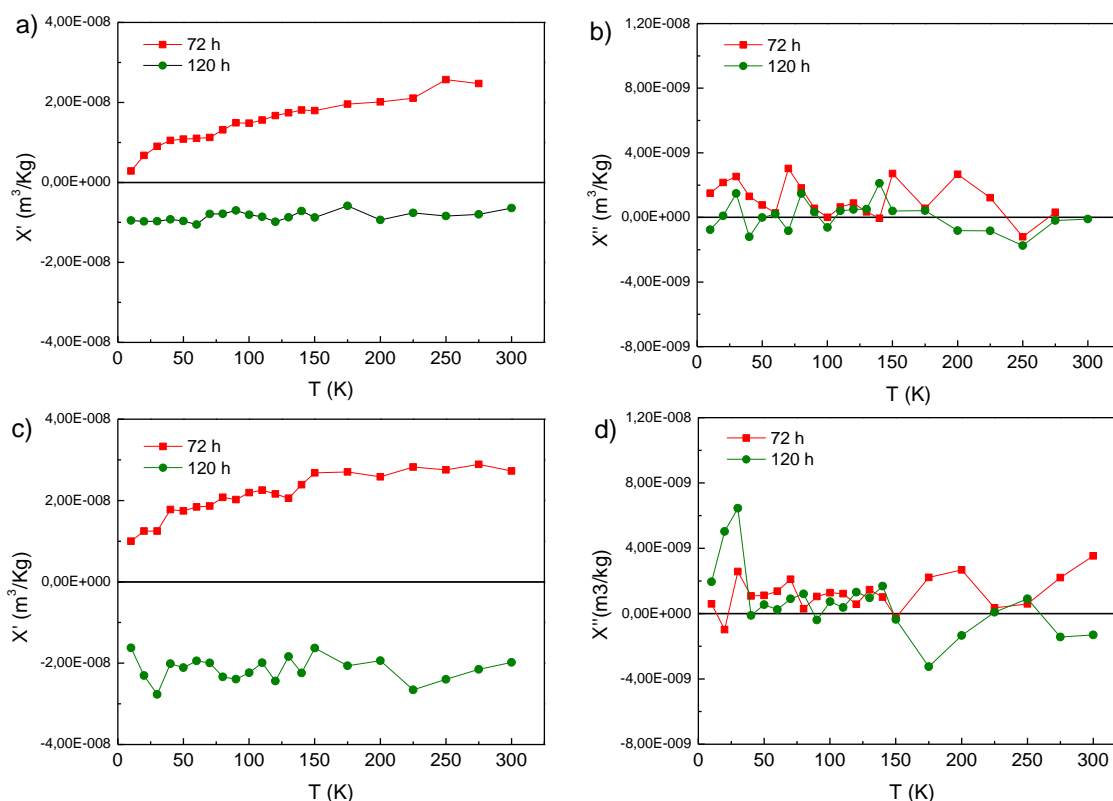
La **Figura 4. 35** muestra las componentes en fase ( $\chi'$ ) y fuera de fase ( $\chi''$ ) de la susceptibilidad magnética de muestras de tejido biológico obtenido tras los experimentos de exposición de los embriones de *Xenopus laevis* a las NPs, a corto y a largo plazo (72 y 120 horas). Se muestran, en concreto, las concentraciones de 1 mg/mL (**Figura 4. 35a** y **Figura 4. 35b**) y de 2 mg/mL de NPs (**Figura 4. 35c** y **Figura 4. 35d**), ya que no fue posible detectar señal magnética para el resto de condiciones experimentales.

El aumento de la  $\chi'$  con la temperatura observada en los experimentos a corto plazo de exposición (**Figura 4. 35a** y **Figura 4. 35c**) indica la presencia de NPs en el organismo de los embriones. Por el contrario, en los experimentos a largo tiempo de exposición solo se observa una señal diamagnética débil (negativa y constante en todo el rango de temperatura) en la contribución de  $\chi'$ , lo que indica que la posible presencia de cualquier partícula restante se encuentra por debajo del límite de detección de esta técnica. Estos resultados están de nuevo en concordancia con los obtenidos mediante el análisis ICP-OES (**Figura 4. 31a**) y las conclusiones derivadas del estudio de metabolismo y degradación de las NPs, corroborando que, tras 72 horas de exposición a las NPs, el organismo se encuentra en la fase de absorción de las mismas. Pasadas 120 horas de exposición, el proceso de absorción ha concluido y el organismo se encuentra en la última etapa del proceso de excreción de las NPs [267].

Adicionalmente, fue posible detectar la presencia de ferritina, la principal proteína de almacenamiento de hierro en el organismo, mediante el máximo en la gráfica  $\chi''$  del experimento de exposición a largo plazo a la concentración de 2 mg/mL de NPs en torno a los 10 K (**Figura 4. 35d**). La ubicación de la temperatura de esta señal concuerda con mediciones previas de esta proteína [268], cuyo núcleo biomineralizado presenta siempre un comportamiento magnético similar (independientemente del ser vivo) cuando se mide en las mismas condiciones. Estos resultados están de acuerdo con la sobre-expresión de ferritina

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

observada para esta condición experimental señalada por los resultados de RT-qPCR (Figura 4. 32).



**Figura 4. 35.** Medidas de susceptibilidad magnética con campo alterno de tejido embrionario de *Xenopus laevis*. Componentes en fase ( $\chi'(T)$ ) y fuera de fase ( $\chi''(T)$ ) de la susceptibilidad magnética, por masa de muestra, correspondientes a tejidos liofilizados de grupos de embriones tras 72 horas (rojo) y tras 120 horas (verde) de exposición a concentraciones de a) y b) 1 mg/mL y c) y d) 2 mg/mL de NPs.

### 4.5. Aplicaciones biomédicas

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de las NPs como posibles agentes biomédicos en tratamientos térmicos combinados contra el cáncer. Concretamente, se estudió su efectividad en tratamientos de hipertermia magnética y de terapia fototérmica.

#### 4.5.1. Hipertermia magnética

Como se comentó previamente en el apartado 1.3.1.1, una de las principales limitaciones en los tratamientos de hipertermia magnética mediados por NPs es la dificultad para ejercer un control preciso de la temperatura alcanzada en el tejido tumoral con el objetivo de no dañar los tejidos

sanos. Por ello, uno de los principales objetivos de este trabajo era el diseño de un agente termosensibilizador para terapias de hipertermia magnética, que aparte de ser biocompatible, posea unas propiedades magnéticas adecuadas y presente una  $T_C$  justo por encima de la temperatura terapéutica,  $\sim 43$  °C. Este control sobre la  $T_C$  haría posible que las NPs dejaran de calentar una vez alcanzada la temperatura deseada, evitando el sobrecalentamiento de la zona a tratar y de tejidos adyacentes [127] [128].

Analizando los resultados obtenidos en el estudio magnético de la serie de muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ) detallado en el apartado 4.1.4.3. *Caracterización magnética.*, se llega a la conclusión de que la muestra más apropiada para ser empleada en tratamientos de hipertermia magnética es la de composición  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$ . En primer lugar, ésta presenta comportamiento superparamagnético a 290 K (**Figura 4. 20**) y una  $M_S$  de 42 emu/g (**Tabla 4. 8**), características necesarias para su uso en biomedicina y su manipulación magnética, respectivamente. En segundo lugar, las curvas ZFC/FC (**Figura 4. 19**) indican que el valor de  $T_C$  correspondiente a esta muestra está por encima de la temperatura ambiente. Aunque no se puede asegurar que el valor de la  $T_C$  sea de 43 °C, esta composición de NPs posee la relación de propiedades magnéticas más comprometida de la serie. Por este motivo, los experimentos se realizaron con muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  de NPs, ya que además es necesario que las NPs cuenten con buenas propiedades coloidales.

Los experimentos se realizaron tomando 1 mL de una suspensión coloidal de NPs a diferentes concentraciones (15, 10 y 5 mg/mL), frecuencias de trabajo (111.7, 468 y 331 KHz) y amplitudes de campo magnético (232, 127 y 80 Oe) (**Tabla 4. 10**). Como se indicó previamente en el apartado 1.3.1.1. *Hipertermia magnética*, el límite experimental establecido entre el producto de la frecuencia y la amplitud del campo aplicado no debe exceder los  $5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$  [48] [126]. La temperatura de las muestras se registró durante 300 s tras la aplicación del campo magnético, calculando el incremento de temperatura a partir de la región estable y lineal. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Inicialmente, se realizaron medidas con las tres concentraciones de NPs (15, 10 y 5 mg/mL) en las mismas condiciones experimentales, es decir, misma frecuencia y amplitud de campo aplicado, con el fin de determinar la concentración óptima. Se observó que la muestra de 15 mg/mL de concentración se desestabilizaba rápidamente al aplicar el campo, sedimentándose las NPs en el fondo del recipiente. Las muestras de 10 y 5 mg/mL de concentración permanecían estables durante más tiempo, aunque la muestra de menor concentración reportó un menor incremento de temperatura.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

**Tabla 4. 10.** Condiciones de medida (frecuencia y campo aplicado) y valores de SAR obtenidos para la muestra  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  (10 mg/mL) en los experimentos de hipertermia magnética.

Frecuencia (kHz)	Campo (Oe)	$\Delta T$ (°C)	SAR (W/g)
111.7	127	1.4 (0.4)	5.5 (2.0)
331	127	2.6 (0.2)	14.3 (1.2)
111.7	232	4.5 (1.1)	15.8 (0.7)
111.7	232	3.6 (0.9)	14.8 (0.8)

Por estos motivos se consideró que la concentración óptima era la de 10 mg/mL de NPs. Se realizaron medidas con diferentes combinaciones de frecuencia y amplitud de campo. La **Tabla 4. 10** recoge los valores de SAR obtenidos más representativos, ya que no todas las condiciones de trabajo reportaron incrementos de temperatura detectables.

El valor de SAR más alto obtenido fue de 15.8 W/g, correspondiente a la muestra medida con las condiciones experimentales de 111.7 kHz y 232 Oe, con un incremento de temperatura de 4.5 °C.

Además, se midió el incremento de temperatura generado en las mismas condiciones experimentales, pero con las NPs embebidas en agar-agar, un medio de alta densidad en comparación con el agua. Debido a la alta densidad del medio, el movimiento rotacional de las NPs, es decir, el mecanismo de calentamiento Browniano está impedido. De modo que el calentamiento generado se deberá únicamente al producido mediante el mecanismo de calentamiento de tipo Néel, debido a la rotación interna de los momentos magnéticos. El valor de SAR obtenido en estas condiciones fue de 14.8 W/g, ligeramente más bajo que el obtenido al utilizar agua como medio dispersante. De igual manera, esta muestra reportó un menor incremento de temperatura, concretamente de 3.6 °C. Por lo tanto, se concluye que el mecanismo de calentamiento predominante de las NPs es el de tipo Néel, con una pequeña contribución del mecanismo de tipo Brown, motivo por el cual el incremento de temperatura obtenido es ligeramente menor.

El resto de condiciones experimentales mostraron valores menores de SAR. Concretamente, la muestra medida a la misma frecuencia, 111.7 kHz, y menor amplitud de campo, 127 Oe, reportó un valor de SAR de 5.5 W/g y un incremento de temperatura de 1.4 °C, mientras que con la

muestra medida aplicando el mismo campo y aumentando la frecuencia a 331 kHz se obtuvo un valor de SAR de 14.3 W/g y un incremento de temperatura de 2.6 °C (**Tabla 4. 10**).

Cabe decir que tanto los valores de SAR obtenidos como los incrementos de temperatura registrados son bajos, no siendo adecuados para su empleo como agentes termosensibilizadores en terapias de hipertermia magnética [48] [269] [270] [271].

### 4.5.2. Terapia fototérmica

Igualmente, se evaluó el uso de las NPs de ferrita de zinc sintetizadas en terapia fototérmica. En este caso se estudiaron además de la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{Cit}$ , otras dos composiciones,  $\text{Zn}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4@\text{Cit}$  y  $\text{Zn}_{0.80}\text{Fe}_{2.20}\text{O}_4@\text{Cit}$ , con el objetivo de llevar a cabo el análisis de la respuesta de calentamiento fototérmico de las NPs de ferrita de zinc en función de la composición química de las mismas, es decir en función de la cantidad de zinc en la estructura, ya que no existían estudios previos en la literatura. Para ello, se realizaron experimentos con suspensiones acuosas de 0.25 mg/mL de tres muestras de NPs de diferente composición,  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4@\text{Cit}$  ( $x = 0.17, 0.53, 0.80$ ), irradiándolas con un láser de 800 nm. Además, se estudió su capacidad de calentamiento en función de la densidad de potencia de láser aplicada empleándose densidades de potencia de 0.6, 0.8, 1.1 y 1.4 W/cm<sup>2</sup>.

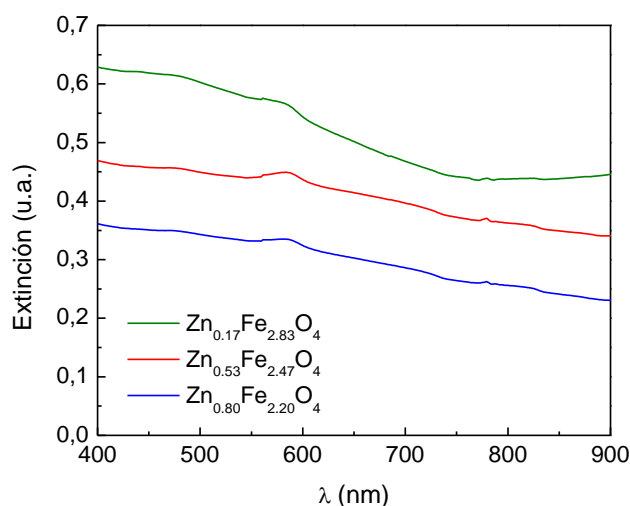
Previamente se caracterizaron las NPs para comprobar que presentaban además de un tamaño de cristal similar un recubrimiento orgánico parecido, con el objetivo de estudiar exclusivamente la influencia del contenido de Zn en su eficacia de calentamiento. En la **Tabla 4. 11** se muestra el porcentaje de pérdida de masa equivalente a la cantidad de recubrimiento orgánico de las muestras, junto con la caracterización coloidal de las mismas a pH 7. Se observa que, en todos los casos, la pérdida de masa se encuentra en un rango del 8 al 10% del peso total de las NPs. La caracterización coloidal muestra valores similares de  $D_H$  y potencial Zeta para las tres muestras. Por ello, puede asumirse que las NPs difieren únicamente en la composición química, es decir, la cantidad de zinc en la estructura cristalina.

En primer lugar, se investigaron las tres composiciones de NPs mediante espectroscopía UV-Vis, mostrando una extinción óptica efectiva en las regiones del NIR y del visible (**Figura 4. 36**). Aparentemente, existe una dependencia entre la composición química de las NPs y el coeficiente de extinción, que tiende a disminuir a medida que aumenta la cantidad de zinc en la muestra. Tang et al. reportaron un fenómeno similar dado en NPs de magnetita de 10 nm. En ese caso la reducción de absorción de luz en la región NIR se asociaba a la disminución de cationes  $\text{Fe}^{2+}$  en la estructura cristalina debido a la oxidación de magnetita a maghemita [272].

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Tabla 4. 11.** Porcentaje de recubrimiento orgánico determinado por TGA y propiedades coloidales de las muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Cit$  ( $x = 0.17, 0.53, 0.80$ ), incluyendo el tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ), PDI (índice de polidispersidad) y los valores de potencial Zeta de la suspensión acuosa de NPs a pH 7.

Muestra	Recubrimiento orgánico (%)	$D_H$ (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)
$Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4@Citric$	9	198	0.210	-46 (4)
$Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Citric$	10	187	0.243	-44 (3)
$Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4@Citric$	8	196	0.180	-40 (4)

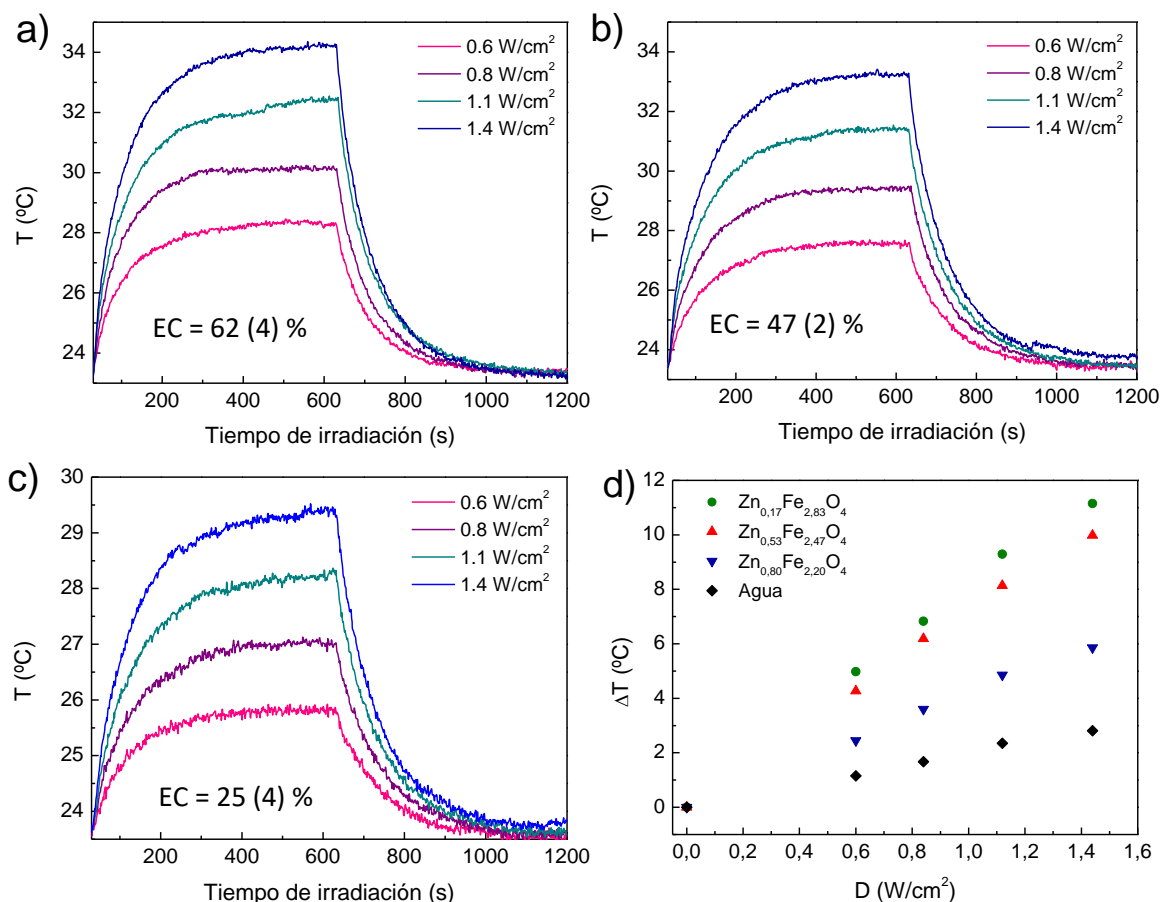


**Figura 4. 36.** Espectros de extinción UV-Vis de las muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Cit$  ( $x = 0.17, 0.53, 0.80$ ) en función de la composición química de las mismas.

La **Figura 4. 37a** muestra el incremento de temperatura de la suspensión acuosa de la muestra de NPs de composición  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4@Cit$ , al ser irradiada durante 10 minutos con las diferentes densidades de potencia del láser detalladas previamente. Se observa el mismo patrón de calentamiento de la solución acuosa para las cuatro condiciones de medida, produciéndose un rápido aumento de la temperatura durante la irradiación del láser y alcanzando un valor máximo alrededor de los 5 minutos que se mantiene estable hasta que la irradiación termina. A partir de ese momento la temperatura disminuye abruptamente, alcanzando de nuevo la temperatura original de la que se partió. No se observó un aumento representativo de temperatura en el control de agua destilada en ninguna de las condiciones experimentales. El mismo patrón de

calentamiento se ve repetido para las otras dos muestras,  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y  $Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4@Cit$  (Figura 4. 37b y Figura 4. 37c).

En la Figura 4. 37d se observa claramente un aumento progresivo del incremento de temperatura de las soluciones a medida que la potencia aumenta para todas las NPs estudiadas. Este incremento resulta ser linealmente dependiente de la potencia de irradiación, como ya había sido descrito previamente en la literatura [273].



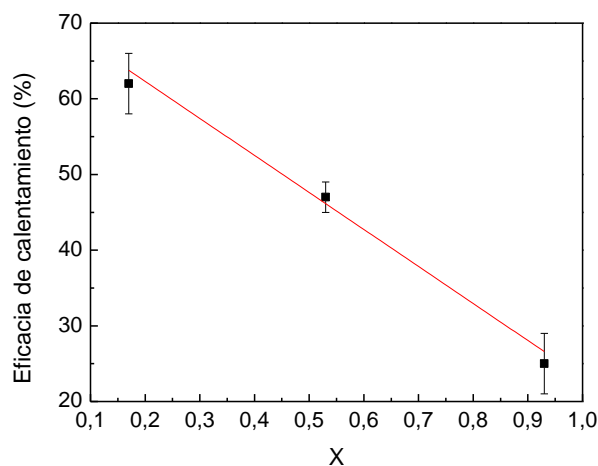
**Figura 4. 37.** Respuesta de calentamiento fototérmico de soluciones acuosas 0.25 mg/mL de a)  $Zn_{0.17}Fe_{2.83}O_4@Cit$ , b)  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$  y c)  $Zn_{0.80}Fe_{2.20}O_4@Cit$ , al ser irradiadas con un láser de 800 nm durante 10 minutos, aplicando densidades de potencia de 0.6, 0.8, 1.1 y 1.4  $W/cm^2$ . d) Variación del incremento de temperatura obtenido en función de la composición de la muestra y de la densidad de potencia de irradiación del láser.

En cuanto a la influencia de la composición química en la eficacia de calentamiento, tal y como cabía esperar de la información obtenida de los espectros UV-Vis, existe una clara dependencia de la composición química de las NPs en su respuesta de calentamiento, aumentando la eficacia

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

a medida que disminuye la cantidad de zinc en la muestra. A modo de ejemplo, la temperatura de la disolución que contiene  $\text{Zn}_{0.80}\text{Fe}_{2.20}\text{O}_4@\text{Cit}$  NPs se elevó un máximo de  $5.8\text{ }^\circ\text{C}$ , la disolución de  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{Cit}$  se calentó  $10\text{ }^\circ\text{C}$  y finalmente, la temperatura de la muestra  $\text{Zn}_{0.2}\text{Fe}_{2.8}\text{O}_4@\text{Cit}$  aumentó un total de  $11\text{ }^\circ\text{C}$  al ser irradiadas con una densidad de potencia de  $1.4\text{ W/cm}^2$  (**Figura 4. 37d**). De modo que, estos resultados confirman que las NPs de óxido de hierro pueden absorber efectivamente la energía láser de  $800\text{ nm}$  y convertirla en calor. Además, las NPs que contienen bajo contenido de Zn son más eficientes al inducir un mayor aumento de temperatura con la misma concentración, densidad de potencia de láser y tiempo de irradiación

De acuerdo a la Ecuación 3. 8 [193], las eficiencias de conversión fototérmica ( $\eta$ ) calculadas fueron de un 62% para la muestra  $\text{Zn}_{0.17}\text{Fe}_{2.83}\text{O}_4@\text{Cit}$ , 47% para la muestra  $\text{Zn}_{0.53}\text{Fe}_{2.47}\text{O}_4@\text{Cit}$  y 25% para la muestra  $\text{Zn}_{0.80}\text{Fe}_{2.20}\text{O}_4@\text{Cit}$  (**Figura 4. 38**).



**Figura 4. 38.** Eficiencias de conversión fototérmica de las muestras  $\text{Zn}_x\text{Fe}_{(3-x)}\text{O}_4@\text{Cit}$  ( $x = 0.17, 0.53, 0.80$ ) en función de la composición química de las mismas.

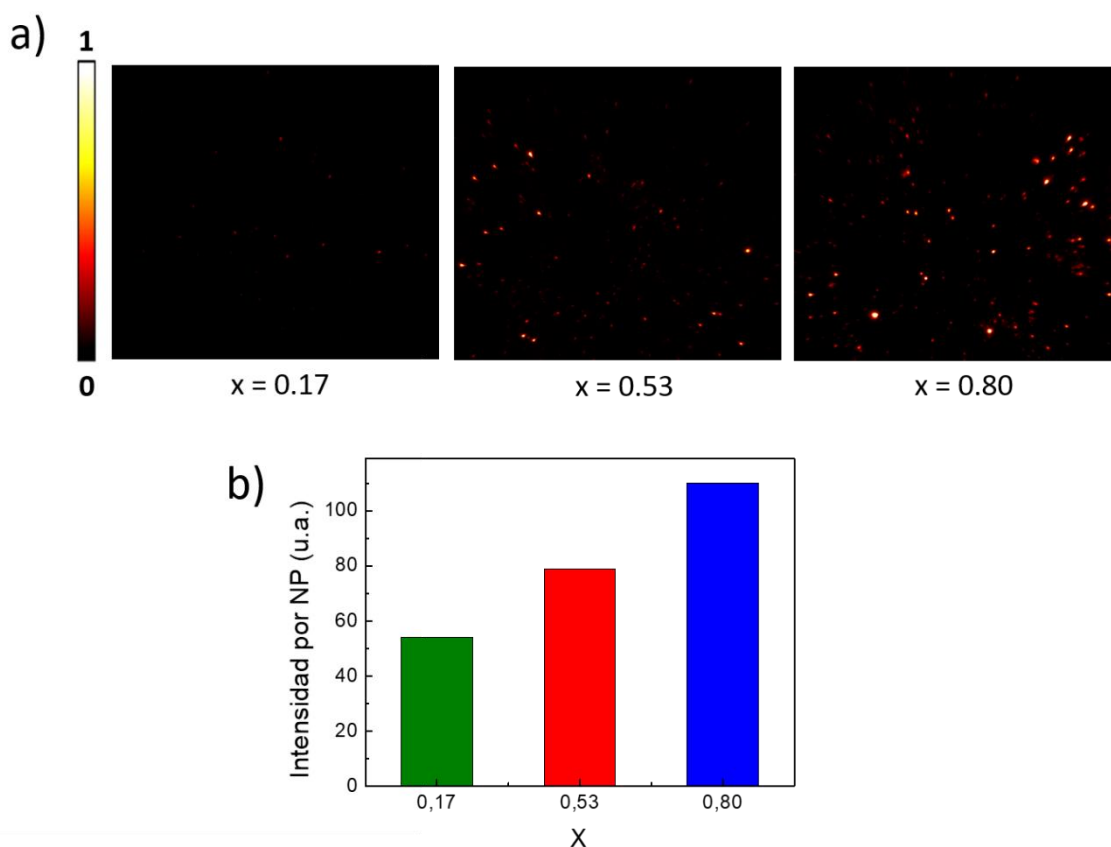
Estos valores resultan ser altos en comparación a los reportados previamente en la literatura para otras ferritas de tamaño similar [274] [275] y otros sistemas magnéticos combinados [276] [148]. Esta mejora en la eficacia permitiría reducir tanto la concentración de NPs como la densidad de potencia aplicada en futuros tratamientos fototérmicos. Además, los valores de  $\eta$  obtenidos varían linealmente en función del nivel de dopaje ( $X$ ). Este hecho posibilita el diseño de NPs magnéticas con propiedades de conversión fototérmica controladas modificando la composición química, ya sea solas o combinadas con otro tipo de materiales, creando sistemas multifuncionales [148] [150].



Por otra parte, los resultados revelan que la reducción del carácter metálico de las NPs mediante la modificación de la composición, es decir, mediante el aumento de la cantidad de zinc, reduce significativamente el valor de  $\eta$ . De hecho, los datos experimentales parecen indicar que el reemplazo completo de cationes  $\text{Fe}^{2+}$  por cationes  $\text{Zn}^{2+}$  daría lugar a un valor de  $\eta$  prácticamente nulo. El origen exacto de esta reducción en la magnitud de  $\eta$ , así como del mecanismo que da lugar al incremento de temperatura inducido por las NPs de óxido de hierro no han sido completamente dilucidados hasta el momento. Sin embargo, los resultados sugieren que ambos fenómenos están fuertemente relacionados con el contenido de hierro y que, por lo tanto, esto está correlacionado con la absorción de luz NIR por parte de dicho elemento y con la posterior relajación de forma no radioactiva.

Por último, la influencia de la composición química de las NPs en sus propiedades ópticas se evaluó mediante microscopía de campo oscuro. El contraste en este tipo de imágenes es proporcional a la eficiencia de dispersión de las NPs individuales. La **Figura 4. 39a** muestra las imágenes en campo oscuro obtenidas para las tres composiciones de NPs estudiadas, pudiendo observarse cómo el contraste de las NPs aumenta progresivamente a medida que aumenta el contenido de zinc en la muestra.

Adicionalmente, la **Figura 4. 39b** representa gráficamente la intensidad de luz dispersa promediada por NP, para las tres composiciones estudiadas, corroborando que la sección eficaz de dispersión por NP aumenta con el contenido de zinc. Este resultado, en combinación con la disminución de  $\eta$  en relación al contenido de Zn, sugiere que a medida que la cantidad de dicho elemento aumenta, se produce un aumento en la eficiencia de dispersión a expensas de la eficiencia de absorción fototérmica. M.E. Sadat et al. reportaron previamente datos sobre la fuerte influencia tanto del tamaño de partícula como del recubrimiento superficial en el balance entre la sección eficaz de dispersión y absorción en NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [151]. De nuevo, la fuerte relación entre las propiedades ópticas (dispersión, absorción, extinción) de las NPs magnéticas basadas en óxido de hierro y sus características como partículas individuales queda evidenciada, en este caso en cuanto a su composición química.



**Figura 4. 39.** a) *Imágenes de campo oscuro* y b) *intensidad por NP de las muestras  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4@Cit$  ( $X = 0.17, 0.53, 0.80$ ).*

Resumiendo, los resultados experimentales revelan que la composición química de las NPs juega un papel clave en la determinación de las propiedades ópticas. Se ha comprobado que el aumento en el contenido de Zn conduce a una disminución simultánea en la eficiencia fototérmica y a una mejora en la sección transversal de dispersión. Por lo tanto, es posible ajustar de manera controlada tanto el calentamiento inducido por la luz y las propiedades ópticas como las propiedades magnéticas durante el procedimiento de síntesis. Esta posibilidad, junto a su fácil y versátil decoración superficial, hacen que las NPs  $Zn_xFe_{3-x}O_4$  sean excelentes candidatos para su empleo en terapia magneto-fototérmica, usándolas como una sola entidad o en sistemas combinados multifuncionales [273].

---

## 5. CONCLUSIONES

---

## 5. Conclusiones

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo se resumen en los puntos detallados a continuación:

- El método electroquímico empleado para la síntesis de NPs de ferrita de zinc demostró ser reproducible, robusto, económico y de gran versatilidad. Dicha versatilidad permite el diseño de NPs de tamaño y composición de forma controlada mediante la optimización de parámetros de síntesis tales como la temperatura de reacción y la intensidad de corriente aplicada a la celda electroquímica.
- Gracias al control de las variables del método de síntesis, fue posible la obtención de NPs de una serie de ferritas de zinc de composición variable,  $Zn_xFe_{(3-x)}O_4$  ( $0 < x < 1$ ), y 12 nm de diámetro. Mediante la exhaustiva caracterización estructural y magnética de las NPs sintetizadas se determinó que los cationes  $Zn^{2+}$  se sitúan preferencialmente en las posiciones tetraédricas de la estructura espinela, que los valores de  $M_s$  disminuyen progresivamente a medida que aumenta la cantidad de zinc en la composición de las NPs y que estas presentan carácter superparamagnético a temperatura ambiente para valores de  $x > 0.24$ .
- Mediante la efectiva funcionalización superficial de las NPs con moléculas de dopamina y el posterior anclaje de moléculas biocompatibles (ácidos cítrico y fólico), fue posible la obtención de NPs con una superficie activa y/o funcional, con un diámetro hidrodinámico por debajo de los 200 nm y con buena estabilidad coloidal, siendo todas ellas propiedades necesarias para su empleo en biomedicina.
- Los estudios de toxicidad *in vitro* realizados con suspensiones coloidales de NPs de composición  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  y funcionalizadas con ácido cítrico ( $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ ) mostraron, en primer lugar, que las NPs son capaces de internalizar efectivamente en la línea celular HeLa. Además, los estudios revelaron que las NPs no son potencialmente tóxicas para las líneas celulares CaLu-3, CaCo-2 y Hep G2, manteniendo los valores de viabilidad celular en un rango de 80-100% a concentraciones de NPs de hasta 1 mg/mL. Por el contrario, la viabilidad de las líneas celulares Raw 264.7 y MDCK mostró una moderada toxicidad, con valores en el rango de 50-70%, lo que indica que las NPs ejercen un mayor efecto tóxico en las líneas celulares implicadas en el proceso de excreción de las mismas. Por último, se detectó la activación del sistema inmune en macrófagos a partir de concentraciones de 0.5 mg/mL de NPs.

## 5. CONCLUSIONES

---

- Los estudios de toxicidad *in vivo* realizados mediante la exposición de embriones del modelo animal *Xenopus laevis* a las NPs de  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4@Cit$ , mostraron un aumento progresivo en la tasa de mortalidad con el aumento de la concentración de NPs y el tiempo de exposición (de 72 a 120 horas). El experimento de exposición a las NPs a corto plazo (72 horas) resultó ser potencialmente tóxico únicamente para la concentración de 2 mg/mL de NPs, con una tasa supervivencia menor del 50%, mientras que el experimento a largo plazo (120 horas) mostró una mortalidad significativa en todos los casos, aumentando esta de una manera dependiente de la dosis. Se detectaron fenotipos anormales asociados a la exposición a las NPs, relacionados principalmente con el tracto gastrointestinal. Mediante el estudio de expresión de genes implicados en el metabolismo del hierro y del zinc y los niveles de ambos elementos en el organismo de los embriones, fue posible establecer que, tras 72 horas de exposición a las NPs, el organismo se encuentra en la etapa de absorción de las mismas. Pasadas 120 horas, se determinó la completa absorción y metabolización de las NPs, y que el proceso de excreción se encuentra en su última etapa, no siendo posible la detección de acumulación de NPs en el organismo de los embriones.

- Los resultados obtenidos para las NPs de composición  $Zn_{0.53}Fe_{2.47}O_4$  y 12 nm de diámetro muestran un bajo calentamiento bajo campo magnético alterno (SAR), de modo que, se concluye que estas no son adecuadas para su empleo como agentes termosensibilizadores en terapias de hipertermia magnética.

- El estudio de la respuesta de calentamiento fototérmico de las NPs en función de la composición química de las mismas mostraron, en general, altos valores de eficiencias de conversión fototérmica. El estudio sistemático de las propiedades ópticas (extinción, dispersión y absorción de luz) de las NPs revela que la composición química juega un papel clave en la determinación las mismas. Los resultados obtenidos demuestran que el aumento en el contenido de zinc en la estructura espinela conduce a una simultánea disminución en la eficiencia fototérmica y una mejora en la sección transversal de dispersión. Esto permite el ajuste controlado del calentamiento inducido por la irradiación con luz NIR y sus propiedades ópticas durante el proceso de síntesis de las NPs.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Sahoo, "The National Nanotechnology Initiative," *Destin. Dubai Conf. to lay Expo 2020 Invest. groundwork*, 2014.
- [2] H. Rauscher *et al.*, *Towards a review of the EC Recommendation for a definition of the term "nanomaterial" part 3*. 2015.
- [3] R. P. Feynman, "There's plenty of room at the bottom," *Engineering and Science*, vol. 23, pp. 22–36, 1960.
- [4] M. E. Vance, T. Kuiken, E. P. Vejerano, S. P. McGinnis, M. F. Hochella, and D. R. Hull, "Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 1769–1780, 2015.
- [5] N. Chaurasia, "Nanotechnology and Nanomaterials in Everyday Life," *Int. J. Sci. Res.*, vol. 6, no. 4, pp. 1560–1562, 2017.
- [6] B. Mrowiec, "Nanomaterials in the environment," *E3S Web Conf.*, vol. 22, p. 00119, 2017.
- [7] G. Catalan, J. Seidel, R. Ramesh, and J. F. Scott, "Domain wall nanoelectronics," *Rev. Mod. Phys.*, vol. 84, no. 1, pp. 119–156, 2012.
- [8] A. H. Lu, E. L. Salabas, and F. Schüth, "Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 46, no. 8, pp. 1222–1244, 2007.
- [9] M. H. Flaifel, S. H. Ahmad, M. H. Abdullah, and B. A. Al-Asbahi, "NiZn ferrite filled thermoplastic natural rubber nanocomposites: Effect of low temperature on their magnetic behaviour," *Cryogenics (Guildf)*, vol. 52, no. 10, pp. 523–529, 2012.
- [10] E. C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion, and A. C. S. Samia, "Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles," *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.*, vol. 26, no. 5, pp. 440–448, 2016.
- [11] M. Rivero, A. del Campo, A. Mayoral, E. Mazario, J. Sanchez-Marcos, and A. Munoz-Bonilla, "Synthesis and structural characterization of Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> ferrite nanoparticles obtained by an electrochemical method," *Rsc Adv.*, vol. 6, no. 46, pp. 40067–40076, 2016.
- [12] K. J. Kim, T. Y. Koh, and Y. B. Lee, "Effects of Tetrahedral Fe<sup>2+</sup> on the Structural, Magnetic and Electronic Properties of Solution-based Titanomagnetite Thin Films," vol. 64, no. 1, pp. 93–97, 2014.
- [13] A. Ali *et al.*, "Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 9, pp. 49–67, 2016.
- [14] A. K. A. Silva, A. Espinosa, J. Kolosnjaj-Tabi, C. Wilhelm, and F. Gazeau, *Medical Applications of Iron Oxide Nanoparticles*, no. April 2016. 2016.
- [15] K. E. Sickafus, J. M. Wills, and N. W. Grimes, "Structure of Spinel," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 82, no. 12, pp. 3279–3292, 2004.
- [16] R. Tackett, G. Lawes, B. C. Melot, M. Grossman, E. S. Toberer, and R. Seshadri, "Magnetodielectric coupling in Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>," *Phys. Rev. B*, vol. 76, no. 2, p. 024409, 2007.
- [17] K. Singh, A. Maignan, C. Simon, and C. Martin, "FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CoCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinels: Multiferroicity in the collinear magnetic state?," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 99, no. 17, pp. 1–4, 2011.
- [18] W. Lu, Y. Shen, A. Xie, and W. Zhang, "Green synthesis and characterization of superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 322, no. 13, pp. 1828–1833, 2010.
- [19] Y. Qu, H. Yang, N. Yang, Y. Fan, H. Zhu, and G. Zou, "The effect of reaction temperature on the particle size, structure and magnetic properties of coprecipitated CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *Mater. Lett.*, vol. 60, no. 29–30, pp. 3548–3552, 2006.
- [20] C. N. Chinnasamy *et al.*, "Mixed spinel structure in nanocrystalline NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>," *Phys. Rev. B*, vol. 63, no. 18, p. 184108, 2001.

- [21] S. Permien *et al.*, “Electrochemical insertion of Li into nanocrystalline MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: a study of the reaction mechanism,” *RSC Adv.*, vol. 3, no. 45, p. 23001, 2013.
- [22] a. Milutinović *et al.*, “The cation inversion and magnetization in nanopowder zinc ferrite obtained by soft mechanochemical processing,” *Mater. Res. Bull.*, vol. 48, pp. 4759–4768, 2013.
- [23] R. S. Melo, F. C. Silva, K. R. M. Moura, a. S. de Menezes, and F. S. M. Sinfrônio, “Magnetic ferrites synthesised using the microwave-hydrothermal method,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 381, no. MAY, pp. 109–115, 2015.
- [24] M. Schmidt, H. L. Andersen, C. Granados-Miralles, M. Saura-Múzquiz, M. Stingaciu, and M. Christensen, “Tuning the size and magnetic properties of Zn<sub>x</sub>Co<sub>1-x</sub> Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocrystallites,” *Dalt. Trans.*, vol. 45, no. 15, pp. 6439–6448, 2016.
- [25] L. Addadi, A. Gal, D. Faivre, A. Scheffel, and S. Weiner, “R e v i e w Control of Biogenic Nanocrystal Formation in Biomineralization,” vol. 14476, pp. 227–242, 2016.
- [26] J. M. Barandiaran *et al.*, “Search for magnetite nanoparticles in the rats’ brain,” *IEEE Trans. Magn.*, vol. 51, no. 1, pp. 18–20, 2015.
- [27] J. J. Jacob and K. Suthindhiran, “Magnetotactic bacteria and magnetosomes – Scope and challenges,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 68, pp. 919–928, 2016.
- [28] I. A. Solov’yov and W. Greiner, “Micromagnetic insight into a magnetoreceptor in birds: Existence of magnetic field amplifiers in the beak,” *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 80, no. 4, pp. 1–10, 2009.
- [29] M. M. Walker, T. P. Quinn, J. L. Kirschvink, and C. Groot, “Production of single-domain magnetite throughout life by sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka.*,” *J. Exp. Biol.*, vol. 140, pp. 51–63, 1988.
- [30] R. A. Holland, J. L. Kirschvink, T. G. Doak, and M. Wikelski, “Bats use magnetite to detect the earth’s magnetic field,” *PLoS One*, vol. 3, no. 2, pp. 1–6, 2008.
- [31] C.-Y. Hsu, F.-Y. Ko, C.-W. Li, K. Fann, and J.-T. Lue, “Magnetoreception System in Honeybees (*Apis mellifera*),” *PLoS One*, vol. 2, no. 4, p. e395, 2007.
- [32] J. Shim, S. Lee, J. Park, S.-J. Han, Y. Jeong, and Y. Cho, “Coexistence of ferrimagnetic and antiferromagnetic ordering in Fe-inverted zinc ferrite investigated by NMR,” *Phys. Rev. B*, vol. 73, no. 6, p. 064404, 2006.
- [33] G. Wang, Q. Peng, and Y. Li, “Lanthanide-doped nanocrystals: Synthesis, optical-magnetic properties, and applications,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 5, pp. 322–332, 2011.
- [34] C. R. De Silva, S. Smith, I. Shim, J. Pyun, T. Gutu, and J. Jiao, “Lanthanide (III)-Doped Magnetite Nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 3, pp. 6336–6337, 2009.
- [35] A. Petran, T. Radu, G. Borodi, A. Nan, M. Suciuc, and R. Turcu, “Effects of rare earth doping on multi-core iron oxide nanoparticles properties,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 428, pp. 492–499, 2018.
- [36] F. L. Deepak *et al.*, “A Systematic Study of the Structural and Magnetic Properties of Mn-, Co-, and Ni-Doped Colloidal Magnetite Nanoparticles,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, no. 21, pp. 11947–11957, 2015.
- [37] Y. Köseoğlu, F. Alan, M. Tan, R. Yilgin, and M. Öztürk, “Low temperature hydrothermal synthesis and characterization of Mn doped cobalt ferrite nanoparticles,” *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 5, pp. 3625–3634, 2012.
- [38] K. Maaz *et al.*, “Structural analysis of nickel doped cobalt ferrite nanoparticles prepared by coprecipitation route,” *Phys. B Condens. Matter*, vol. 404, no. 21, pp. 3947–3951, 2009.
- [39] R. Raeisi Shahraki, M. Ebrahimi, S. a. Seyyed Ebrahimi, and S. M. Masoudpanah, “Structural characterization and magnetic properties of superparamagnetic zinc ferrite nanoparticles synthesized by the coprecipitation method,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 324, no. 22, pp. 3762–3765, 2012.
- [40] N. M. Barkoula, B. Alcock, N. O. Cabrera, and T. Peijs, “Fatigue properties of highly



- oriented polypropylene tapes and all-polypropylene composites," *Polym. Polym. Compos.*, vol. 16, no. 2, pp. 101–113, 2008.
- [41] N. M. Deraz and a Alarifi, "Microstructure and Magnetic Studies of Zinc Ferrite Nano-Particles," *Int. J. Electrochem. Sci.*, vol. 7, pp. 6501–6511, 2012.
- [42] S. Tyagi, N. Batra, and A. K. Paul, "Influence of Temperature on Reducing Gas Sensing Performance of Nanocrystalline Zinc Ferrite," *Trans. Indian Inst. Met.*, vol. 68, no. 5, pp. 707–713, 2015.
- [43] X. Gao, Y. Sun, C. Zhu, C. Li, Q. Ouyang, and Y. Chen, "Chemical Highly sensitive and selective H<sub>2</sub>S sensor based on porous ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanosheets," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 246, pp. 662–672, 2017.
- [44] R. Rahimi, M. Heidari-Golafzani, and M. Rabbani, "Preparation and photocatalytic application of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>@ZnO core-shell nanostructures," *Superlattices Microstruct.*, vol. 85, pp. 497–503, 2015.
- [45] J. Wang *et al.*, "Natural RAFT Polymerization: Recyclable-Catalyst-Aided, Opened-to-Air, and Sunlight-Photolyzed RAFT Polymerizations," *ACS Macro Lett.*, vol. 5, no. 11, pp. 1278–1282, 2016.
- [46] C. Bárcena, A. K. Sra, G. S. Chaubey, C. Khemtong, J. P. Liu, and J. Gao, "Zinc ferrite nanoparticles as MRI contrast agents," *Chem. Commun. (Camb.)*, no. 19, pp. 2224–2226, 2008.
- [47] J. Wan, X. Jiang, H. Li, and K. Chen, "Facile synthesis of zinc ferrite nanoparticles as non-lanthanide T1 MRI contrast agents," *J. Mater. Chem.*, vol. 22, p. 13500, 2012.
- [48] P. M. Zélis *et al.*, "Structural and magnetic study of zinc-doped magnetite nanoparticles and ferrofluids for hyperthermia applications," *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 12, 2013.
- [49] Y. Yang *et al.*, "Synthesis of nonstoichiometric zinc ferrite nanoparticles with extraordinary room temperature magnetism and their diverse applications," *J. Mater. Chem. C*, vol. 1, no. 16, p. 2875, 2013.
- [50] Z. Ž. Lazarević *et al.*, "Characterization of partially inverse spinel ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> with high saturation magnetization synthesized via soft mechanochemically assisted route," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 75, pp. 869–877, 2014.
- [51] M. Mozaffari and H. Masoudi, "Zinc Ferrite Nanoparticles: New Preparation Method and Magnetic Properties," *J. Supercond. Nov. Magn.*, vol. 27, no. 11, pp. 2563–2567, 2014.
- [52] G. F. Goya, H. R. Rechenberg, M. Chen, and W. B. Yelon, "Magnetic irreversibility in ultrafine ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> particles Magnetic irreversibility in ultrafine ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> particles," vol. 8005, no. 2000, pp. 35–38, 2014.
- [53] M. Atif, S. K. Hasanain, and M. Nadeem, "Magnetization of sol-gel prepared zinc ferrite nanoparticles: Effects of inversion and particle size," *Solid State Commun.*, vol. 138, no. 8, pp. 416–421, 2006.
- [54] M. Wen, Q. Li, and Y. Li, "Magnetic, electronic and structural properties of Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub>," *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 153, no. October 2005, pp. 65–70, 2006.
- [55] X. Liu, J. Liu, S. Zhang, Z. Nan, and Q. Shi, "Structural, Magnetic, and Thermodynamic Evolutions of Zn-Doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles Synthesized Using a One-Step Solvothermal Method," *J. Phys. Chem. C*, vol. 120, no. 2, pp. 1328–1341, 2016.
- [56] N. Lee and T. Hyeon, "Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2575–2589, 2012.
- [57] S. Laurent *et al.*, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications (vol 108, pg 2064, 2008)," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 6, pp. 2064–2110, 2008.
- [58] D. T. Nguyen, D. J. Kim, and K. S. Kim, "Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles," *Micron*, vol. 42, no. 3, pp. 207–227, 2011.

- [59] V. K. LaMer and R. H. Dinegar, "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 11, pp. 4847–4854, 1950.
- [60] U. KHAN, N. KHATTAK, A. RAHMAN, and F. KHAN, "Historical Development of Magnetite Nanoparticles Synthesis," *J. Chem. Soc. ...*, vol. 33, no. 6, pp. 793–804, 2011.
- [61] J. Mosayebi, M. Kiyasatfar, and S. Laurent, *Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications*, vol. 1700306. 2017.
- [62] M. Ebrahimi, R. Raeisi Shahraki, S. a. Seyyed Ebrahimi, and S. M. Masoudpanah, "Magnetic Properties of Zinc Ferrite Nanoparticles Synthesized by Coprecipitation Method," *J. Supercond. Nov. Magn.*, vol. 27, no. 6, pp. 1587–1592, 2014.
- [63] D. S. Mathew and R.-S. Juang, "An overview of the structure and magnetism of spinel ferrite nanoparticles and their synthesis in microemulsions," *Chem. Eng. J.*, vol. 129, no. 1–3, pp. 51–65, 2007.
- [64] B. Hangai, E. Borsari, E. C. Aguiar, F. G. Garcia, E. Longo, and A. Z. Simões, "Superparamagnetic behaviour of zinc ferrite obtained by the microwave assisted method," *J. Mater. Sci. Mater. Electron.*, vol. 28, no. 14, pp. 10772–10779, 2017.
- [65] O. Kaman, T. Kořínková, Z. Jiráček, M. Maryško, and M. Veverka, "The superspin glass transition in zinc ferrite nanoparticles," *J. Appl. Phys.*, vol. 117, p. 17C706, 2015.
- [66] S. Ammar *et al.*, "Magnetic properties of zinc ferrite nanoparticles synthesized by hydrolysis in a polyol medium," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 39, pp. 9055–9069, 2006.
- [67] L. Cabrera, S. Gutierrez, N. Menendez, M. P. Morales, and P. Herrasti, "Magnetite nanoparticles: Electrochemical synthesis and characterization," *Electrochim. Acta*, vol. 53, no. 8, pp. 3436–3441, 2008.
- [68] E. Mazarío, P. Herrasti, M. P. Morales, and N. Menéndez, "Synthesis and Characterization of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Ferrite Nanoparticles Obtained By an Electrochemical Method," *Nanotechnology*, vol. 23, no. 35, p. 355708, 2012.
- [69] E. Mazario *et al.*, "High Specific Absorption Rate and Transverse Relaxivity Effects in Manganese Ferrite Nanoparticles Obtained by Electrochemical Route.," *J. Phys. Chem. C*, p. 150304123957002, 2015.
- [70] R. Galindo, E. Mazario, S. Gutiérrez, M. P. Morales, and P. Herrasti, "Electrochemical synthesis of NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: Characterization and their catalytic applications," *J. Alloys Compd.*, vol. 536, pp. S241–S244, 2012.
- [71] E. Mazario, J. Sánchez-Marcos, N. Menéndez, P. Herrasti, M. García-Hernández, and A. Muñoz-Bonilla, "One-pot electrochemical synthesis of polydopamine coated magnetite nanoparticles," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 89, pp. 48353–48361, 2014.
- [72] I. Lozano, N. Casillas, C. P. de León, F. C. Walsh, and P. Herrasti, "New Insights into the Electrochemical Formation of Magnetite Nanoparticles," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 164, no. 4, pp. D184–D191, 2017.
- [73] C. Lei, Y. Sun, D. C. W. Tsang, and D. Lin, "Environmental transformations and ecological effects of iron-based nanoparticles," *Environ. Pollut.*, vol. 232, pp. 10–30, 2018.
- [74] A. Jain, S. Ranjan, N. Dasgupta, and C. Ramalingam, "Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 8398, no. April, pp. 1–21, 2017.
- [75] C. Blaise, F. Gagné, J. F. Férard, and P. Eullaffroy, "Ecotoxicity of Selected Nano-Materials to Aquatic Organisms," *Environ. Toxicol.*, vol. 24, no. 3, pp. 296–303, 2009.
- [76] S. Arora, J. M. Rajwade, and K. M. Paknikar, "Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 258, no. 2, pp. 151–165, 2012.
- [77] Q. Dai, N. Bertleff-Zieschang, J. A. Braunger, M. Björnmalm, C. Cortez-Jugo, and F. Caruso, "Particle Targeting in Complex Biological Media," *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–32, 2018.
- [78] N. Lewinski, V. Colvin, and R. Drezek, "Cytotoxicity of nanopartides," *Small*, vol. 4, no. 1,

- pp. 26–49, 2008.
- [79] W. I. Hagens, A. G. Oomen, W. H. de Jong, F. R. Cassee, and A. J. A. M. Sips, “What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body?,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 49, no. 3, pp. 217–229, 2007.
- [80] A. Elsaesser and C. V. Howard, “Toxicology of nanoparticles,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 2, pp. 129–137, 2012.
- [81] Z. Mao, X. Zhou, and C. Gao, “Influence of structure and properties of colloidal biomaterials on cellular uptake and cell functions,” *Biomater. Sci.*, vol. 1, no. 9, p. 896, 2013.
- [82] A. Panariti, G. Miserocchi, and I. Rivolta, “The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: Disrupting or enabling functions?,” *Nanotechnol. Sci. Appl.*, vol. 5, no. 1, pp. 87–100, 2012.
- [83] H. Markides, M. Rotherham, and A. J. El Haj, “Biocompatibility and toxicity of magnetic nanoparticles in regenerative medicine,” *J. Nanomater.*, vol. 2012, pp. 13–15, 2012.
- [84] H. Su, Y. Wang, Y. Gu, L. Bowman, J. Zhao, and M. Ding, “Potential applications and human biosafety of nanomaterials used in nanomedicine,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 38, no. 1, pp. 3–24, 2018.
- [85] B. Silva and P. Faustino, “An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, no. 7, pp. 1347–1359, 2015.
- [86] M. U. Muckenthaler, S. Rivella, M. W. Hentze, and B. Galy, “A Red Carpet for Iron Metabolism,” *Cell*, vol. 168, no. 3, pp. 344–361, 2017.
- [87] C. Camaschella, “Iron-Deficiency Anemia,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 372, no. 19, pp. 1832–1843, 2015.
- [88] A. J. Marengo-Rowe, “The thalassemias and related disorders.,” *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent).*, vol. 20, no. 1, pp. 27–31, 2007.
- [89] M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella, “Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism,” *Cell*, vol. 142, no. 1, pp. 24–38, 2010.
- [90] A. S. Prasad, “Impact of the discovery of human zinc deficiency on health,” *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 28, no. 4, pp. 357–363, 2014.
- [91] W. Maret and H. H. Sandstead, “Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation,” *J. Trace Elem. Med. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 3–18, 2006.
- [92] M. Mares and H. Haase, “Zinc and immunity: An essential interrelation,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 611, pp. 58–65, 2016.
- [93] P. Bonaventura, G. Benedetti, F. Albarède, and P. Miossec, “Zinc and its role in immunity and inflammation,” *Autoimmun. Rev.*, vol. 14, no. 4, pp. 277–285, 2015.
- [94] M. L. Ackland and A. A. Michalczyk, “Zinc and infant nutrition,” *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 611, pp. 51–57, 2016.
- [95] D.-L. Zhang, M. C. Ghosh, and T. A. Rouault, “The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis - an update,” *Front. Pharmacol.*, vol. 5, no. June, pp. 1–12, 2014.
- [96] S. G. Bell and B. L. Vallee, “The Metallothionein/thionein system: An oxidoreductive metabolic zinc link,” *ChemBioChem*, vol. 10, no. 1, pp. 55–62, 2009.
- [97] M. Marín-Barba *et al.*, “Unravelling the mechanisms that determine the uptake and metabolism of magnetic single and multicore nanoparticles in a *Xenopus laevis* model,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 2, pp. 690–704, 2018.
- [98] S. M. Hoque, S. Hossain, S. Choudhury, S. Akhter, and F. Hyder, “Synthesis and characterization of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and its biomedical applications,” *Mater. Lett.*, vol. 162, no. 3, pp. 60–63, 2016.
- [99] H. Bin Na, I. C. Song, and T. Hyeon, “Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents,” *Adv. Mater.*, vol. 21, no. 21, pp. 2133–2148, 2009.

- [100] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, and M. de la Guardia, "Iron and iron-oxide magnetic nanoparticles as signal-amplification elements in electrochemical biosensing," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 1–9, 2015.
- [101] B. J. Tefft, S. Uthamaraj, J. J. Harburn, M. Klabusay, D. Dragomir-Daescu, and G. S. Sandhu, "Cell Labeling and Targeting with Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles," *J. Vis. Exp.*, no. 104, pp. 1–9, 2015.
- [102] S. Laurent, S. Dutz, U. O. Häfeli, and M. Mahmoudi, "Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 166, no. 1–2, pp. 8–23, 2011.
- [103] Z. Zhang, P. He, J. Zhang, Y. Li, and Q. Wang, "Recent advances in magnetic targeting based on high magnetic field and magnetic particles," *High Volt.*, vol. 2, no. 4, pp. 220–232, 2017.
- [104] A. I. Gonçalves, M. T. Rodrigues, and M. E. Gomes, "Tissue-engineered magnetic cell sheet patches for advanced strategies in tendon regeneration," *Acta Biomater.*, vol. 63, pp. 110–122, 2017.
- [105] S. J. Cheong *et al.*, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-loaded chitosan-linoleic acid nanoparticles as an effective hepatocyte-targeted gene delivery system," *Int. J. Pharm.*, vol. 372, no. 1–2, pp. 169–176, 2009.
- [106] O. L. Gobbo, K. Sjaastad, M. W. Radomski, Y. Volkov, and A. Prina-Mello, "Magnetic nanoparticles in cancer theranostics," *Theranostics*, vol. 5, no. 11, pp. 1249–1263, 2015.
- [107] M. K. Lima-Tenório, E. A. Gómez Pineda, N. M. Ahmad, H. Fessi, and A. Elaissari, "Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy," *Int. J. Pharm.*, vol. 493, no. 1–2, pp. 313–327, 2015.
- [108] L. Hajba and A. Guttman, "The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: Toward handheld diagnostic devices," *Biotechnol. Adv.*, vol. 34, no. 4, pp. 354–361, 2016.
- [109] R. Wang, X. Xu, P. Li, Y. Wang, and W. Jiang, "Terminal protection-mediated autocatalytic cascade amplification coupled with graphene oxide fluorescence switch for sensitive and rapid detection of folate receptor," *Talanta*, vol. 174, no. June, pp. 684–688, 2017.
- [110] M. Arruebo, R. Fernández-pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría, "Magnetic nanoparticles Controlled release of drugs from nanostructured functional materials," *Rev. Lit. Arts Am.*, vol. 2, no. 3, pp. 22–32, 2007.
- [111] J. Liu *et al.*, "Glucose-, pH- and thermo-responsive nanogels crosslinked by functional superparamagnetic maghemite nanoparticles as innovative drug delivery systems," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 8, pp. 1009–1023, 2014.
- [112] M. Mallory, E. Gogineni, G. C. Jones, L. Greer, and C. B. Simone, "Critical Reviews in Oncology / Hematology Therapeutic hyperthermia: The old , the new , and the upcoming," vol. 97, pp. 56–64, 2016.
- [113] B. Hildebrandt *et al.*, "The cellular and molecular basis of hyperthermia," vol. 43, pp. 33–56, 2002.
- [114] M. P. Melancon, M. Zhou, and C. Li, "Cancer theranostics with near-infrared light-activatable multimodal nanoparticles," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 947–956, 2011.
- [115] D. Jaque *et al.*, "Nanoparticles for photothermal therapies," *Nanoscale*, vol. 6, no. 16, p. 9494, 2014.
- [116] W. Yang *et al.*, "Near infrared dye-conjugated oxidative stress amplifying polymer micelles for dual imaging and synergistic anticancer phototherapy," *Biomaterials*, vol. 154, pp. 48–59, 2018.
- [117] Z. Behrouzki, Z. Joveini, B. Keshavarzi, N. Eyvazzadeh, and R. Z. Aghdam, "Hyperthermia: How can it be used?," *Oman Med. J.*, vol. 31, no. 2, pp. 89–97, 2016.
- [118] F. Benyettou *et al.*, "Mesoporous  $\gamma$ -Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically Triggered Release of Doxorubicin and Hyperthermia Treatment," *Chem. - A Eur. J.*, vol. 22, no. 47,

- pp. 17020–17028, 2016.
- [119] A. Hervault and N. T. K. Thanh, “Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer,” *Nanoscale*, vol. 6, no. 20, pp. 11553–11573, 2014.
- [120] C. L. Dennis *et al.*, “The influence of collective behavior on the magnetic and heating properties of iron oxide nanoparticles,” *J. Appl. Phys.*, vol. 103, no. 7, pp. 1–4, 2008.
- [121] D. Serantes *et al.*, “Multiplying magnetic hyperthermia response by nanoparticle assembling,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 118, no. 11, pp. 5927–5934, 2014.
- [122] C. Martinez-Boubeta *et al.*, “Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–8, 2013.
- [123] D. Serantes *et al.*, “Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles,” *J. Appl. Phys.*, vol. 108, no. 7, 2010.
- [124] M. E. Materia *et al.*, “Mesoscale assemblies of iron oxide nanocubes as heat mediators and image contrast agents,” *Langmuir*, vol. 31, no. 2, pp. 808–816, 2015.
- [125] A. Skumiel, T. Hornowski, and A. Józefczak, “Heating characteristics of transformer oil-based magnetic fluids of different magnetic particle concentrations,” *Int. J. Thermophys.*, vol. 32, no. 4, pp. 876–885, 2011.
- [126] R. Hergt and S. Dutz, “Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 311, no. 1 SPEC. ISS., pp. 187–192, 2007.
- [127] T. Miyagawa, H. Saito, Y. Minamiya, and K. Mitobe, “Inhibition of Hsp90 and 70 sensitizes melanoma cells to hyperthermia using ferromagnetic particles with a low Curie temperature,” pp. 722–730, 2014.
- [128] P. M. Zélis *et al.*, “Structural and magnetic study of zinc-doped magnetite nanoparticles and ferrofluids for hyperthermia applications,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 46, no. 12, p. 125006, 2013.
- [129] Z. Bao, X. Liu, Y. Liu, H. Liu, and K. Zhao, “Near-infrared light-responsive inorganic nanomaterials for photothermal therapy,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 349–364, 2016.
- [130] R. Weissleder, “A clearer vision for in vivo imaging”. *Nature Biotechnology.*, vol. 19. pp. 316-317, 2001.
- [131] J. Liu *et al.*, “Tumor acidity activating multifunctional nanoplatforM for NIR-mediated multiple enhanced photodynamic and photothermal tumor therapy,” *Biomaterials*, vol. 157, pp. 107–124, 2018.
- [132] Y. V. Kaneti *et al.*, “Carbon-Coated Gold Nanorods: A Facile Route to Biocompatible Materials for Photothermal Applications,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 46, pp. 25658–25668, 2015.
- [133] T. G. Phan and A. Bullen, “Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: Faster, brighter, deeper,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 88, no. 4, pp. 438–444, 2010.
- [134] N. S. Abadeer and C. J. Murphy, “Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles,” 2016.
- [135] L. C. Kennedy *et al.*, “A New Era for Cancer Treatment : Gold-Nanoparticle- Mediated Thermal Therapies,” pp. 169–183, 2011.
- [136] Y. Yang *et al.*, “Journal of Colloid and Interface Science Gold nanoparticle-gated mesoporous silica as redox-triggered drug delivery for chemo-photothermal synergistic therapy,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 508, pp. 323–331, 2017.
- [137] S. Wang *et al.*, “Plasmonic Copper Sul fi de Nanocrystals Exhibiting Near-Infrared Photothermal and Photodynamic Therapeutic E ff ects,” no. 2, pp. 1788–1800, 2015.
- [138] Liangran Guo, Daisy D. Yan, Dongfang Yang, Yajuan Li, Xiaodong Wang, Olivia Zalewski, Bingfang Yan and Wei Lu, “Combinatorial Photothermal and Immuno Cancer Therapy

- Using Sulfide Nanoparticles,” vol. 8, no. 6, pp. 5670–5681, 2014.
- [139] J. T. Robinson *et al.*, “Ultrasmall Reduced Graphene Oxide with High Near-Infrared Absorbance for Photothermal Therapy,” pp. 6825–6831, 2011.
- [140] B. Tian, C. Wang, S. Zhang, L. Feng, and Z. Liu, “Photothermally Enhanced Photodynamic Therapy Delivered by Nano-Graphene Oxide,” no. 9, pp. 7000–7009, 2011.
- [141] S. V Otari *et al.*, “Rapid synthesis and decoration of reduced graphene oxide with gold nanoparticles by thermostable peptides for memory device and photothermal applications,” *Sci. Rep.*, no. August, pp. 1–14, 2017.
- [142] Y.-W. Bao, X.-W. Hua, Y.-H. Li, H.-R. Jia, and F.-G. Wu, “Hyperthermia-Promoted Cytosolic and Nuclear Delivery of Copper/Carbon Quantum Dot-Crosslinked Nanosheets: Multimodal Imaging-Guided Photothermal Cancer Therapy,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, p. acsami.7b15332, 2018.
- [143] M. Hassan, V. G. Gomes, A. Dehghani, and S. M. Ardekani, “Engineering carbon quantum dots for photomediated theranostics,” *Nano Res.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–41, 2018.
- [144] M. Zhang, W. Wang, F. Wu, P. Yuan, and C. Chi, “Magnetic and fluorescent carbon nanotubes for dual modal imaging and photothermal and chemo-therapy of cancer cells in living mice,” *Carbon N. Y.*, vol. 123, pp. 70–83, 2017.
- [145] R. Lv *et al.*, “Multifunctional anticancer platform for multimodal imaging and visible light driven photodynamic/photothermal therapy,” *Chem. Mater.*, vol. 27, no. 5, pp. 1751–1763, 2015.
- [146] E. Hemmer, P. Acosta-Mora, J. Méndez-Ramos, and S. Fischer, “Optical nanoprobe for biomedical applications: shining a light on upconverting and near-infrared emitting nanoparticles for imaging, thermal sensing, and photodynamic therapy,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 23, pp. 4365–4392, 2017.
- [147] L. Tong *et al.*, “NaYF<sub>4</sub>:Sm<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup>@NaYF<sub>4</sub>:Er<sup>3+</sup>/Yb<sup>3+</sup> core-shell structured nanocalorifier with optical temperature probe,” *Opt. Express*, vol. 25, no. 14, p. 16047, 2017.
- [148] O. Akhavan, A. Meidanchi, E. Ghaderi, and S. Khoei, “Zinc ferrite spinel-graphene in magneto-photothermal therapy of cancer,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 21, p. 3306, 2014.
- [149] S. Shen *et al.*, “CMCTS stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles with extremely low toxicity as highly efficient near-infrared photothermal agents for in vivo tumor ablation,” *Nanoscale*, vol. 5, no. 17, p. 8056, 2013.
- [150] S. M. and S. G. T.C., “Enhanced nonlinear optical absorption and optical limiting properties of superparamagnetic spinel zinc ferrite decorated reduced graphene oxide nanostructures,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 392, pp. 904–911, 2017.
- [151] M. E. Sadat *et al.*, “Photoluminescence and photothermal effect of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for medical imaging and therapy,” *Applied Physics Letters*, vol. 105, no. 9, p. 091903, 2014.
- [152] Y. Zhao *et al.*, “Photothermal effect on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles irradiated by white-light for energy-efficient window applications,” *Sol. Energy Mater. Sol. Cells*, vol. 161, no. September 2016, pp. 247–254, 2017.
- [153] C. Xu *et al.*, “Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126, no. 32, pp. 9938–9939, 2004.
- [154] C. Bi *et al.*, “Click Synthesis of Hydrophilic Maltose-Functionalized Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Based on Dopamine Anchors for Highly Selective Enrichment of Glycopeptides,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 44, pp. 24670–24678, 2015.
- [155] Q. Ye, F. Zhou, and W. Liu, “Bioinspired catecholic chemistry for surface modification,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 40, no. 7, p. 4244, 2011.
- [156] A. K. L. Yuen, G. A. Hutton, A. F. Masters, and T. Maschmeyer, “The interplay of catechol ligands with nanoparticulate iron oxides,” *Dalt. Trans.*, vol. 41, no. 9, p. 2545, 2012.

- [157] B. Sahoo, K. S. P. Devi, R. Banerjee, T. K. Maiti, P. Pramanik, and D. Dhara, "Thermal and pH Responsive Polymer-Tethered Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Delivery of Anticancer Drug," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 9, pp. 3884–3893, May 2013.
- [158] L. B. McCusker, R. B. Von Dreele, D. E. Cox, D. Loue, R. D., and P. Scardi, "Rietveld refinement guidelines," *Int. Union Crystallogr. J. Appl. Crystallogr. J. Appl. Cryst.*, vol. 32, pp. 36–50, 1999.
- [159] J. Rodríguez-Carvajal, "Introduction to the Program FULLPROF: Refinement of Crystal and Magnetic Structures from Powder and Single Crystal Data," *Lab. Léon Brillouin (CEA-CNRS), CEA/Saclay, 91191 Gif sur Yvette Cedex, FRANCE.*, no. March, 2015.
- [160] F. Hofer, F. P. Schmidt, W. Grogger, and G. Kothleitner, "Fundamentals of electron energy-loss spectroscopy," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 109, p. 012007, 2016.
- [161] T. J. Collins, "ImageJ for microscopy.," *Biotechniques*, vol. 43, no. 1 Suppl, pp. 25–30, 2007.
- [162] S. Mobilio, F. Boscherini, and C. Meneghini, *Synchrotron radiation: Basics, methods and applications*. 2015.
- [163] D. Carta, C. Marras, D. Loche, G. Mountjoy, S. I. Ahmed, and a. Corrias, "An X-ray absorption spectroscopy study of the inversion degree in zinc ferrite nanocrystals dispersed on a highly porous silica aerogel matrix," *J. Chem. Phys.*, vol. 138, no. 5, 2013.
- [164] B. Ravel and M. Newville, "ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT," *J. Synchrotron Rad.*, vol. 12, pp. 537–541, 2005.
- [165] L. L. Schramm, *Colloid Stability, in Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. 2005.
- [166] D. Hanaor, M. Michelazzi, C. Leonelli, and C. C. Sorrell, "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 32, no. 1, pp. 235–244, 2012.
- [167] J. C. Stockert, A. Blázquez-Castro, M. Cañete, R. W. Horobin, and Á. Villanueva, "MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets," *Acta Histochem.*, vol. 114, no. 8, pp. 785–796, 2012.
- [168] P. Griess, "On a New Series of Bodies in Which Nitrogen is Substituted for Hydrogen," *Philos. Trans. R. Soc. London*, vol. 154, no. 0, pp. 667–731, 1864.
- [169] E. M. Hetrick and M. H. Schoenfish, "Analytical chemistry of nitric oxide.," *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, vol. 2, pp. 409–33, 2009.
- [170] D. M. Mosser, X. Zhang, and David M. Mosser and Xia Zhang, "Activation of Murine Macrophages," *Curr. Protoc. Immunol.*, vol. Chapter 14, p. Unit 14.2, 2008.
- [171] D. C. Cannatella and R. O. De Sa, "Xenopus laevis as a model organism," *Syst. Biol.*, vol. 42, no. 4, pp. 426–507, 1993.
- [172] C. A. Webster *et al.*, "An early developmental vertebrate model for nanomaterial safety: bridging cell-based and mammalian toxicity assessment," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 6, pp. 643–656, 2016.
- [173] P. D. Nieuwkoop and Jacob Faber, *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. New York: Garland Pub, 1994.
- [174] M. U. of N. Staveley, Brian E (Department of Biology, "Xenopus Laevis. Life cycle." [Online]. Available: [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_03/devo\\_03.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/devo_03.html).
- [175] "Inkscape." [Online]. Available: <https://inkscape.org/>. [Accessed: 01-Jan-2018].
- [176] D. Soukup, S. Moise, E. Céspedes, J. Dobson, and N. D. Telling, "In situ measurement of magnetization relaxation of internalized nanoparticles in live cells," *ACS Nano*, vol. 9, no. 1, pp. 231–240, 2015.
- [177] R. Saiki *et al.*, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA

- polymerase," *Science* (80-. ), vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988.
- [178] J. Wilhelm and A. Pingoud, "Real-Time Polymerase Chain Reaction," *ChemBioChem*, vol. 4, no. 11, pp. 1120–1128, 2003.
- [179] L. Raeymaekers, "Basic principles of quantitative PCR," *Mol. Biotechnol.*, vol. 15, no. 2, pp. 115–122, 2000.
- [180] J. D. Watson, *Molecular Biology of Gene*, 5 th. 2004.
- [181] A. Untergasser, H. Nijveen, X. Rao, T. Bisseling, R. Geurts, and J. A. M. Leunissen, "Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3," *Nucleic Acids Res.*, vol. 35, no. SUPPL.2, pp. 71–74, 2007.
- [182] J. B. Karpinka *et al.*, "Xenbase, the Xenopus model organism database; new virtualized system, data types and genomes," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. D1, pp. D756–D763, 2015.
- [183] M. D. Garrick *et al.*, "DMT1: A mammalian transporter for multiple metals," *BioMetals*, vol. 16, no. 1, pp. 41–54, 2003.
- [184] P. M. Harrison and P. Arosio, "The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1275, no. 3, pp. 161–203, 1996.
- [185] T. Kambe, A. Hashimoto, and S. Fujimoto, "Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, no. 17, pp. 3281–3295, 2014.
- [186] R. J. Cousins, J. P. Liuzzi, and L. A. Lichten, "Mammalian zinc transport, trafficking, and signals," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 34, pp. 24085–24089, 2006.
- [187] R. Wadhwa, H. Ando, H. Kawasaki, K. Taira, and S. C. Kaul, "Targeting mortalin using conventional and RNA-helicase-coupled hammerhead ribozymes," *EMBO Rep.*, vol. 4, no. 6, pp. 595–601, 2003.
- [188] T. Nolan, R. E. Hands, and S. A. Bustin, "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1559–1582, 2006.
- [189] K. Ranganna and F. M. Yatsu, "Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor BB-Induced Expression of Glyceraldehyde- 3-Phosphate Dehydrogenase by Sodium Butyrate in Rat Vascular Smooth Muscle Cells," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 17, no. 12, p. 3420 LP-3427, Dec. 1997.
- [190] E. Mazario, N. Menéndez, P. Herrasti, M. Cañete, V. Connord, and J. Carrey, "Magnetic hyperthermia properties of electrosynthesized cobalt ferrite nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 21, pp. 11405–11411, 2013.
- [191] G. Glöckl, R. Hergt, M. Zeisberger, S. Dutz, S. Nagel, and W. Weitschies, "The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia," *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 18, no. 38, 2006.
- [192] "User's manual FLIR Tools/Tools+ 6.0."
- [193] D. K. Roper, W. Ahn, and M. Hoepfner, "Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles," *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, no. 9, pp. 3636–3641, 2007.
- [194] A. R. Denton and N. W. Ashcroft, "Vegards law," *Phys. Rev. A*, vol. 43, no. 6, pp. 3161–3164, 1991.
- [195] J. M. Byrne *et al.*, "Biosynthesis of zinc substituted magnetite nanoparticles with enhanced magnetic properties," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 24, no. 17, pp. 2518–2529, 2014.
- [196] D. Makovec and M. Drofenik, "Non-stoichiometric zinc-ferrite spinel nanoparticles," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 10, pp. 131–141, 2008.
- [197] H. I. Hsiang and Y. L. Liu, "Electrical properties of copper and titanium-codoped zinc ferrites," *J. Alloys Compd.*, vol. 472, no. 1–2, pp. 516–520, 2009.
- [198] J. Liu, Y. Bin, and M. Matsuo, "Magnetic behavior of Zn-doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles estimated in terms of crystal domain size," *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 1, pp. 134–143,



- 2012.
- [199] K. R. Babu, M. P. Rao, and P. S. V. S. Rao, "Structural and Magnetic Properties of - Cu<sup>2+</sup> + Substituted Co – Zn Ferrite Nanoparticles , Synthesized by Sol – Gel Combustion Method," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 27, no. 3, pp. 612–621, 2017.
- [200] C. Rath *et al.*, "Dependence on cation distribution of particle size, lattice parameter, and magnetic properties in nanosize Mn-Zn ferrite," *J. Appl. Phys.*, vol. 91, no. 3, pp. 2211–2215, 2002.
- [201] B. T. Naughton and D. R. Clarke, "Composition-size effects in nickel-zinc ferrite nanoparticles prepared by aqueous coprecipitation," *J. Am. Ceram. Soc.*, vol. 91, no. 4, pp. 1253–1257, 2008.
- [202] E. Mazario, M. P. Morales, R. Galindo, P. Herrasti, and N. Menendez, "Influence of the temperature in the electrochemical synthesis of cobalt ferrites nanoparticles," *J. Alloys Compd.*, vol. 536, no. SUPPL.1, pp. S222–S225, 2012.
- [203] J. Philip, G. Gnanaprakash, G. Panneerselvam, M. P. Antony, T. Jayakumar, and B. Raj, "Effect of thermal annealing under vacuum on the crystal structure, size, and magnetic properties of ZnFe[sub 2]O[sub 4] nanoparticles," *J. Appl. Phys.*, vol. 102, no. 5, p. 054305, 2007.
- [204] Q. Ba, C. Ban, H. Zeng, and G. Zeng, "Effect of annealing temperature on magnetic phase transition in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *Science (80-. )*, vol. 239, pp. 495–497, 2002.
- [205] S. Ayyappan, G. Paneerselvam, M. P. Antony, and J. Philip, "Structural stability of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles under different annealing conditions," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 128, no. 3, pp. 400–404, 2011.
- [206] X. Bo, G. Li, X. Qiu, Y. Xue, and L. Li, "Magnetic diphas nanostructure of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/g-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>," *J. Solid State Chem.*, vol. 180, pp. 1038–1044, 2007.
- [207] J. Smith and H. P. Wijn, *Ferrites*. Philips' Technician Library, 1959.
- [208] M. Lübbe, A. M. Gigler, R. W. Stark, and W. Moritz, "Identification of iron oxide phases in thin films grown on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(0001) by Raman spectroscopy and X-ray diffraction," *Surf. Sci.*, vol. 604, no. 7–8, pp. 679–685, 2010.
- [209] J. P. Singh, R. C. Srivastava, H. M. Agrawal, and R. Kumar, "Micro-Raman investigation of nanosized zinc ferrite: Effect of crystallite size and fluence of irradiation," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 42, no. 7, pp. 1510–1517, 2011.
- [210] Z. Wang, D. Schiferl, Y. Zhao, and H. S. C. O'Neill, "High pressure Raman spectroscopy of spinel-type ferrite ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 64, no. 12, pp. 2517–2523, 2003.
- [211] M. Bini, C. Tondo, D. Capsoni, M. C. Mozzati, B. Albin, and P. Galinetto, "Superparamagnetic ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>nanoparticles: The effect of Ca and Gd doping," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 204, pp. 72–82, 2018.
- [212] Y.-S. Li, J. S. Church, and A. L. Woodhead, "Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 324, no. 8, pp. 1543–1550, 2012.
- [213] M. Hanesch, "Raman spectroscopy of iron oxides and (oxy)hydroxides at low laser power and possible applications in environmental magnetic studies," *Geophys. J. Int.*, vol. 177, no. 3, pp. 941–948, 2009.
- [214] I. Degree, O. Znf, Z. Ž. Lazarević, D. L. Sekulić, V. N. Ivanovski, and N. Ž. Romčević, "A Structural and Magnetic Investigation of the Inversion Degree in Spinel NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and Ni<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Ferrites Prepared by Soft Mechanochemical Synthesis," vol. 9, no. 8, pp. 1014–1018, 2015.
- [215] S. Thota, S. C. Kashyap, S. K. Sharma, and V. R. Reddy, "Micro Raman, Mossbauer and magnetic studies of manganese substituted zinc ferrite nanoparticles: Role of Mn," *J. Phys. Chem. Solids*, vol. 91, pp. 136–144, 2016.
- [216] L. Malavasi, P. Galinetto, M. C. Mozzati, C. B. Azzoni, and G. Flor, "Raman spectroscopy of AMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (A = Mn, Mg and Zn) spinels," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 4, no. 15, pp. 3876–

- 3880, 2002.
- [217] J. P. Singh, R. C. Srivastava, and H. M. Agrawal, "Optical behaviour of zinc ferrite nanoparticles," *AIP Conf. Proc.*, vol. 1276, no. 2010, pp. 137–143, 2010.
- [218] A. Zoppi, C. Lofrumento, E. M. Castellucci, and M. G. Migliorini, "the Raman Spectrum of Hematite : Possible Indicator for," *Ann. Chim.*, vol. 95, 2005.
- [219] D. L. a. de Faria, S. V. Silva, and M. T. de Oliveira, "Raman microspectroscopy of some iron oxides and oxyhydroxides," *J. Raman Spectrosc.*, vol. 28, no. February, pp. 873–878, 1997.
- [220] G. Ennas, G. Marongiu, a. Musinu, a. Falqui, P. Ballirano, and R. Caminiti, "Characterization of nanocrystalline  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> prepared by wet chemical method," *J. Mater. Res.*, vol. 14, no. 4, pp. 1570–1575, 1999.
- [221] S. Deka and P. A. Joy, "Enhancement of the phase transformation temperature of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> by Zn<sup>2+</sup> doping," *J. Mater. Chem.*, vol. 17, no. 5, pp. 453–456, 2007.
- [222] S. S. Pati and J. Philip, "A facile approach to enhance the high temperature stability of magnetite nanoparticles with improved magnetic property A facile approach to enhance the high temperature stability of magnetite nanoparticles with improved magnetic property," vol. 044314, no. May 2015, 2014.
- [223] S. S. Pati *et al.*, "Facile approach to suppress  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> to  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> phase transition beyond 600 °C in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *Mater. Res. Express*, vol. 2, no. 4, p. 045003, 2015.
- [224] J. Lai *et al.*, "Doping  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with Mn(III) suppresses the transition to the  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> structure," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 38, pp. 11470–11471, 2003.
- [225] H. Hito, S. Amagasa, N. Nishida, Y. Kobayashi, and Y. Yamada, "Wet chemical synthesis of zinc-iron oxide nanocomposite," *Hyperfine Interact*, vol. 238:69, 2017.
- [226] T. Tangcharoen, W. Klysubun, A. Ruangphanit, and W. Pecharapa, "A Comparison of Cation Distribution and Valence State in Spinel Crystal Structure of Zinc and Nickel Ferrites Using the Synchrotron X-ray Absorption Spectroscopy (XAS) Analysis," *Integr. Ferroelectr.*, vol. 155, no. 1, pp. 80–90, 2014.
- [227] Y. Li *et al.*, "Magnetic properties and local structure studies of Zn doped ferrites," *J. Electron Spectros. Relat. Phenomena*, vol. 160, no. 1–3, pp. 1–6, 2007.
- [228] M. J. Akhtar, "Investigation of Cationic Distribution in Zn<sub>1-x</sub>Ni<sub>x</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (x = 0.0 to 1.0) by Employing X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy," *J. Electron. Mater.*, vol. 44, no. 8, pp. 2615–2623, 2015.
- [229] T. E. Westre, P. Kennepohl, J. G. DeWitt, B. Hedman, K. O. Hodgson, and E. I. Solomon, "A multiplet analysis of Fe K-edge 1s → 3d pre-Edge features of iron complexes," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 119, no. 27, pp. 6297–6314, 1997.
- [230] J. a. Gomes *et al.*, "ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for ferrofluids: A combined XANES and XRD study," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 323, no. 10, pp. 1203–1206, 2011.
- [231] L. Galois, G. Calas, and M. A. Arrio, "High-resolution XANES spectra of iron in minerals and glasses: Structural information from the pre-edge region," *Chem. Geol.*, vol. 174, no. 1–3, pp. 307–319, 2001.
- [232] S. Nakashima, K. Fujita, K. Tanaka, K. Hirao, T. Yamamoto, and I. Tanaka, "First-principles XANES simulations of spinel zinc ferrite with a disordered cation distribution," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 75, no. 17, pp. 2–9, 2007.
- [233] S. J. a Figueroa and S. J. Stewart, "First XANES evidence of a disorder-order transition in a spinel ferrite compound: nanocrystalline ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>," *J. Synchrotron Radiat.*, vol. 16, no. 1, pp. 63–68, 2008.
- [234] S. J. Stewart *et al.*, "Cationic exchange in nanosized ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> spinel revealed by experimental and simulated near-edge absorption structure," *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.*, vol. 75, no. 7, pp. 3–6, 2007.
- [235] E. Petrova, D. Kotsikau, and V. Pankov, "Structural characterization and magnetic properties of sol-gel derived Zn<sub>x</sub>Fe<sub>3-x</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol.

- 378, pp. 429–435, 2015.
- [236] C. Cannas *et al.*, “Magnetic properties of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub> aerogel and xerogel nanocomposite materials,” *J. Mater. Chem.*, vol. 11, no. 12, pp. 3180–3187, 2001.
- [237] M. Mozaffari and H. Masoudi, “Zinc Ferrite Nanoparticles: New Preparation Method and Magnetic Properties,” *J. Supercond. Nov. Magn.*, vol. 27, no. 11, pp. 2563–2567, 2014.
- [238] V. L. Pool *et al.*, “Site determination of Zn doping in protein encapsulated Zn xFe<sub>3</sub>-xO<sub>4</sub> nanoparticles,” *J. Appl. Phys.*, vol. 105, no. 7, pp. 1–4, 2009.
- [239] V. Blanco-Gutierrez, R. Saez-Puche, and M. J. Torralvo-Fernandez, “Superparamagnetism and interparticle interactions in ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanocrystals,” *J. Mater. Chem.*, vol. 22, p. 2992, 2012.
- [240] R. D. Zysler, D. Fiorani, and A. M. Testa, “Investigation of magnetic properties of interacting Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 224, no. 1, pp. 5–11, Feb. 2001.
- [241] L. . Tung *et al.*, “Annealing effects on the magnetic properties of nanocrystalline zinc ferrite,” *Phys. B Condens. Matter*, vol. 319, no. 1–4, pp. 116–121, 2002.
- [242] E. C. Mendonça, C. B. R. Jesus, W. S. D. Folly, C. T. Meneses, J. G. S. Duque, and A. A. Coelho, “Temperature dependence of coercive field of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles,” vol. 053917, no. 2012, 2016.
- [243] B. Antic *et al.*, “An integrated study of thermal treatment effects on the microstructure and magnetic properties of Zn-ferrite nanoparticles,” *J. Phys. Condens. Matter*, vol. 25, p. 086001, 2013.
- [244] J. F. Hochepped, P. Bonville, and M. P. Pileni, “Nonstoichiometric Zinc Ferrite Nanocrystals: Syntheses and Unusual Magnetic Properties,” pp. 905–912, 2000.
- [245] M. a. Hakim, M. Manjurul Haque, M. Huq, and P. Nordblad, “Spin-glass-like ordering in the spinel ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ferrite,” *Phys. B Condens. Matter*, vol. 406, no. 1, pp. 48–51, 2011.
- [246] K. L. Palanisamy, N. Meenakshi Sundaram, V. Devabharathi, and P. Thangarasu, “Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles,” *Dig. J. Nanomater. Biostructures*, vol. 8, no. 2, pp. 607–612, 2013.
- [247] Z. R. Marand, M. Helmi, R. Farimani, and N. Shahtahmasebi, “Study of magnetic and structural and optical properties of Zn doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles synthesized by co-precipitation method for biomedical application Properties of Zn doped Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles,” *Nanomed J*, vol. 1, no. 4, pp. 238–247, 2014.
- [248] Y. Köseoğlu, A. Baykal, M. S. Toprak, F. Gözüak, A. C. Başaran, and B. Aktaş, “Synthesis and characterization of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles via a PEG-assisted route,” *J. Alloys Compd.*, vol. 462, no. 1–2, pp. 209–213, 2008.
- [249] K. Vimala, K. Shanthi, S. Sundarraj, and S. Kannan, “Synergistic effect of chemophotothermal for breast cancer therapy using folic acid (FA) modified zinc oxide nanosheet,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 488, pp. 92–108, 2017.
- [250] J. Fouineau *et al.*, “Synthesis, Mössbauer characterization, and Ab initio modeling of iron oxide nanoparticles of medical interest functionalized by dopamine,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 117, no. 27, pp. 14295–14302, 2013.
- [251] H. Basti *et al.*, “Catechol derivatives-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles as potential MRI contrast agents,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 341, no. 2, pp. 248–254, 2010.
- [252] G. Hemery *et al.*, “Thermosensitive polymer-grafted iron oxide nanoparticles studied by in situ dynamic light backscattering under magnetic hyperthermia,” *J. Phys. D Appl. Phys.*, vol. 48, pp. 494001–13, 2015.
- [253] D. Rodriguez-Padrón, A. R. Puente-Santiago, A. M. Balu, A. A. Romero, and R. Luque, “Solventless mechanochemical preparation of novel magnetic bioconjugates,” *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 54, pp. 7635–7637, 2017.
- [254] M. Mazur *et al.*, “Iron oxide magnetic nanoparticles with versatile surface functions based on dopamine anchors,” *Nanoscale*, vol. 5, no. 7, p. 2692, 2013.

- [255] C. Iuga, J. R. Alvarez-Idaboy, and A. Vivier-Bunge, "ROS initiated oxidation of dopamine under oxidative stress conditions in aqueous and lipidic environments," *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, no. 42, pp. 12234–12246, 2011.
- [256] S. Mumtaz *et al.*, "Dopamine coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as enzyme mimics for the sensitive detection of bacteria," *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 91, pp. 12306–12308, 2017.
- [257] G. Marcelo, A. Muñoz-Bonilla, J. Rodríguez-Hernández, and M. Fernández-García, "Hybrid materials achieved by polypeptide grafted magnetite nanoparticles through a dopamine biomimetic surface anchored initiator," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 558–567, 2013.
- [258] Y. Xu *et al.*, "Linker-free conjugation and specific cell targeting of antibody functionalized iron-oxide nanoparticles," *J. Mater. Chem. B. Mater. Biol. Med.*, vol. 2, no. 37, pp. 389–400, 2014.
- [259] Y. Xu, S. Palchoudhury, Y. Qin, T. MacHer, and Y. Bao, "Make conjugation simple: A facile approach to integrated nanostructures," *Langmuir*, vol. 28, no. 23, pp. 8767–8772, 2012.
- [260] J. Hai *et al.*, "Maghemite nanoparticles coated with human serum albumin: combining targeting by the iron-acquisition pathway and potential in photothermal therapies," *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 17, pp. 3154–3162, 2017.
- [261] R. S. Sales and A. Support, "Dynamic Light Scattering Training Achieving reliable nano particle sizing," *Dyn. Light Scatt. Train. Achiev. Reliab. nano Part. sizing*, vol. Accessed 2, p. Available from: <http://149.171.168.221/partcat/wp->, 2014.
- [262] C. Gonçalves, E. Torrado, T. Martins, P. Pereira, J. Pedrosa, and M. Gama, "Dextrin nanoparticles: Studies on the interaction with murine macrophages and blood clearance," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 75, no. 2, pp. 483–489, 2010.
- [263] S. Fiorito, A. Serafino, F. Andreola, and P. Bernier, "Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages," *Carbon N. Y.*, vol. 44, no. 6, pp. 1100–1105, 2006.
- [264] R. D. Palmiter and S. D. Findley, "Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc," *EMBO J.*, vol. 14, no. 4, pp. 639–649, 1995.
- [265] L. Gassié *et al.*, "Hspa9 is required for pronephros specification and formation in *Xenopus laevis*," *Dev. Dyn.*, vol. 244, no. 12, pp. 1538–1549, 2015.
- [266] J. H. Laity, B. M. Lee, and P. E. Wright, "Zinc finger proteins: New insights into structural and functional diversity," *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 11, no. 1, pp. 39–46, 2001.
- [267] A. Ruiz, A. Mancebo, L. Beola, I. Sosa, and L. Gutiérrez, "Dose-Response Bioconversion and Toxicity Analysis of Magnetite Nanoparticles," *IEEE Magn. Lett.*, vol. 7, pp. 3–7, 2016.
- [268] A. Ruiz *et al.*, "Biotransformation of magnetic nanoparticles as a function of coating in a rat model," *Nanoscale*, vol. 7, no. 39, pp. 16321–16329, 2015.
- [269] S. Sabale, V. Jadhav, V. Khot, X. Zhu, M. Xin, and H. Chen, "Superparamagnetic MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Ni, Co, Zn, Mn) nanoparticles: synthesis, characterization, induction heating and cell viability studies for cancer hyperthermia applications," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 26, 2015.
- [270] A. Esmaeili and N. Alizadeh Hadad, "Preparation of ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>–Chitosan-doxorubicin Hydrochloride Nanoparticles and Investigation of their Hyperthermic Heat-Generating Characteristics," *Ceram. Int.*, vol. 41, no. 6, pp. 7529–7535, 2015.
- [271] T. Zargar and A. Kermanpur, "Effects of hydrothermal process parameters on the physical, magnetic and thermal properties of Zn<sub>0.3</sub>Fe<sub>2.7</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic hyperthermia applications," *Ceram. Int.*, vol. 43, no. 7, pp. 5794–5804, 2017.
- [272] J. Tang, M. Myers, K. A. Bosnick, and L. E. Brus, "Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanocrystals: Spectroscopic Observation of Aqueous Oxidation Kinetics<sup>†</sup>," *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 30, pp. 7501–7506, 2003.
- [273] A. Espinosa, R. Di Corato, J. Kolosnjaj-Tabi, P. Flaud, T. Pellegrino, and C. Wilhelm, "Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating

- Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment,” *ACS Nano*, vol. 10, no. 2, pp. 2436–2446, 2016.
- [274] J. Yang, L. Fan, Y. Xu, and J. Xia, “Iron oxide nanoparticles with different polymer coatings for photothermal therapy,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 19, no. 10, 2017.
- [275] Y. Oh, J. Y. Je, M. S. Moorthy, H. Seo, and W. H. Cho, “pH and NIR-light-responsive magnetic iron oxide nanoparticles for mitochondria-mediated apoptotic cell death induced by chemo-photothermal therapy,” *Int. J. Pharm.*, vol. 531, no. 1, pp. 1–13, 2017.
- [276] Q. Tian *et al.*, “Sub-10 nm Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Cu<sub>2</sub>-xS core-shell nanoparticles for dual-modal imaging and photothermal therapy,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 23, pp. 8571–8577, 2013.

## PUBLICACIONES

### Publicadas:

- **Rivero, M;** Hu Jie, Daniel Jaque, Magdalena Cañete, Jorge Sanchez-Marcos, Alexandra Muñoz Bonilla. Compositional tuning of light-to-heat conversion efficiency and of optical properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J.Phys. Chem. C.* **2018**, 122, 28, 16389-16396.
- Wang, J.; **Rivero, M.;** Muñoz Bonilla, A.; Sanchez-Marcos, J.; Xue, W.; Chen, G.; Zhang, W.; Zhu, X. Natural RAFT Polymerization: Recyclable-Catalyst-Aided, Opened-to-Air, and Sunlight-Photolyzed RAFT Polymerizations. *ACS Macro Lett.* **2016**, 5 (11), 1278–1282.
- **Rivero, M.;** del Campo, A.; Mayoral, A.; Mazario, E.; Sanchez-Marcos, J.; Muñoz Bonilla, A. Synthesis and Structural Characterization of  $Zn_xFe_{3-x}O_4$  Ferrite Nanoparticles Obtained by an Electrochemical Method. *Rsc Adv.* **2016**, 6 (46), 40067–40076.

### En redacción:

- **Rivero, M;** Muñoz-Bonilla, A; Sanchez-Marcos, J. Structural and magnetic study of superparamagnetic  $Zn_xFe_{3-x}O_4$  ferrite nanoparticles synthesized by an electrochemical method.
- **Rivero, M;** Marín-Barba, M; Gutiérrez, L; Lozano-Velasco, E; Wheeler, G; Muñoz-Bonilla, A; Morris, C and Ruiz, A. Zinc ferrites' fate in a *Xenopus laevis* model: Toxicity and Biodegradation.

### Relacionadas:

- Jaffry, U.; Mazario, E.; Lemus, J.; **Rivero, M.;** Muñoz-Bonilla, A.; Herrasti, P. The Role of the Temperature in the Morphology and Properties of Zinc Oxide Structures Obtained by Electrosynthesis in Aqueous Solution. *Mater. Chem. Phys.* **2016**, 181, 367–374.







