



Agentes de contraste basados en lantánidos para la obtención de bioimágenes mediante técnicas de resonancia magnética a alto campo y en modo dual T_1 - T_2

Memoria presentada por:

Elísabet Gómez González

Para aspirar al título de doctor

Directores de tesis:

Dr. Manuel Ocaña Jurado

Dra. Nuria Ofelia Núñez Álvarez

Tutora:

Dra. María Dolores Alcalá González

Departamento de Química Inorgánica

Universidad de Sevilla

Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla. CSIC-US

Sevilla, Diciembre 2023

AGRADECIMIENTOS

Es ahora el momento de expresar mi agradecimiento a aquellas personas que me han apoyado de una forma u otra durante la realización de esta tesis.

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores de tesis Manolo y Nuria. Gracias Manolo, por toda la enseñanza que he podido recibir de ti durante estos cuatro años, por tu paciencia y por tu dedicación en todo momento. Gracias Nuria, por toda tu ayuda prestada, especialmente en los aspectos más prácticos. Sin vosotros, esta tesis hubiera sido totalmente distinta. Muchas gracias por guiarme a través de este camino que era totalmente nuevo para mí.

También quiero agradecerle a Ana todos sus consejos y el ánimo que me ha dado, sin los cuales, por ejemplo, difícilmente habría decidido realizar las estancias. Gracias por invertir tu tiempo desinteresadamente en multitud de ocasiones.

Por supuesto, quiero darle las gracias a Encarna, mi compi de laboratorio que, desde el primer momento en que entré en el grupo, no ha dudado en ayudarme en cada momento que lo necesitaba. Gracias por poner la radio justo en el momento más oportuno, por los descansitos propuestos cuando más falta hacían, por cada vez que te pedí que lavaras una muestra o prepararas una rejilla y nunca me negaste el favor. Gracias por tu disposición a responderme pacientemente cada vez que te decía: “Tengo una duda...” (incluidas las que te he preguntado mientras escribía esta sección y de las cuales he perdido ya la cuenta). Sin ti, todo habría sido bastante diferente. ¡Gracias!

Muchas gracias, también, a Dani y Rosalía, sin los cuales no existiría *coffee time*. Gracias por vuestra diligencia incansable al venir y proponernos un descanso cada día a las 11 para que desconectáramos, aun cuando os lo solíamos negar repetidamente.

Además, toda esta aventura, seguramente no hubiera comenzado de la misma manera si no hubiera sido por Mdol y su grupo que me que me abrieron las puertas en el Instituto de Ciencia de Materiales de Sevilla a través de aquella JAE-Intro con la que empezó todo allí. Gracias por contribuir a que me familiarizara con una nueva rutina que era totalmente desconocida para mí.

También me gustaría agradecerles a todos los técnicos, personal de administración y limpieza por facilitar nuestro trabajo en cicCartuja.

Yéndonos ahora fuera del entorno conocido, y viajando un poco...

Me gustaría agradecerles a Jesús del Instituto de Nanociencia y Materiales de Aragón, a su equipo y, en especial a Bea, por hacer posible que mi estancia en Zaragoza fuera un tiempo fructífero de gran aprendizaje.

Y como no, no podía olvidarme de Mélody, Ana Izquierdo, JJ y Benji que me apoyaron durante ese tiempo en Zaragoza. Gracias por hacerme sentir como en casa.

Agradezco, por supuesto, a Marisa y a Carlos por haberme permitido realizar una estancia en su grupo en el Instituto de Investigación Biomédica de Málaga y Plataforma en Nanomedicina (Málaga) para que pudiera aprender de primera mano cómo realizaban la parte *in vivo* de la experimentación.

Me gustaría darle las gracias a Edu y a su grupo por darme la oportunidad de ser uno más de ellos durante algunos meses en *Trinity College Dublin*. Especialmente, quiero agradecerle a Almu por enseñarme tanto en tan poco tiempo y por su paciencia con mi pulso mientras “hacíamos células”. Gracias por facilitarme mi estancia allí y seguir estando dispuesta a que nuestra investigación siga adelante.

I would also like to thank Okiki & Joel, Yasmin & Callum, Ed & Miriam, Leanne, Vicki, Lily, Tanya, Misato, and every person from

Grosvenor Road Baptist Church who during my stay in Dublin included me in their big family and took care of me.

Y volviendo ahora a un ambiente más cercano...

Quiero agradecerles a todos aquellos que forman parte de la Iglesia Bautista El Olivar y en especial a los Hayes, Lidia & Diego, César & Sonia, Maggie & Alfonso, María, Ana Mari, Francielle, por toda su guía y cariño en cada momento. Gracias por ser familia.

En especial, quiero por supuesto darle las gracias a “las Maris” que, aunque aparecieron en mi vida recientemente, me han apoyado cada día, me han enseñado mucho, y me siguen enseñando cada día. Gracias Yessica. Gracias Lydia.

Por último, me gustaría transmitirle mi agradecimiento a mi familia. Particularmente le doy las gracias a mis padres, mi hermana, mi tía Encarni y mi tío José por alentarme a empezar y completar lo que termina aquí hoy y da comienzo a una nueva etapa.

ÍNDICE

Resumen.....	11
Lista de abreviaturas.....	21
Capítulo I: Antecedentes, motivación y objetivos.....	25
1.1.Introducción.....	27
1.2.Obtención de imágenes mediante resonancia magnética para el diagnóstico clínico.....	27
1.2.1. Imagen por resonancia magnética a alto campo.....	31
1.2.2. Imagen por resonancia magnética en modo dual T ₁ -T ₂	34
1.2.3. Imagen multimodal mediante resonancia magnética y luminiscencia.....	36
1.3.Características requeridas para el uso de nanopartículas en la obtención de imágenes biomédicas.....	38
1.3.1. Control del tamaño y forma de partícula.....	40
1.3.2. Control de dispersabilidad: funcionalización.....	42
1.3.3. Biocompatibilidad.....	44
1.4.Objetivos.....	46
1.5. Bibliografía.....	48
Capítulo II: Procedimientos experimentales.....	55
2.1.Síntesis de nanopartículas.....	57
2.1.1. Síntesis de nanopartículas de fase única.....	57
2.1.2. Síntesis de nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza.....	62
2.1.3. Purificación de las nanopartículas sintetizadas.....	63
2.2.Funcionalización.....	63
2.2.1. Funcionalización con ácido poliacrílico.....	65
2.2.2. Funcionalización con polietilenglicol.....	67
2.3.Caracterización.....	69
2.3.1. Análisis morfológico.....	69
2.3.2. Análisis estructural.....	69
2.3.3. Análisis de composición química.....	70

2.4. Dispersabilidad.....	73
2.4.1. Dispersión dinámica de luz.....	73
2.4.2. Potencial zeta.....	73
2.5. Estabilidad química.....	76
2.6. Relajatividades magnéticas.....	76
2.7. Propiedades luminiscentes.....	78
2.7.1. Espectros de excitación y emisión.....	78
2.7.2. Vidas medias.....	78
2.7.3. Imágenes de luminiscencia en el infrarrojo cercano.....	79
2.8. Ensayos en modelo animal.....	80
2.8.1. Imágenes <i>in vivo</i> de resonancia magnética.....	80
2.8.2. Imágenes <i>ex vivo</i> de luminiscencia en el infrarrojo cercano.....	81
2.9. Ensayos de biocompatibilidad.....	82
2.9.1. Citotoxicidad.....	82
2.9.2. Histología.....	84
2.10. Bibliografía.....	85

Capítulo III: Agentes de contraste para imagen por resonancia

magnética de alto campo.....	87
3.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas.....	89
3.1.1. Nanopartículas de vanadato de disproso.....	89
3.1.2. Nanopartículas de molibdato de sodio y disproso.....	96
3.1.3. Nanopartículas de wolframato de sodio y disproso.....	100
3.1.4. Nanopartículas de fosfato de disproso...105	
3.2. Dispersabilidad en condiciones fisiológicas y funcionalización.....	110
3.2.1. Dispersabilidad de las nanopartículas prístinas.....	110
3.2.2. Funcionalización de las nanopartículas con ácido poliacrílico.....	111
3.2.2.1. Funcionalización <i>one pot</i>	111
3.2.2.2. Funcionalización <i>two steps</i>	118
3.3. Relajatividades magnéticas.....	123
3.4. Estabilidad química.....	126
3.5. Biocompatibilidad y comportamiento <i>in vivo</i>	128

3.5.1. Funcionalización con polietilenglicol...	128
3.5.2. Análisis de la viabilidad celular.....	129
3.5.3. Evaluación del comportamiento <i>in vivo</i>	131
3.5.4. Histología.....	135
3.6. Conclusiones.....	135
3.7. Bibliografía.....	137

Capítulo IV: Agentes de contraste para imagen por resonancia

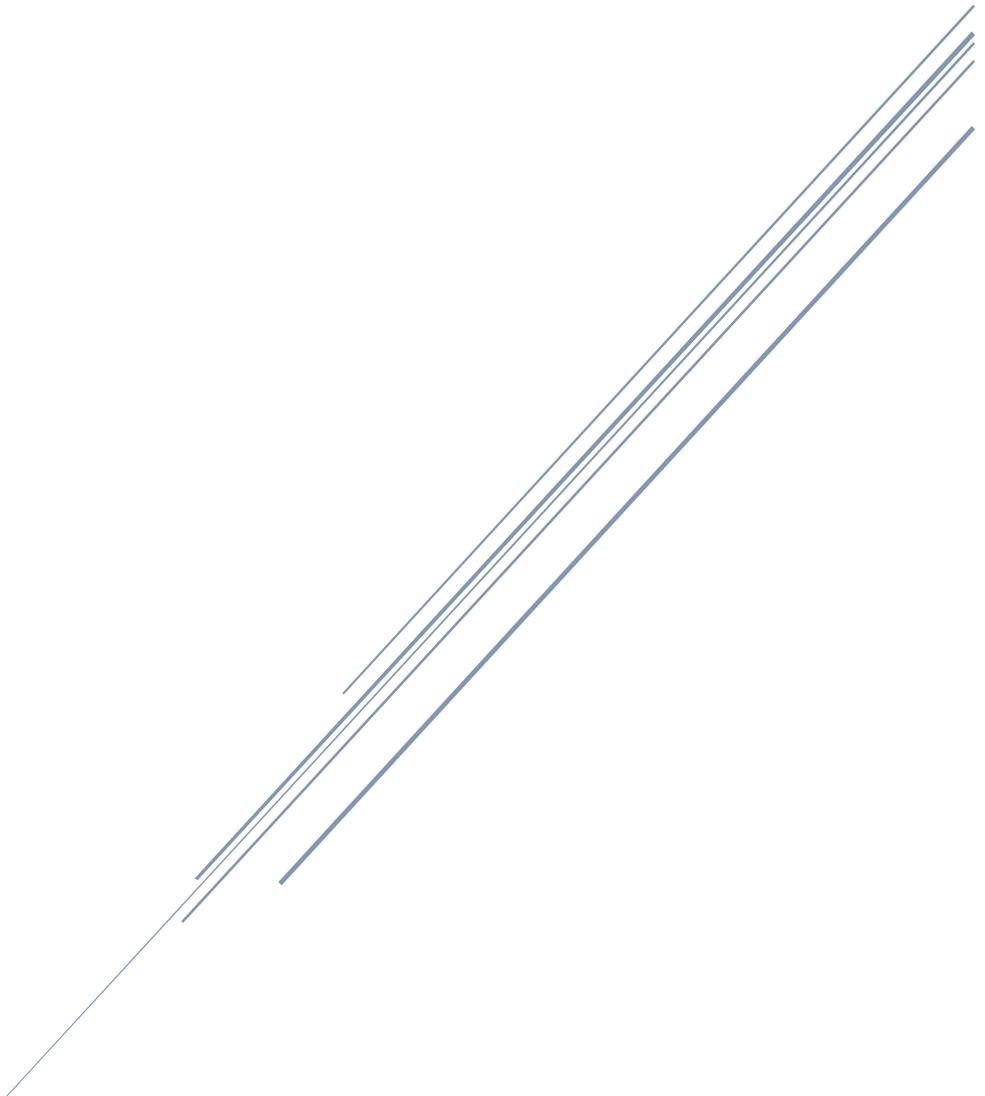
magnética dual T ₁ -T ₂	139
4.1. Introducción.....	141
4.2. Síntesis y caracterización.....	142
4.2.1. Nanopartículas de fase única.....	142
4.2.2. Nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza.....	145
4.3. Relajatividades magnéticas.....	148
4.4. Dispersabilidad.....	151
4.5. Estabilidad química.....	152
4.6. Viabilidad celular.....	153
4.7. Conclusiones.....	155
4.8. Bibliografía.....	156

Capítulo V: Sondas bimodales para imagen por resonancia

magnética de alto campo y luminiscentes en el infrarrojo cercano...	157
5.1. Introducción.....	159
5.2. Síntesis y caracterización.....	161
5.2.1. Nanopartículas de DyVO ₄ dopado con Nd ³⁺	161
5.2.2. Nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza.....	162
5.3. Propiedades luminiscentes.....	170
5.4. Relajatividades magnéticas.....	174
5.5. Dispersabilidad.....	175
5.6. Estabilidad química.....	176
5.7. Viabilidad celular.....	177
5.8. Obtención de imágenes	179
5.9. Conclusión.....	182
5.10. Bibliografía.....	184

Conclusiones generales.....	187
Apéndice I: Factores que determinan los valores de relajatividad magnética de agentes de contraste paramagnéticos.....	
193	
1. Introducción.....	195
2. Relajatividad longitudinal.....	196
3. Relajatividad transversal.....	200
4. Bibliografía.....	203
Apéndice II: Características de los productos químicos empleados.....	
205	
1. Precursores catiónicos.....	207
2. Precursores aniónicos.....	208
3. Disolventes.....	208
4. Polímeros empleados en la funcionalización.....	209
5. Reactivos para la funcionalización con polietilenglicol.....	209
6. Productos químicos empleados en análisis de citotoxicidad...	210
Lista de publicaciones.....	211

RESUMEN



RESUMEN

La técnica de obtención de imágenes por Resonancia Magnética (MRI, siglas en inglés) permite la visualización de órganos y tejidos para el diagnóstico médico. Esta técnica destaca por ser no invasiva, no requerir el uso de agentes radiactivos u ondas electromagnéticas de alta energía, poseer una alta resolución espacial y una gran profundidad de imagen. A pesar de estas ventajas, a veces es necesario aumentar el contraste entre la región de interés y su entorno, empleando agentes de contraste (ACs) que están constituidos por sustancias magnéticamente activas que acortan los tiempos de relajación T_1 y T_2 del protón. Los ACs que acortan T_2 oscurecen la región de interés, mientras que aquellos que disminuyen el valor de T_1 dan lugar a un mayor brillo de dicha región. Entre los primeros destacan los óxidos superparamagnéticos basados en óxido de hierro, y entre los segundos, los compuestos de Gd^{3+} en los cuales están basados los agentes de contraste comerciales.

Aunque la técnica MRI está muy bien establecida en el ámbito clínico, se están abordando en la actualidad diversas modificaciones de la misma con el objetivo de mejorar la fiabilidad del diagnóstico. En concreto, se han propuesto la técnica de MRI a alto campo y la técnica de MRI dual $T_1 - T_2$. La primera supone emplear campos magnéticos más altos que los implicados en los escáneres usados en clínica (≤ 3 T), con el objeto de mejorar la resolución. La segunda permite aumentar la sensibilidad y exactitud del diagnóstico registrando imágenes brillantes y oscuras de forma simultánea, ya que, mediante la validación cruzada de ambos tipos de imágenes, se pueden excluir falsos positivos y, además, obtener información complementaria.

Desafortunadamente, los ACs convencionales que se usan en clínica no son adecuados para la obtención de imágenes mediante estas técnicas por lo que es imperativo desarrollar nuevos agentes de contraste. Para la técnica de MRI a alto campo, se han desarrollado diversas alternativas siendo los candidatos más prometedores los compuestos basados en Dy^{3+} , ya que este ion posee un momento magnético muy elevado ($10,6 \mu B$), lo cual conduce a valores

de relajatividad transversal elevados. Para MRI dual T_1 - T_2 son igualmente interesantes los compuestos basados en iones Dy^{3+} como componente T_2 , y como componente T_1 , suelen emplearse iones Gd^{3+} los cuales poseen un alto momento angular de espín ($7/2$) que permite alcanzar un alto valor de relajatividad longitudinal.

En la bibliografía se han reportado distintos ACs, tanto para MRI de alto campo como para MRI dual T_1 - T_2 , basados en NPs basadas en diversos fluoruros de los elementos lantánidos anteriormente mencionados, los cuales se caracterizan por presentar cierta solubilidad en medio acuoso que da lugar a la liberación de iones fluoruro que son potencialmente tóxicos.

Por último, en los últimos años se están desarrollando sondas que sean útiles para la obtención de bioimágenes mediante distintas técnicas que permitan obtener información complementaria para así mejorar la precisión del diagnóstico. Entre las distintas combinaciones posibles, destacan aquellas que son adecuadas para la obtención de imágenes mediante MRI y mediante luminiscencia, especialmente en la región del infrarrojo cercano (NIR, siglas en inglés) por ser este tipo de radiación menos dañina y tener mayor poder de penetración en los tejidos. Esta última técnica es muy útil para profundizar en el conocimiento de patologías a nivel celular o subcelular debido a su alta sensibilidad, la cual complementa a la información anatómica proporcionada por la técnica MRI, haciendo de esta combinación de técnicas una herramienta muy potente de diagnóstico médico. La disponibilidad de una única sonda que sea capaz de actuar como agente de contraste para ambos tipos de técnicas es obviamente de gran interés ya que reduciría posibles efectos no deseados y aumentaría la comodidad para el paciente. Hasta el momento, la mayoría de sondas reportadas en la bibliografía para la obtención de imágenes multimodales también están basadas en nanopartículas de matriz fluoruro cuya problemática ya ha sido comentada.

Estos antecedentes justifican la pertinencia de esta tesis doctoral cuyos principales objetivos son el desarrollo de agentes de contraste químicamente

estables para MRI monomodal a alto campo, para MRI dual T₁-T₂ y para imagen multimodal mediante MRI a alto campo e imagen luminiscente en el NIR.

Para conseguir estos objetivos ha sido necesario considerar diferentes composiciones, desarrollar diversos métodos de síntesis de nanopartículas y analizar sus características morfológicas y estructurales, su estabilidad química, su dispersabilidad, su relajatividad magnética, sus propiedades luminiscentes (en el caso de las sondas multimodales) y su viabilidad celular.

En concreto, en el caso de los ACs para MRI de alto campo, se han estudiado distintas composiciones que incluyen vanadatos, molibdatos, volframatos y fosfatos de Dy³⁺. Como resultado de estos estudios se concluye que, el sistema óptimo es el constituido por nanopartículas de DyPO₄ funcionalizadas con ácido poliacrílico. En el caso de los ACs para MRI dual T₁-T₂, se han explorado diversas arquitecturas (fase única, núcleo-corteza) de sistemas constituidos por DyVO₄ como componente T₂ y por GdVO₄ como componente T₁, siendo el diseño óptimo el constituido por nanopartículas de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄, y funcionalizadas con ácido poliacrílico. Por último, en el caso de los ACs para la obtención de imágenes multimodales mediante MRI de alto campo y luminiscencia en la región infrarroja, se ha desarrollado un sistema constituido por nanopartículas funcionalizadas con ácido poliacrílico de DyVO₄ (componente magnético) recubiertas por una corteza inactiva de LaVO₄ y una corteza exterior de LaVO₄ dopado con iones Nd³⁺ (componente luminiscente). En todos los casos en los que ha sido posible, se ha evaluado el comportamiento *in vivo* de las sondas óptimas en un modelo animal, que ha permitido establecer la idoneidad de dichas sondas como agentes de contraste para la obtención de bioimágenes mediante las técnicas de MRI de alto campo, MRI dual T₁-T₂ y mediante el uso combinado de MRI de alto campo y luminiscencia en el NIR.

ABSTRACT

Magnetic Resonance Imaging (MRI) allows the visualization of organs and tissues for medical diagnosis. This technique is non-invasive, does not require the use of radioactive agents or high-energy electromagnetic waves, and has a high spatial resolution and a great image depth. Despite these advantages, in order to increase the contrast in these images between the region of interest and its surroundings, it is often necessary to use contrast agents (CAs), which are composed of magnetically active substances that shorten T_1 and T_2 proton relaxation times. CAs that shorten T_2 darken the region of interest, while those that decrease T_1 value result in an increased brightness of the region of interest. The commercial and more efficient T_1 CAs, are based on different Gd^{3+} compounds. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles are among the most studied T_2 CAs.

Although MRI is well established in clinics, several modifications of this technique are being currently addressed with the aim of improving diagnostic reliability. In particular, high-field MRI and T_1 - T_2 dual mode MRI have been proposed. The first one improves image resolution by using higher magnetic fields than those involved in conventional scanners (≤ 3 T). T_1 - T_2 dual mode MRI involves recording bright and dark images simultaneously. By so doing, cross-validation of both types of images can be carried out, so that false positives can be excluded, and complementary information can be also obtained. Both advantages allow to increase diagnostic sensitivity and accuracy.

Unfortunately, the conventional CAs used in clinics are not suitable for these novel techniques, for which, it is imperative to develop new contrast agents. For the high-field MRI technique, several alternatives have been considered. The most promising candidates are compounds based on Dy^{3+} , since this ion has a very high magnetic moment (10.6 μB), which leads to high transverse relaxivity values. For T_1 - T_2 dual mode MRI, compounds based on Dy^{3+} ions as T_2 component are equally interesting, and as T_1 component, Gd^{3+}

ions are usually used, which have a high spin angular momentum ($7/2$) that allows high values of longitudinal relaxivity. Different CAs have been reported in the literature, both for high-field MRI and T_1 - T_2 dual mode MRI, consisting of fluoride-based nanoparticles containing Dy^{3+} and Gd^{3+} . The main drawback of these fluoride-based nanoparticles is their solubility in aqueous media, which result in the release of potentially toxic fluoride ions.

Finally, an increasing activity can be detected in literature regarding with the development of multimodal bioimaging probes, which can be used for two or more imaging techniques that allow to obtain complementary information thus improving diagnosis accuracy. Among the different possible combinations, MRI and luminescence have been widely studied. This combination of techniques is very useful for medical diagnosis since luminescent imaging gives information on pathologies at the cellular or subcellular level due to its high sensitivity, which is complementary to the anatomical information provided by MRI technique. For the former technique, working in the near-infrared (NIR) region is advantageous because this type of radiation is not harmful for biological specimens and has a high penetration deep. For multimodal bioimaging, the development of single probes that work properly for all involved techniques would reduce undesired effects and would be more comfortable for the patient. So far, most of the probes reported in literature for MRI and NIR luminescent bioimaging are also fluoride-based nanoparticles, whose drawbacks for *in vivo* applications has been already discussed.

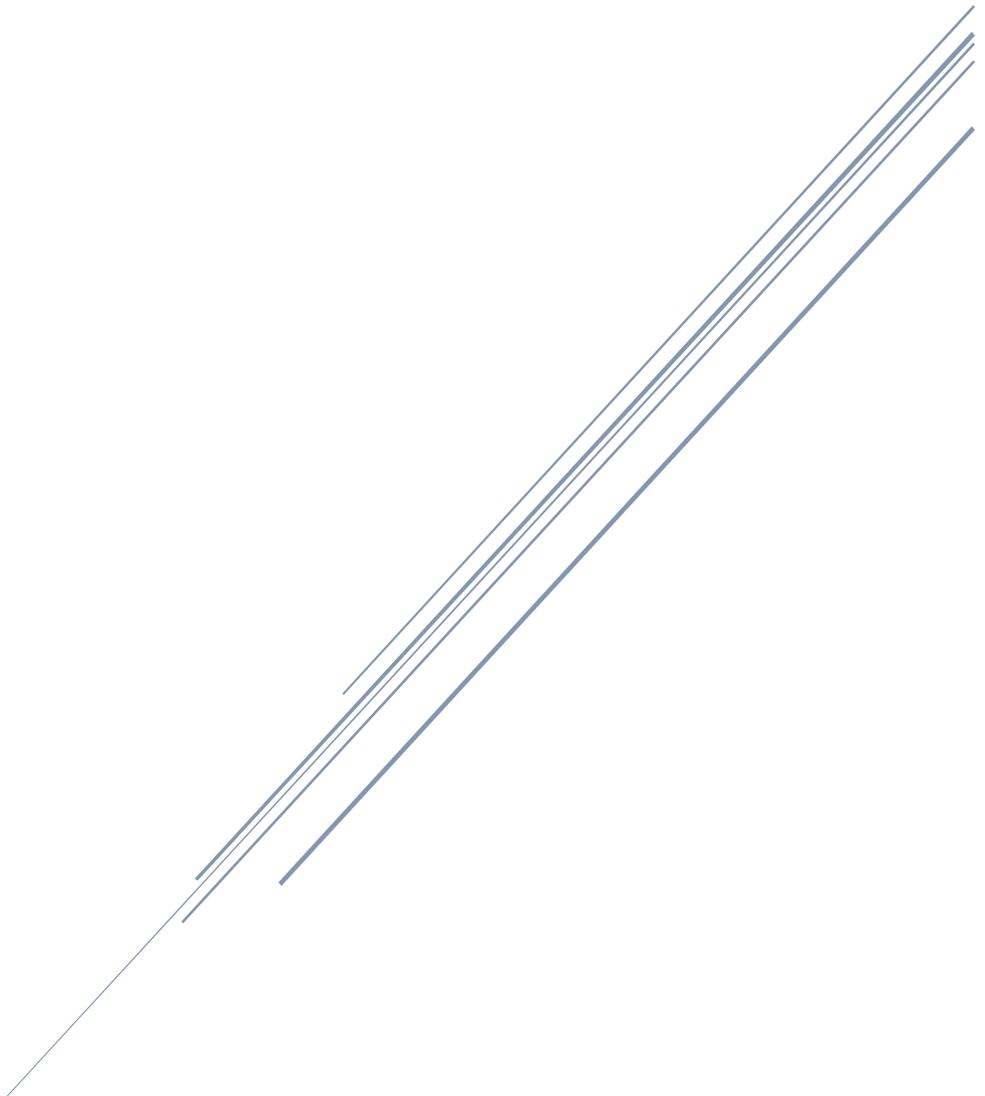
The main objectives of this doctoral thesis are the development of chemically stable contrast agents for high-field single-modal MRI, for T_1 - T_2 dual mode MRI and for multimodal imaging by using high-field MRI and near-infrared luminescent imaging.

To achieve these objectives, it has been necessary to consider different CAs compositions, developing various methods of nanoparticle synthesis and to analyzing their morphological and structural characteristics, their chemical

and colloidal stability, their magnetic relaxivity, their luminescent properties (in the case of multimodal probes) and their cell viability.

In the case of CAs for high-field MRI, vanadates, molybdates, tungstates and phosphates containing Dy^{3+} have been addressed. As a result of these studies, it is concluded that the optimal system is the one constituted by DyPO_4 nanoparticles functionalized with polyacrylic acid. In the case of CAs for dual T_1 - T_2 dual mode MRI, different architectures (single-phase, core-shell) based on DyVO_4 as T_2 component and GdVO_4 as T_1 component, have been explored, the optimal design being the one consisting of DyVO_4 nanoparticles coated with a GdVO_4 shell, and functionalized with polyacrylic acid. Finally, in the case of CAs for multimodal imaging by high-field MRI and luminescence in the infrared region, a system consisting of polyacrylic acid-functionalized DyVO_4 nanoparticles (magnetic component) coated with an inactive LaVO_4 shell and an outer LaVO_4 shell doped with Nd^{3+} ions (luminescent component) has been developed. In all cases, the *in vivo* behavior of the optimal probes was evaluated in animal model, which allowed to establish the suitability of these probes as contrast agents for bioimaging by high-field MRI, T_1 - T_2 dual mode MRI and by the combined use of high-field MRI and near-infrared luminescence.

LISTA DE ABREVIATURAS



LISTA DE ABREVIATURAS

AC(s): agente(s) de contraste

CA(s): *contrast agent(s)*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

Dh: diámetro hidrodinámico

DLS: *dynamic light scattering*

DMEM: *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

DRX: difracción de rayos X

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

EDS: espectroscopía de energías dispersivas de rayos X

EG: etilenglicol

FDA: *Food and Drug Administration*

FSN: fibrosis sistémica nefrogénica

FTIR: espectroscopía infrarroja de absorción por transformada de Fourier

ICP-AES: espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente

I_0 : intensidad de luminiscencia a tiempo cero

I_{0i} : componente de la intensidad de luminiscencia

λ_{em} : longitud de onda de emisión

λ_{exc} : longitud de onda de excitación

Ln: lantánido

MRI: imagen por resonancia magnética

MTT: bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio

MW: horno asistido por microondas

NIR: infrarrojo cercano

NP(s): nanopartícula(s)

PAA: ácido poliacrílico

PAH: poli(clorhidrato) de alilamina

PBS: disolución salina tamponada con fosfato

PEG: polietilenglicol

PZ: potencial zeta

R₁: velocidad de relajación longitudinal

R₂: velocidad de relajación transversal

r₁: relajatividad longitudinal

r₂: relajatividad transversal

RMN: resonancia magnética nuclear

sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida

SPION: nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro

STEM: microscopía electrónica de transmisión con modo barrido.

τ : tiempo de vida media de luminiscencia

τ_i : tiempo de vida media de luminiscencia para el componente i con intensidad I_{0i}

T₁: tiempo de relajación longitudinal

T₂: tiempo de relajación transversal

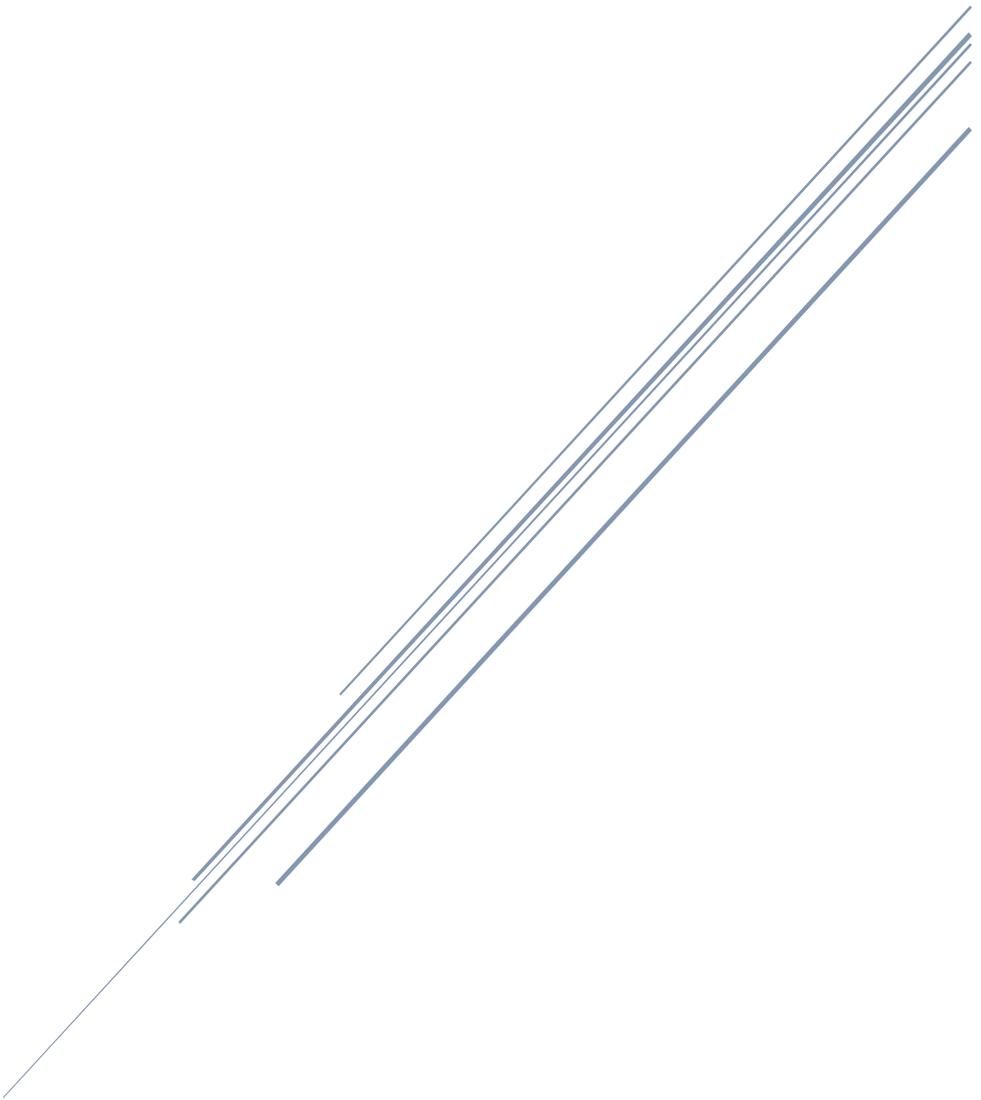
TEM: microscopía electrónica de transmisión

TG: termogravimetría

TO-PRO-3: tiazol rojo

CAPÍTULO I

MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS



1.1 Introducción

La nanomedicina es una rama de la medicina que utiliza la nanotecnología para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de diferentes enfermedades.^{1,2} Esta tesis doctoral se enmarca en el ámbito del diagnóstico clínico y más concretamente, en el relacionado con la adquisición de bioimágenes mediante técnicas avanzadas de resonancia magnética. A continuación, se presenta una descripción breve de los fundamentos y características de esta técnica junto con un análisis de los principales retos que deben abordarse con objeto de optimizar el funcionamiento de la misma y, por tanto, la fiabilidad del diagnóstico

1.2 Obtención de imágenes mediante resonancia magnética para el diagnóstico clínico

Es sobradamente conocido que gran parte de los recientes avances en el campo del diagnóstico médico son debidos al empleo de modernas técnicas de obtención de imágenes de células, tejidos y órganos tales como la imagen por resonancia magnética, la tomografía axial computarizada, la tomografía por emisión de positrones y la tomografía computarizada por emisión de fotón único. La primera de ellas destaca por ser una técnica no invasiva, con alta resolución espacial y gran profundidad de imagen. Además, no requiere el uso de agentes radiactivos u ondas electromagnéticas de alta energía, a diferencia de las otras técnicas mencionadas.^{3, 4}

La técnica de imagen por resonancia magnética (MRI, en inglés) se basa en la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), siendo el protón (^1H) el núcleo más comúnmente analizado debido a su elevada constante giromagnética, a la abundancia del agua en los tejidos biológicos y a la propia abundancia natural de este isótopo del hidrógeno (99,98 %). La espectroscopía RMN requiere la utilización de un imán potente para crear una magnetización neta del sistema de spines del protón en la dirección longitudinal al campo magnético (z), y de un pulso de radiofrecuencias que permite alterar el

equilibrio de población de dicha magnetización, desplazándola hacia el plano transversal a dicho campo (xy) (Fig. 1). Una vez cesa dicho pulso, la magnetización neta (M_z) se recupera mediante un doble proceso de relajación (longitudinal y transversal). El tiempo que tarda en recuperarse el 63 % de la magnetización en el eje z (relajación longitudinal) se denomina T_1 mientras que T_2 es el tiempo que tarda la magnetización en decaer al 37 % de su valor inicial en el plano xy (relajación transversal). En un escáner MRI, se registra, mediante el ajuste de diversos parámetros (tiempo de repetición, tiempo de eco y ángulo de giro), la magnetización recuperada bien en z o la residual en xy , y las imágenes obtenidas a partir de estos datos se conocen como ponderadas en T_1 o en T_2 , respectivamente.

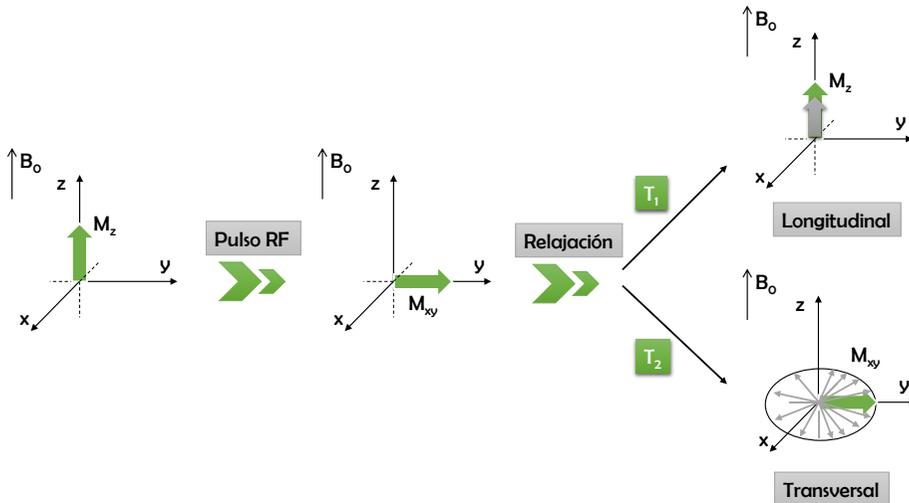


Figura 1: Comportamiento del vector magnetización tras un pulso de radiofrecuencia en un experimento de MRI.

En general, las regiones en las que se produce un acortamiento de T_1 aparecen en la imagen como zonas brillantes, por lo que el contraste se denomina positivo, mientras que un acortamiento de T_2 origina regiones que aparecen más oscuras que su entorno, denominándose este contraste como negativo. Cuanto más rápida es la relajación longitudinal, más brillante es la imagen ponderada en T_1 y cuanto más rápida es la relajación transversal, más oscura es la imagen ponderada en T_2 . Generalmente la imagen ponderada en T_1

es útil para el estudio de tejidos adiposos o para la evaluación de la retención de líquidos en estructuras concretas, como articulaciones, que es difícil analizar mediante imagen ponderada en T_2 . Por el contrario, esta última resulta muy adecuada para estudiar estructuras muy hidratadas o inflamaciones locales.

En ocasiones, la diferencia de contraste entre la región de interés y el tejido que la rodea es sutil y es necesario aumentar dicho contraste. Para ello se emplean los denominados agentes de contraste (ACs) que están constituidos por sustancias magnéticamente activas que acortan los tiempos de relajación T_1 y T_2 del protón.⁵ Los ACs que acortan T_2 oscurecen aún más la región de interés y se denominan ACs negativos, mientras que aquellos que disminuyen el valor de T_1 dan lugar a un mayor brillo de dicha región y se denominan ACs positivos.⁶ Al representar las velocidades de relajación ($R_1 = 1/T_1$ y $R_2 = 1/T_2$) en función de la concentración del AC, se obtiene una recta cuya pendiente es la relajatividad magnética (longitudinal, r_1 , y transversal, r_2 , respectivamente). La eficacia de un agente de contraste es mayor cuanto mayor es el valor de estas magnitudes que, además, determina el carácter positivo o negativo de dicho agente.^{7, 8} Así, se considera comúnmente que, para que un AC actúe como positivo, el cociente r_2/r_1 debe ser próximo a 1,^{9, 10} mientras que para valores de este cociente superiores a 10, los agentes de contraste actúan como negativos.^{4, 11-13}

Atendiendo a su naturaleza magnética, los agentes de contraste para MRI se pueden clasificar en paramagnéticos y superparamagnéticos. Entre los primeros, los más conocidos son los constituidos por complejos de Gd^{3+} (*Magnevist*, *Dotarem*, *Omniscan* y *ProHance*) que son empleados hoy en día en los ensayos clínicos^{14, 15} y que funcionan como ACs positivos debido al elevado momento angular de espín ($S = 7/2$) del Gd^{3+} que da lugar a un alto valor de r_1 (Apéndice D). A pesar del uso extendido de este tipo de ACs en clínica, recientemente se ha observado que en ocasiones desencadena una afección médica conocida como fibrosis sistémica nefrogénica (FSN). Se trata de un efecto secundario poco frecuente pero potencialmente perjudicial que se

observa en algunos pacientes con enfermedad renal grave o tras un trasplante de hígado.^{16, 17} Por ello, se han llevado a cabo diversas investigaciones en los últimos años encaminadas a buscar alternativas a estos ACs. Entre ellas, se ha propuesto la sustitución del Gd^{3+} por Mn^{2+} , cuyo valor de S, aunque menor que el del Gd^{3+} , es también alto ($S = 5/2$) por lo que es adecuado como ACs T_1 . De hecho, dos agentes basados en Mn(II), el conocido como Mn-DPDP que es específico para el hígado (*Teslascan*)¹⁸ y un contraste oral que contiene cloruro de Mn(II) (*LumenHance*)¹⁹, están disponibles comercialmente en la actualidad para uso en humanos, no habiéndose encontrado hasta ahora ninguna relación entre el Mn^{2+} y la FSN. No obstante, y aunque es cierto que pequeñas cantidades son esenciales para la salud humana, la sobreexposición a iones de Mn^{2+} libres puede provocar el trastorno neurodegenerativo conocido como "manganismo", con síntomas parecidos a los de la enfermedad de Parkinson.

Debido a estos posibles efectos secundarios, se ha sugerido el uso de diversas nanopartículas (NPs) inorgánicas como ACs para MRI ya que estas presentan una serie de ventajas interesantes frente a los complejos.^{7, 20, 21} Entre ellas destaca el hecho de que mediante el control del tamaño de las mismas es posible controlar su tiempo de circulación y sus vías de eliminación del organismo.²² Además, las NPs pueden funcionalizarse y bioconjugarse con facilidad para que puedan ser acumuladas preferentemente en el órgano de interés y no se diseminen por todo el organismo. De esta forma, se pueden disminuir las dosis necesarias, con el consiguiente beneficio para el paciente.²³

En cuanto a los ACs superparamagnéticos, en su mayoría están basados en NPs superparamagnéticas de óxido de hierro (conocidas como SPION, en inglés) que presentan un alto valor de r_2 y, por tanto, son útiles como ACs negativos. Estos agentes presentan características atractivas tales como su biocompatibilidad, fácil metabolización, magnetización de saturación elevada que puede controlarse ajustando el tamaño y la composición de las partículas, y una fácil funcionalización de la superficie.²⁴

A pesar de que la técnica MRI está muy bien establecida en el ámbito clínico y de la disponibilidad de ACs adecuados para mejorar el contraste de las imágenes, se están abordando en la actualidad diversas modificaciones de esta técnica con el objetivo de mejorar la fiabilidad del diagnóstico. En concreto, se han propuesto recientemente la técnica de MRI a alto campo, la técnica de MRI dual T₁-T₂ y el uso combinado de imágenes obtenidas mediante MRI y mediante otras técnicas que aportan información complementaria, como es el caso de la imagen luminiscente. El fundamento de estas técnicas, así como las ventajas que presentan frente a la MRI convencional se presentan en las siguientes secciones en los que se establecerá la pertinencia de la investigación propuesta en esta tesis doctoral.

1.2.1. Imagen por resonancia magnética a alto campo.

La técnica de MRI a alto campo supone emplear campos magnéticos más altos que los implicados en los escáneres usados en clínica, los cuales funcionan a campos menores de 3 T. Una de las ventajas más importantes de utilizar campos altos es la mejora de la resolución (Fig. 2). Así, cuanto más intenso es el campo magnético, mayor es la relación señal/ruido y, por consiguiente, la resolución también aumenta.²⁵ Prueba de ello es que mientras que con los escáneres clínicos de 1,5 y 3 T se pueden obtener imágenes con una resolución máxima de 1 mm, a 7 T es posible obtener una resolución de hasta 0,5 mm.²⁵ Otra ventaja importante de usar campos altos es la disminución de los tiempos de adquisición de imágenes, lo cual implica una mayor comodidad para el paciente.^{26, 27}

Hay que señalar que, aunque este tipo de escáneres de alto campo no son utilizados de forma generalizada en clínica actualmente, en el ámbito de la investigación en modelos animales, su empleo ha crecido de forma significativa en los últimos años. Ello es debido a que la alta relación señal-ruido es de especial importancia para la obtención de imágenes preclínicas de modelos animales pequeños como los ratones, para lo cual se requiere una alta resolución. De hecho, los sistemas de MRI para animales suelen estar

equipados con imanes que proporcionan campos entre 7 y 9,4 T.²⁹ Es destacable que mediante el empleo de campos de 9 T se han conseguido visualizar incluso micrometástasis de 0,2 mm en ratones.³⁰ La técnica de MRI a alto campo es también una gran herramienta de investigación en humanos, habiéndose empleado en estudios sobre la esclerosis múltiple, para la obtención de imágenes de los ganglios basales y estructuras relacionadas, y para angiografías.^{25, 31-33}

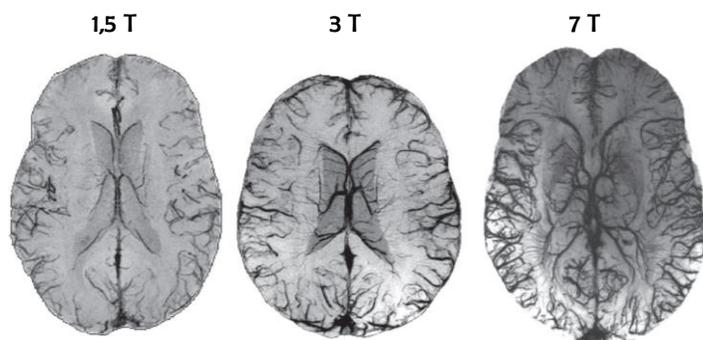


Figura 2. Imágenes de un cerebro obtenidas mediante MRI a distintos campos (1,5, 3 y 7 T).²⁸

Hay que señalar que a pesar de estas ventajas que presenta la MRI a alto campo, aún no está establecido su uso clínico porque deben todavía resolverse aspectos importantes como son la seguridad para el paciente, el desarrollo de nueva instrumentación y la ineficacia de los ACs convencionales al emplearlos a alto campo.

En cuanto al primer aspecto, inicialmente, la normativa de la FDA (*Food and Drug Administration*) limitaba las aplicaciones clínicas a 3T, considerando los posibles efectos secundarios que podían generar ruido y la estimulación nerviosa provocada por los altos campos.^{28, 31} En 2003, la FDA declaró que la MRI con campos de hasta 8 T no constituía un riesgo significativo para humanos (excluidos los neonatos).³⁴ Ello, fue confirmado posteriormente, en 2009, por la Comisión Internacional sobre Protección contra la Radiación No Ionizante (ICNIRP, en inglés), si bien indicó que estos campos pueden provocar leves efectos secundarios tales como vértigos y/o mareos.³⁵

Sin embargo, estos efectos secundarios remiten tras la obtención de las imágenes MRI, por lo que no constituyen un riesgo considerable para la salud. Actualmente, se debate si es adecuado emplear campos superiores a 8 T para la obtención de imágenes MRI en humanos.³⁴

Respecto al desarrollo de la nueva instrumentación necesaria para obtener imágenes a alto campo, hay que hacer notar que en los últimos años ha aumentado el número de sistemas de alto campo (7 T) instalados en centros especializados en neuroimagen para investigación en humanos (60 en 2014 y a más de 80 en 2018).^{33, 36} Además, a partir de 2018, se han instalado varios equipos que funcionan a campos aún más altos (entre 9,4 y 11,7 T),³⁷⁻³⁹ también para su uso en el ámbito de la investigación. No obstante, para uso clínico, sólo se dispone en la actualidad de un sistema de 7 T, que fue autorizado en 2017 para la obtención de imágenes de piernas, brazos y cabeza.⁴⁰

Por último, la ineficacia de los ACs convencionales en condiciones de campo alto es debida a diferentes causas según se trate de ACs positivos o negativos. En el caso de los ACs positivos basados en Gd^{3+} , las ecuaciones Solomon-Bloembergen-Morgan predicen que al aumentar la magnitud del campo magnético, aumenta el tiempo de relajación longitudinal del espín de los electrones (T_{1e}) y, como consecuencia, el valor de r_1 disminuye (Apéndice I).⁴¹⁻
⁴⁷ Este comportamiento es aplicable también a otros ACs positivos tales como los basados en Mn^{2+} , lo cual dificulta el desarrollo de ACs positivos para MRI a alto campo. Ello no sucede con los ACs negativos ya que, de acuerdo con la teoría mecánica cuántica de la esfera externa, sus valores de r_2 aumentan al aumentar su magnetización, la cual aumenta con la magnitud del campo (Apéndice I). No obstante, hay que tener en cuenta que en el caso de los ACs basados en SPIONs, su magnetización satura a una magnitud de campo inferior a 1 T,^{1, 52} lo cual no sucede para los ACs basados en cationes Ln^{3+} paramagnéticos que serían, por tanto, candidatos más interesantes para su uso a altos campos.^{48, 49} Entre ellos, los basados en Dy^{3+} son especialmente atractivos, pues este catión presenta el mayor valor de magnetización debido a

su mayor momento magnético ($10,6 \mu\text{B}$)⁵⁰ entre todos los cationes Ln^{3+} . De hecho, al comienzo de esta tesis doctoral, podían encontrarse en la bibliografía diversas publicaciones sobre este tipo de ACs que incluían, bien complejos de Dy^{3+} que presentan valores bajos de r_2 ,^{51,52} o bien NPs inorgánicas constituidas en su mayoría por matrices tipo fluoruro^{45, 53, 54} que presentan un inconveniente importante relacionado con su solubilidad en medio acuoso,^{55, 56} que provoca la liberación de iones de fluoruro potencialmente tóxicos.⁵⁷

Estos antecedentes ponen de manifiesto que la búsqueda de ACs basados en compuestos de Dy^{3+} estables químicamente en medio acuoso es indispensable para el desarrollo de la técnica MRI a alto campo. Como posibles alternativas, sería razonable abordar NPs basadas en vanadato, molibdato, volframato y fosfato de Dy^{3+} , ya que, si bien no se han tenido en consideración hasta el comienzo de esta tesis, sí se habían desarrollado diversos ACs de Gd^{3+} basados en estas matrices, que presentan características adecuadas para su uso en MRI a bajo campo.⁵⁸⁻⁶⁰ No obstante, es importante señalar que la estabilidad química de estos compuestos en condiciones fisiológicas no había sido analizada.

1.2.2. Imagen por resonancia magnética en modo dual T_1 - T_2 .

En muchas ocasiones, incluso empleando ACs T_1 o T_2 , la nitidez de las imágenes MRI registradas no permite alcanzar un diagnóstico preciso. Para aumentar la sensibilidad y exactitud del diagnóstico se ha propuesto el empleo de la técnica conocida como MRI dual T_1 - T_2 .⁶ El registro de imágenes brillantes y oscuras de forma simultánea permite excluir falsos positivos mediante la validación cruzada de ambos tipos de imágenes. Además, la resonancia magnética, en modo dual T_1 y T_2 puede suministrar información complementaria y esencial para un correcto diagnóstico, lo cual constituye una ventaja adicional de esta técnica. Por ejemplo, en la resonancia magnética cerebral, las imágenes T_1 permiten distinguir posibles lesiones, mientras que mediante las imágenes T_2 se puede visualizar el líquido cefalorraquídeo en el tejido cerebral.⁶¹

A pesar de estas ventajas, la resonancia magnética en modo dual T_1 - T_2 no se ha implementado aun en clínica como método estándar, lo cual puede ser debido, en parte, a que los ACs positivos disponibles tienen poca capacidad para acortar T_2 mientras que los negativos, aunque producen un cierto acortamiento de T_1 , no llegan a mejorar el contraste de la imagen ponderada en T_1 . Sólo algunos ACs constituidos por SPION,⁶² tienen la capacidad de acortar tanto T_2 como T_1 (Fig. 3), pudiendo actuar como agentes duales T_1 - T_2 , aunque su capacidad para acortar T_1 es significativamente menor.⁶³ Por ello, resulta una actividad prioritaria en este campo, el diseño de nuevos ACs duales T_1 - T_2 (Fig. 4), que sean capaces de acortar ambos tiempos de relajación con eficiencia similar.

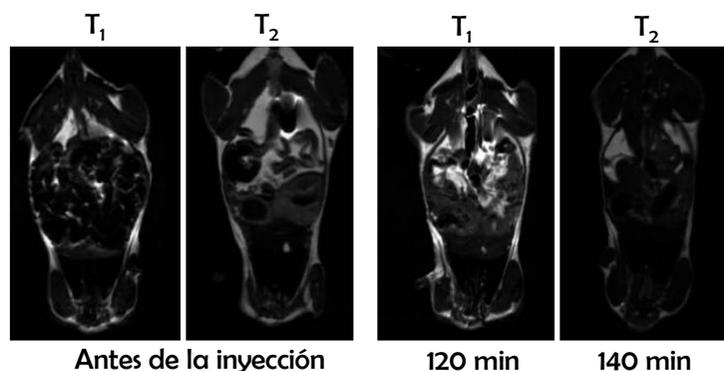


Figura 3. Imágenes in vivo de MRI a 7 T ponderadas en T_1 y T_2 de un ratón antes y después de la inyección de NPs de Fe_3O_4 .⁶²

Con este objetivo, en la bibliografía se ha propuesto incorporar en cada partícula, ACs que aporten alto valor de r_1 (basados en Gd^{3+} o, en menor medida, Mn^{2+}) y ACs con alto valor de r_2 (basados en SPION, Dy^{3+} , Ho^{3+} o Yb^{3+}).⁶⁴⁻⁶⁸

Para este tipo de diseño, el empleo de cationes Dy^{3+} como componente T_2 es muy conveniente si se usa Gd^{3+} como agente T_1 , ya que la similar reactividad de los iones lantánidos simplifica el proceso de síntesis de las NPs compuestas. Hay que resaltar que la mayoría de NPs reportadas en la bibliografía que se basan en combinaciones Dy^{3+}/Gd^{3+} están basadas en fluoruros, los cuales poseen el inconveniente anteriormente mencionado de su

solubilidad en medio acuoso y, por lo tanto, su potencial toxicidad. Es, por tanto, fundamental desarrollar nuevas NPs de Dy^{3+}/Gd^{3+} basadas en otro tipo de matriz.



Figura 4. Esquema del funcionamiento de los agentes de contraste duales T_1-T_2 .

1.2.3. Imagen multimodal mediante resonancia magnética y luminiscencia

Si bien la técnica de obtención de bioimágenes MRI se usa frecuentemente en clínica, en ocasiones, esta puede resultar insuficiente para un diagnóstico preciso. Por ello, se han llevado a cabo numerosos estudios que proponen usar esta técnica en combinación con otras técnicas de imagen que proporcionen una información complementaria.⁶⁹ Una de las más interesantes es la imagen luminiscente que consiste en iluminar la muestra con radiación electromagnética (excitación) y registrar la emisión de radiación emitida por la misma con una energía diferente a la de la excitación. Debido a su alta sensibilidad, esta técnica es muy útil para obtener información sobre patologías a nivel celular o subcelular, que complementa a la información anatómica obtenida mediante MRI. Ello hace de esta combinación de técnicas una herramienta de diagnóstico médico muy potente.

Para la obtención de bioimágenes luminiscentes de las células órganos o tejidos de interés se utilizan sondas luminiscentes que se incorporan al espécimen a analizar. Tradicionalmente, las sondas más empleadas han sido complejos orgánicos y proteínas,⁷⁰ que se excitan en el ultravioleta y emiten en la zona del visible (400-700 nm), lo que conlleva poco poder de penetración en especímenes vivos y por tanto limita su uso a estudios *in vitro*; además,

presentan baja fotoestabilidad y pueden interferir fácilmente con la autoluminiscencia de los tejidos biológicos. Estas limitaciones pueden minimizarse parcialmente mediante el uso de sondas luminiscentes basadas en NPs inorgánicas, consistentes bien en puntos cuánticos de semiconductores con tamaño <10 nm, en NPs de carbono o en nanoclústeres de oro. Sin embargo, estos tres tipos de NPs presentan importantes inconvenientes entre los que cabe destacar su baja selectividad para ensayos biológicos debida a la elevada anchura de sus bandas de emisión.⁷¹ Además, los puntos cuánticos (sobre todo, los basados en CdSe) pueden presentar elevada toxicidad.⁷²

Durante las últimas décadas, se viene prestando gran atención a otro tipo de NPs inorgánicas luminiscentes basadas en matrices de diversa composición dopadas con cationes lantánidos. Estos materiales presentan importantes ventajas respecto a los anteriores tales como una menor toxicidad y una mayor estabilidad química y térmica.⁷³ Además, sus bandas de emisión son mucho más estrechas, lo que confiere una alta selectividad a los ensayos. Esta característica es debida a que los orbitales f están muy apantallados por los orbitales 5s y 5p externos y sus niveles de energía apenas se ven afectados por el campo cristalino. Finalmente, mediante la elección de los cationes activos es posible seleccionar el rango espectral en el que tienen lugar la excitación y las emisiones de los mismos. Ello es esencial para el uso de estos materiales como sondas para la obtención de imágenes biomédicas ya que es conveniente que, en el caso de aplicaciones *in vivo*, la excitación y emisión de las sondas tenga lugar en el infrarrojo cercano (NIR, en inglés), concretamente, en las regiones conocidas como ventanas biológicas I ($\lambda = 650-950$ nm), II ($\lambda = 1000-1350$ nm) y III ($\lambda = 1500-1800$ nm), en las que las radiaciones tienen alto poder de penetración y no dañan los tejidos.⁷⁰ Entre los iones lantánidos con emisión en el NIR más estudiados se encuentra el Nd^{3+} que se excita a 808 nm (ventana biológica I) y que emite a 900 nm, 1060 nm y 1340 nm (ventanas biológicas I y II).

Todo lo expuesto anteriormente justifica el gran interés que tiene en la actualidad el desarrollo de nuevas sondas multimodales para la obtención de imágenes mediante luminiscencia en las ventanas biológicas y mediante MRI (Fig. 5).

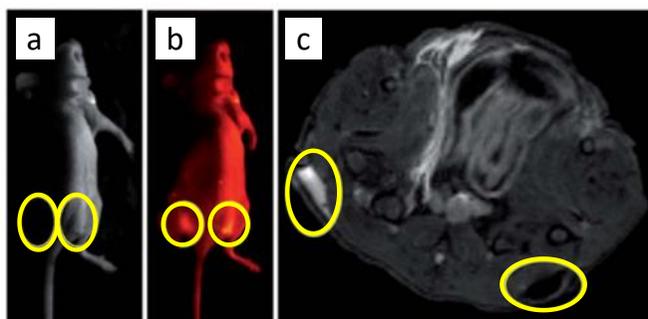


Figura 5. (a) Fotografía de un ratón implantado con células HeLa. Las posiciones de las dos regiones tumorales están marcadas en amarillo. Imagen de fluorescencia NIR-II *in vivo* (b) y de MRI ponderada en T₂ (c) de las regiones tumorales tras la inyección directa de un agente de contraste basado en NaYF₄:Nd (izquierda) y NaYF₄:Nd/NaDyF₄ (derecha).⁷⁴

1.3. Características requeridas para el uso de nanopartículas en la obtención de imágenes biomédicas

Los requisitos esenciales que debe cumplir cualquier sonda basada en NPs para su empleo en aplicaciones biomédicas *in vivo*, son los siguientes (Fig. 6):

- **Forma y tamaño de partícula.** Es común administrar las NPs vía intravenosa para aplicaciones *in vivo*. En este caso, se admite que el tamaño óptimo para evitar la formación de trombos y que no sean eliminadas antes de cumplir su función se encuentra entre 20 y 100 nm, pues las partículas más pequeñas son rápidamente eliminadas a través del riñón y las más grandes, por el sistema reticuloendotelial, acumulándose en el bazo o el hígado.⁷⁵ Por otra parte, el comportamiento *in vivo* de las NPs (internalización por células, biodistribución, farmacocinética, etc) depende en gran medida de su forma y tamaño,⁷⁶ por lo que la forma debe ser homogénea y la

distribución de tamaños estrecha para asegurar la reproducibilidad de dicho comportamiento y simplificar el estudio de dichos procesos.

- **Dispersabilidad.** Para cumplir el requisito de tamaño anteriormente mencionado, las NPs deben presentar una adecuada dispersabilidad en el medio fisiológico, es decir, debe evitarse su agregación, lo cual puede conseguirse mediante un diseño adecuado de las características de su superficie, que generalmente incluye su recubrimiento con polímeros orgánicos.
- **Biocompatibilidad.** Es obvio que para su uso en aplicaciones *in vivo*, las NPs deben ser biocompatibles, es decir, no deben presentar toxicidad. Debe tenerse en cuenta que dicha toxicidad no sólo depende de la composición química de las partículas sino, además, de otros factores tales como su forma, tamaño, características superficiales (hidrofilicidad y carga superficial) y naturaleza del recubrimiento orgánico.⁷⁷

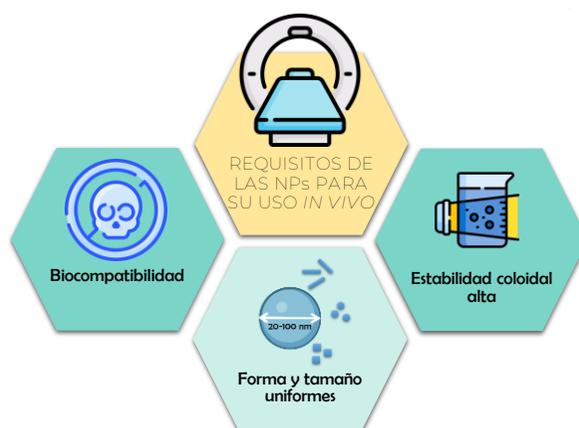


Figura 6. Requisitos de las NPs para su uso *in vivo*.

En el caso de los ACs para MRI, es necesario además que los materiales desarrollados presenten propiedades de relajatividad adecuadas, las cuales se ven afectadas de forma significativa por su composición, tamaño, forma y las propiedades de su superficie, como se describe de forma detallada en el Apéndice I. Por otra parte, es obvio que las sondas para la obtención de

imágenes luminiscentes deben presentar una luminiscencia intensa, estando esta propiedad también afectada por las características de las NPs anteriormente mencionadas.

Por tanto, para diseñar ACs para MRI basados en NPs se requiere una modulación cuidadosa de las características de las mismas, de acuerdo con los criterios anteriormente presentados. A continuación, se revisan los procedimientos más comunes que pueden emplearse para conseguir dicho propósito.

1.3.1. Control del tamaño y forma de partícula

El método tradicional de síntesis de partículas por reacción en estado sólido no es el más adecuado para producir NPs útiles en aplicaciones biomédicas, debido a que conllevan altas temperaturas de síntesis que normalmente conducen a formas irregulares y tamaño heterogéneo. Por esta razón, para la síntesis de este tipo de NPs se han usado preferentemente métodos de química húmeda que permiten un mayor control sobre la forma y el tamaño de partícula.^{78, 79}

En general, estos métodos de síntesis implican el uso de disoluciones de los precursores de los componentes de la fase sólida, la cual puede formarse a través de distintos tipos de reacciones inducidas térmicamente, en la mayor parte de los casos. Los precursores pueden ser iones que se unen para formar un precipitado insoluble (precipitación) o compuestos iónicos o covalentes solubles que sean capaces de descomponerse originando especies insolubles (termólisis). Las fuentes de calentamiento más empleadas son estufas convencionales u hornos asistidos por microondas. Como disolventes pueden emplearse agua o distintos tipos de disolventes orgánicos (alcoholes, polioles, hidrocarburos, etc.). Dado que para que se produzcan las reacciones mencionadas es necesario aumentar la temperatura de síntesis a temperaturas moderadas, en la bibliografía estos métodos se suelen denominar hidrotermales (cuando emplean agua) o solvotermales (cuando emplean otros disolventes

orgánicos). No obstante, estrictamente hablando, esta denominación debe reservarse sólo para aquellos casos en los que la temperatura de reacción es superior al punto de ebullición del disolvente. En estas condiciones es necesario trabajar en reactores herméticamente cerrados en los se genera una presión autógena superior a la atmosférica, por lo que estos métodos implican una mayor complejidad experimental (uso de autoclaves) que aquellos en los que se trabaja a temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente, siendo estos últimos los más empleados para la obtención de NPs basadas en lantánidos.

Es importante mencionar que para obtener NPs de tamaño nanométrico, en la mayor parte de estos métodos es necesario añadir al medio de reacción distintos compuestos, generalmente orgánicos, que sean capaces de adsorberse sobre la superficie de las mismas durante su formación, bloqueando así su crecimiento. Entre los compuestos más usados para este fin se encuentran el ácido oleico, el ácido linoleico, el ácido esteárico y sus sales,⁸⁰ los cuales son insolubles en agua, por lo que en estos casos se requiere el uso de otros disolventes orgánicos. Dado el carácter hidrofóbico de estos aditivos, las NPs obtenidas son también hidrofóbicas y, por tanto, no cumplen el requisito de dispersabilidad en medios fisiológicos. No obstante, este requisito puede conseguirse mediante tratamientos posteriores basados en procesos de intercambio de ligandos, calcinación o tratamientos ácidos que implican una mayor complejidad,⁸¹ y sobre todo pueden afectar a las características morfológicas de las NPs. Por otro lado, no debe despreciarse la toxicidad que en la mayoría de los casos presentan dichos disolventes y aditivos.

Estos inconvenientes pueden eliminarse o minimizarse utilizando polioles (alcoholes con más de un grupo alcoholico en su molécula) como disolvente. Esta ruta sintética fue introducida por primera vez en 1989 cuando se utilizó la nomenclatura síntesis del poliol para la síntesis de NPs metálicas.⁸² Los polioles ofrecen excelentes ventajas en varios aspectos. En primer lugar, el alto punto de ebullición de los polioles puede permitir la síntesis en el rango de

temperaturas de 200-320 °C sin alta presión y, por tanto, sin requerir el empleo de autoclaves. Asimismo, la buena capacidad de los polioles para solubilizar los compuestos de partida permite el uso de precursores metálicos sencillos y baratos. Además, la capacidad complejante del polirol es un factor beneficioso para controlar procesos clave, como la nucleación, el crecimiento y la aglomeración de las partículas.⁸³ Por último, las NPs obtenidas presentan carácter hidrofílico no requiriendo tratamientos posteriores para su uso en nanomedicina. Por todas estas ventajas, se han usado distintos tipos de polioles (etilenglicol, propilenglicol, butilenglicol, dietilenglicol, glicerol, etc.) como disolvente para la síntesis de una gran variedad de NPs,^{84,85} incluyendo distintos compuestos de lantánidos.⁷⁹

1.3.2. Control de dispersabilidad: funcionalización

En una dispersión coloidal las partículas están sujetas a movimiento browniano que puede dar lugar a colisiones entre las mismas y a su posible agregación.⁸⁶ Que esta se produzca o no depende de una serie de factores que se deducen de la teoría de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek. Según esta teoría, existen dos tipos de fuerzas de interacción entre partículas, las fuerzas atractivas de Van der Waals siempre presentes y que tienden a agregar las partículas para así disminuir la energía libre superficial del sistema, y las fuerzas repulsivas de carácter electrostático causadas por la carga eléctrica superficial de las partículas que tiene su origen en diversos procesos, tales como ionización de grupos superficiales, adsorción de iones o surfactantes iónicos, o pérdida diferencial de iones en la red cristalina. La magnitud de las fuerzas repulsivas depende del valor del potencial zeta, cuya magnitud está determinada por diversos factores tales como la composición de la superficie de las partículas y el pH, la constante dieléctrica y la fuerza iónica del medio.⁸⁶

Si la fuerza de atracción entre dos partículas es mayor que la fuerza de repulsión, estas se agregarán entre sí.⁸⁷ Por el contrario, si las fuerzas de repulsión son mayores que las de atracción, no se produce agregación y el coloide es estable.

En caso de que la estabilización mediante interacciones electrostáticas no sea efectiva, es posible evitar el proceso de agregación mediante impedimento estérico. Para ello, la superficie de las partículas debe recubrirse con moléculas poliméricas que puedan extenderse a distancias suficientemente grandes para enmascarar la influencia de la atracción de Van der Waals entre las partículas.⁸⁶ En el caso de que los polímeros sean de naturaleza iónica, estos pueden también contribuir a la dispersabilidad mediante el desarrollo de carga eléctrica por ionización de sus grupos funcionales. A este proceso de recubrimiento se denomina funcionalización cuya importancia en el contexto de las aplicaciones biomédicas va más allá de sus efectos sobre la dispersabilidad. Así, los grupos funcionales unidos a la superficie de las NPs tras el proceso de funcionalización también pueden utilizarse como punto de anclaje para la posterior unión de moléculas biológicas como anticuerpos, péptidos, proteínas y fármacos que pueden ser necesarios para el diagnóstico y la terapia, proceso denominado bioconjugación.⁸⁸

Entre los aditivos más utilizados para la funcionalización de NPs basadas en lantánidos con interés en biomedicina (citrato sódico, polietilenglicol, poli(L-lisina), poli(clorhidrato) de alilamina, poli(4-estirenosulfonato sódico) y poli(anhídrido maléico isobutileno) modificado con dodecilamina),^{88, 89} el ácido poliacrílico (PAA) ocupa un lugar destacado. Ello es debido al gran número de grupos carboxilato que posee que confieren una gran carga superficial que ayuda a mejorar la dispersabilidad de las NPs^{58, 90, 91} y que además pueden utilizarse para el anclaje de diferentes moléculas de interés biológico, como por ejemplo el polietilenglicol. Este polímero se ha estado empleando para recubrir la superficie de las NPs en el campo de la nanomedicina durante más de cuatro décadas,⁹²⁻⁹⁵ ya que ayuda a evitar el reconocimiento de las NPs por las células del sistema fagocítico mononuclear, de modo que aumentan los tiempos de retención de las NPs en la corriente sanguínea.⁹⁶ De esta forma se dificulta que el sistema inmune reconozca a las NPs como una sustancia extraña y las retire antes de cumplir su función.⁹⁶⁻¹⁰²

1.3.3. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad es la capacidad de cualquier material para cumplir funciones específicas de forma segura dentro de un biosistema. Para que se considere que un material es biocompatible, lo primero que debe cumplir es que su respuesta hacia dicho sistema biológico no sea tóxica, si bien, tampoco debe producir otros efectos indeseables tales como la formación de trombos.¹⁰³

En general, la toxicidad puede analizarse en diferentes niveles de complejidad creciente que se asocian a ensayos específicos.¹⁰⁴⁻¹⁰⁷ En concreto:

(a) Nivel celular. El análisis de toxicidad a nivel celular (citotoxicidad) abarca la evaluación de procesos de apoptosis y necrosis, así como de otros aspectos tales como la detención del crecimiento, morfología anormal, señalización celular no deseada o actividad secretora. El más peligroso de los mecanismos químicos que afecta a los procesos celulares es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, en última instancia, pueden provocar alteraciones a nivel subcelular y el consiguiente daño celular. Otros efectos adversos pueden tener su origen en la disolución y liberación de iones potencialmente tóxicos.

(b) Nivel de órganos. Esta evaluación se refiere a los efectos tóxicos que puedan detectarse en diferentes órganos (principalmente riñón, bazo, hígado, corazón, cerebro, pulmones y piel), los cuales pueden observarse tras un cierto periodo de exposición. Las pruebas suelen incluir la medición de parámetros fisiológicos de un órgano y el examen de su morfología, incluyendo análisis histológicos.

(c) Nivel de organismo. Este análisis evalúa el estado general del organismo, incluyendo síntomas de comportamiento anormal, cambios en el potencial reproductivo y otros parámetros; incluso en algunos modelos, como en el caso del pez cebra o el nematodo *C. Elegans*, los cambios de morfología corporal pueden también ser indicativos de toxicidad.¹⁰⁸

(d) Nivel de medio ambiente. Esta evaluación sea quizás la que más dificultad entrañe de todas, ya que el ámbito de la nanotoxicología es ampliamente complejo; sin embargo, la producción masiva de NPs es bastante improbable, por lo que su impacto en el medio ambiente no es de interés primordial.

El análisis de la toxicidad a todos estos niveles es muy complejo y requiere mucho tiempo. Por ello, en la mayor parte de los estudios sobre el desarrollo de biosondas suele abordarse una evaluación preliminar de la biocompatibilidad mediante análisis de toxicidad *in vitro* usando diversas líneas celulares y análisis histológicos de los tejidos de modelos animales *post-mortem*. Los procedimientos más empelados para llevar a cabo estos estudios se describen a continuación de forma resumida.

Análisis de la viabilidad celular. La viabilidad celular puede determinarse evaluando la proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular expuesta a un fármaco o agente externo. Este tipo de análisis constituye un paso esencial en la evaluación de la biocompatibilidad de los mismos.¹⁰⁹

Existen varios tipos de ensayos de viabilidad que se basan en el análisis de diversas funciones de las células, como la actividad enzimática, la permeabilidad de la membrana celular, la adherencia celular, la producción de trifosfato de adenosina, la producción de coenzimas y la actividad de captación de nucleótidos.

El ensayo de viabilidad más empleado en la evaluación de la citotoxicidad de NPs es el ensayo de reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-bromuro de difeniltetrazolio), el cual evalúa la actividad mitocondrial, basándose en la conversión de MTT en cristales de formazán por la acción de células vivas.¹¹⁰ Dicho ensayo es una prueba colorimétrica sencilla de proliferación y supervivencia celular, que fue desarrollada por Mosmann (1983) y adaptada por Cole (1986) para medir la quimiosensibilidad de las líneas celulares de cáncer de pulmón humano. Desde entonces, este ensayo ha

sido ampliamente adoptado y sigue siendo popular en los laboratorios académicos como lo demuestran miles de artículos publicados.

Otro de los ensayos colorimétricos más ampliamente utilizados en la evaluación de la citotoxicidad de NPs que complementa al ensayo MTT, es el conocido como vivo-muerto. La integridad de la membrana es la característica más utilizada para detectar si las células cultivadas *in vitro* están vivas o muertas. Las células que han perdido la integridad de la membrana se clasifican como no viables o muertas. El ensayo vivo-muerto emplea colorantes, que no son permeables a las células viables, pero que pueden penetrar en las células muertas a través de membranas dañadas, para así cuantificar la población muerta de células en un cultivo.¹¹¹ Hay que tener en cuenta que los resultados dependen en gran medida del tipo de célula (tejido de origen) tiempo de incubación, medio de cultivo y suplementación.¹¹²

Análisis histológicos. Los análisis histológicos se llevan a cabo mediante tinción, seccionamiento y posterior examen al microscopio (electrónico o óptico) de los tejidos de interés.¹¹³ Se analizan tanto las características de los tejidos como las estructuras microscópicas de las células, lo cual aporta información sobre la toxicidad de las NPs.

1.4. Objetivos

Los antecedentes expuestos en la sección anterior justifican la pertinencia del objetivo general de la presente tesis doctoral que consiste en el desarrollo de agentes de contraste químicamente estables para MRI monomodal a alto campo, para MRI dual T₁-T₂ y para imagen bimodal mediante MRI a alto campo e imagen luminiscente en el infrarrojo cercano.

Estos objetivos se abordarán a través de los siguientes objetivos específicos:

a) Síntesis de nanopartículas hidrofílicas y uniformes basadas en DyVO₄, NaDy(MoO₄)₂, NaDy(WO₄)₂ y DyPO₄.

- b) Síntesis de nanopartículas basadas en los compuestos de Dy³⁺ contemplados en el objetivo (a) a las que se les incorporan cationes Gd³⁺ utilizando diferentes arquitecturas.
- c) Síntesis de nanopartículas basadas en los compuestos de Dy³⁺ contemplados en el objetivo (a) a las que se les incorporan cationes Nd³⁺ empleando distintas arquitecturas.
- d) Funcionalización con ácido poliacrílico de las NPs sintetizadas según objetivos (a), (b) y (c), que así lo requieran, para que puedan ser dispersadas en condiciones fisiológicas.
- e) Análisis de la estabilidad química en condiciones fisiológicas de las nanopartículas funcionalizadas.
- f) Evaluación comparativa *in vitro* de las relajatividades magnéticas de las nanopartículas funcionalizadas en función de su composición, tamaño, forma y diámetro hidrodinámico.
- g) Evaluación *in vitro* de las propiedades luminiscentes de las nanopartículas sintetizadas según el objetivo específico (c).
- h) Análisis de la biocompatibilidad de las sondas desarrolladas mediante estudios de citotoxicidad *in vitro* y análisis histológicos.
- i) Aplicación de las sondas desarrolladas para la obtención de imágenes *in vivo* en modelo animal.

1.5. Bibliografía

1. H. J. Lu, J. K. Wang, T. Wang, J. Zhong, Y. Bao and H. X. Hao, *Journal of Nanomaterials*, 2016, **2016**, 5762431.
2. R. Watkins, L. Wu, C. M. Zhang, R. M. Davis and B. Xu, *International Journal of Nanomedicine*, 2015, **10**, 6055-6074.
3. J. Key and J. F. Leary, *International Journal of Nanomedicine*, 2014, **9**, 711-726.
4. T. Tegafaw, S. Liu, M. Y. Ahmad, A. Saidi, D. Zhao, Y. Liu, S. W. Nam, Y. Chang and G. H. Lee, *Pharmaceutics*, 2023, **15**, 1745.
5. E. Peng, F. H. Wang and J. M. Xue, *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, **3**, 2241-2276.
6. F. Q. Hu and Y. S. Zhao, *Nanoscale*, 2012, **4**, 6235-6243.
7. J. Estelrich, M. J. Sanchez-Martin and M. A. Busquets, *International Journal of Nanomedicine*, 2015, **10**, 1727-1741.
8. B. A. Bony, J. S. Baeck, Y. Chang, J. E. Bae, K. S. Chae and G. H. Lee, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2015, **36**, 1203-1208.
9. S. Caspani, R. Magalhaes, J. P. Araujo and C. T. Sousa, *Materials*, 2020, **13**, 2586.
10. M. J. Molaei, *Scientific Reports*, 2022, **12**, 17681.
11. F. Q. Hu and Y. S. Zhao, *Nanoscale*, 2012, **4**, 6235-6243.
12. N. Guldris, B. Argibay, Y. V. Kolen'ko, E. Carbo-Argibay, T. Sobrino, F. Campos, L. M. Salonen, M. Banobre-Lopez, J. Castillo and J. Rivas, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, **472**, 229-236.
13. S. Sanchez-Cabezas, R. Montes-Robles, J. Gallo, F. Sancenon and R. Martinez-Manez, *Dalton Transactions*, 2019, **48**, 3883-3892.
14. I. S. Oliveira, S. S. Hedgire, W. E. Li, S. Ganguli and A. M. Prabhakar, *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2016, **6**, 508-518.
15. H. S. Thomsen, S. K. Morcos, T. Almen, M. F. Bellin, M. Bertolotto, G. Bongartz, O. Clement, P. Leander, G. Heinz-Peer, P. Reimer, F. Stacul, A. van der Molen and J. A. W. Webb, *European Radiology*, 2013, **23**, 307-318.
16. H. S. Thomsen, *European Radiology*, 2004, **14**, 1654-1656.
17. D. P. J. Pan, A. H. Schmieder, S. A. Wickline and G. M. Lanza, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 8431-8444.
18. A. Skjold, B. H. Amundsen, R. Wiseth, A. Stoylen, O. Haraldseth, H. B. W. Larsson and P. Jynge, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2007, **26**, 720-727.
19. W. C. Small, D. D. Macchi, J. R. Parker and M. E. Bernardino, *Academic Radiology*, 1998, **5**, S147-S150.
20. E. Blumfield, D. W. Swenson, R. S. Iyer and A. L. Stanescu, *Pediatric Radiology*, 2019, **49**, 448-457.
21. A. Fatima, M. W. Ahmad, A. K. A. Al Saidi, A. Choudhury, Y. Chang and G. H. Lee, *Nanomaterials*, 2021, **11**, 2449.
22. J. A. Barreto, W. O'Malley, M. Kubeil, B. Graham, H. Stephan and L. Spiccia, *Advanced Materials*, 2011, **23**, H18-H40.

23. H. B. Na, I. C. Song and T. Hyeon, *Advanced Materials*, 2009, **21**, 2133-2148.
24. Y. Bao, J. A. Sherwood and Z. Sun, *Journal of Materials Chemistry C*, 2018, **6**, 1280-1290.
25. A. Nowogrodzki, *Nature*, 2018, **563**, 24-26.
26. M. Norek, E. Kampert, U. Zeitler and J. A. Peters, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 5335-5340.
27. G. K. Das, Y. Zhang, L. D'Silva, P. Padmanabhan, B. C. Heng, J. S. C. Loo, S. T. Selvan, K. K. Bhakoo and T. T. Y. Tan, *Chemistry of Materials*, 2011, **23**, 2439-2446.
28. M. E. Ladd, P. Bachert, M. Meyerspeer, E. Moser, A. M. Nagel, D. G. Norris, S. Schmitter, O. Speck, S. Straub and M. Zaiss, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2018, **109**, 1-50.
29. G. Öz, I. Tkáč and K. Uğurbil, *Dialogues in Clinical Neurosciences*, 2013, **15**, 263-278.
30. Z. Y. Liang, Q. Y. Wang, H. W. Liao, M. Zhao, J. Y. Lee, C. Yang, F. Y. Li and D. S. Ling, *Nature Communications*, 2021, **12**, 3840.
31. M. Inglese, L. Fleysler, N. Oesingmann and M. Petracca, *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2018, **18**, 221-230.
32. S. Trattning, E. Springer, W. Bogner, G. Hangel, B. Strasser, B. Dymerska, P. L. Cardoso and S. D. Robinson, *Neuroimage*, 2018, **168**, 477-489.
33. C. A. Park, C. K. Kang, Y. B. Kim and Z. H. Cho, *Neuroimage*, 2018, **168**, 269-278.
34. M. J. P. Van Osch and A. G. Webb, *Current Radiology Reports*, 2014, **2**, 61.
35. G. Ziegelberger and Icnirp, *Health Physics*, 2009, **97**, 259-261.
36. B. R. Planting, Y. Temel, A. Roebroek, K. Uludag, D. Ivanov, M. L. Kuijf and B. M. T. Romenij, *Frontiers in Human Neuroscience*, 2014, **8**, 876.
37. J. H. G. Helthuis, A. van der Zwan, T. P. C. van Doormaal, R. Bleys, A. A. Harteveld, A. van der Toorn, M. Brozici, J. Hendrikse and J. J. M. Zwanenburg, *Scientific Reports*, 2018, **8**, 14235.
38. A. Sadeghi-Tarakameh, L. DelaBarre, R. L. Lagore, A. Torrado-Carvajal, X. P. Wu, A. Grant, G. Adriany, G. J. Metzger, P. F. Van de Moortele, K. Ugurbil, E. Atalar and Y. Eryaman, *Magnetic Resonance in Medicine*, 2020, **84**, 484-496.
39. L. Quettier, G. Aubert, J. Belorgey, C. Berriaud, P. Bredy, G. Dilasser, O. Dubois, G. Gilgrass, Q. Guihard, V. Jannot, F. P. Juster, H. Lannou, F. Molinie, F. Nunio, A. Roger, T. Schild, L. Scola, A. Sinanna, V. Stepanov and P. Vedrine, *Ieee Transactions on Applied Superconductivity*, 2020, **30**, 4401705.
40. R. Voelker, *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2017, **318**, 1858-1858.

41. H. Dong, S. R. Du, X. Y. Zheng, G. M. Lyu, L. D. Sun, L. D. Li, P. Z. Zhang, C. Zhang and C. H. Yan, *Chemical Reviews*, 2015, **115**, 10725-10815.
42. M. Woods, M. Botta, S. Avedano, J. Wang and A. D. Sherry, *Dalton Transactions*, 2005, **24**, 3829-3837.
43. S. Aime, M. Botta, M. Fasano, S. Paoletti, P. L. Anelli, F. Uggeri and M. Virtuani, *Inorganic Chemistry*, 1994, **33**, 4707-4711.
44. M. Bottrill, L. K. Nicholas and N. J. Long, *Chemical Society Reviews*, 2006, **35**, 557-571.
45. Y. Zhang, V. Vijayaragavan, G. K. Das, K. K. Bhakoo and T. T. Y. Tan, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 2044-2048.
46. P. Caravan, *Chemical Society Reviews*, 2006, **35**, 512-523.
47. L. Helm, *Future Medicinal Chemistry*, 2010, **2**, 385-396.
48. G. K. Das, N. J. J. Johnson, J. Cramen, B. Blasiak, P. Latta, B. Tomanek and F. van Veggel, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012, **3**, 524-529.
49. J. Wahsner, E. M. Gale, A. Rodriguez-Rodriguez and P. Caravan, *Chemical Reviews*, 2019, **119**, 957-1057.
50. S. Viswanathan, Z. Kovacs, K. N. Green, S. J. Ratnakar and A. D. Sherry, *Chemical Reviews*, 2010, **110**, 2960-3018.
51. M. Harris, C. Henoumont, W. Peeters, S. Toyouchi, L. Vander Elst and T. N. Parac-Vogt, *Dalton Transactions*, 2018, **47**, 10646-10653.
52. X. Y. Zheng, J. Pellico, A. A. Khrapitchev, N. R. Sibson and J. J. Davis, *Nanoscale*, 2018, **10**, 21041-21045.
53. X. H. Zhang, B. Blasiak, A. J. Marenco, S. Trudel, B. Tomanek and F. van Veggel, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 3060-3072.
54. D. Gonzalez-Mancebo, A. I. Becerro, T. C. Rojas, M. L. Garcia-Martin, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Particle & Particle Systems Characterization*, 2017, **34**, 1700116.
55. D. Lisjak, O. Plohl, J. Vidmar, B. Majaron and M. Ponikvar-Svet, *Langmuir*, 2016, **32**, 8222-8229.
56. M. I. Saleh, B. Ruhle, S. Wang, J. Radnik, Y. You and U. Resch-Genger, *Scientific Reports*, 2020, **10**, 19318.
57. S. Guth, S. Hueser, A. Roth, G. Degen, P. Diel, K. Edlund, G. Eisenbrand, K.-H. Engel, B. Epe, T. Grune, V. Heinz, T. Henle, H.-U. Humpf, H. Jaeger, H.-G. Joost, S. E. Kulling, A. Lampen, A. Mally, R. Marchan, D. Marko, E. Muehle, M. A. Nitsche, E. Roehrdanz, R. Stadler, C. van Thriel, S. Vieths, R. F. Vogel, E. Wascher, C. Watzl, U. Noethlings and J. G. Hengstler, *Archives of Toxicology*, 2020, **94**, 1375-1415.
58. N. O. Nunez, S. Rivera, D. Alcantara, J. M. de la Fuente, J. Garcia-Sevillano and M. Ocana, *Dalton Transactions*, 2013, **42**, 10725-10734.
59. S. Rodriguez-Liviano, A. I. Becerro, D. Alcantara, V. Grazu, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Inorganic Chemistry*, 2013, **52**, 647-654.

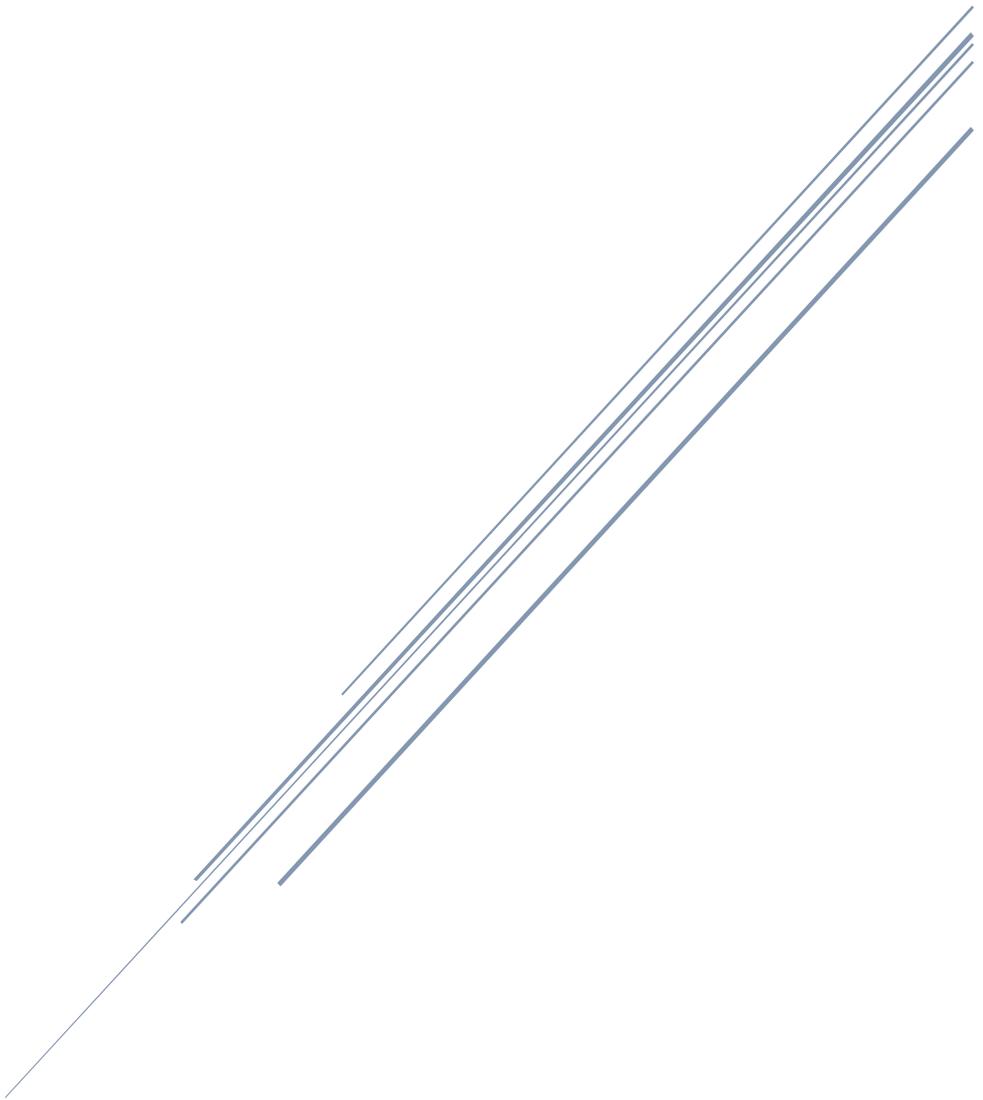
60. M. Laguna, N. O. Nunez, V. Rodriguez, E. Cantelar, G. Stepien, M. L. Garcia, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Dalton Transactions*, 2016, **45**, 16354-16365.
61. J. W. Prichard and J. R. Alger, *Bmj-British Medical Journal*, 1999, **319**, 1302-U1364.
62. G. N. Wang, X. J. Zhang, A. Skallberg, Y. X. Liu, Z. J. Hu, X. F. Mei and K. Uvdal, *Nanoscale*, 2014, **6**, 2953-2963.
63. M. P. Leal, S. Rivera-Fernandez, J. M. Franco, D. Pozo, J. M. de la Fuente and M. L. Garcia-Martin, *Nanoscale*, 2015, **7**, 2050-2059.
64. T. W. Mekonnen, Y. S. Birhan, A. T. Andrgie, E. Y. Hanurry, H. F. Darge, H. Y. Chou, J. Y. Lai, H. C. Tsai, J. M. Yang and Y. H. Chang, *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2019, **184**, 110531.
65. V. Haribabu, A. S. Farook, N. Goswami, R. Murugesan and A. Girigoswami, *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 2016, **104**, 817-824.
66. Q. Q. Zhang, P. Y. Wang, X. M. Li, Y. T. Yang, X. F. Liu, F. Zhang, Y. Ling and Y. M. Zhou, *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, **5**, 3765-3770.
67. H. T. Zhu, L. R. Zhang, Y. F. Liu, Y. P. Zhou, K. Wang, X. D. Xie, L. Song, D. Q. Wang, C. L. Han and Q. Y. Chen, *Scientific Reports*, 2016, **6**, 39245.
68. Z. L. Xue, Z. G. Yi, X. L. Li, Y. B. Li, M. Y. Jiang, H. R. Liu and S. J. Zeng, *Biomaterials*, 2017, **115**, 90-103.
69. A. N. Generalova, B. N. Chichkov and E. V. Khaydukov, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2017, **245**, 1-19.
70. D. Jaque, C. Richard, B. Viana, K. Soga, X. G. Liu and J. G. Sole, *Advances in Optics and Photonics*, 2016, **8**, 1-103.
71. J. S. Wang, S. H. Bo, L. M. Song, J. Hu, X. H. Liu and Z. Zhen, *Nanotechnology*, 2007, **18**, 465606.
72. X. L. Huang, X. Teng, D. Chen, F. Q. Tang and J. Q. He, *Biomaterials*, 2010, **31**, 438-448.
73. G. F. Wang, Q. Peng and Y. D. Li, *Accounts of Chemical Research*, 2011, **44**, 322-332.
74. J. Zhao, H. Hu, W. Liu and X. Wang, *Nanoscale Advances*, 2021, **3**, 463-470.
75. N. Hoshyar, S. Gray, H. B. Han and G. Bao, *Nanomedicine*, 2016, **11**, 673-692.
76. X. P. Duan and Y. P. Li, *Small*, 2013, **9**, 1521-1532.
77. P. Rivera-Gil, D. J. De Aberasturi, V. Wulf, B. Pelaz, P. Del Pino, Y. Y. Zhao, J. M. De La Fuente, I. R. De Larramendi, T. Rojo, X. J. Liang and W. J. Parak, *Accounts of Chemical Research*, 2013, **46**, 743-749.
78. G. Paramasivam, V. V. Palem, T. Sundaram, V. Sundaram, S. C. Kishore and S. Bellucci, *Nanomaterials*, 2021, **11**, 3228.
79. A. Escudero, A. I. Becerro, C. Carrillo-Carrion, N. O. Nunez, M. V. Zyuzin, M. Laguna, D. Gonzalez-Mancebo, M. Ocana and W. J. Parak, *Nanophotonics*, 2017, **6**, 881-921.

80. Z. G. Yan and C. H. Yan, *Journal of Materials Chemistry*, 2008, **18**, 5046-5059.
81. V. Muhr, S. Wilhelm, T. Hirsch and O. S. Wolfbeis, *Accounts of Chemical Research*, 2014, **47**, 3481-3493.
82. F. Fievet, J. P. Lagier, B. Blin, B. Beaudoin and M. Figlarz, *Solid State Ionics*, 1989, **32-3**, 198-205.
83. B. G. Rao, D. Mukherjee and B. M. Reddy, *Novel Approaches for Preparation of Nanoparticles. Nanostructures for Novel Therapy*, 2017, **2**, 1-36.
84. K. J. Carroll, J. U. Reveles, M. D. Shultz, S. N. Khanna and E. E. Carpenter, *Journal of Physical Chemistry C*, 2011, **115**, 2656-2664.
85. H. Grisaru, O. Palchik, A. Gedanken, V. Palchik, M. A. Slifkin and A. M. Weiss, *Inorganic Chemistry*, 2003, **42**, 7148-7155.
86. P. C. Hiemenz and R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry*, New York, Third Edition edn., 1997.
87. V. S. Raghuvanshi, C. Browne, W. Batchelor and G. Garnier, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2023, **630**, 249-259.
88. A. Gnach and A. Bednarkiewicz, *Nano Today*, 2012, **7**, 532-563.
89. S. Q. Wu, Y. Li, W. H. Ding, L. T. Xu, Y. Ma and L. B. Zhang, *Nano-Micro Letters*, 2020, **12**, 70.
90. N. O. Nunez, P. Zambrano, J. Garcia-Sevillano, E. Cantelar, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, **27**, 4546-4554.
91. N. O. Nunez, F. Cusso, E. Cantelar, B. Martin-Gracia, J. M. de la Fuente, A. Corral, M. Balcerzyk and M. Ocana, *Nanomaterials*, 2020, **10**, 149.
92. J. M. Rabanel, P. Hildgen and X. Banquy, *Journal of Controlled Release*, 2014, **185**, 71-87.
93. K. Maruyama, T. Yuda, A. Okamoto, C. Ishikura, S. Kojima and M. Iwatsuru, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1991, **39**, 1620-1622.
94. A. Cieslak, N. Wauthoz, A. N. Orellana, N. Lautram, J. Bejaud, J. Hureauux, M. Lafleur, J. P. Benoit, C. J. Salomon and G. Bastiat, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017, **115**, 31-38.
95. A. Kolate, D. Baradia, S. Patil, I. Vhora, G. Kore and A. Misra, *Journal of Controlled Release*, 2014, **192**, 67-81.
96. B. Pelaz, P. del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente, G. U. Nienhaus and W. J. Parak, *Acs Nano*, 2015, **9**, 6996-7008.
97. A. L. Klibanov, K. Maruyama, V. P. Torchilin and L. Huang, *Febs Letters*, 1990, **268**, 235-237.
98. T. A. Larson, P. R. Joshi and K. Sokolov, *Acs Nano*, 2012, **6**, 9182-9190.
99. T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, K. Yamamoto, J. Kimura, E. Majima and H. Kiwada, *Journal of Controlled Release*, 2006, **112**, 15-25.

100. V. Bastos, J. de Oliveira, D. Brown, H. Jonhston, E. Malheiro, A. L. Daniel-da-Silva, I. F. Duarte, C. Santos and H. Oliveira, *Toxicology Letters*, 2016, **249**, 29-41.
101. G. Pasut and F. M. Veronese, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2009, **61**, 1177-1188.
102. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Muller, J. M. Verbavatz and R. Langer, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**, 316-326.
103. D. Klee and H. Hocker, *Biomedical Applications: Polymer Blends*, 1999, **149**, 1-57.
104. A. Elsaesser and C. V. Howard, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, **64**, 129-137.
105. S. J. Soenen, P. Rivera-Gil, J. M. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt and K. Braeckmans, *Nano Today*, 2011, **6**, 446-465.
106. T. G. Iversen, T. Skotland and K. Sandvig, *Nano Today*, 2011, **6**, 176-185.
107. T. Xia, N. Li and A. E. Nel, *Annual Review of Public Health*, 2009, **30**, 137-150.
108. P. R. Hunt, *Journal of Applied Toxicology*, 2017, **37**, 50-59.
109. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, 2011, **740**, 1-240.
110. J. van Meerloo, G. J. L. Kaspers and J. Cloos, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, Second Edition*, 2011, **731**, 237-245.
111. T. Riss, A. Niles, R. Moravec, N. Karassina, J. Vidugiriene, S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, Y. Saradjian, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia and X. Xu, in *Assay Guidance Manual*, ed. E. L. C. a. t. N. C. f. A. T. Sciences, 2004.
112. S. Lorscheidt and A. Lamprecht, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2016, **13**, 1545-1558.
113. H. A. Alturkistani, F. M. Tashkandi and Z. M. Mohammedsaleh, *Global Journal of Health Science*, 2015, **28**, 72-79.

CAPÍTULO II

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES



2.1. Síntesis de nanopartículas

En este trabajo se han diseñado dos tipos de NPs uniformes en función de la aplicación a la que están destinadas. Así, los ACs para MRI a alto campo consisten en una única fase basada en vanadato, molibdato, volframato o fosfato de disprosio, mientras que para MRI dual, están constituidos por estas mismas matrices con cationes Gd^{3+} , bien incorporados en disolución sólida, o bien en la capa externa de nanoarquitecturas núcleo-corteza (*core-shell* en inglés). Asimismo, para el desarrollo de ACs para imagen multimodal (MRI y luminiscencia) se han considerado también NPs de fase simple que incorporan iones lantánidos luminiscentes en su estructura o NPs con arquitectura núcleo-corteza, en la que el componentes luminiscente (Nd^{3+}) y el componente magnético (Dy^{3+}) se incorporan separadamente, bien en el núcleo o en la corteza.

Los procedimientos experimentales concretos que se han empleado en esta tesis para la síntesis de cada uno de los sistemas estudiados, se detallan en los capítulos de resultados correspondientes; y las características de los precursores y disolvente empleados, se especifican en las Tablas 1, 2 y 3 del Apéndice II. No obstante, para una mejor comprensión de la estrategia seguida, a continuación, se describen de forma resumida los fundamentos de los procesos de síntesis desarrollados.

2.1.1. Síntesis de nanopartículas de fase única

Para la síntesis de NPs constituidas por una única fase se desarrollaron métodos basados en un proceso de precipitación homogénea que es aquel en el que la cinética de los distintos eventos implicados en dicho proceso es idéntica en todas las regiones de la disolución. Para que ello sea posible, es necesario que los factores que controlan dicha cinética (principalmente la temperatura y la concentración de los precursores de la fase sólida en formación) sean similares en todas las zonas de la disolución durante todo el proceso de precipitación.¹ Para conseguir esto, la estrategia más empleada es preparar

disoluciones de precursores adecuados que no reaccionen a temperatura ambiente y calentar posteriormente las mismas a temperatura constante para inducir el proceso de precipitación.

La condición de precipitación homogénea es necesaria para la obtención de partículas uniformes pero no suficiente tal y como establece el modelo propuesto por LaMer y Dinegar,² que es el más empleado para describir el proceso de formación de partículas coloidales uniformes mediante procesos de precipitación. Según este modelo dicho proceso implica tres etapas: inducción, nucleación y crecimiento (Fig. 1):

- Etapa de inducción: en esta primera etapa tienen lugar las reacciones químicas que generan los iones implicados en la formación de la fase sólida, cuya concentración va aumentando hasta que se alcanza la sobresaturación (C_s) de la disolución. A partir de este momento, la reacción química entre los iones precursores da lugar a la precipitación de las primeras entidades sólidas muy pequeñas que se redisuelven continuamente por no ser estables termodinámicamente. Estas entidades se denominan embriones.

- Etapa de nucleación: cuando la concentración de precursores alcanza un valor denominado “concentración mínima de nucleación” (C_{min}^{nucl}), superior a C_s , los embriones alcanzan un tamaño suficiente para ser estables termodinámicamente y, por tanto, no se redisuelven. Estas entidades se denominan núcleos (no confundir con los núcleos de las arquitecturas núcleo-corteza arriba mencionadas).

- Etapa de crecimiento: esta etapa comienza cuando la concentración de precursores en el medio disminuye por debajo de C_{min}^{nucl} , como consecuencia del proceso de nucleación, inhibiéndose así la formación de nuevos núcleos, y comenzando entonces el crecimiento de los núcleos previamente formados mediante el aporte de nuevos iones que difunden desde el seno de la disolución a la superficie de los núcleos y se anclan sobre las misma.

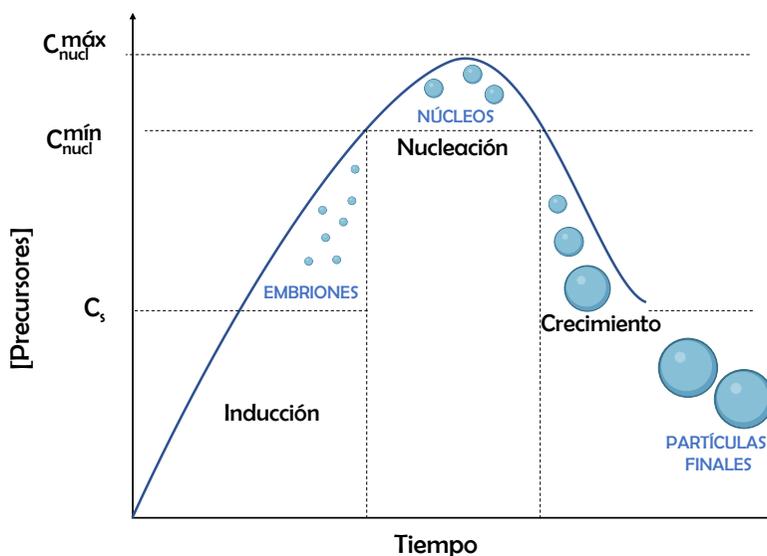


Figura 1: Representación esquemática del modelo propuesto por LaMer y Dinegar, donde C_s corresponde a la concentración de saturación, C_{nucl}^{min} concentración mínima de nucleación, y C_{nucl}^{max} concentración máxima de nucleación.

Según este modelo, para que estos procesos de precipitación produzcan NPs uniformes y dispersas, el evento de nucleación debe ser corto y único para que no se produzcan nucleaciones secundarias, ya que, el crecimiento de los nuevos núcleos se produciría de forma desfasada con el de los inicialmente formados dando lugar a sistemas con tamaño heterogéneo. Dado que la cinética de nucleación depende de variables experimentales tales como la temperatura de reacción, la naturaleza y la concentración de reactivos, la naturaleza del disolvente y la velocidad de calentamiento, estos parámetros deben ser ajustados para conseguir una cinética de nucleación adecuada que evite los procesos de nucleación secundaria.

Posteriormente, Sugimoto³ sugirió que, para obtener partículas uniformes, también es necesario evitar la agregación de las mismas durante su crecimiento, es decir, deben ser dispersables, ya que de lo contrario se obtendrían agregados irreversibles. Hay que señalar que la tendencia a la dispersabilidad está gobernada por el balance entre fuerzas atractivas y repulsivas entre partículas que siempre están presentes en los sistemas coloidales y que son de naturaleza de Van der Waals (interacciones dipolares)

y electrostática (asociada a la carga eléctrica superficial de las partículas), respectivamente. Por tanto, para que las partículas no se agreguen, es necesario que las fuerzas repulsivas predominen sobre las atractivas. Puesto que la magnitud y el signo las fuerzas de repulsión depende del pH, la fuerza iónica del medio y la constante dieléctrica del disolvente,⁴ el ajuste experimental de estos parámetros es también muy importante desde este punto de vista.

Hay que tener en cuenta que en los casos en los que la estabilización electrostática no se produzca debido a que la carga eléctrica superficial sea insuficiente, pueden añadirse polímeros orgánicos al medio de síntesis que sean capaces de adsorberse sobre la superficie de las partículas evitando así que se agreguen por impedimento estérico.⁵ La eficiencia de un agente dispersante depende de su composición y concentración, por lo cual, estos parámetros deben ser también ajustados para que su efecto dispersante sea efectivo.⁴

Por último, es importante señalar que, a pesar del razonamiento anteriormente expuesto, se ha observado en muchos sistemas un mecanismo de crecimiento de partículas uniformes que consiste en que varias partículas pequeñas, conocidas como primarias, coalescen de forma ordenada tras haber alcanzado cierto tamaño, dando lugar a partículas monodispersas más grandes y densas (Fig. 2), conocidas como secundarias, que normalmente son policristalinas.⁶ Las causas de la formación de estos agregados monodispersos no están bien establecidas. No obstante, deben estar relacionadas con el balance entre las fuerzas atractivas y repulsivas, anteriormente mencionadas, aunque la presencia de otro tipo de fuerzas también puede ser otro factor determinante de las características morfológicas de los agregados precipitados.⁶

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente expuestas, se concluye que para conseguir partículas uniformes mediante reacciones de precipitación es necesario ajustar la cinética de precipitación mediante un análisis sistemático de los efectos de los distintos parámetros experimentales, tales como concentración y naturaleza de reactivos, temperatura y tiempo de reacción y naturaleza del disolvente, sobre las características de las partículas

precipitadas. Las condiciones concretas que permiten obtener una morfología adecuada se determinan usando un procedimiento empírico de prueba-error, puesto que no pueden ser predichas de forma teórica.⁷



Figura 2. Ilustración esquemática del crecimiento por agregación de las NPs.

Entre dichos parámetros, la elección del disolvente juega un papel esencial cuando se pretenden obtener partículas en el rango manométrico, como es el caso de esta tesis doctoral. En concreto, se ha reportado ampliamente que el empleo de polioles como disolvente tiene una serie de ventajas selectivas frente a otros disolventes. En primer lugar, se ha sugerido que estos compuestos pueden formar complejos con distintos cationes⁸ que pueden impedir la precipitación a temperatura ambiente, pero que al calentarse pueden descomponerse liberando así de forma controlada los cationes constituyentes de la fase sólida de forma homogénea en el seno de la disolución que es un requisito esencial para la precipitación de partículas uniformes. Por otra parte, las moléculas de estos compuestos pueden adherirse a la superficie de las partículas durante su formación bloqueando su crecimiento y favoreciendo la obtención de tamaños nanométricos.⁹ Además, variando la naturaleza del poliol es posible modificar la viscosidad y la constante dieléctrica del medio, magnitudes que afectan a la cinética de precipitación (viscosidad) y a los procesos de agregación (viscosidad y constante dieléctrica) y, por tanto, a las características morfológicas de las partículas precipitadas.^{7, 10, 11} Por último, es también importante señalar que las NPs obtenidas en medio poliol tienen carácter hidrofílico, lo cual es esencial para que puedan ser dispersables en medios fisiológicos, y por tanto, para su empleo en las aplicaciones biomédicas que son objeto de esta tesis

Por todas estas ventajas, en esta tesis se ha considerado el uso preferente de etilenglicol (EG) como disolvente para la síntesis de los distintos tipos de partículas estudiadas. Hay que señalar que, aunque en la bibliografía pueden encontrarse métodos de síntesis de una variedad de tipos de NPs¹²⁻¹⁶ en los que se emplean diversos polioles como disolvente, esta tesis doctoral es pionera en uso de estos compuestos para la obtención de agentes de contraste para MRI a alto campo y MRI dual.

2.1.2. Síntesis de nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza

Con el fin de obtener las nanoarquitecturas núcleo-corteza se ha empleado el método de precipitación homogénea descrito en la sección anterior para la formación de la fase corteza, pero en presencia de las NPs que constituyen la fase núcleo y que actúan como semillas sobre las cuales se produce la nucleación de la fase corteza y el posterior crecimiento de la misma. En la Fig. 3 se presenta un esquema del proceso de formación de este tipo de partículas. Esencialmente, este supone suprimir la etapa de nucleación homogénea producida como consecuencia de una concentración de especies precursoras de la precipitación superior a la sobresaturación al introducir de forma deliberada las semillas que actúan como núcleos, los cuales crecen por difusión mientras que la disolución permanezca sobresaturada. Cuando la concentración de precursores cae por debajo del umbral de sobresaturación, el proceso de crecimiento finaliza. Este tipo de nucleación se denomina heterogénea. En este procedimiento de síntesis es importante evitar que tenga lugar una nucleación homogénea en el seno de la disolución que originaría la formación adicional de NPs de la fase corteza. Ello puede conseguirse ajustando la cinética de precipitación de forma que no se alcance la C_{min}^{nucl} , para lo cual, en esta tesis, se utilizó el mismo procedimiento empírico descrito en la sección anterior, que implica un análisis sistemático de los efectos de los distintos parámetros experimentales sobre el evento de precipitación.¹⁷

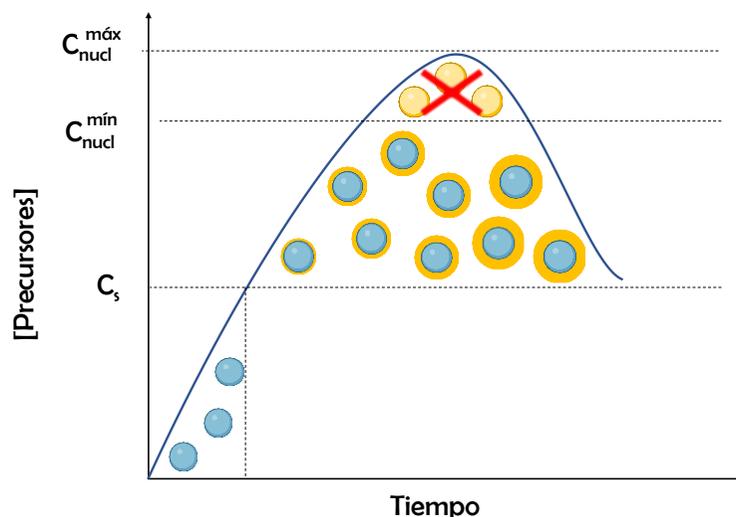


Figura 3. Ilustración esquemática del proceso de formación de NPs con arquitectura núcleo-corteza.

2.1.3. Purificación de las nanopartículas sintetizadas

En todos los casos, las partículas fueron sometidas a un procedimiento de purificación consistente en la centrifugación y lavado dos veces con etanol y una con agua doblemente destilada del precipitado obtenido. Las NPs purificadas se dispersaron finalmente en agua destilada, exceptuando algunos casos, en lo que se secaron a 50 °C para posteriores análisis.

2.2. Funcionalización

Existen distintos procedimientos de funcionalización de partículas con superficie tanto hidrofóbica como hidrofílica. Aquí, sólo nos referiremos al segundo caso, en el que se enmarcan las NPs objeto de estudio de esta tesis.

Atendiendo al procedimiento experimental empleado, estos métodos de funcionalización pueden clasificarse en dos categorías, dependiendo de si el proceso de funcionalización se lleva a cabo durante el propio proceso de síntesis de las NPs o en una etapa posterior. En el primer caso, tenemos los métodos de funcionalización conocidos como *one-pot* según su denominación en inglés, y en el segundo, los métodos *two steps* siguiendo también su denominación en inglés, los cuales se ilustran en la Fig. 4.

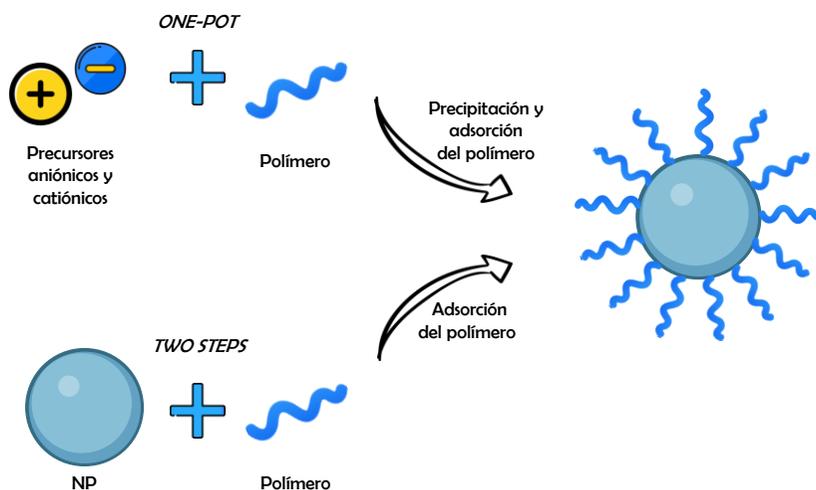


Figura 4. Esquema de los métodos de funcionalización: *One-pot* y *two steps*.

Los métodos de funcionalización también pueden clasificarse según la naturaleza de las interacciones entre las NPs y las moléculas del agente de funcionalización. Así, podemos distinguir aquellos métodos que se basan en interacciones iónicas, covalentes o electrostáticas.¹⁸

Entre los primeros se encuentran la mayoría de procesos de funcionalización con grupos carboxilato, ya que las moléculas de estos compuestos pueden adherirse a los cationes presentes en la superficie de las NPs mediante enlace iónico.

El procedimiento más empleado para la funcionalización mediante enlace covalente es el conocido método de química de la carbodiimida.^{19, 20} Como se verá más adelante, este método consiste básicamente, en la reacción entre grupos carboxilo y grupos amino para formar enlaces amida.

Por último, el método de funcionalización basado en interacciones electrostáticas más conocido es el denominado “capa a capa” que aquí será mencionado por su denominación en inglés *layer-by-layer*. Este tipo de funcionalización se basa en adsorber sobre la superficie de las NPs, mediante interacciones electrostáticas, polielectrolitos de carga eléctrica opuesta de forma secuencial y alternada.

Los reactivos empleados en los procesos de funcionalización se incluyen en las Tablas 4 y 5 del Apéndice II y los procedimientos experimentales concretos, se detallan a continuación.

2.2.1. Funcionalización con ácido poliacrílico (PAA)

Procedimiento *one-pot*. Para la funcionalización de las NPs con PAA durante su proceso de formación se utilizaron los mismos métodos ya optimizados para la obtención de NPs homogéneas de los distintos sistemas estudiados, pero introduciendo $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (salvo que se indique otra cantidad) de PAA en la disolución de partida del precursor de disprosio para propiciar la adsorción de este polímero (Fig. 5) sobre la superficie de las NPs mediante interacciones iónicas con los cationes Ln superficiales.²¹

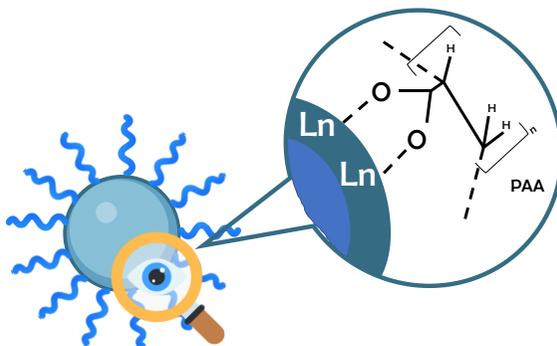


Figura 5: Esquema de la funcionalización con PAA mediante interacciones iónicas.

Procedimiento *two steps*. En aquellos casos en los que el proceso de funcionalización mediante procedimientos *one-pot* no tuvo éxito, se optó por llevar a cabo la funcionalización de NPs con PAA mediante procedimientos *two steps*. Para ello, en primer lugar, se ensayó el método de deposición de moléculas de PAA sobre la superficie de las NPs basado en interacciones iónicas. Para los sistemas en que este procedimiento no funcionó, se procedió a usar el procedimiento conocido como *layer-by-layer* basado en interacciones electrostáticas.

a) Funcionalización mediante interacciones iónicas

Para funcionalizar las NPs sintetizadas mediante interacciones iónicas con ácido poliacrílico (Fig. 5) en una etapa posterior a su síntesis, se preparó una suspensión de NPs en agua Milli-Q con una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y su pH se ajustó a 10 con una disolución de NaOH (1 M). A continuación, se añadió la cantidad deseada de PAA a dicha suspensión y, de nuevo, se ajustó el pH a 10. La suspensión resultante se agitó magnéticamente durante 1 h a temperatura ambiente y, posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm durante 20 min para eliminar el sobrenadante. Las NPs resultantes se lavaron dos veces con agua Milli-Q mediante centrifugación en las mismas condiciones y se almacenaron en agua Milli-Q.

b) Funcionalización mediante el método *layer-by-layer*

Como se ha mencionado anteriormente, este tipo de funcionalización se basa en adsorber sobre la superficie de las NPs polielectrolitos de carga eléctrica opuesta mediante interacciones electrostáticas de forma secuencial y alternada (Fig. 6). Como polielectrolito de carga positiva se utilizó poli(clorhidrato) de alilamina (PAH)²² y como polielectrolito de carga negativa, se usó PAA. En primer lugar, se procedió a depositar la capa PAH mediante el siguiente procedimiento. Se añadieron 5 mL de una disolución acuosa de NaCl 0,05 M a pH 6,5 que contenía $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de PAH, a 1,5 mL de una dispersión acuosa que contenía 5 mg de las NPs. La mezcla resultante se sonicó en agua helada durante 5 minutos y luego se mantuvo en agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la dispersión se centrifugó para eliminar el sobrenadante y las NPs se lavaron dos veces con agua Milli-Q. Para la deposición de la segunda capa negativa de PAA, se siguió un procedimiento similar, salvo que el PAH se sustituyó por PAA. Las NPs funcionalizadas resultantes se dispersaron y almacenaron en agua Milli-Q.

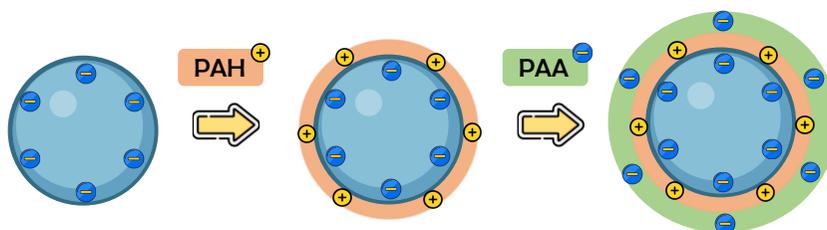


Figura 6: Esquema de la funcionalización *layer-by-layer* con PAH y PAA de una NP.

2.2.2. Funcionalización con polietilenglicol

La funcionalización con polietilenglicol mediante unión covalente^{23, 24} se llevó a cabo utilizando la química de acoplamiento de la carbodiimida, también conocida como química EDC-NHS (Fig. 7), la cual está bien establecida en la química orgánica y, especialmente, en la de bioconjugación.²⁵ Básicamente, el procedimiento consiste en la reacción entre grupos carboxilo y grupos amino para formar enlaces amida.²⁵ Para ello, se usa 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, (EDC) que activa los grupos carboxilo formando un producto intermedio inestable denominado O-acilisourea. Este producto es estabilizado mediante la adición de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), de forma que el nuevo producto intermedio semiestable puede reaccionar eficazmente con grupos amino para formar los enlaces amida.²⁶ Por tanto, se trata de una vía de funcionalización mediante enlaces covalentes.²⁷

Por tanto, este método requiere la presencia de grupos carboxilato en la superficie de las NPs y grupos amino en las cadenas de PEG. Por ello, las NPs de interés fueron previamente funcionalizadas con PAA, y se seleccionó un PEG derivatizado con grupos amino (α -metoxi- ω -amino PEG).

El procedimiento experimental se llevó a cabo como se describe a continuación. Para la funcionalización de las NPs con PAA se siguió el mismo procedimiento *two steps* descrito anteriormente, pero utilizando $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA para aumentar el número de grupos carboxilato en la superficie de las NPs y así facilitar la incorporación de α -metoxi- ω -amino PEG en la superficie de las NPs. Las NPs así funcionalizadas fueron dispersadas en una disolución de tampón borato sódico ($6 \text{ mg NPs} \cdot \text{mL}^{-1}$). A continuación, se mezcló un volumen

de 0,94 mL de una disolución de EDC en tampón borato ($3,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con 0,85 mL de disolución de sulfo-NHS en tampón borato ($6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).²⁸ La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 min. A esta disolución, se añadió un volumen de 161 μL de la suspensión de NPs funcionalizadas con PAA. Los volúmenes mencionados se eligieron para obtener una relación molar: 1 COOH:10 EDC:15 sulfo-NHS (COOH se refiere a los grupos carboxílicos del PAA unidos a las NPs). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h en el agitador rotatorio y se mezcló con 1,56 mL de una disolución de 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de α -metoxi- ω -amino PEG en tampón borato sódico (de acuerdo con la proporción 1 COOH:2 PEG). Por último, tras 45 minutos de agitación a temperatura ambiente en agitador rotatorio, las NPs se separaron por centrifugación a 14500 rpm durante 5 minutos. Las NPs resultantes se lavaron dos veces con la disolución de tampón borato sódico y se suspendieron en 1 mL de esta misma disolución tamponada, dejando la suspensión resultante almacenada a 4 °C. Para su caracterización posterior, estas NPs funcionalizadas con α -metoxi- ω -amino PEG se dispersaron y almacenaron en agua Milli-Q.

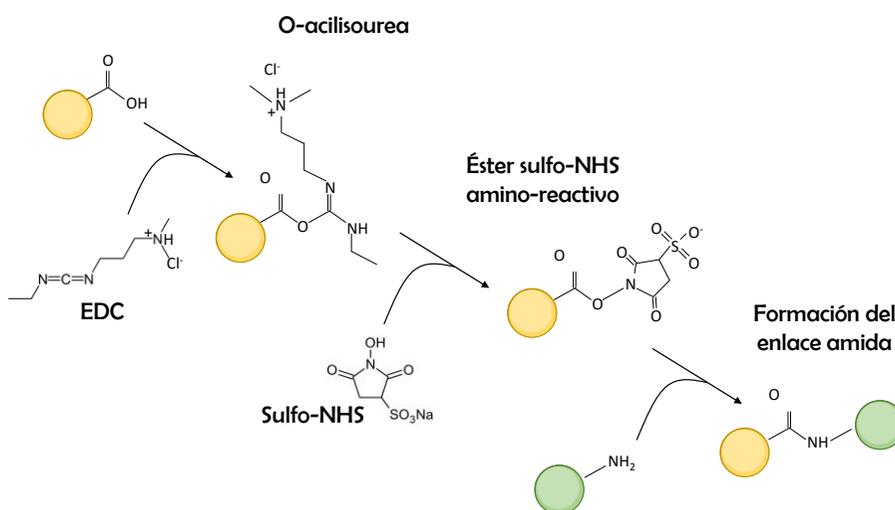


Figura 7: Reacciones de la química de la carbodiimida para la formación del enlace amida y consecuente anclaje del α -metoxi- ω -amino PEG en la superficie carboxilada de la nanopartícula.

2.3. Caracterización

2.3.1. Análisis morfológico

Microscopía de transmisión electrónica (TEM). La morfología y el tamaño de las partículas sintetizadas se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Como es bien conocido, esta técnica usa un haz de electrones como fuente de iluminación. Cuando este haz incide sobre la muestra, según sea el tipo de átomo que constituya la muestra y el espesor de la misma, los electrones pueden atravesar la muestra. Estos electrones transmitidos son empleados para formar las imágenes mediante el uso de lentes.

Para la obtención de las micrografías TEM, se depositó una gota de la suspensión acuosa de NPs en una rejilla de cobre recubierta con un polímero transparente que se dejó secar al aire antes de ser introducida en un microscopio de transmisión JEOL 2100Plus de 200 kV con filamento de LaB₆.

Las curvas de distribución del tamaño de las partículas sintetizadas se obtuvieron midiendo un centenar de partículas en las micrografías TEM utilizando el software libre *ImageJ*.

2.3.2. Análisis estructural

Difracción de rayos X (DRX). Para obtener información sobre las fases cristalinas presentes en las muestras analizadas, se hizo uso de la técnica de difracción de rayos X, la cual permite identificar las fases cristalinas y el tamaño de cristal.

El fundamento de esta técnica se basa en las interferencias ópticas que tienen lugar cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija con un espesor similar a la longitud de onda de la radiación. En particular, los rayos X tienen longitudes de onda del orden de los Angstroms, al igual que las distancias interatómicas de los componentes de las redes cristalinas. Por lo tanto, al focalizar esta radiación sobre la muestra a analizar, los rayos X se difractan con ángulos que dependen de las distancias interatómicas.

Las condiciones necesarias para que se produzca la difracción vienen determinadas por la conocida ley de Bragg, dada por la Ecuación 1:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta \quad (\text{Ecuación 1})$$

donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d_{hkl} es la distancia entre los planos cristalinos (hkl) y θ es el ángulo de difracción.

Para la obtención de los diagramas de difracción se utilizó un difractómetro modelo X'Pert Panalytical con radiación $K\alpha$ del cobre ($\lambda=1,5406$ Å) que emplea un detector X'Celerator multicanal y un monocromador de grafito. Los difractogramas se registraron entre 10 y 90° (valores de 2θ), con un tiempo de conteo de 200 s en cada paso, y un paso de $0,05$ (2θ).

El tamaño de cristal (D), también conocido como tamaño de los dominios coherentes de difracción, de las partículas sintetizadas se calculó a partir de la anchura del pico de difracción de mayor intensidad, empleando para ello la ecuación de Scherrer (Ecuación 2):²⁹

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta_b} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde K es el factor de forma, una constante que depende de las condiciones experimentales y cuyo valor es $0,89$ para cristales redondeados, λ es la longitud de onda de la línea $CuK\alpha$, B es la anchura de pico a media altura corregida ($B = B_{experimental} - B_{instrumental}$, siendo $B_{instrumental} = 0,112$ en radianes, y θ_b es el ángulo correspondiente al máximo del pico.

2.3.3. Análisis de composición química

Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES). El análisis de la composición química cuantitativa de las muestras se llevó a cabo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.³⁰ Esta técnica permite cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles de traza y ultra traza, pero para ello es

necesario tener a los átomos de la especie a analizar en disolución y llevar a cabo todo el procedimiento en un ambiente inerte para evitar la formación de especies indeseables, tales como óxidos, carburos, etc., los cuales afectarían a la precisión de la medición.

Para la digestión de las muestras se empleó ácido clorhídrico y los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro de emisión con fuente de plasma de acoplamiento inductivo iCAP 7200 ICP-OES Duo (ThermoFisher Scientific).

Espectroscopía de energías dispersivas de rayos X (EDS). Para analizar la localización de los cationes en las partículas, se llevaron a cabo análisis mediante espectroscopía de energías dispersivas de rayos X (EDS). Esta técnica se basa en el análisis de la energía de los rayos X emitidos por una muestra cuando esta es irradiada con un haz de electrones en un microscopio electrónico. Cuando estos chocan con los átomos que constituyen una muestra, son capaces de arrancar electrones de sus capas más internas, dando lugar así a un hueco y quedando el átomo ionizado. A continuación, un electrón de las capas más externas ocupa dicho hueco y el átomo emite energía (rayos X) para volver al estado fundamental. La energía emitida de los rayos X y la transición desde la que se producen son características de cada elemento. Para adquirir los espectros se empleó un detector de EDS acoplado a un microscopio de transmisión en modo barrido (STEM), FEI TECNAI G2F30 (300kV).

Para la obtención de las micrografías STEM y mapas composicionales de las partículas, se depositó una gota de la suspensión acuosa de las mismas en una rejilla de cobre recubierta con un polímero transparente que se dejó secar al aire antes de ser introducida en el microscopio.

Espectroscopía infrarroja (FTIR). Para obtener información sobre la presencia de especies adsorbidas o impurezas en la superficie de las partículas se utilizó la técnica de espectroscopía infrarroja que se basa en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética, en el rango infrarrojo medio del

espectro con la materia.^{31, 32} Cuando la radiación infrarroja es focalizada sobre una muestra, esta radiación puede absorberse, dando lugar a cambios en los estados vibracionales de las moléculas constituyentes de la misma o de la red cristalina. Por lo tanto, la absorción de radiación por parte de una muestra puede dar información sobre la composición química de la muestra, ya que el número, posición e intensidad de las bandas de adsorción de un espectro IR están determinados esencialmente por la naturaleza del enlace entre los átomos implicados.

El registro de los espectros de absorción de infrarrojos se llevó a cabo en un rango de 4000 a 300 cm^{-1} en un espectrofotómetro de transformada de Fourier JASCO FT/IR-6200 IRT-5000, con una resolución de 4 cm^{-1} . Para ello, las muestras en forma de polvo se mezclaron con bromuro potásico y la mezcla se compactó (aplicando una presión aproximada de 8000 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) resultando pastillas de 1 cm de diámetro.

Termogravimetría (TG). Con objeto de obtener información adicional sobre la composición química de las muestras se utilizó además la técnica de termogravimetría. Esta técnica se fundamenta en medidas de variación de masa de una muestra al someterla a un programa de calentamiento controlado con una atmósfera adecuada (aire estático, aire dinámico, O_2 , N_2 , Ar o H_2), representándose la masa en el eje de ordenadas y la temperatura en el eje de abscisas, y obteniendo así la curva TG. Esta variación de masa en función de la temperatura proveyó información sobre el contenido en agua y compuestos orgánicos adsorbidos en las NPs tratadas en esta tesis.³³

Las medidas se llevaron a cabo en un equipo TA Instruments Q500 TG/TA en un intervalo de temperatura de 25 a 1000 $^{\circ}\text{C}$ con una velocidad de calentamiento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y en un flujo de aire de 1000 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para facilitar la eliminación de los gases producidos durante las medidas.

2.4. Dispersabilidad

Para el análisis de la dispersabilidad de las NPs en el medio líquido deseado (agua destilada, o disolución salina tamponada con fosfato, PBS, Sigma-Aldrich, a pH = 7,4) se llevaron a cabo medidas del diámetro hidrodinámico (D_h) de las NPs mediante la técnica de dispersión dinámica de luz, también conocida como DLS por sus siglas en inglés (*dynamic light scattering*) y del potencial zeta de las mismas, ya que estas magnitudes proporcionan información sobre el estado de agregación de las partículas y sus causas.

2.4.1. Dispersión dinámica de luz

Con objeto de determinar el diámetro hidrodinámico de las NPs en suspensión se empleó la técnica DLS, cuyo fundamento es el siguiente. Al hacer incidir un láser sobre una suspensión de NPs, debido a su movimiento browniano, se producen fluctuaciones en la intensidad de luz dispersada en función del tiempo. La velocidad de estos cambios en la intensidad de la luz depende del D_h de las partículas, el cual se obtiene a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 3):

$$D_h = \frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot \eta \cdot D_{dif}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

donde, K_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η es la viscosidad del disolvente y D_{dif} es el coeficiente de difusión traslacional de las partículas.³⁴

Esta evaluación del D_h de las NPs se llevó a cabo en suspensiones en el medio deseado con una concentración de las mismas de $0,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y utilizando un equipo Malvern Zetasizer nanoseries Nano-ZS90.

2.4.2. Potencial zeta

Las partículas coloidales dispersas en un medio líquido se caracterizan por la presencia de cargas eléctricas en su superficie, las cuales se generan a

través de diversos procesos, tales como ionización de grupos superficiales, adsorción de iones o surfactantes iónicos, o pérdida diferencial de iones en la red cristalina. Dichas cargas eléctricas generan fuerzas electrostáticas que afectan a cómo se distribuyen los iones en la región interfacial, aumentando así la concentración de iones de carga opuesta, conocidos como contraiones, en las zonas más cercanas a la superficie de partículas, así como a la repulsión de iones de la misma carga. El modelo de la doble capa³⁵ describe como se distribuyen estos iones en las regiones próximas a las partículas coloidales dispersas, tal y como se indica en la Fig. 8. La zona que rodea a la superficie se divide principalmente en dos regiones:

- a) Capa de Stern: es la capa más próxima a la superficie y está constituida por contraiones que interaccionan fuertemente con la superficie.
- b) Capa difusa: es la capa exterior donde los iones interaccionan ligeramente con la superficie, y cuyo límite se denomina plano de deslizamiento.

El potencial zeta se define como la diferencia de potencial entre un punto de la superficie de las partículas y un punto en la superficie de la bicapa en el plano de deslizamiento. El valor de esta magnitud determina la dispersabilidad de las muestras. Así, se pueden distinguir 5 situaciones: (1) inestabilidad coloidal (potencial zeta ± 0 mV); (2) cierta estabilidad coloidal (potencial zeta $> \pm 15$ mV); (3) estabilidad coloidal moderada (potencial zeta $> \pm 30$ mV); (4) alta estabilidad coloidal (potencial zeta $> \pm 45$ mV); (5) muy alta estabilidad coloidal (potencial zeta $> \pm 60$ mV).³⁶

Para determinar los valores de potencial zeta se realizaron medidas de movilidad electroforética que dan información sobre la velocidad con la que las partículas migran al aplicar una diferencia de potencial a los electrodos de la célula que contiene la suspensión de las partículas. La ecuación de Henry relaciona el potencial zeta con la movilidad electroforética según la Ecuación 4:

$$U_E = \frac{2\varepsilon \cdot Z \cdot f(\kappa\alpha)}{3\eta} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde U_E es la movilidad electroforética, zeta es el potencial zeta, $f(\kappa\alpha)$ es la función de Henry y η es la viscosidad.

Las medidas de potencial zeta se llevaron a cabo utilizando un analizador automático de potencial zeta incorporado en el equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS90, a partir de las mismas suspensiones de NPs empleadas en el análisis por DLS.

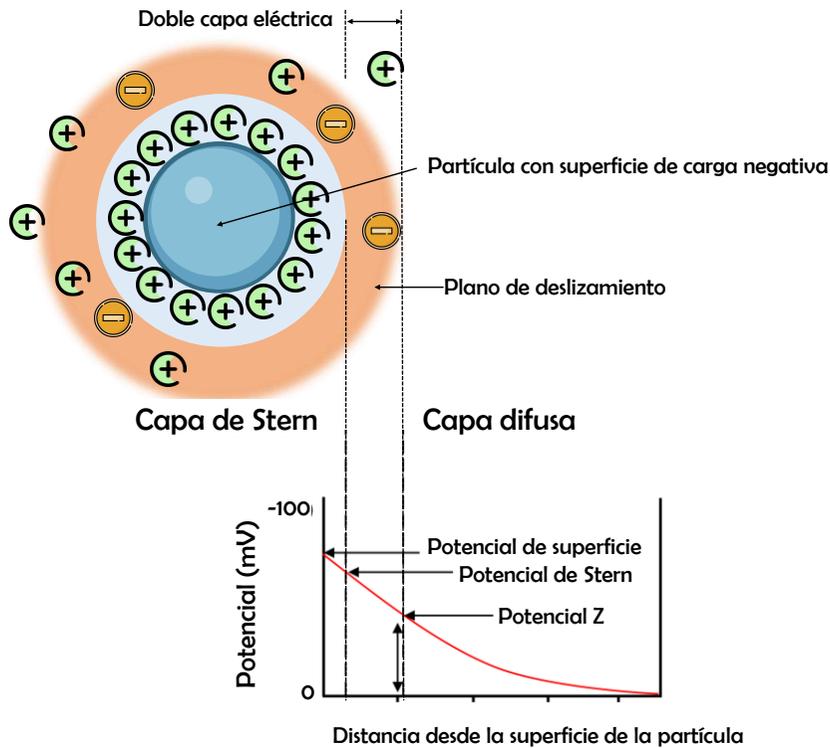


Figura 8: Esquema del modelo de la doble capa eléctrica.

2.5. Estabilidad química

El análisis de la estabilidad química de las NPs preparadas se llevó a cabo en condiciones que mimetizan el medio fisiológico. Para ello, se prepararon suspensiones de NPs en PBS (pH = 7,4) y se mantuvieron con agitación magnética a 37 °C durante diferentes periodos, tras lo cual se centrifugaron. Los sobrenadantes resultantes se analizaron por ICP para determinar los posibles elementos disueltos. Además, las NPs resultantes se lavaron dos veces con agua Milli-Q y se examinaron mediante TEM para evaluar posibles cambios morfológicos.

2.6. Relajatividades magnéticas

Para las medidas de las propiedades magnéticas de las diferentes muestras estudiadas, se prepararon suspensiones acuosas de NPs con diferente concentración. Los valores de relajatividades longitudinal (r_1) y transversal (r_2) se calcularon a partir de los valores de las pendientes de las rectas obtenidas al representar los inversos de los tiempos de relajación ($1/T_1$ y $1/T_2$) obtenidos para cada una de las suspensiones en función de su concentración (mM) del ion lantánido.

Para la medida de T_1 a campo magnético externo constante (1,44 o 9,4 T), se utilizó la secuencia de pulsos denominada *Inversion Recovery* (Fig. 9). Esta secuencia está constituida por un pulso de radiofrecuencia de 180° en el eje z, un intervalo de espera (τ), que es necesario para que el vector de magnetización se recupere, y un pulso de 90° en el eje z. Tras este proceso, se registró la curva de decaimiento libre inducido (FID) que es proporcional a la magnetización longitudinal que se haya aplicado al sistema.

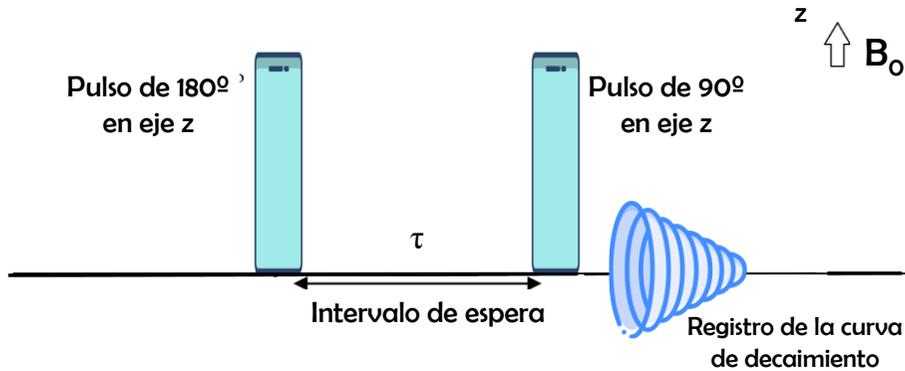


Figura 9: Secuencia de pulsos *Inversion-Recovery* para la determinación de T_1 .

Para la determinación de T_2 a campo magnético externo constante (1,44 o 9,4 T) se usó la secuencia de pulsos *Carl-Purcell-Meiboom-Gill* (Fig. 10). Dicha secuencia consta de un pulso de radiofrecuencia de 90° en el eje x , un intervalo de espera (τ) y otro pulso de 180° en el eje y . Por último, tras un intervalo de espera doble (2τ), se aplica un nuevo pulso de 180° en el eje y . Transcurrido de nuevo uno de los intervalos de espera, se registra la FID, que será proporcional a la magnetización transversal.

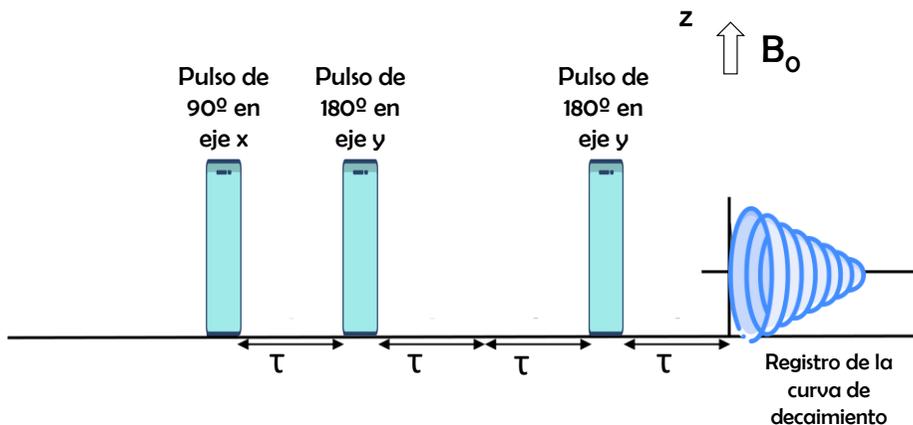


Figura 10: Secuencia de pulsos *Carl-Purcell-Meiboom-Gill* para la determinación de T_2 .

Las medidas de relajatividad magnética transversal (r_2) a 1,44 T fueron realizadas en un equipo Bruker Minispec (TD-NMR), mientras que las medidas a 9,4 T fueron llevadas a cabo en un equipo Bruker Biospec MRI.

2.7. Propiedades luminiscentes

Las propiedades luminiscentes de las NPs dopadas con neodimio fueron analizadas a partir de sus espectros de excitación y emisión, de los valores de vida media de luminiscencia y de las imágenes en el infrarrojo cercano de la muestra.

2.7.1. Espectros de excitación y emisión

Los espectros de excitación y emisión de fotoluminiscencia se registraron en un instrumento FLS1000 Edinburgh, equipado con tubos fotomultiplicadores que detectan radiación roja e infrarroja, y una lámpara de Xe, utilizando longitudes de onda de emisión y excitación de 877 nm y 806 nm, respectivamente. Los espectros de emisión se corrigieron en función de la respuesta del detector, los espectros de excitación se corrigieron en función de la intensidad de la lámpara y ambos se corrigieron también en función del fondo. Para llevar a cabo las medidas, se prepararon suspensiones coloidales de las NPs en agua utilizando una concentración constante ($0,5 \text{ mg NPs} \cdot \text{mL}^{-1}$) para todas las muestras, lo cual permitió llevar a cabo un análisis comparativo preciso de las propiedades luminiscentes de las mismas.

2.7.2. Vidas medias

Los valores de los tiempos de vida de la luminiscencia se estimaron mediante ajuste de las curvas de decaimiento obtenidas al excitar las muestras con un pulso de luz de alta intensidad y corta duración y registrar a continuación el número de fotones emitidos en función del tiempo.

Para las muestras que muestran un único tiempo de vida de luminiscencia, su intensidad decae exponencialmente según la Ecuación 5:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde I_0 es la intensidad de la luminiscencia a tiempo cero y τ es el tiempo de vida media de la luminiscencia, es decir, es el tiempo en el que la intensidad de emisión decae un factor $1/e$ con respecto a su valor inicial.

Sin embargo, las muestras analizadas en esta tesis están constituidas por NPs de compuestos de elementos lantánidos que no suelen presentar un decaimiento monoexponencial, sino biexponencial que se ajusta mediante Ecuación 6:

$$I(t) = I_{01} \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + I_{02} \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde τ_1 y τ_2 son los tiempos de vida media de los dos componentes de la luminiscencia con intensidades I_{01} e I_{02} , respectivamente.

El componente de tiempo de vida más largo se considera como el tiempo de decaimiento de los iones lantánidos situados en el interior de las NPs, mientras que el componente más corto se refiere a los iones situados cerca de la superficie de las mismas, cuya luminiscencia estará influenciada por centros de desactivación como pueden ser moléculas de disolvente o moléculas de ligandos adsorbidas superficialmente.³⁷

A partir de los valores de vida media de los distintos componentes es posible calcular el tiempo de vida promedio, dado por la Ecuación 7:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\int_{t_0}^{t_f} tI(t)dt}{\int_{t_0}^{t_f} I(t)dt} = \frac{\tau_1^2 I_1 + \tau_2^2 I_2}{\tau_1 I_1 + \tau_2 I_2} \quad (\text{Ecuación 7})$$

El análisis de los tiempos de vida de la luminiscencia se realizó con las muestras en forma de polvo usando en el mismo equipo mencionado anteriormente para el registro de espectros de emisión y excitación.

2.7.3. Imágenes de luminiscencia en el infrarrojo cercano

Para obtener imágenes de la luminiscencia infrarroja emitida por la muestra dopada con Nd^{3+} se utilizó una cámara NIR (WiDy SenS 320 V-ST) equipada con un detector InGaAs (rango de longitud de onda 900 -1700 nm). La muestra, preparada en polvo sobre un portaobjetos, fue excitada a una longitud de onda (λ_{ex}) de 806 nm, con una fuente láser pulsada sintonizable (Fianium, SC400) que funcionaba a una frecuencia de repetición de 40 kHz.

2.8. Ensayos en modelo animal

Para los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones macho Balb/c, proporcionados por Janvier Labs. Los ratones se anestesiaron con isoflurano (0,5-1 % en oxígeno a 1 dm³/min) y se les canuló la vena de la cola para la administración intravenosa de las NPs en una concentración entre 5 y 10 mg Dy/kg animal. A continuación, los ratones se colocaron en el imán, donde se monitorearon las constantes vitales, la respiración y la temperatura corporal durante todo el experimento. En la Fig. 11 se indica esquemáticamente dicho procedimiento.

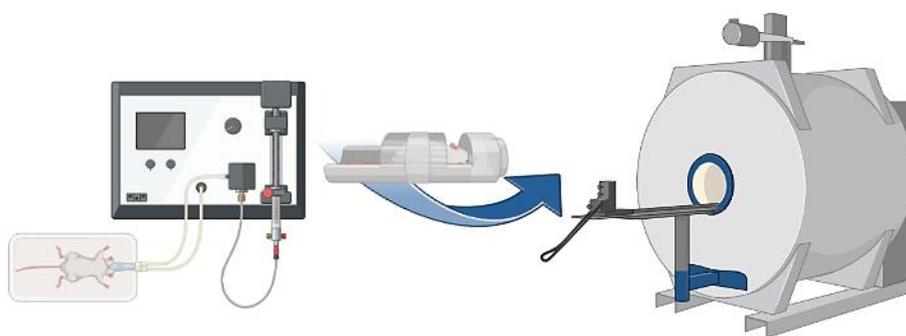


Figura 11: Representación esquemática del procedimiento utilizado para la obtención de imágenes MRI en un ratón.

Todos los estudios se realizaron cumpliendo las Directrices Españolas y Europeas para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (R.D. 53/2013 y 2010/62/UE) y aprobados por el Comité Local de Ética Animal y el Máximo Comité de Ética Institucional (Junta de Andalucía, acreditación número 14/09/2021/130).

2.8.1. Imágenes *in vivo* de resonancia magnética

Las imágenes de resonancia magnética se adquirieron en el equipo Bruker Biospec 9,4 T mencionado en la sección 2.5, equipado con una antena de 40 mm de diámetro tipo *bird-cage*. El esquema de adquisición consistió en imágenes ponderadas en T₂ de alta resolución, imágenes paramétricas cuantitativas en T₂, inyección intravenosa de las NPs, secuencia dinámica ponderada en T₂ y nuevamente imágenes de alta resolución e imágenes T₂

paramétricas.³⁸ Las imágenes ponderadas en T_2 de alta resolución se adquirieron utilizando una secuencia turbo-RARE con control respiratorio (TE = 16 ms, TR = 1000 ms, 4 promedios, FOV = 4 cm, tamaño de matriz = 384x384, grosor de corte = 1 mm). Los mapas T_2 se adquirieron utilizando una secuencia de eco de espín multieco (TE que van desde 7 ms a 448 ms, TR = 3500 ms, FOV = 4 cm, tamaño de matriz = 128x128, espesor de corte = 1 mm).

El comportamiento farmacocinético a corto plazo (primeros 30 minutos) se estudió a partir del análisis semicuantitativo de la secuencia dinámica ponderada en T_2 . Se adquirieron imágenes T_2 cuantitativas a las 0, 1 y 24 h para evaluar la farmacocinética y la biodistribución a largo plazo de las NPs. Después de 24 h tras la inyección de las NPs, los ratones fueron sacrificados y se recolectaron muestras de tejido para la evaluación histológica y la cuantificación del contenido de Dy^{3+} por ICP.

Para obtener los valores de intensidad, se dibujaron regiones de interés (ROI) en la primera imagen de la secuencia de imágenes y se ajustaron según las Ecuaciones 8 y 9:

$$M_Z(t) = M_0 \left(1 - e^{-\frac{TR}{T_1}}\right) \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$M_{XY}(t) = M_0 e^{-\frac{TE}{T_2}} \quad (\text{Ecuación 9})$$

donde M_Z y M_{XY} son las intensidades de señal en el tiempo TR (tiempo de repetición) o TE (tiempo de eco), y M_0 es la intensidad de señal en equilibrio.

2.8.2. Imágenes *ex vivo* de luminiscencia en el infrarrojo cercano

Las imágenes *ex vivo* de fluorescencia en el NIR se registraron en el equipo Bruker Xtreme. El filtro de excitación se fijó en 600 nm y el filtro de emisión en 800 nm, se empleó un campo de visión de 120x120 mm, un *binning* de 2x2, y un tiempo de exposición de 1 min.

2.9. Ensayos de biocompatibilidad

La biocompatibilidad de las NPs preparadas se evaluó mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* y mediante el análisis histológico *ex vivo* de diversos órganos del modelo animal utilizado para los estudios *in vivo*. Los productos químicos requeridos para la realización de estos análisis se encuentran recogidos en la Tabla 6 del Apéndice II.

2.9.1. Citotoxicidad

La evaluación de la viabilidad celular de las NPs se realizó empleando la línea celular de fibroblastos de prepucio humano HFF-1 mediante dos métodos: el ensayo colorimétrico MTT y el ensayo conocido como vivo-muerto.

Ensayo MTT. El ensayo colorimétrico MTT mide la actividad metabólica celular. El fundamento de este ensayo se basa en la capacidad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial para reducir el compuesto MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-(2,5-difeniltetrazólico) que es amarillo, a un compuesto púrpura que se denomina formazán. El ensayo supone incubar un cultivo celular con el reactivo MTT y las NPs cuya toxicidad se desea analizar.³⁹ Al cuantificar la cantidad de formazán producido se tiene información sobre el % de células viables en el cultivo, ya que la capacidad de las células para reducir el MTT indica el nivel de integridad de las mitocondrias y puede entonces interpretarse su actividad funcional como una medida de la viabilidad celular en presencia de las NPs analizadas.

Para realizar el ensayo MTT, se sembraron células HFF-1 a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ en 200 µl de DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle's Medium*) suplementado. Tras incubarlas durante de 24 h, el medio de los pocillos se reemplazó con medio fresco que contenía las NPs a analizar en concentraciones variables de 0,1 µg/ml a 100 µg/ml. Y a uno de los pocillos se le agregó Triton X-100 como control positivo de muerte. Después de 24 h, el

sobrenadante de cada pocillo se reemplazó por 200 μL de medio fresco con MTT ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Transcurridas 2 h de incubación a 37°C y 5 % de CO_2 , se retiró el medio y los cristales de formazán formados se solubilizaron con 200 μl de dimetilsulfóxido. Finalmente, las disoluciones de formazán se agitaron vigorosamente para disolver el colorante reaccionado y se midió la absorbancia de cada pocillo en un lector de microplacas (Dynatech MR7000) a 550 nm. Todas las medidas de viabilidad celular se llevaron a cabo por quintuplicado para obtener un valor promedio y evitar errores experimentales. La viabilidad celular relativa (%) y su error relacionado con los pocillos de control que contenían medio de cultivo celular sin nanopartículas se calcularon mediante las Ecuaciones 10 y 11:

$$\text{Viab. celular relativa (VCR)}(\%) = \frac{[Abs]_{test}}{[Abs]_{control}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$\text{Error}(\%) = VCR_{test} \times \sqrt{\left(\frac{[\sigma]_{test}}{[Abs]_{test}}\right)^2 + \left(\frac{[\sigma]_{control}}{[Abs]_{control}}\right)^2} \quad (\text{Ecuación 11})$$

Según se especifica en la norma UNE-EN ISO 10993-5:2009 “Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: ensayos de citotoxicidad *in vitro*”, cuando la viabilidad decae más allá del 70 %, las NPs se consideran potencialmente tóxicas para la línea celular utilizada.⁴⁰

Morfología celular y ensayo vivo-muerto. Las células HFF-1 se sembraron a una densidad de 1×10^4 células/pocillo en una placa de 96 pocillos a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO_2 en 200 μl de DMEM suplementado. Después de 24 h de cultivo, el medio DMEM de los pocillos se reemplazó con medio fresco que contenía las NPs a analizar en concentraciones variables de 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. De manera similar a los ensayos de citotoxicidad, después de 24 h, se agregó Triton X-100 a los pocillos de control positivo. Después de 15 min, todos los pocillos se tiñeron con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol) (dilución 1:3000) para marcar los núcleos en todas las células, y TO-PRO-3 (tiazol rojo) (dilución 1:1000) para marcar solo las células muertas. Las imágenes de morfología celular se adquirieron utilizando el equipo Operetta High Content

Imaging System (Perkin Elmer) con una lente de objetivo 20x. Se analizaron 5 réplicas de pocillos para cada condición con 10 campos de imágenes aleatorias capturadas por pocillo. Para cada campo, se capturaron imágenes de fluorescencia para DAPI y TO-PRO-3, además de una imagen de campo claro. Los porcentajes de mortalidad celular se calcularon automáticamente mediante el software Operetta Harmony, mediante el cual se identificaron todos los núcleos (vivos y muertos) a partir de la tinción DAPI y luego se determinó el porcentaje de células muertas por el número de núcleos que también poseían altos niveles de tinción TO-PRO-3.⁴¹

2.9.2. Histología

Secciones de tejido de riñón, bazo e hígado se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar la arquitectura del tejido mediante microscopía óptica (escáner de portaobjetos OLYMPUS VS200 con campo claro, campo oscuro y polarizador).⁴² Los tejidos se fijaron en formaldehído al 4 % (Panreac, pH 7 tamponado) durante 48 h, cambiando el formaldehído al 4 % transcurridas 24 h. Luego, las muestras se deshidrataron con etanol y se embebieron en parafina (temperatura de 56 ° C durante 2 h con agitación y vacío). Las muestras incluidas en parafina se seccionaron en láminas de 7 µm de espesor. A continuación, se desparafinizaron, rehidrataron y tiñeron con H&E, y finalmente se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol, se aclararon en xileno y se montaron en un portaobjetos de vidrio comercial.

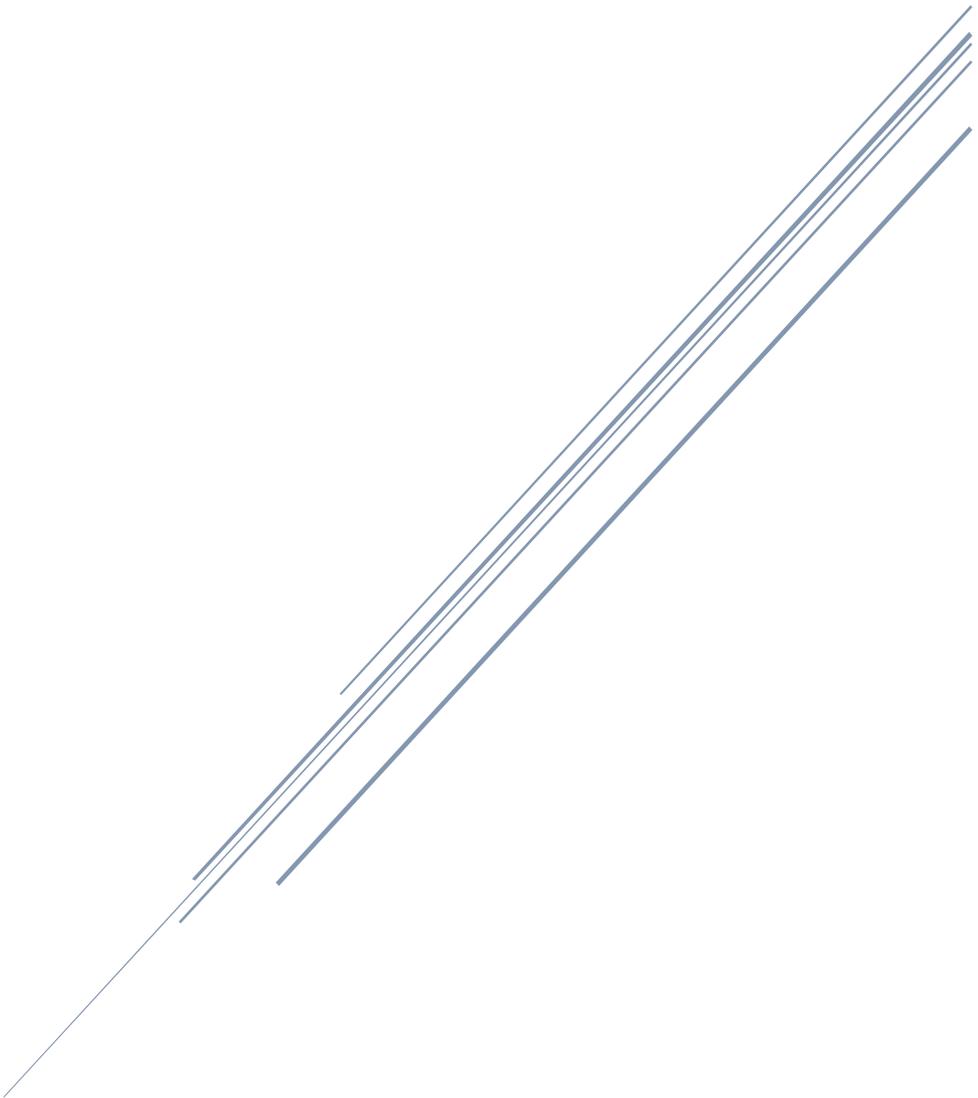
2.10. Bibliografía

1. V. Privman, D. V. Goia, J. Park and E. Matijevic, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1999, **213**, 36-45.
2. V. K. Lamer and R. H. Dinegar, *Journal of the American Chemical Society*, 1950, **72**, 4847-4854.
3. T. Sugimoto, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1987, **28**, 65-108.
4. P. C. Hiemenz and R. Rajagopalan, *Principles of colloid and surface chemistry*, New York, Third Edition edn., 1997.
5. M. Iosin, V. Canpean and S. Astilean, *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2011, **217**, 395-401.
6. M. Ocana, R. Rodriguez-Clemente and C. J. Serna, *Advanced Materials*, 1995, **7**, 212-216.
7. T. D. Nguyen, *Nanoscale*, 2013, **5**, 9455-9482.
8. R. Belcher, G. W. Tully and G. Svehla, *Analytica Chimica Acta*, 1970, **50**, 261-267.
9. A. Escudero, M. E. Calvo, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Langmuir*, 2013, **29**, 1985-1994.
10. L. Poul, S. Ammar, N. Jouini, F. Fievet and F. Villain, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2003, **26**, 261-265.
11. C. Feldmann, *Solid State Sciences*, 2005, **7**, 868-873.
12. H. Dong, Y. C. Chen and C. Feldmann, *Green Chemistry*, 2015, **17**, 4107-4132.
13. Y. J. Xiong, J. Y. Chen, B. Wiley, Y. N. Xia, S. Aloni and Y. D. Yin, *Journal of the American Chemical Society*, 2005, **127**, 7332-7333.
14. H. Kawasaki, Y. Kosaka, Y. Myoujin, T. Narushima, T. Yonezawa and R. Arakawa, *Chemical Communications*, 2011, **47**, 7740-7742.
15. T. Herricks, J. Y. Chen and Y. N. Xia, *Nano Letters*, 2004, **4**, 2367-2371.
16. F. Fievet, S. Ammar-Merah, R. Brayner, F. Chau, M. Giraud, F. Mhammeri, J. Peron, J. Y. Piquemal, L. Sicard and G. Viau, *Chemical Society Reviews*, 2018, **47**, 5187-5233.
17. B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko and C. J. O'Connor, *Chemical Reviews*, 2004, **104**, 3893-3946.
18. F. Gambinossi, S. E. Mylon and J. K. Ferri, *Advances in Colloid and Interface Science*, 2015, **222**, 332-349.
19. F. H. Meng, G. H. M. Engbers and J. Feijen, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2004, **70A**, 49-58.
20. J. Suh, K. L. Choy, S. K. Lai, J. S. Suk, B. C. Tang, S. Prabhu and J. Hanes, *International Journal of Nanomedicine*, 2007, **2**, 735-741.
21. X. C. Qi, Z. L. Wang, S. M. Ma, L. J. Wu, S. G. Yang and J. Xu, *Polymer*, 2014, **55**, 1183-1189.
22. Y. M. Guo, W. Geng and J. Q. Sun, *Langmuir*, 2009, **25**, 1004-1010.

23. A. Grigoletto, A. Mero, K. Maso and G. Pasut, *Nanoarmoring of Enzymes: Rational Design of Polymer-Wrapped Enzymes*, 2017, **590**, 317-346.
24. M. Ebara, *Biomaterials Nanoarchitectonics*, Japan, First Edition edn., 2016.
25. T. Betancourt, J. D. Byrne, N. Sunaryo, S. W. Crowder, M. Kadapakkam, S. Patel, S. Casciato and L. Brannon-Peppas, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2009, **91A**, 263-276.
26. Z. Grabarek and J. Gergely, *Analytical Biochemistry*, 1990, **185**, 131-135.
27. C. Zhang, N. Luo and D. E. Hirt, *Langmuir*, 2006, **22**, 6851-6857.
28. Z. Grabarek and J. Gergely, *Biophysical Journal*, 1988, **53**, A392-A392.
29. A. L. Patterson, *Physical Review*, 1939, **56**, 978-982.
30. D. A. Skoog, F. J. Holler and S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, New York, Seventh Edition edn., 1992.
31. K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*, 6th Edition edn., 1997.
32. V. C. Farmer, *The infrared spectra of minerals*, London, 1974.
33. R. C. Mackenzie, *The Differential Thermal Investigation of Clays*, London, 1957.
34. P. Becher, "A Review of: "Foundations of Colloid Science, Vol. 1, Robert J. Hunter (written in the collaboration of L. R. White, L. R. Fisher, N. Parker, R. M. Pashley, D. H. Napper, R. W. O'Brien, J. Ralston, F. Grieser), New York, 1987.
35. J.-P. Jolivet, *Metal Oxide Chemistry and Synthesis: From Solution to Solid State*, 2000.
36. R. Choudhary, D. Khurana, A. Kumar and S. Subudhi, *Journal of Experimental Nanoscience*, 2017, **12**, 140-151.
37. I. C. o. Illumination, *Commission Internationale de l'Eclairage proceedings*, 1931.
38. C. Caro, M. Carmen Munoz-Hernandez, M. Pernia Leal and M. Luisa Garcia-Martin, *Preclinical Mri: Methods and Protocols*, 2018, **1718**, 409-419.
39. T. Mosmann, *Journal of Immunological Methods*, 1983, **65**, 55-63.
40. UNE-EN ISO 10993-5:2009: Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. <https://www.aenor.com/>.
41. E. Christou, J. R. Pearson, A. M. Beltran, Y. Fernandez-Afonso, L. Gutierrez, J. M. de la Fuente, F. Gamez, M. L. Garcia-Martin and C. Caro, *Pharmaceutics*, 2022, **14**, 636.
42. C. Caro, J. M. Paez-Munoz, A. M. Beltran, M. P. Leal and M. L. Garcia-Martin, *Acs Applied Nano Materials*, 2021, **4**, 4199-4207.

CAPÍTULO III

AGENTES DE CONTRASTE PARA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE ALTO CAMPO



3.1. Síntesis y caracterización de las nanopartículas

En este capítulo se aborda el desarrollo de ACs para MRI a alto campo basados en Dy^{3+} . Para ello se lleva a cabo un estudio comparativo de diferentes matrices (vanadato, molibdato, volframato y fosfato) con objeto de encontrar el sistema con valores óptimos de relajatividad magnética que, como se detalla en el Apéndice I, se ven afectados de forma significativa por la composición, tamaño y forma de las NPs que constituyen dichos ACs.

3.1.1. Nanopartículas de vanadato de disprosio

Para la síntesis de NPs uniformes de DyVO_4 , se utilizó como punto de partida un método de precipitación homogénea en medio poliol desarrollado previamente¹ para sintetizar NPs de GdVO_4 con una única modificación que consistió en sustituir el precursor $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3$ por $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$. Específicamente, se prepararon dos disoluciones en viales independientes conteniendo una de ellas $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ en una mezcla EG/ H_2O (1,5 mL H_2O + 1 mL EG) y otra, Na_3VO_4 que fue disuelto en etilenglicol (2,5 mL) a $\approx 80^\circ\text{C}$ en agitación magnética. Una vez enfriada esta última a temperatura ambiente, se mezclaron ambas disoluciones. Esta mezcla, en la que las concentraciones finales de Dy^{3+} y VO_4^{3-} fueron 0,02 M y 0,1 M, respectivamente, se envejeció durante 20 h en una estufa convencional precalentada a 120°C .

Tabla 1. Forma, tamaño medio, diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z (PZ) de las partículas obtenidas usando diferentes condiciones experimentales. Las condiciones que conducen a la muestra óptima se encuentran sombreadas.

Precursor de Dy ³⁺	[Dy ³⁺] (M)	[VO ₄ ³⁻] (M)	EG/H ₂ O (vol.)	Fuente de calor	T (°C)	Forma	Tamaño (σ) (nm)	Dh (nm)	PZ (mV)	Fig.
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	3.5/1.5	Estufa	120	≈ Cúbica	101 (18)	237	-28	1a
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	3.5/1.5	Estufa	120	≈ Cúbica	77 (14)	254	-29	1b
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	2.5/2.5	Estufa	120	Heterogénea	-	-	-	2a
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	4/1	Estufa	120	≈ Cúbica	67 (5)	81	-37	2b
Dy(OAc) ₃	0,02	0,02	4/1	Estufa	120	Irregular	-	-	-	3a
Dy(OAc) ₃	0,02	0,2	4/1	Estufa	120	Anisométrica	72 (16) x 49 (7)	171	-40	3b
Dy(OAc) ₃	0,01	0,1	4/1	Estufa	120	≈ Cúbica	81 (25)	237	-28	3c
Dy(OAc) ₃	0,04	0,1	4/1	Estufa	120	≈ Cúbica	83 (17)	138	-27	3d
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	4/1	Estufa	180	≈ Cúbica	84 (6)	170	-37	4a
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	4/1	Estufa	150	Irregular	51 (14)	276	-31	4b
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	4/1	MW	120	Anisométrica	45 (1) x 26 (3)	209	-32	4c

σ: desviación estándar

MW: horno asistido por microondas durante 30 min

En la Fig. 1a se presenta una micrografía TEM de las partículas obtenidas mediante este procedimiento, las cuales presentaron una forma aparentemente cúbica y una longitud de arista media de 101 nm (desviación estándar, $\sigma = 18$ nm) (Tabla 1). El valor de Dh obtenido para estas NPs en suspensión acuosa a pH nativo (≈ 5) fue notablemente superior (237 nm) a su tamaño medio (Tabla 1), indicando la presencia de un cierto grado de agregación. Teniendo en cuenta que el valor de potencial zeta (PZ) medido en estas condiciones (-28 mV) (Tabla 1) es suficiente alto para proporcionar estabilización electrostática (Sección 2.4.2. del Capítulo II), puede considerarse que dicha agregación es irreversible, por lo que estas NPs no son adecuadas para su uso en biomedicina. Con objeto de disminuir dicho grado de agregación, se procedió a variar sistemáticamente las condiciones experimentales de síntesis (concentración y naturaleza de los precursores, proporción de la mezcla EG/H₂O como disolvente, fuente de calentamiento y temperatura de reacción), factores que, como se ha descrito en la Sección 2.1.1. del Capítulo II, determinan las características de las partículas precipitadas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

En primer lugar, se varió la naturaleza del precursor de Dy³⁺, sustituyendo Dy(NO₃)₃ por Dy(OAc)₃ (acetato de disprosio), mantenido los demás parámetros constantes. Esta variación, no produjo cambios en la forma de las partículas (Fig. 1b), pero si en su longitud media de arista que disminuyó de 101 a 77 nm ($\sigma = 14$ nm) siendo este último más adecuado para aplicaciones en bioimagen. No obstante, el valor de Dh no se modificó notablemente (254 nm) en suspensiones con un pH similar (≈ 5) en las que el valor de PZ fue también similar (-29 mV), lo que indica que estas NPs también presentaban un grado de agregación apreciable.

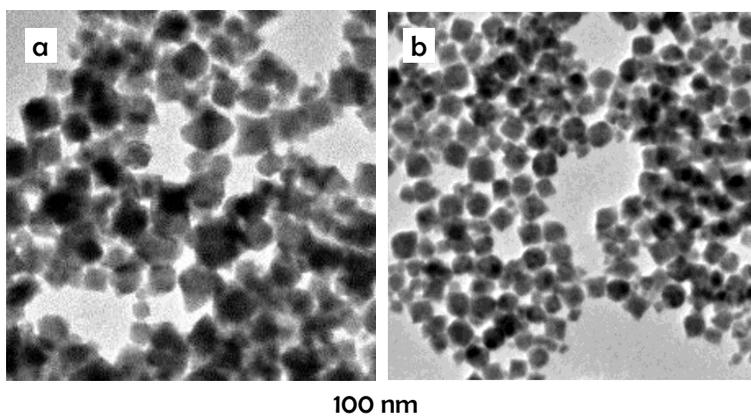


Figura 1. Micrografías TEM de las NPs obtenidas por calentamiento a 120 °C durante 20 h de disoluciones que contenían 0,1 M Na_3VO_4 y 0,02 M $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ (a) o $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ (b) en una mezcla EG/ H_2O (relación volumétrica 3,5/1,5) según se indica en la Tabla 1.

A continuación, se evaluó el efecto de la proporción EG/ H_2O , manteniendo constantes las demás condiciones que dieron lugar a las NPs más pequeñas (77 nm). Las partículas obtenidas al aumentar la relación EG/ H_2O de 3,5/1,5 a 4/1, se ilustran en la Fig. 2a, en la que puede observarse que dicho cambio únicamente dio lugar a una ligera disminución del tamaño de partícula (67 nm, $\sigma = 5$ nm). Hay que destacar que, en estas condiciones, el valor del Dh de las NPs en suspensión acuosa ($\text{PZ} = -37$ mV) fue mucho más próximo (81 nm) al tamaño estimado mediante microscopía electrónica, indicando que las NPs estaban altamente dispersas (libres de agregación). Por otra parte, al disminuir la relación EG/ H_2O desde 3,5/1,5 a 2,5/2,5, se obtuvieron partículas heterogéneas en forma y tamaño (Fig. 2b). Estos cambios morfológicos descritos pueden explicarse en función de los valores de viscosidad (1,002 mPa·s para el H_2O y 16,2 mPa·s para el EG) de ambos disolventes. Así, al adicionar una mayor cantidad de EG, la viscosidad de la mezcla de disolventes aumenta dando lugar a que los procesos de difusión implicados en el crecimiento de las partículas y en su posible agregación sean más lentos, lo cual favorecería un menor tamaño de partícula y un menor grado de agregación, según se describe en la Sección 2.1.1. del Capítulo II.

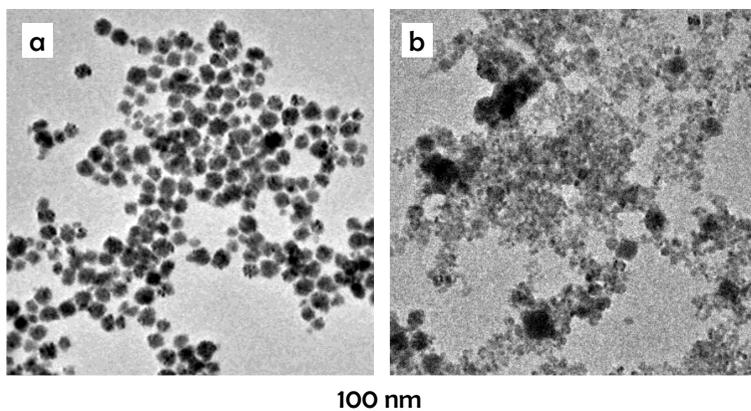


Figura 2. Micrografías TEM de las NPs obtenidas por calentamiento a 120 °C durante 20 h de disoluciones que contenían 0,02 M $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,1 M Na_3VO_4 en mezclas EG/ H_2O con relaciones volumétricas 4/1 (a) o 2,5/2,5 (b), según se indica en la Tabla 1.

Teniendo en cuenta estos resultados, el efecto de la concentración de los precursores se investigó usando las condiciones experimentales que dieron lugar a las NPs más dispersas (relación EG/ H_2O = 4/1). En primer lugar, se varió la concentración del precursor de vanadato. Este estudio puso de manifiesto que al disminuir la concentración de Na_3VO_4 desde 0,1 M hasta 0,02 M, precipitaron NPs irregulares (Fig. 3a), mientras que, al aumentar la concentración de dicho precursor hasta 0,2 M, se obtuvieron NPs ligeramente anisométricas (Fig. 3b) con un tamaño medio de 72 nm ($\sigma = 16$ nm) x 49 nm ($\sigma = 7$ nm), y un valor de $D_h = 171$ nm. Este valor indica un cierto grado de agregación que no puede atribuirse a razones electrostáticas dado que el valor de PZ para una dispersión de estas NPs fue muy elevado (-40 mV). Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración del precursor de Dy^{3+} , encontrándose que una disminución de la concentración del $\text{Dy}(\text{Ac})_3$ de 0,02 M a 0,01 M, dio lugar a un aumento de la longitud media de arista (Fig. 3c) (81 nm, $\sigma = 25$ nm) así como del valor de D_h (237 nm) (PZ = -28 mV) y, por tanto, del grado de agregación. El aumento de la concentración de dicho precursor de 0,02 M a 0,04 M resultó en NPs muy similares a estas últimas en forma (Fig. 3d) y tamaño, aunque más dispersas ($D_h = 138$ nm). Estos cambios morfológicos pueden ser atribuidos a la modificación de la cinética de

precipitación que cabría esperar como consecuencia de la variación de las concentraciones de precursores (Sección 2.1.1. del Capítulo II).

De estos resultados se deduce que para la obtención de NPs que puedan ser empleadas en biomedicina debe emplearse unas concentraciones de precursores muy restrictivas, en concreto, 0,02 M de Dy^{3+} y 0,1 M de VO_4^{3-} .

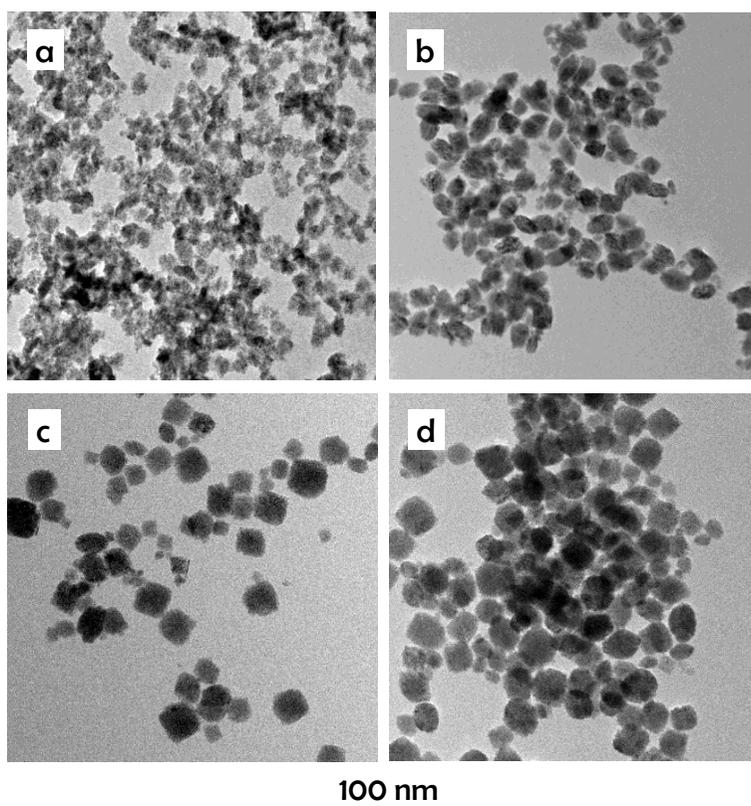


Figura 3. Micrografías TEM de las NPs obtenidas por calentamiento a 120 °C durante 20 h de disoluciones que contenían 0,02 M de $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,02 M de Na_3VO_4 (a), 0,02 M de $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,2 M de Na_3VO_4 (b), 0,01 M de $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,1 M de Na_3VO_4 (c) y 0,04 M de $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,1 M de Na_3VO_4 (d) en mezclas EG/ H_2O = 4/1, según se indica en la Tabla 1.

Por último, se estudió cómo afectaban la temperatura y el modo de calentamiento a las características morfológicas de las partículas utilizando las condiciones experimentales que dieron lugar a las NPs más pequeñas, homogéneas y dispersas (ilustradas en la Fig. 2a). Se observó que al disminuir la temperatura desde 120 a 80 °C, se mantuvo la forma aparentemente cúbica

de las NPs (Fig. 4a), aumentando tanto la longitud media de arista a 84 nm ($\sigma = 6$ nm) como el valor de Dh a 170 nm (PZ = -37 mV) y, por tanto, su grado de agregación. Al incrementar dicho parámetro a 150 °C, se obtuvieron NPs más pequeñas (51 nm, $\sigma = 14$ nm) pero más heterogéneas (Fig. 4b) y agregadas (Dh de 276 nm, PZ = -31 mV). Así pues, la temperatura de síntesis que permite obtener las NPs más adecuadas para aplicaciones biomédicas por su forma, tamaño y grado de dispersión es 120 °C.

En cuanto al efecto de la fuente de calentamiento, se observó que el empleo de un horno asistido por microondas (tiempo de calentamiento = 30 min) en lugar de una estufa convencional, resultó en NPs más alargadas (Fig. 4c) con tamaño 45 nm ($\sigma = 1$ nm) x 26 nm ($\sigma = 3$ nm) y un valor de Dh en suspensión acuosa de 209 nm (PZ = -32 mV) que revela la presencia de un cierto grado de agregación. Este resultado indica que la mayor velocidad de calentamiento asociada al empleo del horno microondas no mejora, en este caso, las características morfológicas de las NPs precipitadas.

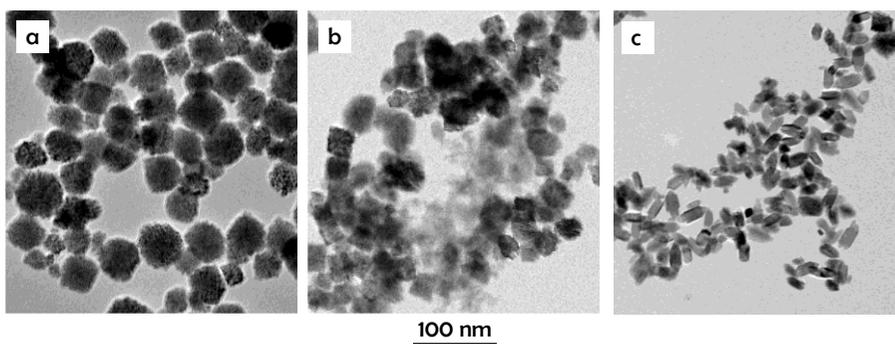


Figura 4. Micrografías TEM de las NPs obtenidas por calentamiento de disoluciones de 0,02 M $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ y 0,1 M Na_3VO_4 en mezclas EG/ H_2O = 4/1 en estufa convencional a $T = 80$ °C (a), estufa convencional a $T = 150$ °C (b) y horno asistido por microondas a 120 °C (c), según se indica en la Tabla 1.

Del análisis de los efectos de los parámetros de síntesis sobre las características de las partículas obtenidas se concluye que, por su uniformidad, tamaño y valor de Dh, las NPs más adecuadas para su empleo en bioimagen serían las que presentan una forma aparentemente cúbica (Fig. 2a), una longitud

media de arista de 67 nm y un valor de Dh de 81 nm, por lo que se eligió esta muestra (denominada en adelante DyV67) para estudios posteriores.

La estructura cristalina de dichas NPs se analizó mediante DRX. En la Fig. 5 se presenta el diagrama de difracción obtenido que consiste en un conjunto de reflexiones compatibles con el patrón correspondiente a la fase tetragonal de DyVO_4 (PDF: 01-076-2476). La ausencia otras reflexiones adicionales indicó que no estaban presentes otras fases cristalinas y, por tanto, un alto grado de pureza. Utilizando la fórmula de Scherrer aplicada a la reflexión $2\theta \approx 33^\circ$, se obtuvo un valor de tamaño de cristalito de 16 nm que es notablemente inferior al tamaño de las NPs (67 nm), indicando que dichas NPs presentaban un carácter policristalino. Ello sugiere que probablemente se formaron por un proceso de agregación ordenada de unidades más pequeñas cuyo mecanismo se discute en la Sección 2.1.1. del Capítulo II.

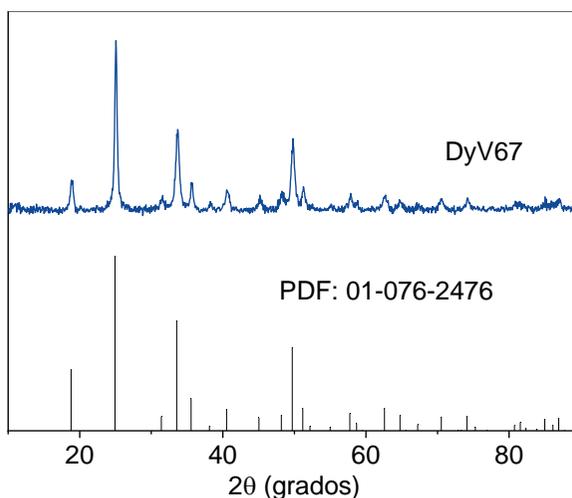


Figura 5. Diagrama de difracción de rayos X obtenido para la muestra DyV67, junto con el patrón de difracción correspondiente a la estructura tetragonal de DyVO_4 (PDF: 01-076-2476).

3.1.2. Nanopartículas de molibdato de sodio y disprosio

Para la síntesis de NPs uniformes de $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$, se adaptó un método desarrollado anteriormente para fabricar NPs esféricas de $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$ basado en reacciones de precipitación homogénea en medio poliol,² pero usando DyCl_3 como precursor de Dy^{3+} . Para ello, se prepararon dos

disoluciones en viales independientes con agitación magnética, una de ella contenía Na_2MoO_4 disuelto en una mezcla EG/ H_2O (1 mL H_2O + 1,5 mL EG) y otra, DyCl_3 disuelto en 2,5 mL de EG a $\approx 80^\circ\text{C}$. Una vez enfriada esta última a temperatura ambiente, se mezclaron ambas disoluciones. Las concentraciones de Dy^{3+} y MoO_4^{2-} en la disolución final fueron 0,02 M y 0,2 M, respectivamente. Una vez homogeneizada la mezcla, se envejeció durante 20 horas en una estufa convencional precalentada a 120°C . El precipitado obtenido consistió en NPs esféricas (Fig. 6a) con un tamaño medio de 23 nm ($\sigma = 4$ nm) (Tabla 2) y un valor de Dh de 52 nm (PZ = -31 mV) (Tabla 2) que indicó que estaban dispersas en medio acuoso.

Es importante indicar que, en este caso, la variación sistemática de la mayor parte de los parámetros experimentales (Tabla 2) no dio lugar a cambios apreciables en la forma (Fig. 6) de las NPs obtenidas, en comparación con las presentadas en la Fig. 6a, excepto al disminuir la proporción EG/ H_2O (de 4/1 a 2,5/2,5) que resultó en partículas irregulares (Fig. 6e). Tampoco se observaron cambios significativos en el tamaño de partícula ni mejoras en los valores de Dh. Por ello, se utilizaron para estudios posteriores las NPs de 23 nm (Fig. 6a) que constituyen la muestra, denominada a partir de aquí, DyMo23.

Tabla 2. Forma, tamaño medio, diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z (PZ) de las partículas obtenidas usando diferentes condiciones experimentales. Las condiciones que conducen a la muestra óptima se encuentran sombreadas.

Precursor de Dy ³⁺	[Dy ³⁺] (M)	[MoO ₄ ²⁻] (M)	EG/H ₂ O (vol.)	Fuente de calor	T (°C)	Forma	Tamaño (σ) (nm)	Dh (nm)	PZ (mV)	Fig.
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,2	4/1	Estufa	120	Esférica	23 (4)	52	-31	6a
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	4/1	Estufa	120	Esférica	27 (9)	143	-23	6b
Dy(NO ₃) ₃	0,01	0,2	4/1	Estufa	120	Esférica	23 (4)	93	-30	6c
Dy(NO ₃) ₃	0,04	0,2	4/1	Estufa	120	Esférica	19 (2)	85	-22	6d
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,2	2,5/2,5	Estufa	120	Irregular	-	-	-	6e
Dy(OAc) ₃	0,02	0,2	4/1	Estufa	120	Esférica	19 (8)	52	-36	6f
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,2	4/1	Estufa	180	Esférica	17 (3)	44	-32	6g
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,2	4/1	MW	120	Esférica	21 (2)	1069	-32	6h

σ: desviación estándar

MW: horno asistido por microondas durante 30 min

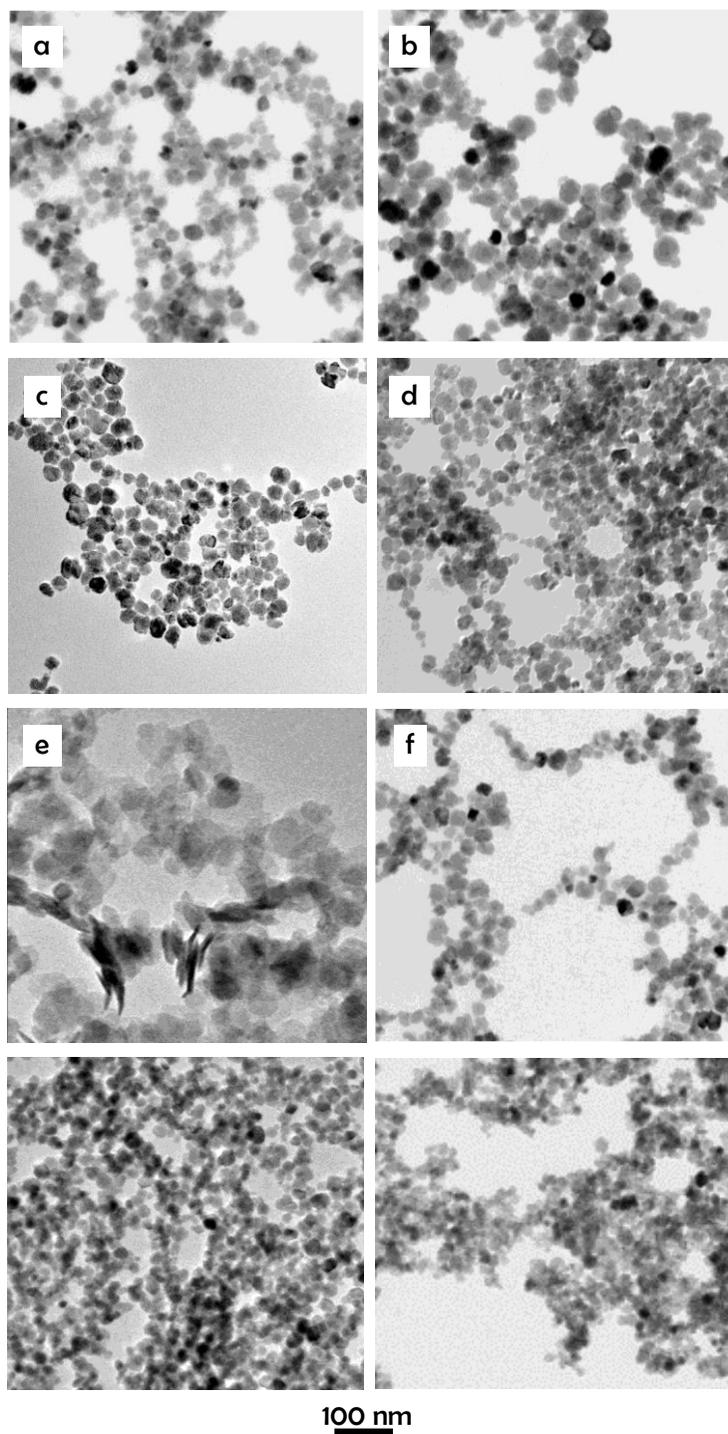


Figura 6. Micrografías TEM de las NPs obtenidas empleando las condiciones indicadas en la Tabla 2.

En la Fig. 7 se muestra el diagrama de DRX de dicha muestra. Aunque no se encontró en la base de datos cristalográfica ninguna referencia para la estructura del $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$, las reflexiones observadas son consistentes con la fase tetragonal del $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$ (PDF: 01-082-2369), por lo que puede admitirse que las NPs obtenidas presentan una estructura tetragonal. Por otra parte, haciendo uso de la fórmula de Scherrer aplicada a la reflexión $2\theta \approx 29^\circ$, se obtuvo un valor de tamaño de cristalito de 23 nm, el cual es próximo al tamaño de las NPs, y sugiere, por lo tanto, que las NPs presentaban un carácter monocristalino, lo cual sugiere un modelo de crecimiento por difusión (Sección 2.1.1. del Capítulo II).

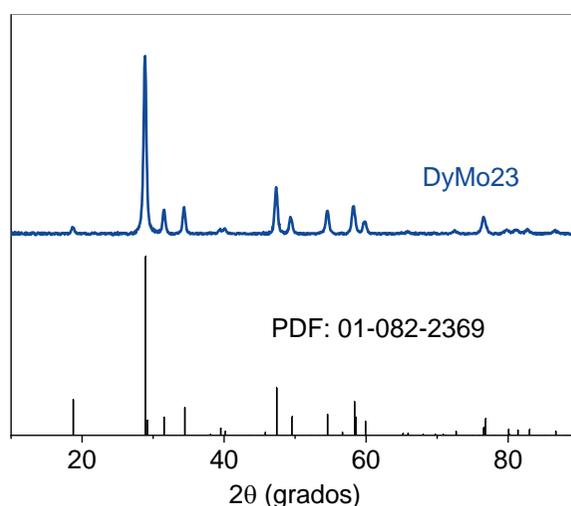


Figura 7. Diagrama de difracción de rayos X obtenido para la muestra DyMo23, junto con el patrón de difracción correspondiente a la estructura tetragonal de $\text{NaY}(\text{MoO}_4)_2$ (PDF: 01-076-2476).

3.1.3. Nanopartículas de wolframato de sodio y disprosio

Dada la similitud en composición y estructura del $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$ y el $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$, para la síntesis de NPs uniformes de este último se siguió un procedimiento experimental muy similar al descrito en la sección anterior para la muestra DyMo23 sustituyendo el precursor Na_2MoO_4 por Na_2WO_4 e introduciendo ligeras variaciones en las concentraciones de los reactivos que fueron 0,02 M y 0,1 M en Dy^{3+} y WO_4^{2-} , respectivamente. En estas condiciones se obtuvieron partículas con morfología poco definida, aunque próxima a la

esférica (Fig. 8a) y con una distribución estrecha de tamaños, siendo el tamaño medio de 14 nm y el valor de $\sigma = 3$ nm (Tabla 3). Estas NPs presentaban un valor de Dh en suspensión acuosa (308 nm) muy superior a su tamaño medio (Tabla 3) indicando un alto grado de agregación. Este comportamiento no puede atribuirse a razones electrostáticas dado que el valor de PZ para esta dispersión fue suficientemente elevado (-26 mV) (Tabla 3) para proporcionar estabilización electrostática. Con objeto de obtener NPs uniformes y libres de agregación, se realizaron experimentos adicionales en los que se analizó el efecto de la variación de los parámetros de síntesis (naturaleza y concentración de los precursores, proporción EG/H₂O, fuente de calentamiento y temperatura de reacción) sobre las características de las NPs precipitadas. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.

En primer lugar, se modificó la fuente de calentamiento empleando un horno asistido por microondas en lugar de una estufa convencional, y manteniendo constantes el resto de condiciones de síntesis. Ello dio lugar a partículas de morfología similar (Fig. 8b) de mayor tamaño medio (37 nm, $\sigma = 9$ nm). El valor de Dh obtenido para una suspensión acuosa de dichas partículas fue 80 nm (PZ = -32 mV), el cual es sólo ligeramente superior a su tamaño medio indicando la ausencia de procesos de agregación significativos. Por tanto, en este sistema, el uso del horno asistido por microondas permite mejorar el grado de dispersión de las NPs, por lo que se mantuvo este modo de calentamiento en experimentos posteriores. El aumento de la temperatura de reacción, de 120 °C a 220 °C manteniendo constantes las condiciones anteriormente seccionadas, dio lugar a NPs con forma aproximadamente esférica (Fig. 8c) y tamaño medio (40 nm, $\sigma = 9$ nm) similares a las sintetizadas a 120 °C (37 nm), pero con un valor de Dh menor (68 nm, PZ = -39 mV). Debido a esta mejora en la dispersabilidad, el análisis de los efectos de los demás parámetros experimentales se llevó a cabo manteniendo la temperatura del horno microondas a 220 °C.

Tabla 3. Forma, tamaño medio, diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z (PZ) de las partículas obtenidas usando diferentes condiciones experimentales. Las condiciones que conducen a la muestra óptima se encuentran sombreadas.

Precursor de Dy ³⁺	[Dy ³⁺] (M)	[WO ₄ ²⁻] (M)	EG/H ₂ O (vol.)	Fuente de calor	T (°C)	Forma	Tamaño (σ) (nm)	Dh (nm)	PZ (mV)	Fig.
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	4/1	Estufa	120	Cuasi esférica	14 (3)	308	-26	8a
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	4/1	MW	120	Cuasi esférica	37 (9)	80	-32	8b
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	4/1	MW	220	Cuasi esférica	40 (9)	68	-39	8c
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,1	3/2	MW	220	Heterogénea	-	-	-	8d
Dy(OAc) ₃	0,02	0,1	4/1	MW	220	Cuasi esférica	39 (8)	65	-39	8e
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,3	4/1	MW	220	Irregular	-	-	-	8f
Dy(NO ₃) ₃	0,01	0,1	4/1	MW	220	Cuasi esférica	66 (7)	81	-37	8g
Dy(NO ₃) ₃	0,04	0,1	4/1	MW	220	Cuasi esférica	22 (4)	49	-36	8h

σ: desviación estándar

MW: horno asistido por microondas durante 30 min

En dichas condiciones, la relación EG/H₂O en la mezcla disolvente es un parámetro crítico para la obtención de las NPs perseguidas, ya que la variación de esta magnitud de 4/1 a 3/2, dio lugar a NPs con forma heterogénea (Fig. 8d) probablemente debido a los cambios en la cinética de precipitación y en el comportamiento frente a la agregación originados por la variación de las propiedades (viscosidad y constante dieléctrica) de dicha mezcla. (Sección 2.1.1 del Capítulo II).

Sin embargo, un cambio en la naturaleza del precursor de disprosio no tuvo un efecto importante, ya que al emplear Dy(OAc)₃ en lugar de Dy(NO₃)₃, no se observaron cambios significativos en la forma (Fig. 8e), ni en el tamaño medio (39 nm, $\sigma = 8$ nm) ni en el valor de Dh (65 nm, PZ = -39 mV) de las partículas precipitadas.

En cuanto al efecto de las concentraciones de reactivos, se observó que el aumento de la concentración de Na₂WO₄ de 0,1 a 0,3 M resultó en NPs irregulares (Fig. 8f). Por otra parte, una disminución la concentración de Dy(NO₃)₃ de 0,02 a 0,01 M condujo a un aumento del tamaño de las NPs (Fig. 8g) de 40 a 66 nm ($\sigma = 7$ nm), y del valor de Dh de 68 a 81 nm (PZ = -37 mV), mientras que un aumento de dicha magnitud de 0,02 a 0,04 M, dio lugar a una disminución del tamaño de las NPs (Fig. 8h) de 40 a 22 nm ($\sigma = 4$ nm) y del valor de Dh de 68 a 49 nm (PZ = -36 mV). Por tanto, a través de la variación de la concentración del precursor de Dy³⁺, es posible modular el tamaño y el valor de Dh de las NPs en un rango adecuado para que estas puedan ser empleadas en el campo de la biomedicina. Por ello, en este caso, se decidió considerar NPs con diferentes tamaños (22 y 66 nm) para evaluar el efecto de este parámetro sobre sus propiedades y, por tanto, sobre su aplicabilidad como AC. Estas muestras se denominarán a partir de aquí DyW22 y DyW66, respectivamente.

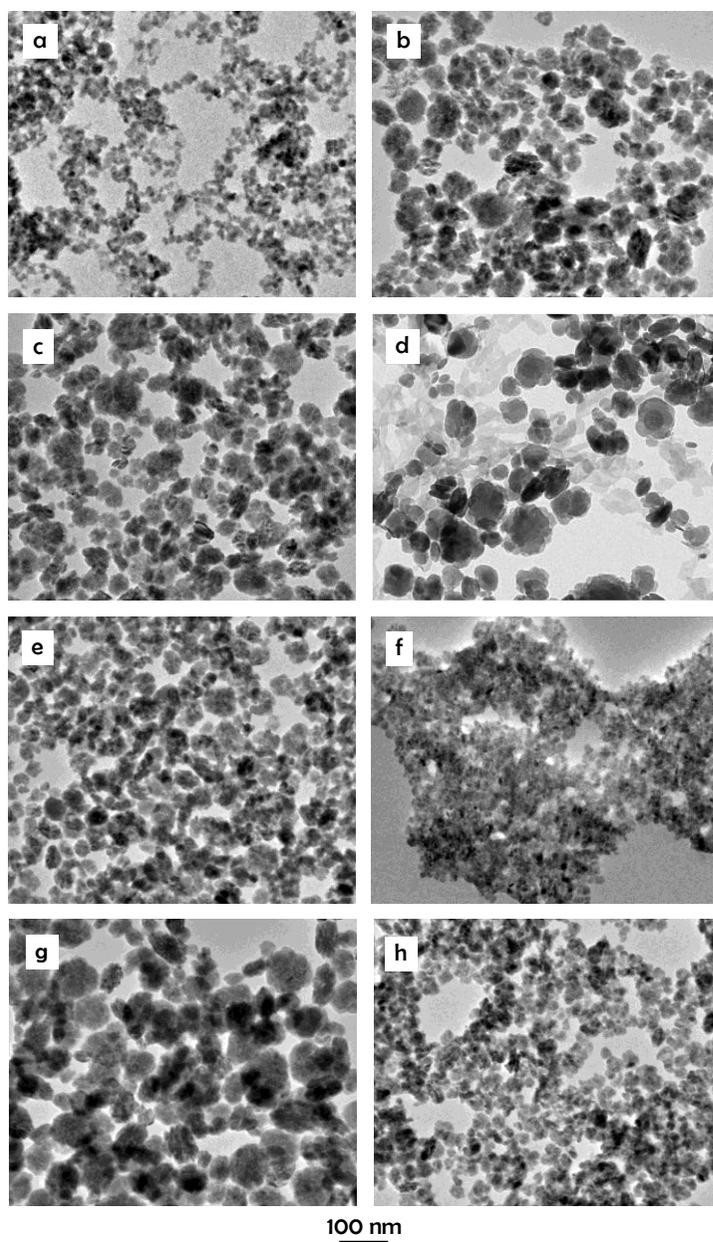


Figura 8. Micrografías TEM de las NPs obtenidas empleando las condiciones indicadas en la Tabla 3.

Dichas muestras fueron analizadas mediante DRX para identificar su estructura cristalina. Las reflexiones observadas eran compatibles con la fase $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$ tetragonal (PDF: 96-222-4801) (Fig. 9). Por otra parte, mediante la fórmula de Scherrer aplicada a la reflexión con $2\theta \approx 29^\circ$, se obtuvieron unos

tamaños de cristalito de 14 y 47 nm para las muestras DyW22 y DyW66, respectivamente. Estos valores no son muy diferentes del tamaño medio de partícula de cada una de estas muestras (22 y 66 nm, respectivamente), lo cual sugiere que las NPs son monocristalinas, lo que sugiere que se formaron a través de un proceso de crecimiento difusivo (Sección 2.1.1. del Capítulo II).

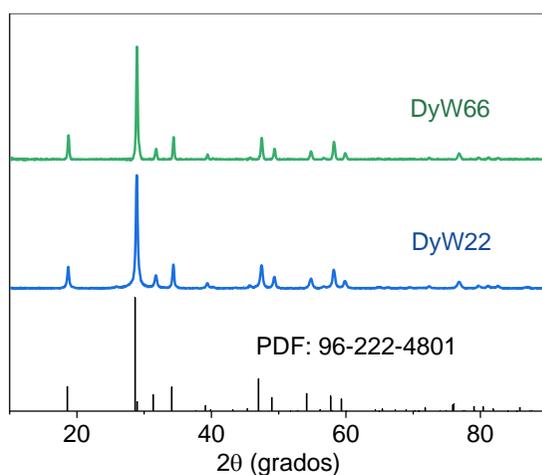


Figura 9. Diagramas de difracción de rayos X obtenidos para las muestras DyW66 y DyW22, junto con el patrón de difracción correspondiente a la estructura tetragonal del $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$ (PDF:96-222-4801).

3.1.4. Nanopartículas de fosfato de disprosio

Para la síntesis de NPs uniformes de fosfato de disprosio, se seleccionó como punto de partida un método de precipitación homogénea en medio poliol desarrollado previamente para sintetizar NPs de fosfato de holmio.³ Sin embargo, debido a la insolubilidad del precursor de ion lantánido ($\text{Dy}(\text{OAc})_3$) en el disolvente implicado (butilenglicol), fue necesario cambiar tanto el disolvente como el precursor de disprosio empleados. En concreto, la síntesis se llevó a cabo preparando una disolución 0,01 M de $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ en un volumen total de 30 mL de butanol en agitación magnética a 50 °C durante 1 hora para facilitar la disolución. Una vez disuelta y enfriada, la disolución se mezcló con la cantidad deseada de H_3PO_4 concentrado para obtener una disolución final con una concentración de 0,15 M. La mezcla se envejeció a 150 °C durante 1 h

en tubos herméticamente cerrados, utilizando un horno microondas como fuente de calentamiento.

El precipitado obtenido consistió de NPs con forma aparentemente cúbica (Fig. 10a), una longitud media de arista de 22 nm ($\sigma = 3$ nm) y un valor de 1033 nm (Tabla 4), que indicaba un alto grado de agregación. Dado que en el valor del PZ (-14 mV) al pH nativo de estas suspensiones (pH \approx 3) fue inferior al requerido para proporcionar estabilización electrostática frente a la agregación ($> \pm 15$ mV, Sección 2.4.2. del Capítulo II), se procedió a aumentar el pH de las suspensiones con objeto de aumentar el valor absoluto del PZ y así obtener más información sobre el origen de la agregación detectada. Se observó que a pH \approx 10, el valor de PZ fue de -41 mV, lo cual conlleva a un aumento importante de las fuerzas repulsivas entre partículas como se infiere de la importante disminución del valor de Dh (190 nm). No obstante, este valor de Dh sigue siendo superior al tamaño medio de las NPs por lo que, a pesar de la estabilización electrostática conseguida, esta fue insuficiente para obtener partículas dispersas. Por ello, se procedió a modificar los parámetros experimentales (Tabla 4) con el objetivo de obtener NPs con un alto grado de dispersión.

En primer lugar, se observó que, aumentando la concentración de Dy(NO₃)₃ de 0,01 M a 0,02 M, se obtenían partículas también aparentemente cúbicas (Fig. 10b) con una longitud media de arista de 70 nm ($\sigma = 8$ nm) y un valor de Dh de 142 nm (tanto a pH \approx 3 como a pH \approx 10, condiciones en las que el valor de PZ fue de -18 y -44 mV, respectivamente). Este valor de Dh indica una mejora en el grado de dispersión, por lo que el efecto de los demás parámetros se evaluó para una concentración 0,02 M de Dy³⁺.

Tabla 4. Forma, tamaño medio, diámetro hidrodinámico (Dh) y potencial Z (PZ) de las partículas obtenidas usando diferentes condiciones experimentales. Las condiciones que conducen a la muestra óptima se encuentran sombreadas.

Precursor de Dy ³⁺	[Dy ³⁺] (M)	[H ₃ PO ₄] (M)	Fuente de calor	T (°C)	Forma	Tamaño (σ) (nm)	Dh (nm) pH≈3	PZ (mV) pH≈3	Dh (nm) pH≈10	PZ (mV) pH≈10	Fig.
Dy(NO ₃) ₃	0,01	0,15	MW	180	≈ Cúbica	22 (3)	1033	-14	190	-41	10a
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,15	MW	180	≈ Cúbica	70 (8)	142	-18	142	-44	10b
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,15	MW	150	≈ Cúbica	37 (3)	164	-22	106	-42	10c
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,15	Estufa	150	≈ Cúbica	60 (5)	1106	0	342	-44	10d
Dy(OAc) ₃	0,02	0,15	MW	150	Irregular	-	1096	-15	888	-27	10e
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,075	MW	150	≈ Cúbica	23 (3)	2904	-5	190	-44	10f
Dy(NO ₃) ₃	0,02	0,3	MW	150	≈ Cúbica	57 (7)	164	-19	142	-40	10g

σ: desviación estándar

MW: horno asistido por microondas durante 30 min

A continuación, se disminuyó la temperatura de síntesis desde 180 a 150 °C, resultando NPs con forma similar (Fig. 10c) y menor longitud media de arista (37 nm, $\sigma = 3$ nm). El valor de Dh medido para estas NPs era también menor (106 nm) a $\text{pH} \approx 10$ ($\text{PZ} = -42$ nm), por lo que, para estudios posteriores, se empleó una temperatura de envejecimiento de 150 °C.

En las condiciones anteriores, se observó que, al emplear una estufa convencional en lugar de un horno asistido por microondas, no se produjeron diferencias significativas de la forma de las NPs (Fig. 10d) pero sí aumentó su tamaño medio (60 nm, $\sigma = 5$ nm) y, sobre todo, su grado de agregación como puso de manifiesto el alto valor de Dh (342 nm) obtenido en suspensión acuosa ($\text{pH} \approx 10$; $\text{PZ} = -44$ mV). Por tanto, el empleo de un horno microondas como fuente de calentamiento es esencial en este sistema para la obtención de NPs adecuadas para las aplicaciones perseguidas.

La naturaleza del precursor de Dy^{3+} también resultó ser un parámetro crítico pues utilizando $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ en lugar de $\text{Dy}(\text{NO}_3)_3$ se obtuvieron partículas muy irregulares (Fig. 10e).

Por último, se evaluó el efecto de la concentración de H_3PO_4 . Usando las condiciones que dieron lugar a las NPs de tamaño medio (37 nm), se observó que, al disminuir la concentración de H_3PO_4 de 0,15 a 0,075 M, se produjo una disminución de la longitud media de arista de las NPs (Fig. 10f) desde 37 a 23 nm ($\sigma = 3$ nm). El valor de Dh para estas NPs fue claramente superior (190 nm) a su tamaño medio incluso a $\text{pH} \approx 10$, condiciones en que el PZ fue muy elevado (-44 mV), manifestando que estaban agregadas de forma irreversible. Por el contrario, el empleo de una concentración de H_3PO_4 mayor (0,3 M) dio lugar a un aumento del tamaño medio (57 nm, $\sigma = 7$ nm) manteniéndose una forma de partícula similar (Fig. 10g). En este caso, el valor de Dh disminuyó (142 nm) ($\text{PZ} = -40$ mV, a $\text{pH} \approx 10$) indicando una mejora del grado de dispersión. Así pues, la modificación de la concentración de H_3PO_4 permitió modular el tamaño medio de las NPs con forma aparentemente cúbica obtenidas entre 37 y 57 nm manteniendo un grado de dispersión razonable.

Estas muestras, denominadas en adelante DyP37 y DyP57, respectivamente, fueron seleccionadas para estudios posteriores, con objeto de evaluar el efecto del tamaño de partícula sobre sus propiedades y potenciales aplicaciones en bioimagen.

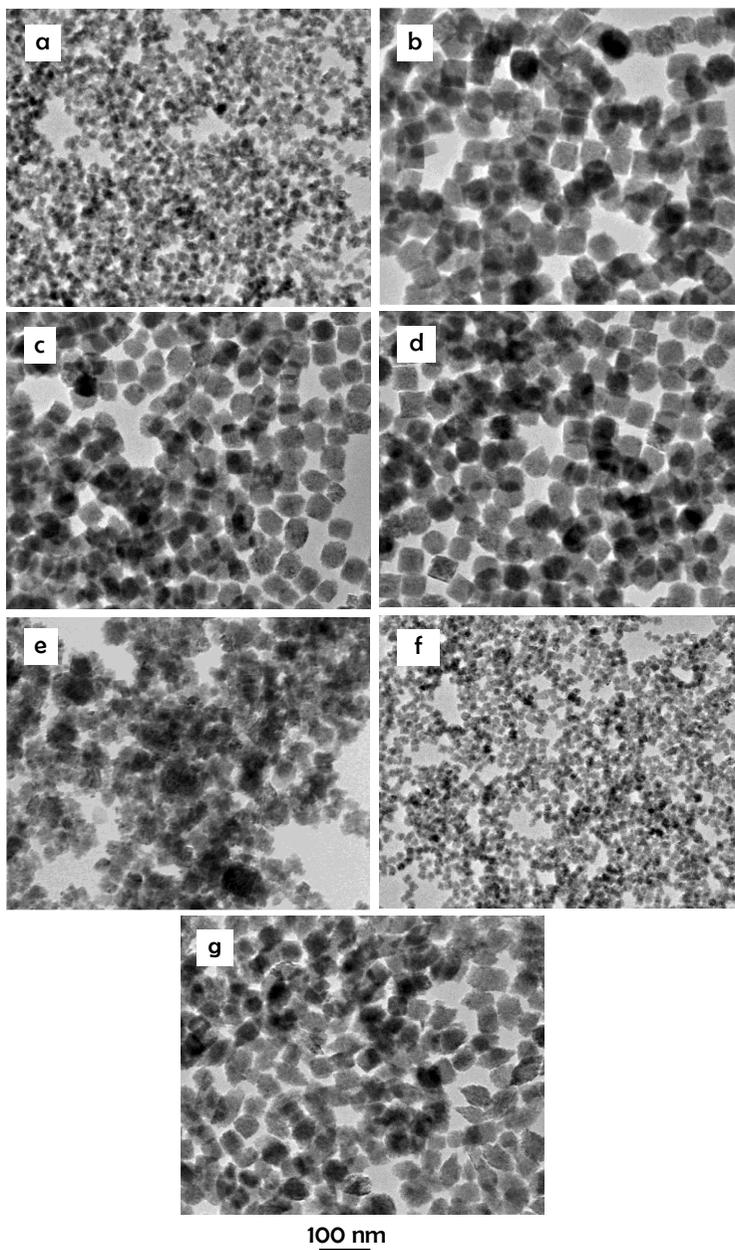


Figura 10. Micrografías TEM de las NPs obtenidas empleando las condiciones indicadas en la Tabla 4.

El análisis de estas muestras (DyP37 y DyP57) mediante DRX puso de manifiesto que ambas presentaban un conjunto similar de reflexiones (Fig. 11), todas ellas compatibles con la estructura tetragonal del DyPO_4 (PDF: 00-026-0593). Haciendo uso de la fórmula de Scherrer aplicada a la reflexión con $2\theta \approx 29^\circ$, se obtuvieron valores de tamaño de cristalito de 34 nm y 52 nm para las muestras DyP37 y DyP57, respectivamente. En ambos casos, estos valores son muy próximos al tamaño de las NPs, lo cual sugiere que las NPs presentaban un carácter monocristalino que sugiere su formación a través de un proceso de crecimiento difusivo (Sección 2.1.1. del Capítulo II).

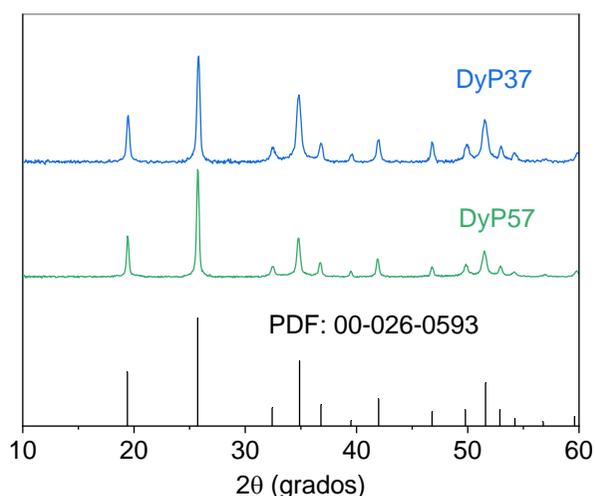


Figura 11. Diagramas de difracción de rayos X obtenidos para DyP37 y DyP57, junto con el patrón de difracción correspondiente a la estructura tetragonal del DyPO_4 (PDF: 00-026-0593).

3.2. Dispersabilidad en condiciones fisiológicas y funcionalización

3.2.1. Dispersabilidad de las nanopartículas prístinas

La dispersabilidad de las NPs seleccionadas para cada sistema y suspendidas en PBS (pH = 7,4) fue evaluada a partir de medidas de los valores de D_h mediante DLS, obteniéndose en todos los casos valores de dicha

magnitud superiores a 700 nm (Figura), lo cual indica que todas ellas presentan un alto grado de agregación en medio fisiológico.

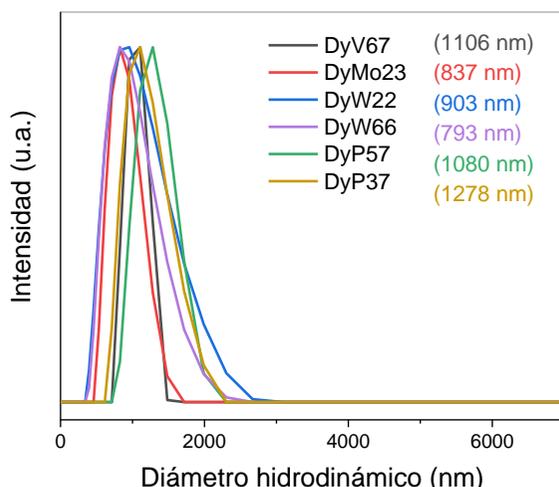


Figura 12. Curvas DLS y diámetro hidrodinámico (Dh) correspondientes a suspensiones en PBS a pH = 7,4 de NPs de distinta composición.

Por tanto, ninguno de estos sistemas cumple el requisito de dispersabilidad necesario para su aplicación en técnicas de bioimagen. Por ello, se procedió a su funcionalización con PAA, para lo cual se seleccionó en primer lugar un procedimiento en una sola etapa (*one-pot*) por su simplicidad y rapidez. En los casos en que este procedimiento no tuvo éxito, se desarrolló un procedimiento más complejo en dos etapas (*two steps*).

3.2.2. Funcionalización de las nanopartículas con ácido poliacrílico

3.2.2.1. Funcionalización *one-pot*

Este método de funcionalización se llevó a cabo de forma simultánea al proceso de síntesis de las partículas. Específicamente, se emplearon las mismas condiciones experimentales implicadas en la síntesis de las NPs que constituían las diferentes muestras seleccionadas para cada sistema (DyV67, DyMo23, DyW22, DyW66, DyP37 y DyP57) descritas en la sección anterior, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA a la disolución del precursor de Dy^{3+} , ya que se ha reportado anteriormente que esta cantidad es suficiente para dotar de dispersabilidad a NPs de naturaleza similar.^{1,4}

Nanopartículas de DyVO₄. Las NPs obtenidas para este sistema en presencia de PAA presentaban una forma más esférica (Fig. 13a) que las obtenidas en ausencia de PAA (Fig. 2b) y un tamaño similar (66 nm, $\sigma = 10$) (Fig 13b).

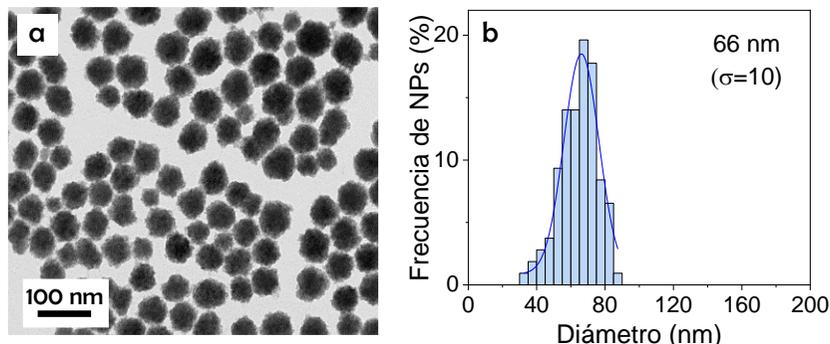


Figura 13. Micrografía TEM (a) y distribución del tamaño de partícula (b) de las NPs sintetizadas según las condiciones de la muestra DyV67, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA.

El valor de Dh obtenido para dichas NPs en medio acuoso sólo fue ligeramente superior 106 nm (Fig. 14) a su tamaño medio indicando que la ausencia de una agregación significativa. También se observó que el valor de PZ medido después del proceso de funcionalización era superior (-61 mV a $\text{pH} \approx 6$) respecto a las NPs no funcionalizadas ($\text{PZ} = -37 \text{ mV}$, Tabla 1). Este cambio del valor del PZ sugiere la presencia en la superficie de las NPs de moléculas de PAA, cuya ionización daría lugar a un aumento de la carga negativa.

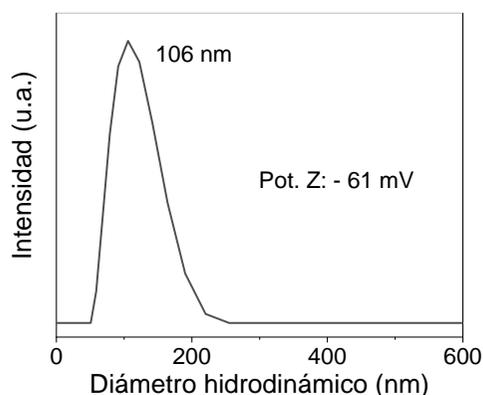


Figura 14. Curva DLS, diámetro hidrodinámico y potencial Z correspondientes a una suspensión acuosa de las NPs sintetizadas según las condiciones de la muestra DyV67, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA.

Ello fue confirmado mediante espectroscopía FTIR. Así en el espectro de la muestra obtenida en presencia de PAA se detectaron bandas de absorción entre 1400 y 1550 cm^{-1} , que no se observan en el espectro de las partículas obtenidas en ausencia de este polímero (Fig. 15a) y que pueden atribuirse a los modos vibracionales de tensión simétrico y asimétrico característicos de los aniones carboxilato del PAA, respectivamente.⁵

Mediante un análisis TG fue posible cuantificar la cantidad de PAA incorporado a las NPs. Como se observa en la Fig.15b, la curva TG de la muestra obtenida en ausencia de PAA, sólo mostró una pérdida de peso, que tuvo lugar principalmente en el rango de temperaturas 25 - 300 °C , la cual se debe a la liberación del agua adsorbida. Sin embargo, en el caso de la muestra obtenida en presencia de PAA, además de detectarse la liberación de agua, se observó, una pérdida de peso (9 %) en el intervalo de 300 - 800 °C , que puede atribuirse a la descomposición de las especies de PAA.

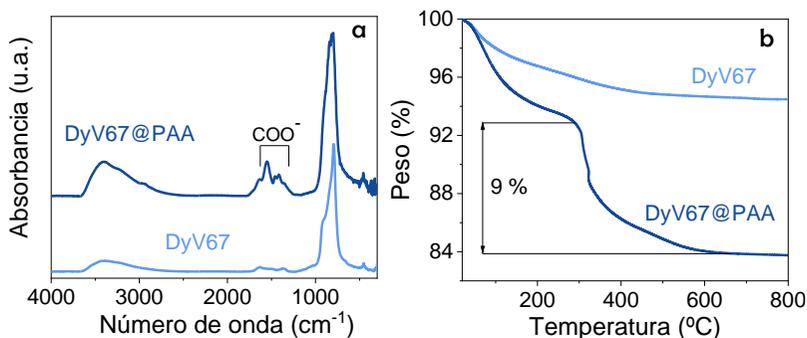


Figura 15. Espectros FTIR (a) y curvas TG (b) para las muestras DyV67 y DyV67@PAA.

Una vez funcionalizada dicha muestra (denominada en adelante DyV67@PAA), se procedió a evaluar el efecto del proceso de funcionalización sobre la dispersabilidad de las NPs en medio PBS ($\text{pH} = 7,4$). En estas condiciones, el valor de D_h obtenido mediante DLS (Fig. 16) es muy inferior (94 nm) al correspondiente a las NPs sin funcionalizar (1106 nm, Fig. 12) y similar al tamaño medio de las NPs (67 nm). Ello pone de manifiesto que mediante funcionalización de las NPs con PAA, estas pueden ser bien dispersadas a pH fisiológico.

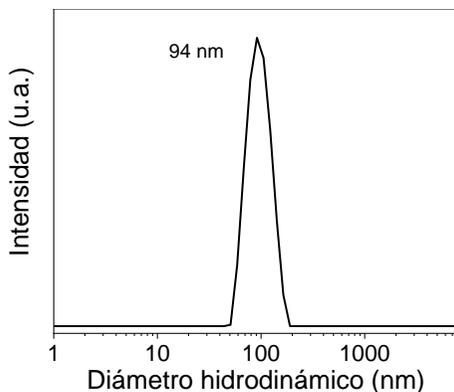


Figura 16. Curva DLS y diámetro hidrodinámico para una suspensión de la muestra DyV67@PAA en PBS.

Finalmente, el diagrama DRX obtenido para la muestra funcionalizada era similar al correspondiente a la muestra sin funcionalizar (Fig. 5), y, por tanto, también consistente con la estructura tetragonal del DyVO_4 .

Nanopartículas de $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$. El proceso de funcionalización *one-pot* con PAA aplicado a las NPs que constituyen la muestra DyMo23 no tuvo éxito, ya que no se observó precipitación apreciable tras el proceso de síntesis. Aunque la causa de tal inhibición de la precipitación no ha sido establecida, podría estar relacionada con la disminución del pH producida por la adición del ácido poliacrílico que daría lugar a una protonación de los aniones MoO_4^{2-} disminuyendo así la cantidad de dichos iones disponibles y, por tanto, ralentizando la precipitación.

Nanopartículas de $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$. Al emplear las condiciones de síntesis que dieron lugar a las NPs que constituían la muestra DyW66, pero añadiendo PAA a la disolución inicial, no se detectó una precipitación apreciable, lo cual podría atribuirse a la ralentización de la precipitación mencionada anteriormente para el sistema $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$.

No obstante, en el caso de las NPs DyW22, sí se observó precipitación indicando que dicha ralentización fue menos efectiva, probablemente debido a la mayor concentración de iones Dy^{3+} implicada en el proceso de síntesis. Las NPs obtenidas presentaban una forma poco definida (Fig. 17a) y un tamaño

medio de 17 nm con una desviación estándar ($\sigma = 4$ nm) pequeña (Fig. 17b) que indica una distribución de tamaños estrecha. Estas características morfológicas son ligeramente distintas a las de las NPs obtenidas sin usar PAA como aditivo, lo cual parece confirmar la influencia de las moléculas de polímero en la cinética de precipitación y su intervención en los procesos de nucleación y/o crecimiento de las NPs.

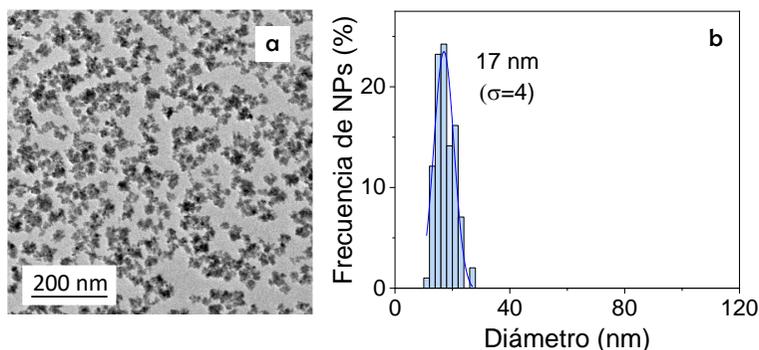


Figura 17. Micrografía TEM, b) distribución del tamaño de partícula obtenido a partir de micrográficas TEM de las NPs sintetizadas según las condiciones de la muestra DyW22, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA.

El valor de D_h obtenido (60 nm) mediante DLS (Fig. 18) para una suspensión acuosa ($\text{pH} \approx 6$) de estas NPs ($\text{PZ} = -31 \text{ mV}$) indica que se encontraban razonablemente dispersas.

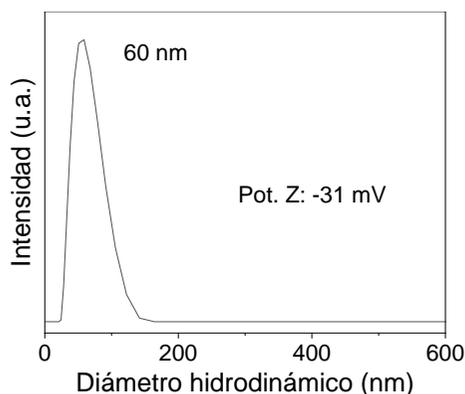


Figura 18. Curva DLS y diámetro hidrodinámico para una suspensión de la muestra DyW22, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA.

Como se muestra en la Fig. 19a, el espectro FTIR de las NPs sintetizadas en presencia de PAA, presenta las bandas características de los grupos carboxilato del PAA, ya descritas anteriormente para el caso de la

muestra DyV67, las cuales no estaban presentes en el espectro de la muestra sin funcionalizar indicando el éxito del proceso de funcionalización.

La comparación de las curvas TG obtenidas para las NPs sin funcionalizar y funcionalizadas (Fig. 19b) permiten cuantificar la cantidad de PAA incorporada en el segundo caso. Así, la curva de la muestra obtenida en ausencia de PAA (DyW22), sólo mostró una pérdida de peso en el intervalo 25-300 °C como consecuencia de la liberación de agua adsorbida. Sin embargo, en el caso de la muestra funcionalizada con PAA (muestra denominada a partir de aquí DyW22@PAA), se detectó junto con la liberación de agua, una pérdida de peso adicional (4 %) en el intervalo de 300-800 °C, que puede atribuirse a la descomposición de las especies de PAA.

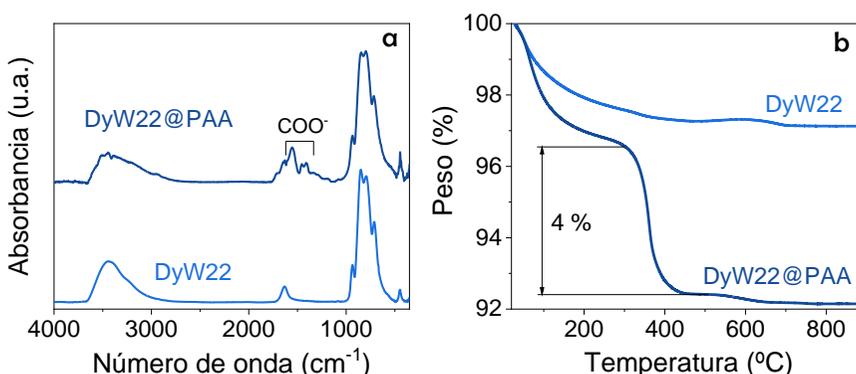


Figura 19. Espectros FTIR (a) y curvas TG (b) para las muestras DyW22 y DyW22@PAA.

Para comprobar el efecto de la funcionalización de las NPs de $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$ sobre su dispersabilidad en PBS, se registró la curva DLS de una suspensión de las NPs funcionalizadas en dicho medio (Fig. 20). El valor de Dh obtenido (81 nm) es muy inferior al correspondiente a las NPs sin funcionalizar (903 nm, Fig. 12), lo cual pone de manifiesto el papel esencial de las moléculas de PAA sobre la dispersabilidad de las mismas en PBS.

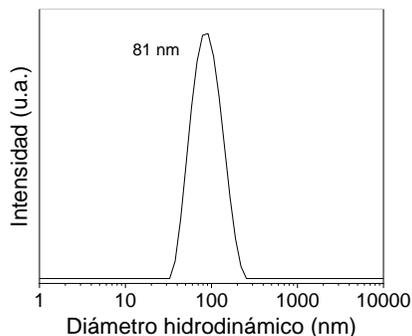


Figura 20. Curva DLS y diámetro hidrodinámico para una suspensión de la muestra DyW22@PAA en PBS.

Finalmente, hay que mencionar que la muestra funcionalizada presentaba un diagrama DRX similar al de la muestra sin funcionalizar (Fig. 9) consistente con la fase tetragonal del $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$.

Nanopartículas de DyPO_4 . Empleando las condiciones de síntesis que dieron lugar a las NPs que constituían la muestra DyP37 pero añadiendo PAA a la disolución inicial, se obtuvieron NPs uniformes (Fig.21a).

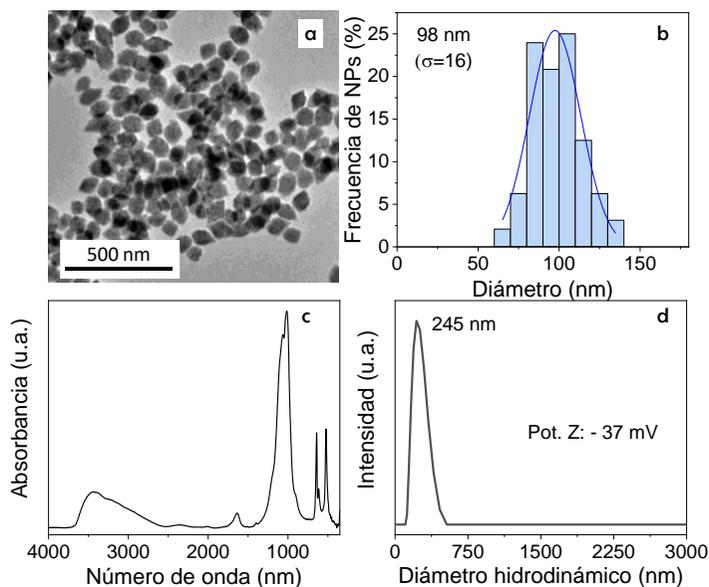


Figura 21. Micrografía TEM (a) y distribución del tamaño de partícula (b) de las NPs sintetizadas según las condiciones de la muestra DyP37, pero añadiendo $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA. Curva DLS y diámetro hidrodinámico para una suspensión de dichas NPs a $\text{pH} \approx 6$ (c). Espectro FTIR (d) de la muestra presentada en (a).

Estas NPs presentaron un tamaño medio de 98 nm (Fig. 21b) que es superior al de las NPs sin funcionalizar y un valor de Dh en suspensión acuosa ($pH \approx 10$) de 245 nm ($PZ = -37$ mV) (Fig.21c), el cual indica que el proceso de funcionalización induce la agregación de las mismas. Hay que señalar que mediante FTIR (Fig. 21d) se observó que la muestra no presentaba las bandas características de los grupos carboxilatos del PAA. El comportamiento de la muestra DyP57 fue similar. Estos resultados ponen de manifiesto que este método de funcionalización no es adecuado para este sistema.

3.2.2.2. Funcionalización two steps.

Para los sistemas basados en $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$ (muestra DyMo23) y DyPO_4 (muestras DyP37 y DyP57), para los cuales no funcionó el procedimiento de funcionalización *one-pot* se utilizó un método de funcionalización consistente en recubrir las NPs previamente sintetizadas con moléculas de PAA.

Nanopartículas de DyPO_4 . El procedimiento experimental seguido para la deposición de moléculas de PAA sobre la superficie de las NPs correspondientes a las muestras DyP37 y DyP57, mediante interacciones iónicas, se detalla en la Sección 2.2. del Capítulo II. En ambos casos, este tratamiento de funcionalización fue efectivo como puede observarse en las Figs. 22c y d, en las que se presentan los espectros FTIR de las NPs antes y después del recubrimiento con PAA. Así, para ambas muestras, los espectros de las NPs registrados después de la funcionalización mostraban bandas de baja intensidad entre 1400 y 1500 cm^{-1} que pueden asignarse a las vibraciones de los grupos carboxilato de las moléculas de PAA,⁶ demostrando el éxito del proceso de funcionalización. Mediante análisis termogravimétrico se cuantificó la cantidad de PAA adsorbida. Así, las curvas TG obtenidas para las muestras DyP37 y DyP57 antes de la funcionalización con PAA (Figs.22e y f, respectivamente) únicamente mostraron una primera pérdida de peso (6 %), correspondiente a la eliminación del agua adsorbida entre 100 y 300 °C y una segunda, progresiva (1 %), entre 300 y 600 °C que podría asignarse a la

descomposición de las moléculas de disolvente (butanol) residuales. Sin embargo, después de la funcionalización, se observó para ambas muestras (denominadas en adelante DyP37@PAA y DyP57@PAA, respectivamente.) una pérdida de peso más pronunciada ($\approx 3\%$) en el rango 300-600 °C que puede asociarse a la descomposición de las moléculas de PAA.

El proceso de funcionalización no afectó a las características morfológicas de las NPs (Figs. 22a y b), ni a la dispersabilidad de las mismas en suspensión acuosa (a $\text{pH} \approx 7$). Así, las muestras DyP37@PAA y DyP57@PAA presentaron valores de D_h de 85 y 105 nm (Figs. 22g y h), respectivamente, que son similares a los obtenidos en dichas condiciones para las muestras sin funcionalizar (106 y 142 nm) y que no son muy superiores a los tamaños de las NPs (37 y 57 nm), indicando la ausencia de agregación en estas condiciones. Este comportamiento estaría de acuerdo con los valores similares de potencial zeta medidos para las muestras antes (-42 y -40 mV, muestras DyP37 y DyP57, respectivamente) y después de la funcionalización (-45 y -52 mV, muestras DyP37@PAA y DyP57@PAA, respectivamente).

El recubrimiento con PAA tuvo un efecto importante sobre la dispersabilidad de las NPs suspendidas en PBS, como se observa en las Figs. 22g y h en las que se presentan las curvas DLS obtenidas para las muestras funcionalizadas. Los valores de D_h medios obtenidos a partir de estas medidas (100 y 109 nm, para las muestras DyP37@PAA y DyP57@PAA, respectivamente) eran muy inferiores a los de las muestras sin funcionalizar (>1000 nm, Fig. 12), por lo que puede concluirse que el proceso de funcionalización mejoró notablemente la dispersabilidad de las NPs de DyPO_4 en PBS.

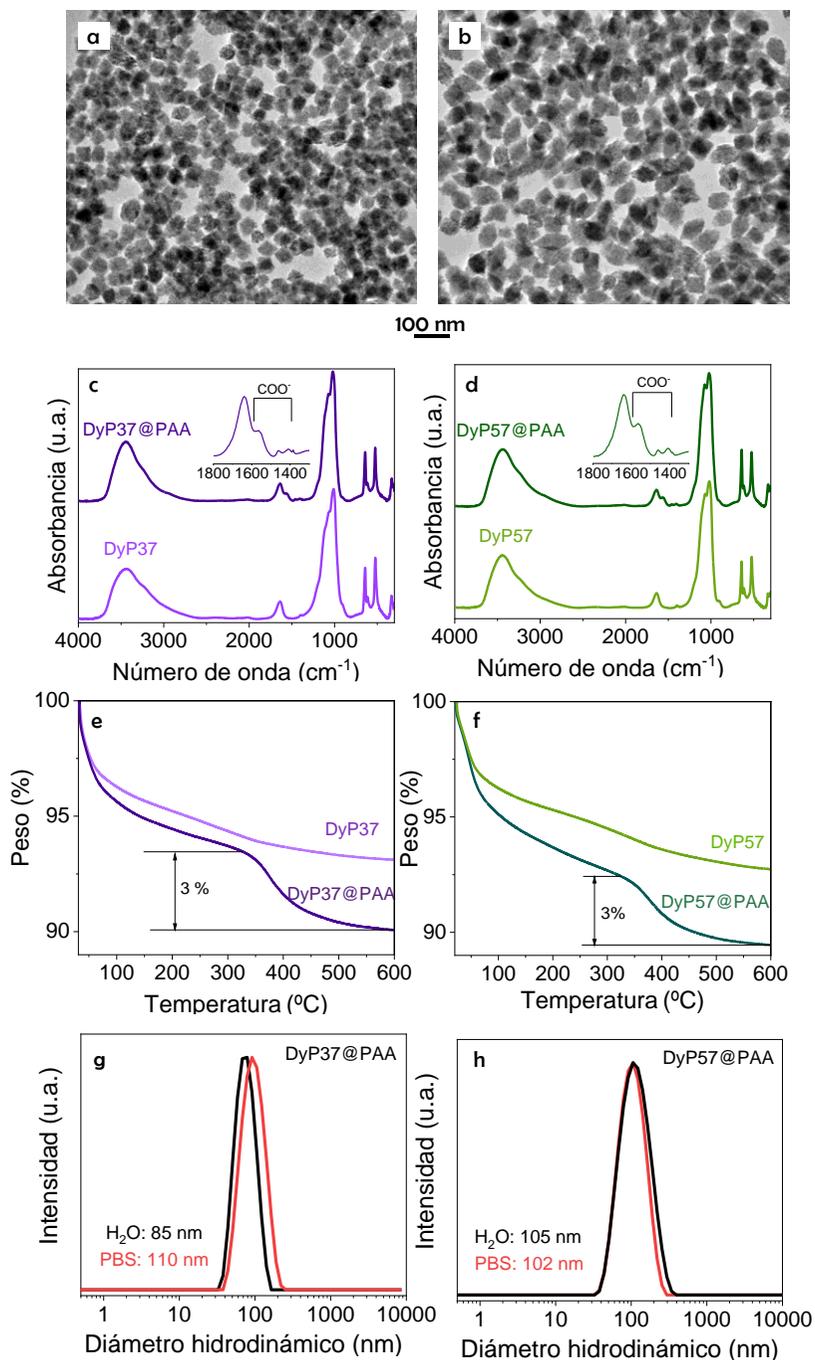


Figura 22. Micrografía TEM de las NPs que constituyen la muestra DyP37 (a) y DyP57 (b), espectros FTIR tanto de las muestras prístinas como funcionalizadas de las muestras DyP37 (c) y DyP57 (d), curvas TG tanto de las muestras prístinas como funcionalizadas de las muestras DyP37 (e) y DyP57 (f), y curvas DLS para suspensiones de la muestra DyP37@PAA en agua y en PBS (g) y para suspensiones de la muestra DyP57@PAA en agua y en PBS (h).

Nanopartículas de $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$. En primer lugar, se procedió a depositar el PAA sobre la superficie de las NPs de $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$ (muestra DyMo23) mediante interacciones iónicas siguiendo el procedimiento experimental detallado en la Sección 2.2.1. del Capítulo II, el cual no produjo cambios, como era de esperar, en las características morfológicas de las NPs (Fig. 23a).

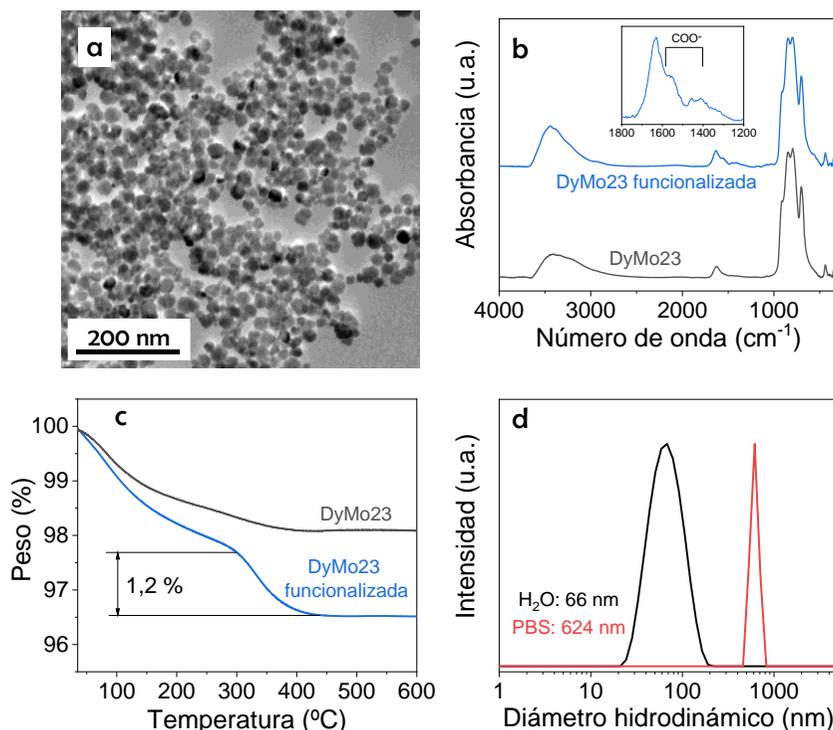


Figura 23. Micrografía TEM de las NPs que constituyen la muestra DyMo23 funcionalizada en una segunda etapa con $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de PAA (a), espectros FTIR (b) y curvas TG (c) de dicha muestra en comparación con la muestra prístina (DyMo23) y curvas DLS para suspensiones en agua y en PBS de la muestra DyMo23 funcionalizada (d).

El espectro FTIR obtenido para dichas NPs (Fig. 23b) mostró bandas de absorción entre 1400 y 1500 cm^{-1} de intensidad débil que no están presentes en el espectro obtenido previamente al proceso de funcionalización y que corresponden a los grupos carboxilato del PAA.⁵ La curva TG de la muestra prístina (Fig. 23c), sólo mostró una pérdida de peso en el rango de temperaturas 25 - $300 \text{ }^\circ\text{C}$ como consecuencia de la liberación del agua adsorbida. Sin embargo, en el caso de la muestra funcionalizada, se detectó la liberación de

agua junto con una pérdida de peso adicional de un 1,2 % en el intervalo de 300-600 °C (Fig. 23c), que puede atribuirse a la descomposición de las especies orgánicas. Como puede observarse en la Fig. 23d, el valor de D_h obtenido en PBS (624 nm), es significativamente superior al obtenido en agua (66 nm) a pH similar, lo que indica que esta cantidad de PAA era insuficiente para dotar a las NPs de dispersabilidad en medio fisiológico.

Por este motivo, se procedió a emplear una estrategia de funcionalización en una segunda etapa a través de interacciones electrostáticas, conocida en inglés como *layer-by-layer*. Para ello, las NPs fueron recubiertas con dos capas de polielectrolito utilizando el método descrito en la Sección 2.2.1. del Capítulo II. Dado que el valor de PZ de las NPs en suspensión acuosa era negativo (-30 mV), se seleccionó un polímero cargado positivamente (poli(clorhidrato) de alilamina, PAH) como primera capa para favorecer la interacción electrostática entre ambas entidades. En efecto, el valor del PZ de las NPs recubiertas con PAH cambió a +49 mV. Esta inversión del signo de la carga eléctrica superficial sugiere el éxito del procedimiento de recubrimiento. Las moléculas de PAA (polímero aniónico) fueron depositadas con la misma estrategia en una segunda capa, resultando un valor de PZ negativo (-40 mV), sugiriendo también la incorporación de este polímero a las NPs. Este procedimiento tampoco dio lugar a cambios significativos en la forma y tamaño de las NPs (Fig. 24a).

Los espectros FTIR obtenidos para las NPs funcionalizadas (Fig. 24b) mostraron bandas en la región 1400-1650 cm^{-1} (marcadas con un asterisco) solapadas con la debida al agua en torno a 1620 cm^{-1} , que pueden atribuirse a los modos vibracionales de los grupos N-H (1624 y 1455 cm^{-1})⁷ y COO^- (1553 cm^{-1})⁸ de las moléculas de PAH y PAA, respectivamente, confirmando la adsorción de estos polímeros en la superficie de las NPs. Mediante TG (Fig. 24c) se observó para esta muestra (denominada a partir de aquí DyMo23@PAH@PAA) una pérdida de masa del 7 % en el intervalo 300-600 °C que corresponden a la descomposición de las especies orgánicas.

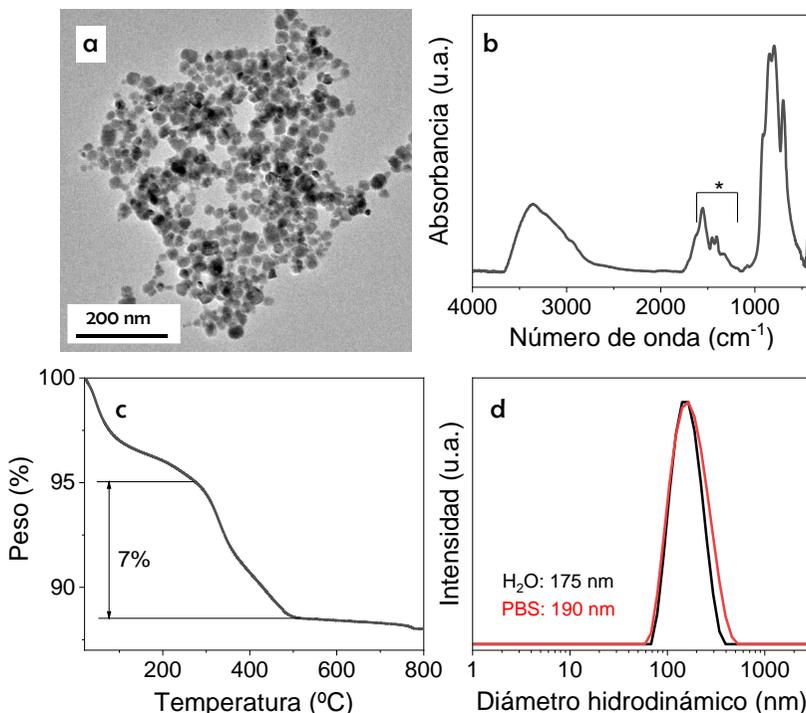


Figura 24. Micrografía TEM (a), espectro FTIR (b) y curva TG (c) de las NPs que constituyen la muestra DyMo23@PAH@PAA, y curvas DLS para suspensiones en agua y en PBS de dicha muestra (d).

El efecto de este proceso de funcionalización sobre la dispersabilidad de las NPs de $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$ en PBS se analizó mediante DLS (Fig. 24d), observándose que el valor de Dh obtenido para las NPs funcionalizadas (190 nm) es similar al obtenido en agua (175 nm) y muy inferior al obtenido para las NPs sin funcionalizar (837 nm, Fig. 12), indicando así el efecto favorable de la capa de funcionalización depositada mediante el procedimiento *layer-by-layer*

3.3. Relajatividades magnéticas

En la Fig. 25 se presentan las imágenes *phantom* ponderadas en T_2 obtenidas por resonancia magnética a 9,4 T para suspensiones acuosas con diferentes concentraciones de las distintas NPs seleccionadas (muestras DyV67@PAA, DyMo23@PAH@PAA, DyW22@PAA, DyP37@PAA y DyP57@PAA). En dicha figura puede observarse un oscurecimiento progresivo de las imágenes a medida que aumentaba la concentración de NPs

en las suspensiones para todos los sistemas considerados, lo que indica que, independientemente de su composición y características morfológicas, todas las NPs se comportan como ACs negativos para MRI a alto campo.

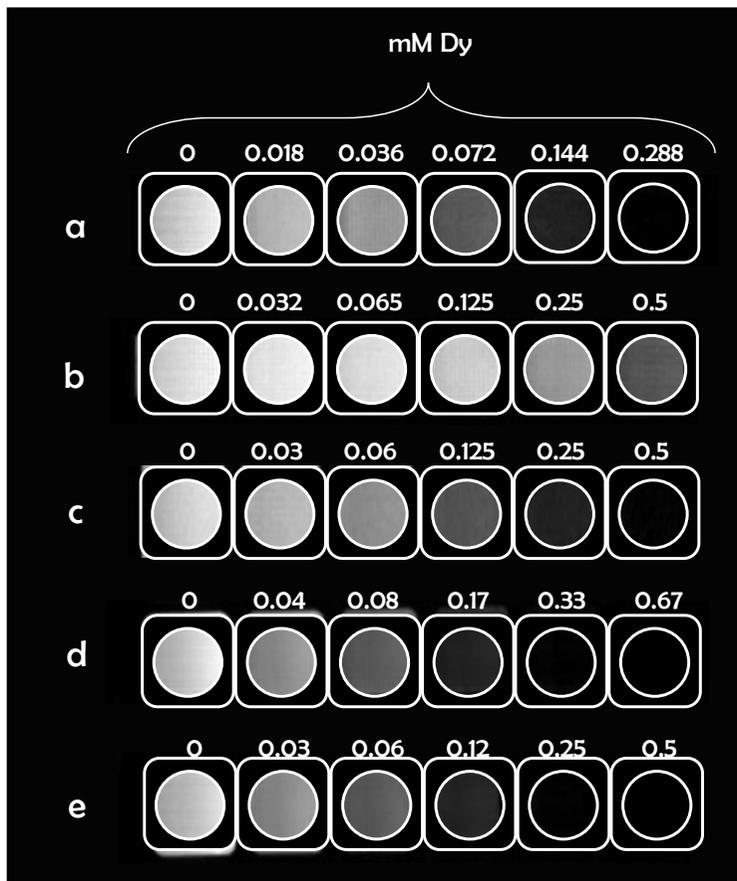


Figura 25. Imágenes *phantom* de MRI obtenidas a 9,4 T para suspensiones acuosas con diferentes concentraciones (mM de Dy^{3+}) de las muestras: a) DyV67@PAA, b) DyMo23@PAH@PAA, c) DyW22@PAA, d) DyP57@PAA y e) DyP37@PAA.

Para llevar a cabo un análisis comparativo de la capacidad de dichas muestras para actuar como AC para MRI a alto campo, se determinaron los valores de relajatividad, r_2 , para cada una de ellas a partir de las pendientes de las rectas resultantes de representar la inversa del tiempo de relajación ($1/T_2$) de los protones del agua en función de la concentración milimolar de Dy^{3+} (Fig. 26).

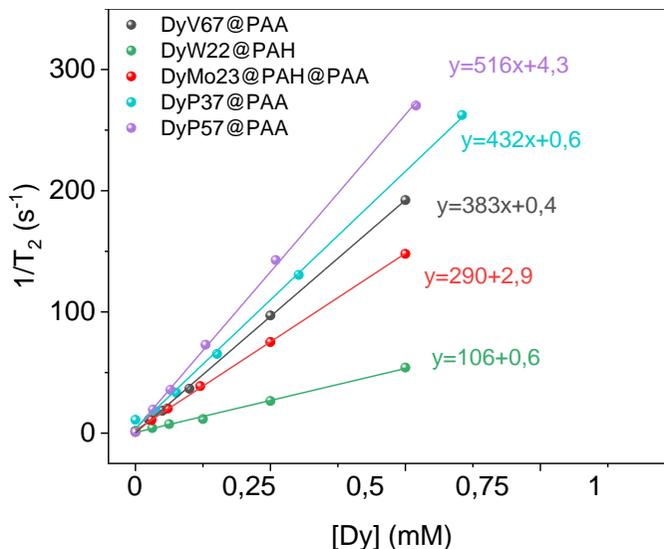


Figura 26. Velocidad de relajación transversal ($1/T_2$) en función de la concentración de Dy^{3+} en suspensiones acuosas de las NPs correspondientes a los distintos sistemas seleccionados.

Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 5. En dicha tabla se observa que los menores valores de r_2 corresponden a las muestras DyW22@PAA ($106 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) y DyMo23@PAH@PAA ($290 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$). Ello puede atribuirse al menor tamaño de partícula de dichas muestras (17 nm para la muestra DyW22@PAA y 23 nm, para la muestra DyMo23@PAH@PAA) ya que según la teoría mecano-cuántica de la relajatividad, r_2 debe aumentar al aumentar el tamaño de partícula (Apéndice I). Este mismo efecto puede explicar las diferencias de r_2 observadas para las dos muestras basadas en fosfato de disprosio (DyP37@PAA y DyP57@PAA) ya que la muestra con mayor valor de r_2 ($516 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) es aquella que posee un mayor tamaño de partícula (57 nm). Es sorprendente, sin embargo, que esta última muestra presente un valor de r_2 superior a la basada en vanadato de disprosio (DyV67@PAA) ($383 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) siendo el tamaño de esta última superior (67 nm). Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que el valor de D_h obtenido para la muestra DyP57@PAA (105 nm) es superior al correspondiente al de la muestra DyV67@PAA (81 nm) ya que es ampliamente aceptado que las inhomogeneidades magnéticas locales inducidas por agentes

de contraste favorecen r_2 y que el área afectada por dichas inhomogeneidades aumenta a medida que aumenta el valor de D_h .⁹

Tabla 5. Tamaño medio obtenido a partir de micrografías TEM, diámetro hidrodinámico (D_h) en suspensión acuosa y relajatividad transversal (r_2) de las NPs correspondientes a los distintos sistemas seleccionados.

Sistema	Muestra	Tamaño (nm)	D_h (nm)	r_2 ($mM^{-1}s^{-1}$)
DyVO ₄	DyV67@PAA	67	81	383
NaDy(WO ₄) ₂	DyW22@PAA	17	60	106
NaDy(MoO ₄) ₂	DyMo23@PAH@PAA	23	59	290
DyPO ₄	DyP37@PAA	37	85	432
	DyP57@PAA	57	105	516

Finalmente, cabe mencionar que los valores de r_2 obtenidos en esta tesis para las dos muestras basadas en fosfato de Dy son más altos que los reportados previamente para NPs basadas en distintos compuestos de Dy, tales como DyF₃,¹⁰ NaDyF₄,^{10, 11} o Dy₂O₃,¹², que mostraron valores de r_2 entre 100 y 380 $mM^{-1}s^{-1}$, por lo que darían lugar a mayor contraste de las imágenes MIR.

3.4. Estabilidad química

Los estudios de estabilidad química de las muestras seleccionadas se llevaron a cabo empleando suspensiones de las NPs en medio PBS que fueron tratadas a 37 °C, para simular el medio fisiológico.

En el caso de los sistemas basados en matrices tipo molibdato y volframato (DyMo23@PAH@PAA y DyW22@PAA) se observó mediante TEM, que tras un día de tratamiento aparecieron partículas con forma fibrosa (Figs. 27a y b) que no estaban presentes en las muestras de partida. Además, el análisis mediante ICP de los sobrenadantes obtenidos tras centrifugar las

suspensiones reveló la presencia de altas cantidades de Mo y W (39,5 y 20,0 % molar, respectivamente, respecto al contenido inicial de las mismas), indicando que dichas NPs tienden a disolverse en condiciones fisiológicas. Hay que mencionar que la tendencia a la disolución de estas partículas es incluso superior a la reportada para NPs de diversos fluoruros de tierras raras (liberación de F = 15-25 %),¹³ por lo que tampoco serían adecuadas para su uso como ACs.

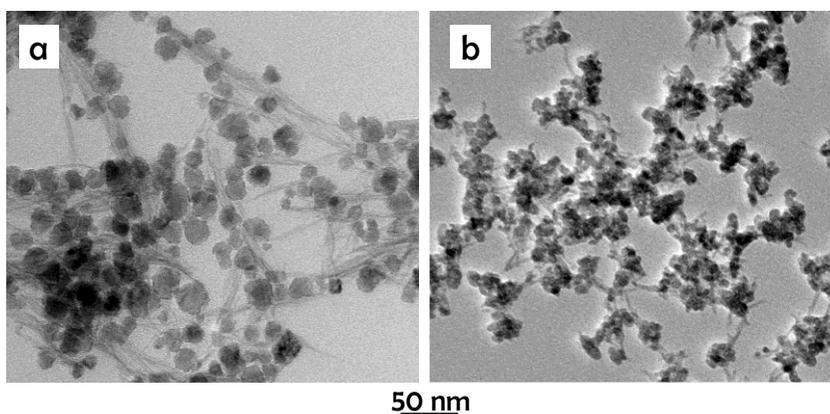


Figura 27. Micrografías TEM obtenidas para las muestras DyMo23@PAH@PAA (a) y DyW22@PAA (b) tras tratarlas durante 1 día en PBS a 37 °C.

Sin embargo, para las NPs basadas en las matrices tipo vanadato y fosfato (muestras DyV67, DyP37 y DyP57) no se observaron variaciones significativas de su morfología (Figs. 28a, b y c) tras 5 semanas de tratamiento. Además, la cantidad de V o P determinada mediante análisis ICP de los sobrenadantes respecto al contenido inicial de las suspensiones era insignificante (0,8 % molar para la muestra DyV67@PAA, 1,7 % molar para la muestra DyP37@PAA y 2,1 % molar para la muestra DyP57@PAA). Estos datos indican que no se produjo una disolución significativa de estas NPs durante el tratamiento y que, por tanto, cumplen el requisito de estabilidad química para ser empleadas en biomedicina.

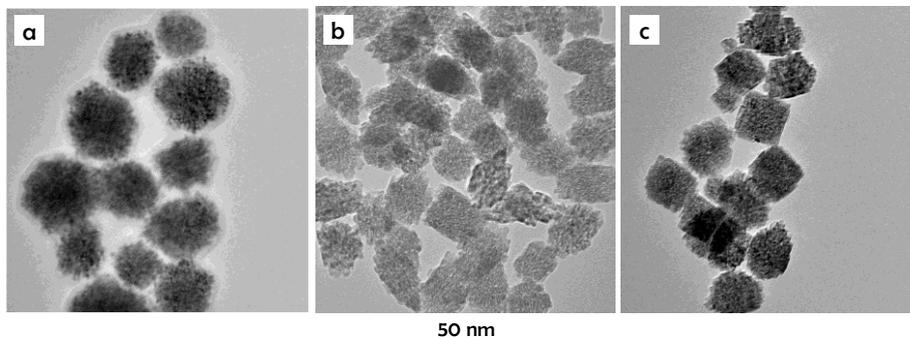


Figura 28. Micrografías TEM obtenidas para las muestras DyV67@PAA (a), DyP37@PAA (b) y DyP57@PAA (c) tras tratarlas durante 5 semanas en PBS a 37 °C.

3.5. Biocompatibilidad y comportamiento *in vivo*

A la vista de los resultados obtenidos de la evaluación de la relajatividad y estabilidad química, para los estudios de viabilidad celular y del comportamiento *in vivo* que se presentan a continuación, se seleccionó la muestra DyP57@PAA por presentar el valor óptimo de r_2 ($516 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) siendo químicamente estable.

3.5.1. Funcionalización con polietilenglicol

Previamente a la evaluación de la biocompatibilidad y del comportamiento *in vivo* de las NPs que constituyen la muestra DyP57@PAA, estas se recubrieron con α -metoxi- ω -amino polietilenglicol (PEG) con el fin de mejorar su tiempo de circulación sistémica y evitar su eliminación por el sistema inmunitario.¹⁴ Para ello, fue necesario utilizar una mayor cantidad de PAA (10 mg mL^{-1}) en el proceso de funcionalización que la considerada en los estudios anteriormente descritos, para así aumentar el número de grupos carboxilato en la superficie de las NPs que son necesarios para su reacción mediante la química de la carbodiimida con los grupos amino de α -metoxi- ω -amino polietilenglicol.

En la Fig. 29a se presentan los espectros FTIR de las NPs recubiertas con α -metoxi- ω -amino PEG y del α -metoxi- ω -amino PEG puro. En el espectro de las primeras se observan varias bandas correspondientes al α -metoxi- ω -

amino PEG (marcadas con asterisco) entre las que no se encuentran las asociadas a vibraciones de tensión de aminas alifáticas que aparecen a 1282 y 1242 cm^{-1} en el espectro del α -metoxi- ω -amino PEG puro (marcadas en rojo). Ello prueba la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilato y las moléculas de α -metoxi- ω -amino PEG y, por tanto, el éxito del proceso de recubrimiento. Ha de destacarse que la banda característica del grupo amida solapa con la del agua en la región 1640-1650 cm^{-1} por lo que no puede identificarse claramente.

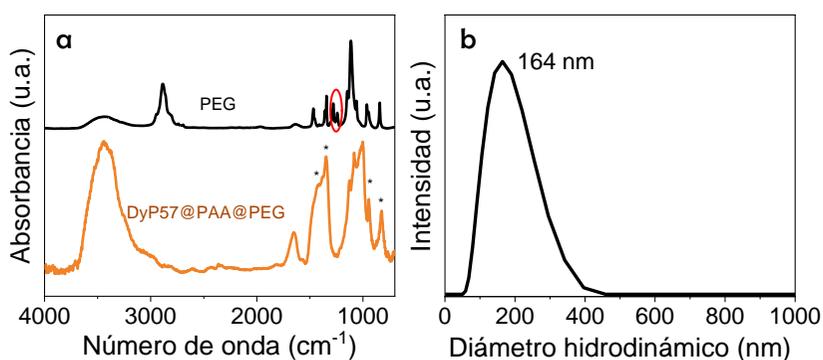


Figura 29. a) Espectros FTIR de las NPs DyP57@PAA recubiertas con α -metoxi- ω -amino PEG. También se presenta el espectro FTIR del α -metoxi- ω -amino PEG puro con fines comparativos. b) Diámetro hidrodinámico y curva DLS de una suspensión en PBS de NPs DyP57@PAA@PEG.

En la Fig. 29b se presenta la curva DLS de las NPs funcionalizadas con α -metoxi- ω -amino PEG y dispersadas en PBS, de la cual se obtuvo un valor de Dh de 164 nm, el cual indica la ausencia de una agregación importante en dicho medio. A partir de aquí, esta muestra se denominará DyP57@PAA@PEG.

3.5.2. Análisis de la viabilidad celular

La evaluación del comportamiento citotóxico de la muestra DyP57@PAA@PEG se llevó a cabo empleando la línea celular de fibroblastos de prepucio humano HFF-1. Dicha evaluación incluyó varios estudios tales como el análisis de la morfología celular mediante microscopía óptica, de la inducción de células necróticas/apoptóticas tardías y de la actividad mitocondrial de las células en presencia de dichas NPs.

Al fusionar las imágenes de microscopía de campo claro, con las de fluorescencia correspondientes a la tinción DAPI (azul, células vivas) y TO-PRO-3 (rojo, células muertas) (Figs. 30a-c), se observó que las células expuestas a una concentración de NPs de hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (referida a Dy^{3+}), no mostraban ningún cambio morfológico apreciable.

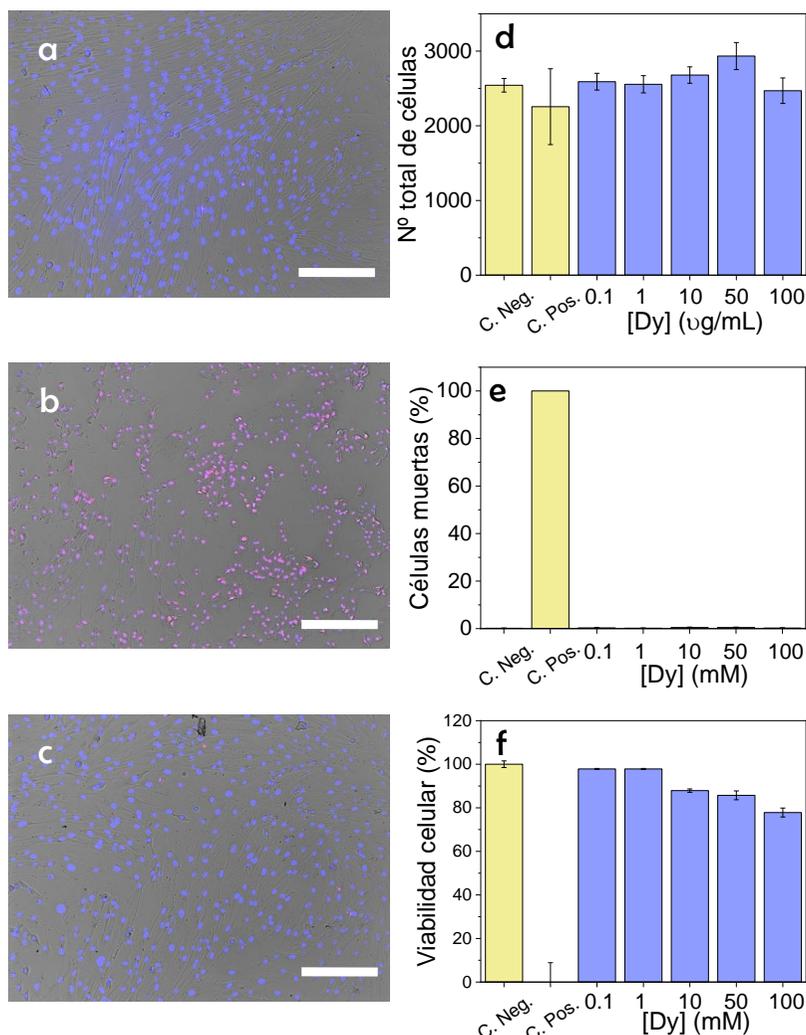


Figura 30. Ensayos de citotoxicidad para la muestra DyP57@PAA@PEG: Imágenes de microscopía óptica de fibroblastos HFF-1 resultantes de la fusión de imágenes de campo claro (gris), con tinción DAPI (azul) y tinción TO-PRO-3 (rojo): a) control negativo, b) control positivo, c) células expuestas a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Dy. La barra de escala corresponde a 50 μm . Número total de células por pocillo (d), porcentaje de células muertas (e) y ensayo MTT (f) de células expuestas a concentraciones crecientes de NPs.

La necrosis celular, evaluada mediante el recuento del número total de células en el ensayo vivo-muerto (Fig. 30d), también puede descartarse, ya que no se produjo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el número de células para ninguna de las concentraciones de Dy ensayadas ($\leq 100 \mu\text{g/mL}$).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de células muertas cuando se exponen a las diferentes concentraciones de Dy ensayadas ($\leq 100 \mu\text{g/mL}$) y el correspondiente al control negativo, indicando la ausencia de apoptosis (Fig. 30e).

Por último, no se observó ningún efecto estadísticamente significativo sobre la actividad mitocondrial mediante el ensayo MTT, ya que la supervivencia celular fue superior al 70 % (Fig. 30f) que es el límite por debajo del cual se considera que las NPs son potencialmente citotóxicas (norma UNE-EN ISO 10993-5:2009)¹⁵.

Estos resultados indican claramente que las NPs de DyPO_4 funcionalizadas con PAA y α -metoxi- ω -amino PEG (muestra DyP57@PAA@PEG), no son tóxicas en las condiciones ensayadas y, por tanto, serían aptas para su uso como sondas en aplicaciones de bioimagen.

3.5.3. Evaluación del comportamiento *in vivo*

Dado que según la teoría mecano-cuántica (Apéndice I), la naturaleza y el espesor de la capa de funcionalización puede afectar a la relajatividad transversal, previamente a la evaluación del comportamiento *in vivo* de la muestra DyP57@PAA@PEG , se procedió a comprobar el efecto del recubrimiento con PEG sobre la efectividad de las mismas como ACs T_2 para MRI a alto campo.

El valor de r_2 obtenido para dicha muestra (Fig. 31a) fue algo inferior ($438 \text{ mM}^{-1}\text{-s}^{-1}$) al de la muestra sin recubrir con PEG ($516 \text{ mM}^{-1}\text{-s}^{-1}$). Ello puede explicarse según la teoría mecano-cuántica de la relajatividad, según la cual r_2 disminuye al aumentar el grosor de la capa superficial de funcionalización de

las NPs, como cabría esperar, en este caso, debido a la adición de PEG. No obstante, aunque el valor de r_2 , las imágenes *phantom* obtenidas para diferentes suspensiones acuosas con distinta concentración de Dy (Fig. 31b), presentan un oscurecimiento significativo al aumentar la concentración de NPs, lo cual indica que las NPs recubiertas con PEG son adecuadas para su uso como agentes de contraste negativo en MRI a alto campo.

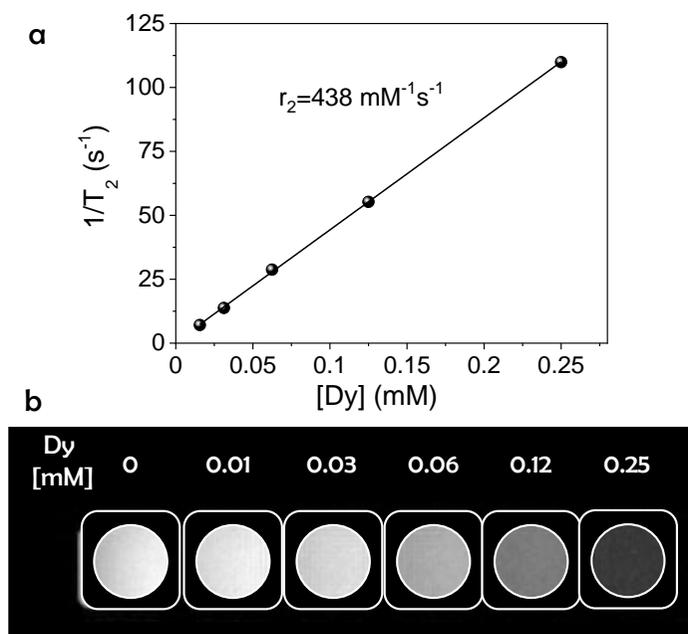


Figura 31. Representación de la velocidad de relajación trasversal ($1/T_2$) en función de la concentración de Dy^{3+} (a) e imágenes *phantom* de MRI a 9,4 T obtenidas para suspensiones acuosas con diferentes concentraciones (mM de Dy^{3+}) de la muestra DyP57@PAA@PEG.

Para la evaluación del comportamiento *in vivo*, se inyectó por vía intravenosa a ratones BALB/c una cierta cantidad de la muestra DyP57@PAA@PEG suspendida en PBS, correspondiente a una concentración de 5 mg Dy/kg animal. Posteriormente se obtuvieron imágenes de resonancia magnética dinámica ponderada en T_2 y mapas cuantitativos en T_2 a un campo de 9,4 T. Mediante el análisis de las primeras, se obtuvo información sobre la farmacocinética a corto plazo, observándose una rápida captación hepática (hígado) y esplénica (bazo), y una despreciable acumulación en los riñones

(Fig. 32). Hay que destacar que la captación hepática fue notablemente mayor y más rápida que la esplénica, lo que concuerda con la farmacocinética de captación descrita para otras NPs recubiertas con PEG en el mismo intervalo de tamaño.¹⁶ Este comportamiento puede explicarse por una mayor afinidad endocítica/fagocítica de los nanomateriales por parte de las células de Kupffer en comparación con los macrófagos esplénicos.¹⁷

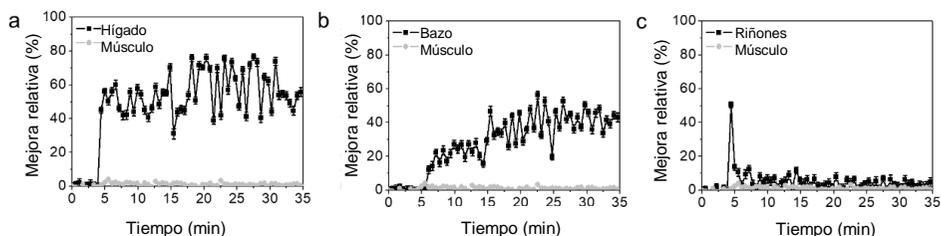


Figura 32. Farmacocinética a corto plazo de las NPs correspondientes a la muestra Dy57@PAA@PEG inyectadas por vía intravenosa (5 mg Dy/kg animal) determinada mediante MRI dinámica ponderada en T_2 . (a) hígado, (b) bazo y (c) riñón. El músculo (gris) se representa como referencia en todos los casos.

La farmacocinética se evaluó a largo plazo (24 h) mediante el análisis de mapas cuantitativos en T_2 (Fig. 33a), observándose un drástico incremento de la velocidad de relajación transversal, R_2 ($1/T_2$), en el hígado y en el bazo 1 hora después de la inyección de las NPs, con ΔR_2 de 24 s^{-1} y 14 s^{-1} , respectivamente (Fig. 33b). Después de 24 h, seguía retenida una cierta cantidad de NPs, tanto en el hígado como en el bazo, como evidencian sus valores de ΔR_2 ($6,6 \text{ s}^{-1}$ y $12,3 \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Por otra parte, la cuantificación *post-mortem* del contenido de las NPs que constituyen la muestra DyP57@PAA@PEG en extractos tisulares mediante ICP (Fig. 33c) confirmó los resultados de la resonancia magnética, mostrando altas concentraciones de Dy en el hígado (115 g Dy/ Kg de tejido) y mucho menores en el bazo (29 g Dy/ Kg de tejido), que correspondían a $\approx 23 \%$ y $\approx 0,6 \%$ respecto a la dosis inyectada, respectivamente. En cuanto a los riñones, se observó un ligero decaimiento de T_2 ($\Delta R_2 = 4 \text{ s}^{-1}$) 1 h después de la inyección de NPs, que puede atribuirse al paso de las NPs restantes por el torrente sanguíneo. Como era de esperar, los valores de T_2 renales volvieron a la normalidad a las 24 horas, lo

que concuerda con la ausencia de NPs en el torrente sanguíneo a partir de ese momento.

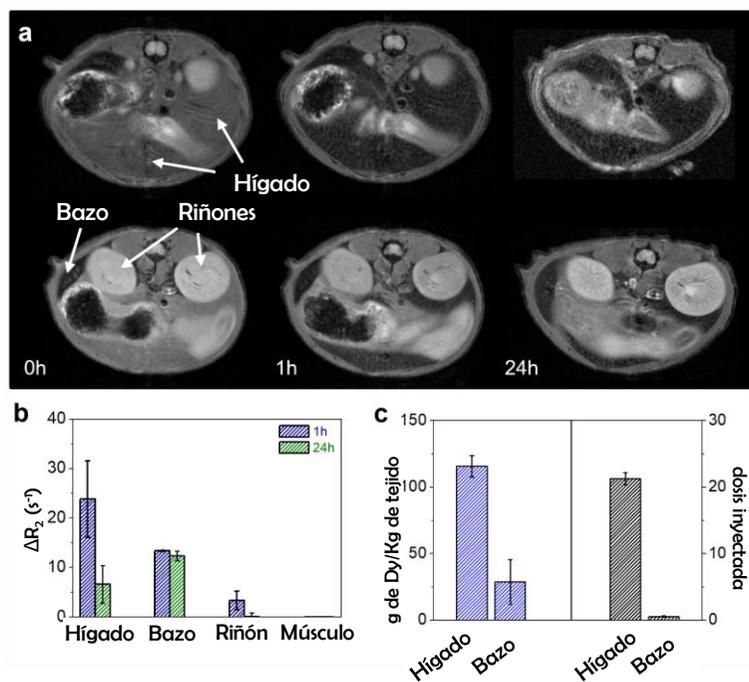


Figura 33. Imágenes representativas de MRI ponderada en T₂ a diferentes tiempos tras la inyección intravenosa de las NPs que constituyen la muestra Dy57@PAA@PEG (5 mg Dy/kg animal) (a). Cambios ΔR_2 en hígado, bazo, riñón y músculo calculados a partir de imágenes MRI ponderadas en T₂ a diferentes tiempos (b). Concentraciones absolutas y relativas (g de Dy/Kg de tejido y % respecto a la dosis inyectada) en hígado y bazo a las 24 h tras la inyección de las NPs. (c).

Así pues, la evaluación *in vivo* de las NPs constituidas por DyPO₄ y recubiertas con PAA y PEG demostró que se comportan como un agente de contraste negativo eficiente para MRI a alto campo y que, según los estudios de biodistribución, el principal mecanismo de eliminación de estas NPs del torrente sanguíneo será vía hepatobiliar, tal y como se esperaba debido a su naturaleza nanoparticulada.¹⁷

3.5.4. Histología

Por último, se llevó a cabo un análisis histológico de los principales órganos para evaluar la toxicidad *in vivo* de las NPs que constituyen la muestra DyP57@PAA@PEG, ya que como se mencionó en la introducción de esta tesis

doctoral, es conveniente complementar los resultados obtenidos de los ensayos *in vitro*, con esta evaluación *post-mortem*. Tal y como puede observarse en la Fig. 34, los órganos analizados (hígado, riñón, bazo y pulmón) presentaban una arquitectura celular normal, comparable a la de los controles (inyectados con disolución salina), sin cambios histopatológicos observables que indiquen daño tisular.¹⁸ Estos resultados junto con los obtenidos de los ensayos citotóxicos, demuestran que las NPs que constituyen la muestra DyP57@PAA@PEG son biocompatibles bajo las condiciones ensayadas y, por lo tanto, pueden usarse como AC para MRI a alto campo.

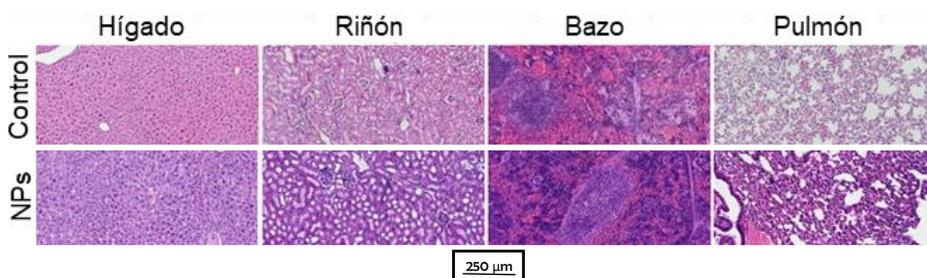


Figura 34. Tinción H&E de secciones de tejido de hígado, riñón, bazo y pulmón inyectadas con disolución salina (control) y con las NPs que constituyen la muestra Dy57@PAA@PEG.

3.6. Conclusiones

1. Empleando métodos de precipitación homogénea en medio alcohólico se han obtenido partículas uniformes con diferentes morfologías de DyVO_4 , $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$, $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$ y DyPO_4 cuyo tamaño pudo ajustarse en el rango nanométrico ($< 100 \text{ nm}$).
2. Todas las nanopartículas cristalizaron con estructura tetragonal, siendo todas ellas monocristalinas, a excepción de las basadas en DyVO_4 , que presentaban un carácter policristalino.
3. Todas las nanopartículas pudieron ser funcionalizadas con ácido poliacrílico mediante procedimientos *one-pot* (DyVO_4 y $\text{NaDy}(\text{WO}_4)_2$) o *two steps* (DyPO_4 y $\text{NaDy}(\text{MoO}_4)_2$).

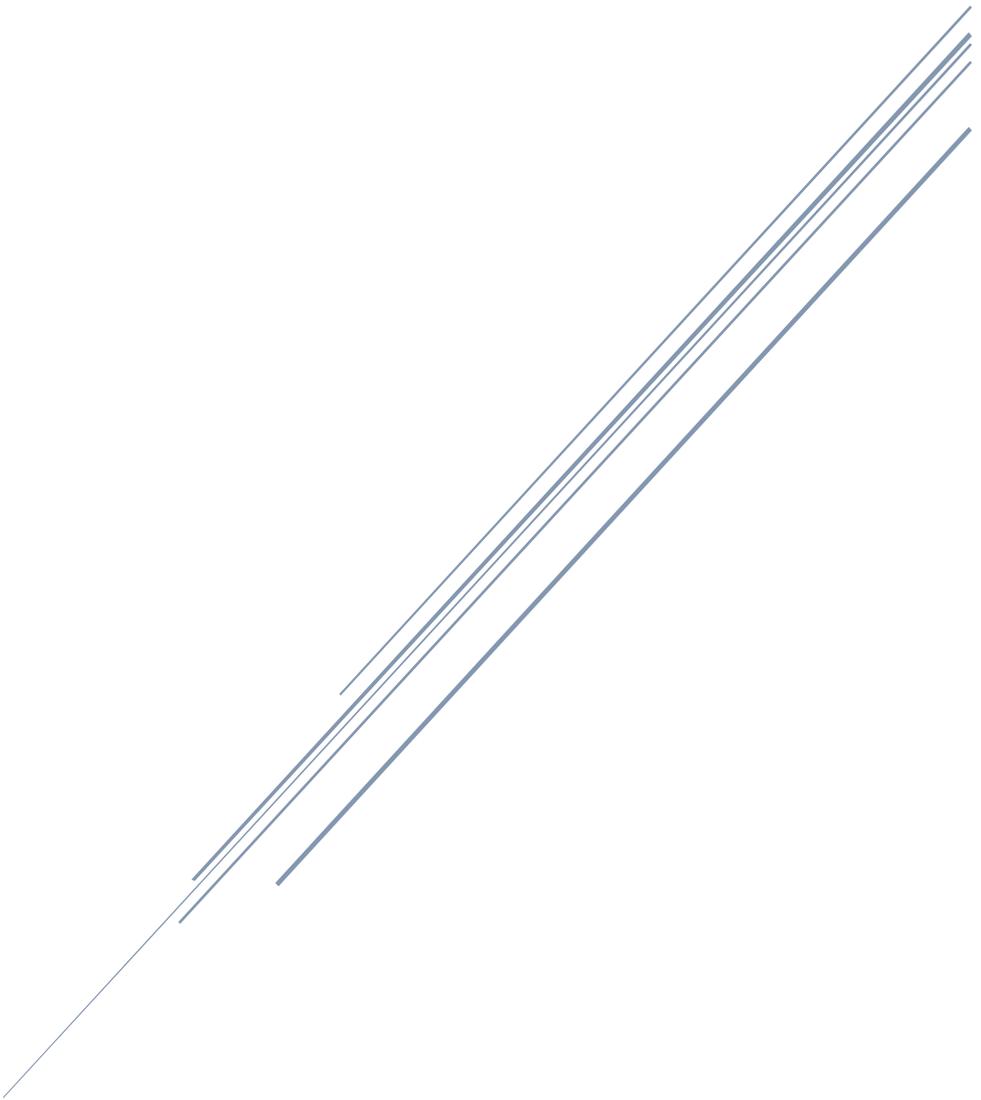
4. Para todos los sistemas, las nanopartículas funcionalizadas con ácido poliacrílico presentaron un alto grado de dispersabilidad en medio PBS, seleccionado como simulador de las condiciones fisiológicas.
5. Todas las nanopartículas estudiadas presentaron elevados valores de relajatividad transversal a 9,4 T, siendo excepcionalmente alto el correspondiente a las nanopartículas de DyPO₄ con tamaño de 57 nm (516 mM⁻¹s⁻¹) que es muy superior a los publicados en la bibliografía para otros sistemas basados en Dy (100 < r₂ < 380 mM⁻¹s⁻¹).
6. Sólo las nanopartículas de DyVO₄ y las de DyPO₄ recubiertas con ácido poliacrílico, resultaron ser estables químicamente al menos durante 5 semanas de tratamiento en medio PBS a 37 °C.
7. Las nanopartículas de DyPO₄ con mayor relajatividad transversal pudieron ser recubiertas con polietilenglicol con objeto de mejorar su tiempo de circulación sistémica y evitar su eliminación por el sistema inmunitario, lo cual es esencial para su empleo en ensayos *in vivo*.
8. Dichas nanopartículas presentaron una toxicidad despreciable para células HFF-1 en concentraciones ≤ 100 µg/ml.
9. La evaluación del comportamiento *in vivo* de las nanopartículas DyPO₄ recubiertas con ácido poliacrílico y polietilenglicol demostró que no producían daño tisular en los distintos órganos (hígado, riñón, bazo y pulmón), confirmando su alta biocompatibilidad y que eran excelentes agentes de contraste negativos para la obtención de imágenes por resonancia magnética a alto campo.

3.7. Bibliografía

1. N. O. Nunez, S. Rivera, D. Alcantara, J. M. de la Fuente, J. Garcia-Sevillano and M. Ocana, *Dalton Transactions*, 2013, **42**, 10725-10734.
2. N. O. Nunez, E. Gomez-Gonzalez, R. M. Calderon-Olvera, A. I. Becerro, G. Colon and M. Ocana, *Dalton Transactions*, 2021, **50**, 16539-16547.
3. E. Gomez-Gonzalez, C. Caro, D. Martinez-Gutierrez, M. L. Garcia-Martin, M. Ocana and A. I. Becerro, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2021, **587**, 131-140.
4. N. O. Nunez, P. Zambrano, J. Garcia-Sevillano, E. Cantelar, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, **27**, 4546-4554.
5. L. J. Kirwan, P. D. Fawell and W. van Bronswijk, *Langmuir*, 2003, **19**, 5802-5807.
6. A. I. Becerro and M. Ocana, *Rsc Advances*, 2015, **5**, 34517-34524.
7. L. Shao and J. L. Lutkenhaus, *Soft Matter*, 2010, **6**, 3363-3369.
8. P. Wang, R. K. Kankala, B. Chen, R. Long, D. Cai, Y. Liu and S. Wang, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2019, **107**, 339-347.
9. R. Antwi-Baah, Y. J. Wang, X. Q. Chen and K. Yu, *Advanced Materials Interfaces*, 2022, **9**, 2101710.
10. D. Gonzalez-Mancebo, A. I. Becerro, T. C. Rojas, M. L. Garcia-Martin, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Particle & Particle Systems Characterization*, 2017, **34**, 1700116.
11. X. H. Zhang, B. Blasiak, A. J. Marenco, S. Trudel, B. Tomanek and F. van Veggel, *Chemistry of Materials*, 2016, **28**, 3060-3072.
12. G. K. Das, N. J. J. Johnson, J. Cramen, B. Blasiak, P. Latta, B. Tomanek and F. van Veggel, *Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012, **3**, 524-529.
13. D. Lisjak, O. Plohl, J. Vidmar, B. Majaron and M. Ponikvar-Svet, *Langmuir*, 2016, **32**, 8222-8229.
14. B. Pelaz, P. del Pino, P. Maffre, R. Hartmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente, G. U. Nienhaus and W. J. Parak, *Acs Nano*, 2015, **9**, 6996-7008.
15. UNE-EN ISO 10993-5:2009: Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. <https://www.aenor.com/>.
16. M. Pernia Leal, C. Caro and M. Luisa Garcia-Martin, *Nanoscale*, 2017, **9**, 8176-8184.
17. K. M. Tsoi, S. A. MacParland, X.-Z. Ma, V. N. Spetzler, J. Echeverri, B. Ouyang, S. M. Fadel, E. A. Sykes, N. Goldaracena, J. M. Kathis, J. B. Conneely, B. A. Alman, M. Selzner, M. A. Ostrowski, O. A. Adeyi, A. Zilman, I. D. McGilvray and W. C. W. Chan, *Nature Materials*, 2016, **15**, 1212-1221.
18. K. E. Ibrahim, M. G. Al-Mutary, A. O. Bakhiet and H. A. Khan, *Molecules*, 2018, **23**.

CAPÍTULO IV

AGENTES DE CONTRASTE PARA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA DUAL T₁-T₂



4.1. Introducción

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en relación con el desarrollo de sondas multimodales para la obtención de imágenes mediante resonancia magnética dual T₁-T₂, para lo cual se utilizaron iones Dy³⁺ como componentes T₂ e iones Gd³⁺ como componentes T₁. Ambos tipos de cationes fueron incorporados a una matriz de tipo vanadato como prueba de concepto ya que, como se ha demostrado en el Capítulo III, las NPs de DyVO₄ se encuentran entre las que mayor valor de relajatividad transversal presentan y, además, pueden ser funcionalizadas fácilmente con PAA (para dotarlas de dispersabilidad) mediante un proceso *one-pot*.

Hay que señalar que en la bibliografía se han considerado mayoritariamente dos tipos de arquitecturas para este tipo de agentes de contraste duales que consisten en NPs constituidas por una única fase en la que se incorporan ambos tipos de iones en disolución sólida (Fig. 1a),^{1,2} o bien, en arquitecturas núcleo-corteza.^{3,4} En estas últimas, el componente T₂ (Dy³⁺) se sitúa en el núcleo y el componente T₁ (Gd³⁺) en la corteza (Fig. 1b) para favorecer su contacto directo con el agua y así obtener valores de r₁ más elevados (Apéndice I).

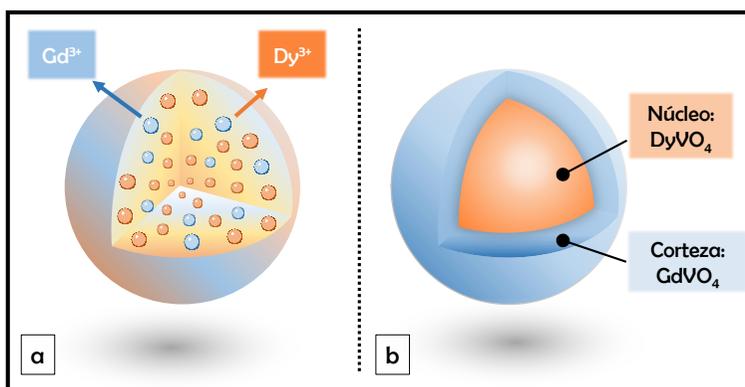


Figura 1. Ilustración esquemática de las dos arquitecturas estudiadas en este capítulo en una NP de vanadato de disprosio y gadolinio coprecipitados en una única fase (a) y en una NP constituida por un núcleo de DyVO₄ recubierto por una corteza de GdVO₄ (b).

Teniendo en cuenta estas consideraciones se decidió abordar un estudio comparativo de las dos arquitecturas mencionadas anteriormente (Fig. 1) con objeto de obtener agentes de contraste para MRI dual T₁-T₂ con propiedades magnéticas óptimas.

4.2. Síntesis y caracterización

4.2.1. Nanopartículas de fase única

Para sintetizar NPs con iones Gd³⁺ e iones Dy³⁺ integrados en una única fase (Fig. 1a), se empleó un método de precipitación homogénea usado previamente para sintetizar NPs de DyVO₄ que fue ligeramente modificado. El procedimiento experimental consiste en el envejecimiento a 120 °C durante 20 h de disoluciones en una mezcla EG/H₂O (relación volumétrica: 3,5:1,5) que contenían Dy(NO₃)₃ (0,02 M), Gd(NO₃)₃ (0,01 M), PAA (2 mg·mL⁻¹) y Na₃VO₄ (0,1 M).

Las NPs obtenidas presentaron una forma esférica (Fig. 2a) con un diámetro medio de 36 nm (Fig. 2b) y una distribución de tamaños estrecha ($\sigma = 6$, Fig. 2b).

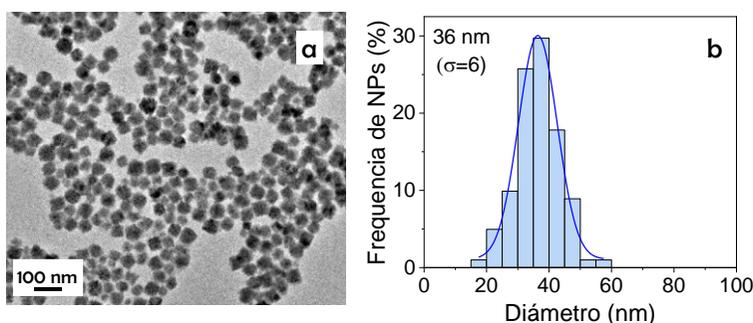


Figura 2. Micrografía TEM (a) y distribución del tamaño de partícula (b) de las NPs que contienen Dy³⁺ y Gd³⁺ coprecipitados en forma de disolución sólida.

El diagrama de DRX de estas NPs se ajustó a los patrones de las fases DyVO₄ y GdVO₄, ambas con estructura tetragonal (Fig. 3), los cuales son casi indistinguibles dada la similitud de radios iónicos de los dos cationes lantánidos (1,03 para el Dy³⁺ y 1,05 para el Gd³⁺, en coordinación VIII).⁵

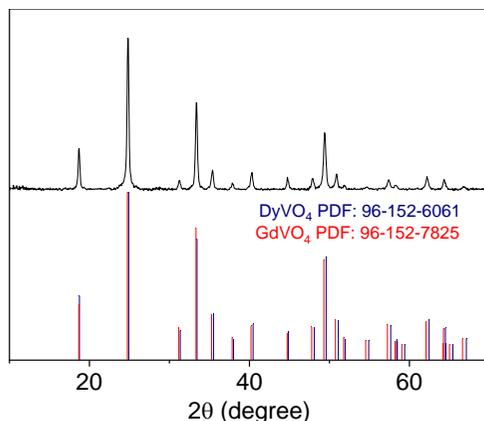


Figura 3. Diagrama de DRX de las NPs que contienen Dy³⁺ y Gd³⁺ coprecipitados en forma de disolución sólida. También se incluyen los patrones de las fases DyVO₄ (PDF: 01-076-2476) y GdVO₄ (PDF: 96-152-7825) tetragonales.

Los mapas de composición obtenidos mediante EDS (Fig. 4a-c) para una nanopartícula (Fig. 4d) confirmaron la incorporación de los iones Dy³⁺ y Gd³⁺ por coprecipitación en una única fase, ya que en ellos se observó una distribución homogénea tanto de Dy como de Gd en el interior de la NP, que también fue detectada mediante en el perfil de composición mostrado en la Fig. 4e.

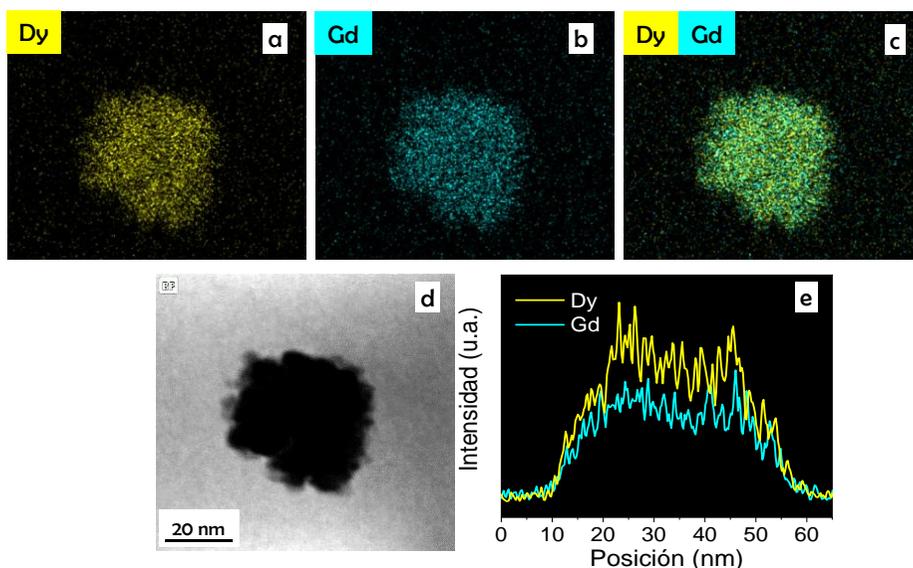


Figura 4. Mapas composicionales (a, b y c), micrografía STEM (d) y perfil de composición(e) obtenidos mediante EDS tras la coprecipitación de los iones Gd³⁺ y Dy³⁺ en NPs de una única fase.

Los análisis mediante ICP indicaron que las NPs contenían un 63,4 % molar de Dy (relación molar $Dy^{3+}/(Dy^{3+}+Gd^{3+})$) y un 36,5% de Gd (relación molar $Gd^{3+}/(Dy^{3+}+Gd^{3+})$) y, por tanto, una relación molar $Dy^{3+}/Gd^{3+} = 1,6$.

Por último, el espectro FTIR (Fig. 5a) de esta muestra, denominada a partir de aquí, DyGd, presentó bandas entre 1600 y 1400 cm^{-1} que son características de los aniones carboxilato procedentes del PAA, confirmando la incorporación de este polímero a las NPs durante el proceso de síntesis. La curva TG obtenida para dichas NPs (Fig. 5b) indicó que contenían un 4 % en peso de PAA incorporado, que corresponde a la pérdida de peso detectada en el rango de temperatura comprendido entre 300 y 800 °C.

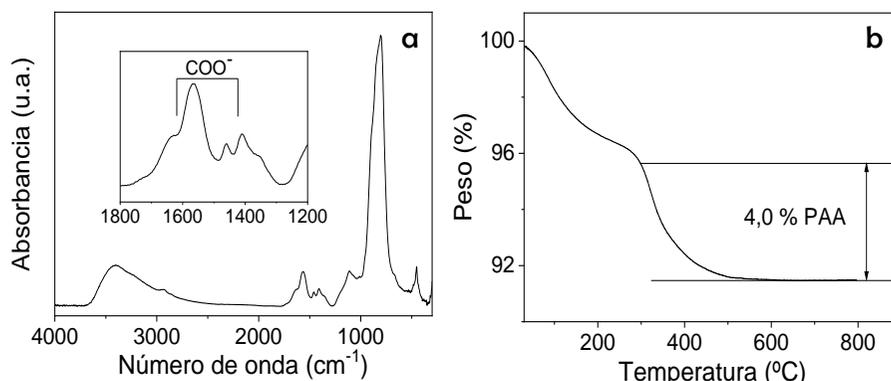


Figura 5. Espectro FTIR (a) y curva TG (b) obtenidos para la muestra DyGd.

4.2.2. Nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza

Siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.2.2.1. del Capítulo III, se sintetizaron NPs de $DyVO_4$ para ser utilizadas como núcleos que serían recubiertos posteriormente con una corteza de $GdVO_4$. Los núcleos de $DyVO_4$ presentaron una forma esférica (Fig. 6a) y un tamaño medio de 50 nm con una distribución de tamaños estrecha, $\sigma = 6$ (Fig. 6b).

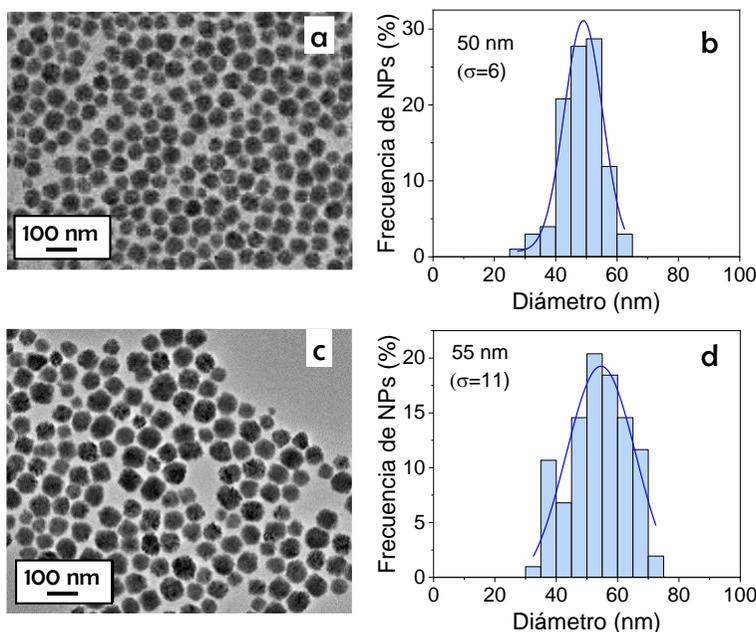


Figura 6. Micrografías TEM (a) y distribución del tamaño de partícula (b) de las NPs de DyVO₄ utilizadas como núcleos. Micrografías TEM (c) y distribución del tamaño de partícula (d) de las NPs de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄.

Para la deposición de la corteza de GdVO₄ sobre los núcleos de DyVO₄, se dispersaron 30 mg de estos últimos en una disolución que contenía Gd(NO₃)₃ (0,02 M), Na₃VO₄ (0,1 M) y PAA (4 mg·mL⁻¹) en una mezcla EG/H₂O (3,5 mL de EG + 1,5 mL de H₂O). Finalmente, esta dispersión fue envejecida en una estufa convencional a 120 °C durante 20 h.

Este proceso de recubrimiento dio lugar a NPs esféricas (Fig. 6c) cuyo tamaño medio fue superior (55 nm, $\sigma = 11$, Fig. 6d) al de los núcleos (50 nm, $\sigma = 6$, Fig. 6b), lo cual sugiere el éxito del proceso de recubrimiento que fue corroborado mediante análisis EDS. Así, tanto los mapas composicionales obtenidos mediante EDS (Fig. 7a-c) de una única NP (Fig. 7d) como su correspondiente perfil (Fig. 7e), claramente indicaron la presencia de Gd³⁺ en su parte externa, mientras que los iones Dy³⁺ se encontraban en su parte central.

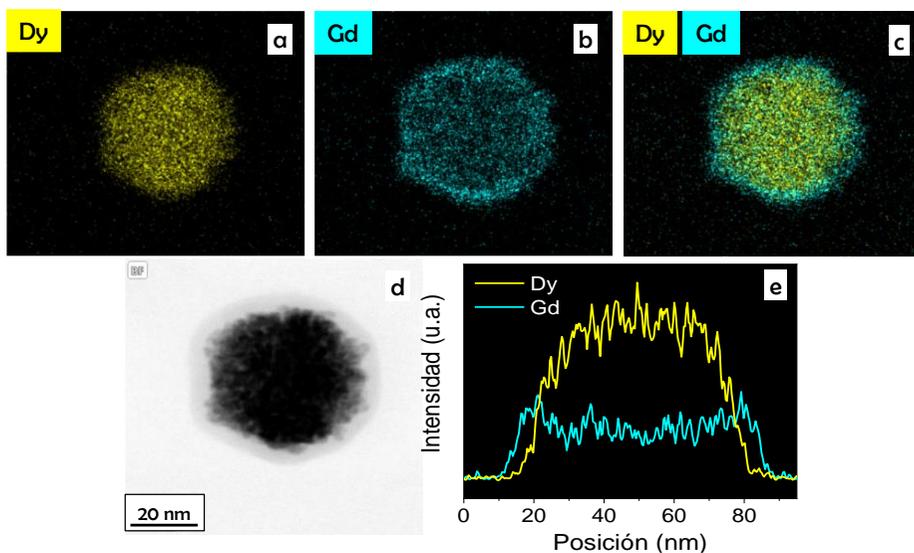


Figura 7. Mapas composicionales (a, b y c), micrografía STEM (d) y perfil de composición (e) obtenidos mediante EDS tras el recubrimiento de las NPs de DyVO₄ con GdVO₄.

La presencia de la cubierta de GdVO₄ no pudo ser detectada mediante DRX, ya que el difractograma obtenido para las NPs con arquitectura núcleo-corteza es consistente tanto con la fase DyVO₄ tetragonal como con la fase de GdVO₄ tetragonal (Fig. 8a), las cuales son difícilmente distinguibles mediante esta técnica, como se ha mencionado anteriormente.

La composición cuantitativa de estas NPs núcleo-corteza obtenida mediante análisis ICP reveló que el contenido en Dy y Gd (relaciones molares Dy³⁺/(Dy³⁺+Gd³⁺) o Gd³⁺/(Dy³⁺+Gd³⁺)) era del 63,7 % y 36,4 %, respectivamente, lo cual indica una relación molar Dy³⁺/Gd³⁺ = 1,6, muy similar a la obtenida para la arquitectura de fase única. Ello permite comparar y evaluar las relajatividades magnéticas de ambos tipos de NPs.

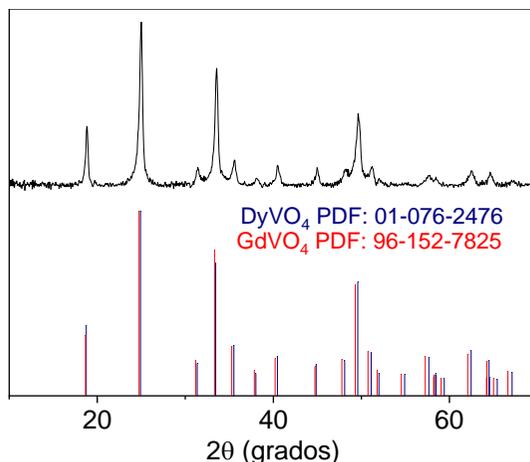


Figura 8. Diagrama de DRX de las NPs de DyVO₄ tras su recubrimiento con GdVO₄. También se incluyen los patrones de las fases DyVO₄ (PDF: 01-076-2476) y GdVO₄ (PDF: 96-152-7825) tetragonales.

Finalmente, la presencia de moléculas de PAA sobre la superficie de las NPs fue confirmada mediante espectroscopía FTIR. Así, en el espectro de esta muestra se observaron las bandas características de los grupos carboxilatos del PAA en el rango 1600-1400 cm⁻¹ (Fig. 7b). La cantidad de polímero incorporada fue del 4,6 % en peso, de acuerdo con la pérdida de masa detectada en el rango 300-800 °C determinada a partir de la curva TG (Fig. 7c). En adelante, esta muestra constituida por NPs de DyVO₄ recubiertas por una corteza de GdVO₄ se denominará Dy@Gd.

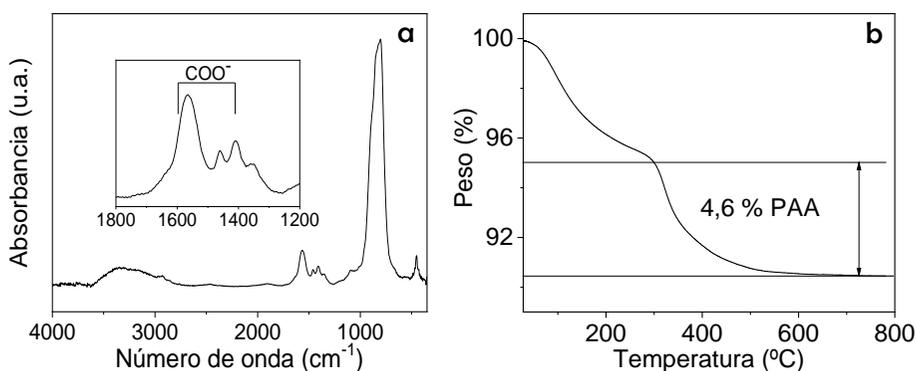


Figura 9. Espectro FTIR (a) y curva TG (b) de las NPs de DyVO₄ tras su recubrimiento con GdVO₄.

4.3. Relajatividades magnéticas

Las relajatividades magnéticas medidas a 9,4 T para las arquitecturas ensayadas se presentan en la Fig. 10. En ella puede observarse en primer lugar que los valores de r_1 obtenidos para ambas arquitecturas son muy similares ($0,663 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la muestra DyGd y $0,707 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la muestra Dy@Gd). Por otra parte, el valor de r_2 obtenido para la muestra DyGd constituida por las NPs formadas por una única fase es inferior ($258,0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) que para la muestra Dy@Gd constituida por las NPs con arquitectura núcleo-corteza ($454,06 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), lo cual podría atribuirse al mayor tamaño de partícula de esta última (Apéndice I).

Hay que resaltar que la efectividad de un AC para MRI dual T₁-T₂ depende no sólo de los valores de r_1 y r_2 sino también de la relación r_2/r_1 . Así, esta magnitud debe presentar valores próximos a 1 para los ACs T₁,⁶⁻⁸ superiores a 10 para los ACs T₂,^{9,10} e intermedias entre 1 y 10 para los ACs T₁-T₂.⁶ Para las NPs de este estudio, el valor del cociente r_2/r_1 es muy superior a 10, tanto para la muestra DyGd (389) como para la muestra Dy@Gd (642), lo cual indica que ninguna de ellas es apropiada para la obtención de imágenes mediante MRI dual T₁-T₂.

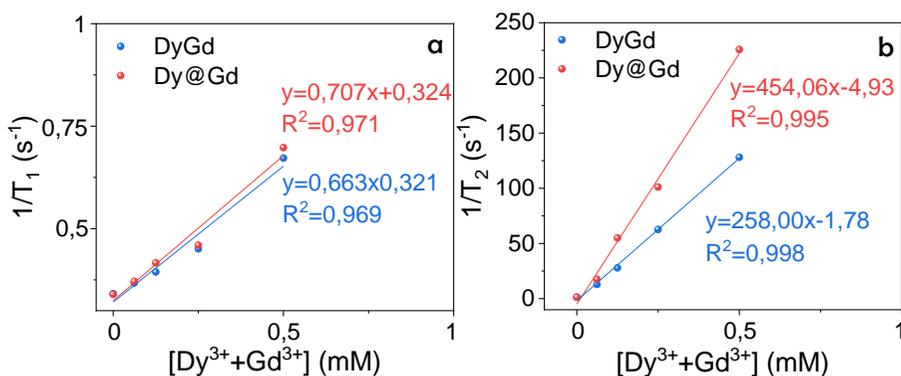


Figura 10. Velocidad de relajación longitudinal (a) y transversal (b) frente a la concentración de $(\text{Dy}^{3+} + \text{Gd}^{3+})$ obtenidas a 9,4 T para las muestras DyGd (azul) y Dy@Gd (rojo).

Dado que la mayor parte de los escáneres clínicos usados para humanos funcionan a campos magnéticos ≤ 3 T, se decidió llevar a cabo un estudio de

las relajatividades a 1,44 T, para así evaluar la potencialidad de las arquitecturas desarrolladas como ACs para MRI dual T₁-T₂ en estas condiciones.

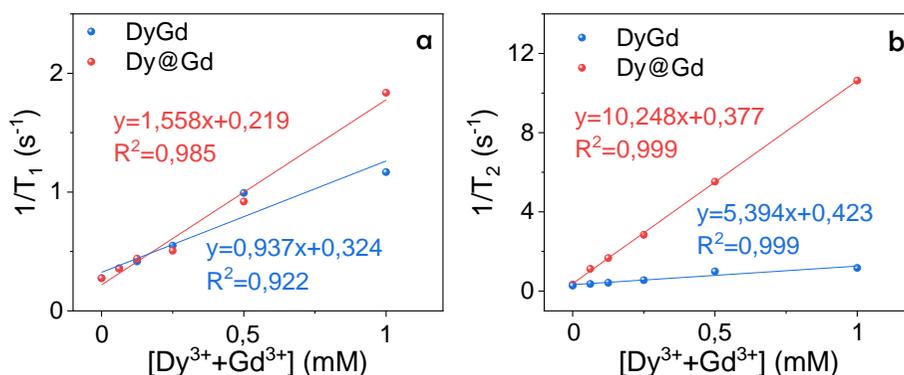


Figura 11. Velocidad de relajación longitudinal (a) y transversal (b) frente a la concentración de (Dy³⁺+Gd³⁺) obtenidas a 1,44 T para las muestras DyGd (azul) y Dy@Gd (rojo).

En la Fig 11a se puede observar que, en estas condiciones, los valores de r_1 aumentaron (0,937 mM⁻¹s⁻¹ para la muestra DyGd y 1,558 mM⁻¹s⁻¹ para la muestra Dy@Gd) y los valores de r_2 disminuyeron (5,394 mM⁻¹s⁻¹ para la muestra DyGd y 10,248 mM⁻¹s⁻¹ para la muestra Dy@Gd) respecto a los resultados obtenidos a 9,4 T. Este comportamiento se ajusta al predicho por las ecuaciones de Solomon-Bloembergen-Morgan y por la teoría mecano-cuántica que explican el valor de r_1 y r_2 , respectivamente (Apéndice I).

En dicha figura también se observa que los valores de, tanto de r_1 como de r_2 , de la muestra con arquitectura núcleo-corteza (Dy@Gd) eran superiores (1,558 y 10,248 mM⁻¹s⁻¹, respectivamente) a los de la muestra DyGd obtenida por coprecipitación (0,937 y 5,394 mM⁻¹s⁻¹, respectivamente). Para explicar estas diferencias de relajatividad es necesario considerar que, la mayor contribución a r_1 viene dada por los iones Gd³⁺ que presentan un momento angular de espín (7/2) mayor que el Dy³⁺ (5/2), mientras que la mayor contribución a r_2 viene dada por los iones Dy³⁺, ya que presentan un momento magnético (10,65 μB) mayor que el que poseen los iones Gd³⁺ (7,29 μB) (Apéndice I). Por tanto, el mayor valor de r_2 que presentaron las NPs con arquitectura núcleo-corteza puede deberse al mayor tamaño de sus núcleos (50

nm) en los que se encuentran los iones Dy³⁺ en comparación al tamaño inferior (36 nm) que presentan las NPs que incorporan Dy³⁺ y Gd³⁺ en una única fase, ya que según la teoría mecano-cuántica de la relajatividad, r₂ debe aumentar al aumentar el tamaño de partícula (Apéndice I). Por otra parte, el mayor valor de r₁ que presentan las NPs con arquitectura núcleo-corteza debe atribuirse, al menos en parte, a la localización de los iones Gd³⁺ en la corteza, ya que, en estas condiciones, el número de iones Gd³⁺ en contacto directo con el agua circundante sería mayor, lo cual aumenta el valor de r₁ según predicen las ecuaciones de Solomon-Bloembergen-Morgan (Apéndice I). Adicionalmente, hay que tener en cuenta que cuando los iones Dy³⁺ y Gd³⁺ están localizados en posiciones próximas de la matriz en la que se incorporan, la nube de electrones de los iones Gd³⁺, que presenta una polarizabilidad mayor que la de los iones Dy³⁺, puede distorsionarse por el acoplamiento con la nube de electrones de los iones Dy³⁺. En consecuencia, el estado isótropo de los iones Gd³⁺ se vuelve anisótropo, surgiendo la interacción espín-orbital que conduce a una disminución del tiempo de relajación del espín longitudinal de los electrones (ver T_{1e} en Apéndice I) y, por lo tanto, a una disminución de r₁.⁴ Por tanto, la separación de los iones Dy³⁺ e iones Gd³⁺ en la arquitectura núcleo-corteza, minimiza las interferencias magnéticas entre ambos tipos de iones (Gd³⁺, T₁ y Dy³⁺, T₂) lo cual también conduce a un mayor valor de r₁.

Independientemente de su arquitectura, el cociente r₂/r₁ (≈ 6) de las muestras ensayadas, obtenido a partir de los valores de r₁ y r₂ arriba comentados, se encuentra comprendido en el rango requerido (1 < r₂/r₁ < 10) para ser empleadas como agentes de contraste para MRI dual T₁-T₂. No obstante, la muestra Dy@Gd presentó valores más elevados de relajatividad (tanto longitudinal como transversal), por lo que se concluye que las NPs de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄, son más apropiadas para ser empleadas como ACs T₁-T₂ a 1,44 T. Para evaluar la idoneidad de esta muestra para dicha aplicación se llevaron a cabo los estudios de dispersabilidad, de estabilidad química y de viabilidad celular que se presentan a continuación. Hay

que señalar que, en este caso, no se pudieron llevar a cabo estudios *in vivo* debido a la falta de disponibilidad de un equipo de MRI a bajo campo (1,44 T) para estudios preclínicos en animales.

4.4. Dispersabilidad

La dispersabilidad de las NPs que constituyen la muestra Dy@Gd se evaluó para suspensiones de estas NPs en agua y PBS (pH = 7,4). En la Fig. 12 se presentan las curvas de DLS junto con los valores de Dh obtenidos para estas suspensiones. Como puede observarse, en PBS se obtuvo un valor de Dh similar (106 nm) al de la suspensión en agua (105 nm) siendo ambos valores algo más elevados que el tamaño medio obtenido a partir de las micrografías TEM (55 nm), pero suficientemente pequeños para descartar una agregación significativa. Por consiguiente, puede considerarse que estas NPs que constituyen la muestra Dy@Gd son dispersables tanto en agua como en un simulador de las condiciones fisiológicas, tal como se requiere para las aplicaciones *in vivo*. Esta dispersabilidad puede atribuirse a la presencia de las moléculas de PAA en la superficie de las NPs como se ha discutido en el Capítulo III para los ACs para MRI a alto campo.

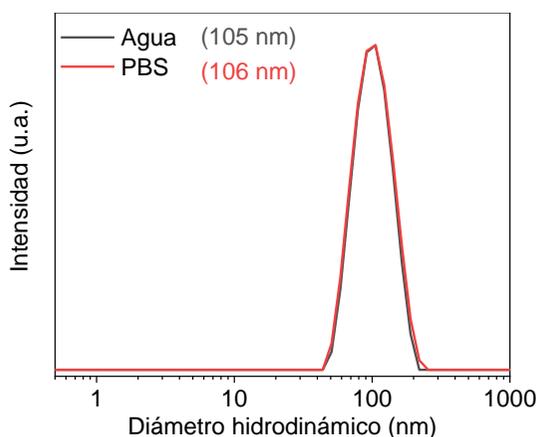


Figura 12. Curva DLS y valor de Dh obtenido para suspensiones de las NPs que constituyen la muestra Dy@Gd en agua (gris) y PBS (rojo).

4.5. Estabilidad química

En la Fig. 13 se presentan las micrografías TEM obtenidas antes y después de envejecer durante 1, 21 y 35 días una dispersión de las NPs que constituyen la muestra Dy@Gd en PBS a 37 °C. Como puede observarse, no se produjeron cambios sustanciales en la forma de las NPs ni en su tamaño (Tabla 1), incluso tras 35 días de tratamiento, lo que indica que la estabilidad química de las mismas es elevada.

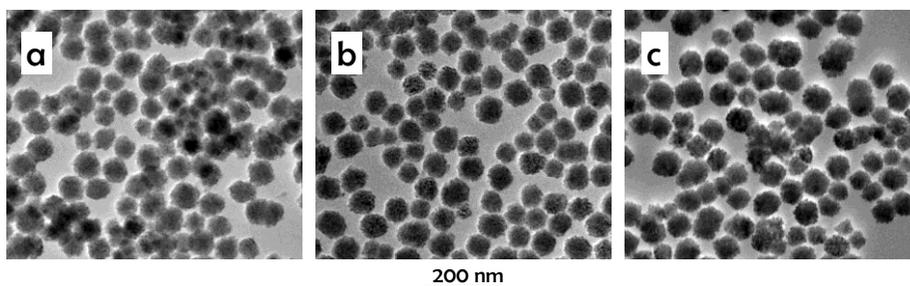


Figura 13. Micrografías TEM obtenidas para la muestra Dy@Gd tras tratarlas durante 1 día (a), 21 días (b) y 35 días (c) en PBS a 37 °C.

Este resultado fue confirmado mediante análisis por ICP (Tabla 1) del sobrenadante obtenido por centrifugación de dichas dispersiones tras los tiempos de tratamiento indicados, ya que en dichos sobrenadantes se detectaron unos contenidos en vanadio inferiores al 3,5 % del contenido inicial, lo que indica la escasa disolución de las NPs en PBS y, por tanto, su potencialidad para ser utilizadas en biomedicina.

Tabla 1. Diámetro medio obtenido a partir de micrografías TEM y % de vanadio presente en el sobrenadante obtenido mediante ICP tras tratar y centrifugar una dispersión de Dy@Gd en PBS a 37 °C durante 1, 21 y 35 días.

Tiempo (días)	Tamaño medio (nm)	Vanadio liberado (%)
1	57	2,9
21	56	3,0
35	58	3,3

4.6. Viabilidad celular

La viabilidad celular de la muestra Dy@Gd se evaluó en primer lugar mediante el ensayo vivo-muerto empleando la línea celular HFF-1. Las células incubadas en presencia de NPs (100 µg/mL Dy³⁺+Gd³⁺) conservaron su característica forma elipsoidal, sin mostrar cambios morfológicos (Fig. 14a-c). Además, no se produjo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el número total de células (Fig. 14d) para concentraciones ≤ 50 µg/mL (Dy³⁺+Gd³⁺) indicando la ausencia de necrosis celular. También, se descartaron procesos de apoptosis celular, puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el porcentaje de células muertas cuando se exponen a las concentraciones de Dy³⁺+Gd³⁺ anteriormente mencionadas y el correspondiente al control negativo (muerte celular) (Fig. 14e).

En segundo lugar, se llevó a cabo un ensayo MTT que reveló que para concentraciones de NPs ≤ 50 µg/mL de Dy³⁺+Gd³⁺, la supervivencia celular era superior al 70 % (Fig. 14f) que es el límite por debajo del cual se considera que las NPs son potencialmente citotóxicas (norma UNE-EN ISO 10993-5:2009).¹¹ Por tanto, estos resultados indican que las NPs de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄ cumplen el criterio de viabilidad celular requerido para aplicaciones de bioimagen.

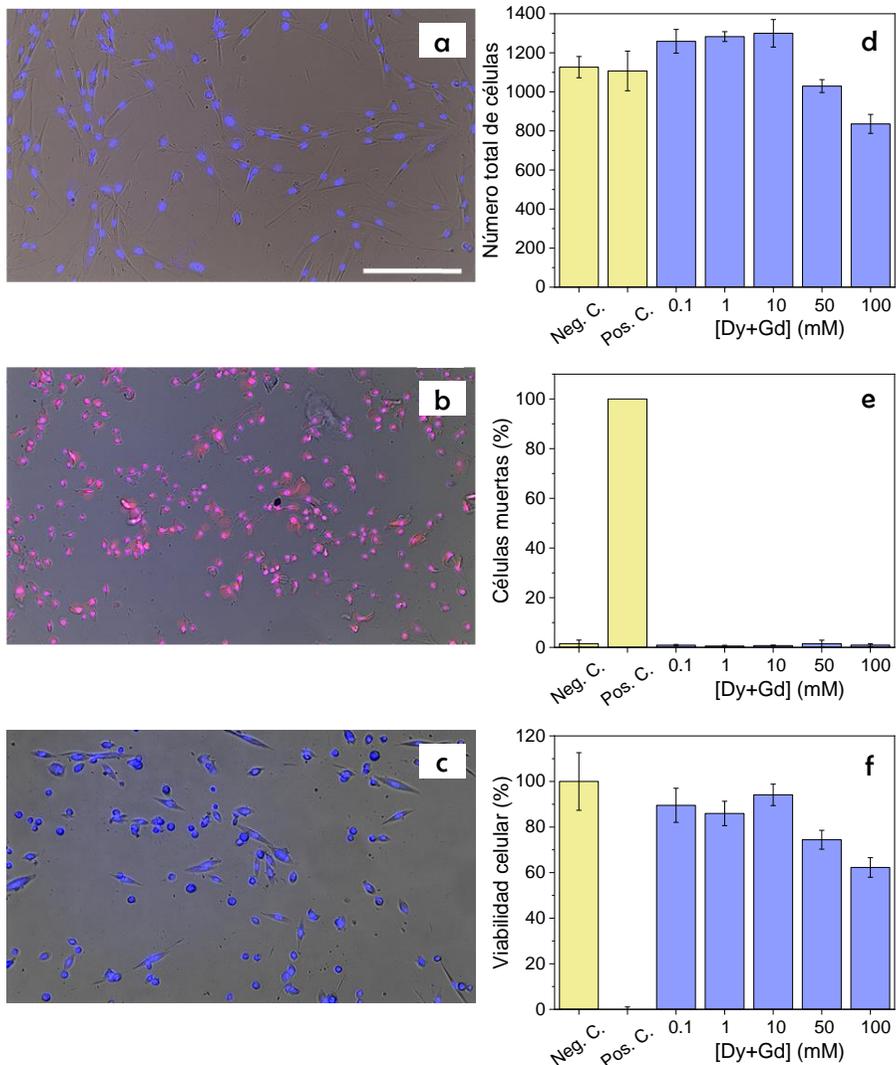


Figura 14. Ensayos de citotoxicidad para la muestra Dy@Gd: Imágenes de microscopía óptica de fibroblastos HFF-1 resultantes de la fusión de imágenes de campo claro (gris), con tinción DAPI (azul) y tinción TO-PRO-3 (rojo): a) control negativo, b) control positivo, c) células expuestas a 100 µg/ml de Dy³⁺+Gd³⁺. La barra de escala corresponde a 50 µm. Número total de células por pocillo (d), porcentaje de células muertas (e) y ensayo MTT (f) de células expuestas a concentraciones crecientes de NPs.

4.7. Conclusiones

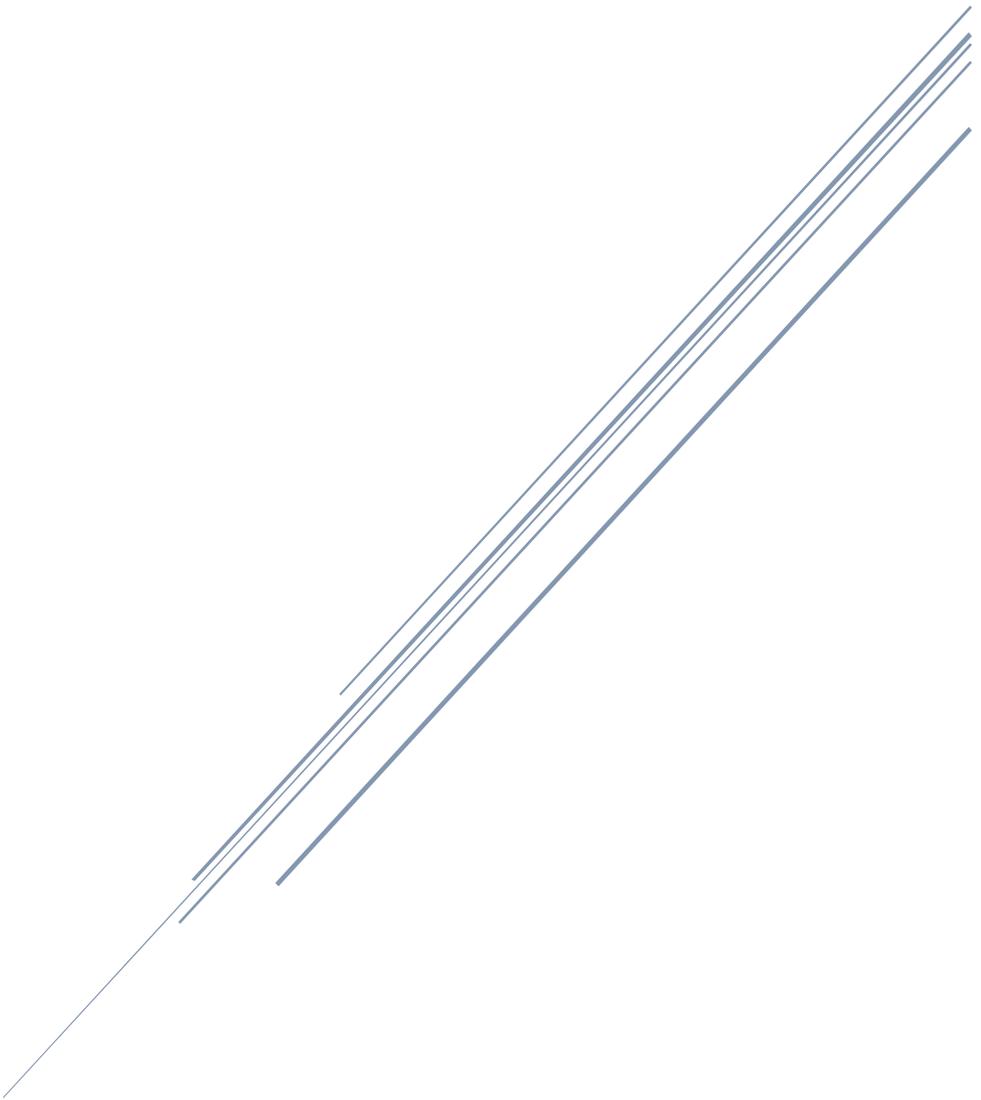
1. Mediante métodos de precipitación homogénea en medio poliol, se han sintetizado nanopartículas uniformes con tamaño medio de 36 nm basadas en vanadato de Dy³⁺ y Gd³⁺ ambos incorporados mediante coprecipitación en una única fase, y también, nanopartículas con un tamaño medio de 55 nm y una arquitectura núcleo-corteza en las que el núcleo estaba constituido por DyVO₄ y la corteza por GdVO₄. Ambos tipos de nanopartículas presentaban una estructura cristalina tetragonal y pudieron ser funcionalizadas con ácido poliacrílico en el mismo proceso de síntesis.
2. Ambos tipos de nanopartículas presentan una relación $r_2/r_1 \approx 6$, a campo bajo magnético (1,44 T) y, por tanto, comprendida en el rango requerido ($1 < r_2/r_1 < 10$) para su uso como de agentes de contraste para MRI T₁-T₂. No obstante, gracias a la separación espacial de los iones Dy³⁺ y Gd³⁺, los valores de relajatividad de las nanopartículas núcleo-corteza son superiores, por lo que dicha arquitectura es más adecuada para este tipo de agentes de contraste.
3. Las nanopartículas núcleo-corteza pueden dispersarse fácilmente, tanto en agua como en PBS.
4. Las nanopartículas núcleo-corteza presentan una alta estabilidad química cuando se suspenden en PBS a 37 °C, al menos, durante 35 días.
5. Las nanopartículas núcleo-corteza no presentaron toxicidad apreciable para la línea celular de fibroblastos humanos HFF-1 a una concentración de (Dy³⁺+ Gd³⁺) ≤ 50 µg/mL.
6. Por su tamaño, dispersabilidad y estabilidad química en medio fisiológico, viabilidad celular y valores de relajatividad, las nanopartículas de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄ y funcionalizadas con ácido poliacrílico son adecuadas para su uso como de agentes de contraste para MRI T₁-T₂.

4.8. Bibliografía

1. J. Zhou, Z. G. Lu, G. G. Shan, S. H. Wang and Y. Liao, *Biomaterials*, 2014, **35**, 368-377.
2. X. Jin, F. Fang, J. Liu, C. Jiang, X. Han, Z. Song, J. Chen, G. Sun, H. Lei and L. Lu, *Nanoscale*, 2015, **7**, 15680-15688.
3. Y. Zhang, G. K. Das, V. Vijayaragavan, Q. C. Xu, P. Padmanabhan, K. K. Bhakoo, S. T. Selvan and T. T. Y. Tan, *Nanoscale*, 2014, **6**, 12609-12617.
4. J. Y. Huang, Y. Hou, C. Y. Liu, L. H. Jing, T. C. Ma, X. D. Sun and M. Y. Gao, *Chemistry of Materials*, 2015, **27**, 7918-7925.
5. R. D. Shannon and C. T. Prewitt, *Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1969, **B 25**, 925-&.
6. T. Tegafaw, S. Liu, M. Y. Ahmad, A. Saidi, D. Zhao, Y. Liu, S. W. Nam, Y. Chang and G. H. Lee, *Pharmaceutics*, 2023, **15**, 1745.
7. S. Sanchez-Cabezas, R. Montes-Robles, J. Gallo, F. Sancenon and R. Martinez-Manez, *Dalton Transactions*, 2019, **48**, 3883-3892.
8. N. Guldris, B. Argibay, Y. V. Kolen'ko, E. Carbo-Argibay, T. Sobrino, F. Campos, L. M. Salonen, M. Banobre-Lopez, J. Castillo and J. Rivas, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2016, **472**, 229-236.
9. S. Caspani, R. Magalhaes, J. P. Araujo and C. T. Sousa, *Materials*, 2020, **13**, 2586.
10. M. J. Molaei, *Scientific Reports*, 2022, **12**, 17681.
11. UNE-EN ISO 10993-5:2009: Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. <https://www.aenor.com/>.

CAPÍTULO V

SONDAS BIMODALES PARA IMAGEN POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE ALTO CAMPO Y LUMINISCENTES EN EL INFRARROJO CERCANO



5.1. Introducción

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos sobre el desarrollo de sondas multimodales para la obtención de imágenes mediante MRI a alto campo basadas en Dy^{3+} y mediante luminiscencia en el NIR usando cationes Nd^{3+} como centros emisores. Hay que mencionar que, para obtener una luminiscencia intensa, los cationes Nd^{3+} deben diluirse en una matriz huésped mediante dopado para evitar el conocido proceso de desactivación de luminiscencia por concentración.¹ En este estudio se ha usado un nivel de dopado $\approx 2\%$ (molar), ya que, según se ha reportado para NPs de diversa composición dopadas con este catión, con esta concentración de Nd^{3+} se consigue una luminiscencia óptima.²⁻⁴

En la bibliografía pueden encontrarse diversas sondas multimodales en las que se combina el uso de dichos cationes en matrices tipo fluoruro,^{5,6} las cuales no son las más adecuadas para su empleo en biomedicina por su solubilidad en medio acuoso y su consiguiente efecto tóxico ya discutido en la Sección 1.2.1. del Capítulo I. Por ello, en este estudio se ha propuesto como alternativa el empleo de una matriz de vanadato que, como se ha demostrado en la Sección 3.4. del Capítulo III, es más estable químicamente que los fluoruros presentando, además, las NPs de DyVO_4 desarrolladas valores muy altos de relajatividad transversal a alto campo. Una ventaja adicional de esta elección es la simplicidad del procedimiento de síntesis y funcionalización con PAA de dichas NPs mediante un proceso *one-pot*.

La arquitectura más simple para este tipo de sondas consiste en incorporar los iones Nd^{3+} en forma de disolución sólida a NPs de DyVO_4 por dopado (Fig. 1a). No obstante, se ha reportado que cuando los cationes Nd^{3+} y Dy^{3+} están localizados en posiciones cercanas de la red cristalina en la que están incorporados, una vez excitados los primeros, puede producirse una transferencia de energía desde estos a los cationes Dy^{3+} que resultaría en una desactivación de la luminiscencia del Nd^{3+} .⁷ Cuando esto sucede, pueden diseñarse arquitecturas basadas en NPs núcleo-corteza en la que los iones

emisores (Nd^{3+}) y los iones desactivadores (Dy^{3+}) se incorporan separadamente, bien en el núcleo o en la corteza (Fig. 1b y c), lo cual minimizaría dicho proceso de desactivación.⁷ Hay que hacer notar, además, que la separación entre ambos tipos de cationes (Dy^{3+} y Nd^{3+}) podría aumentarse aún más introduciendo una capa inactiva entre las dos fases activas (magnética y luminiscente) localizadas en el núcleo y la corteza (Fig. 1d y e).⁸

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se decidió abordar en este estudio todas las arquitecturas mencionadas anteriormente (Fig. 1) con objeto de obtener sondas bimodales con propiedades luminiscentes óptimas. En las arquitecturas núcleo-corteza, se eligió LaVO_4 como matriz huésped para albergar a los iones Nd^{3+} , ya que se trata de una matriz similar en composición a la del componente magnético (DyVO_4) y, además, el La^{3+} presenta un radio iónico (1,3 Å en coordinación VIII)⁹ próximo al del Nd^{3+} (1,25 Å en coordinación VIII),⁹ lo cual facilita el proceso de dopado. Como capa inactiva, se empleó LaVO_4 sin dopar, también por un motivo de similitud en composición con la fase corteza.

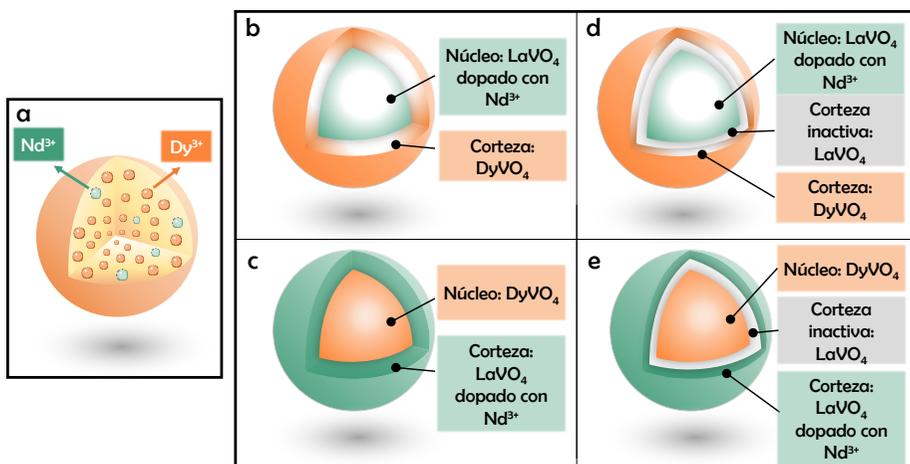


Figura 1. Esquema ilustrativo de las distintas arquitecturas propuestas: a) NPs de DyVO_4 dopado con Nd^{3+} , b) NPs de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} recubiertas con DyVO_4 , c) NPs de DyVO_4 recubiertas con LaVO_4 dopado con Nd^{3+} , d) NPs de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} recubiertas con una primera capa de LaVO_4 y una segunda de DyVO_4 y e) NPs de DyVO_4 recubiertas con una primera capa de LaVO_4 y una segunda de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} .

5.2. Síntesis y caracterización

5.2.1. Nanopartículas de DyVO₄ dopado con Nd³⁺

La síntesis de NPs uniformes de fase única de DyVO₄ dopado con Nd³⁺ (Fig. 1a), se llevó a cabo utilizando el protocolo descrito en la Sección 3.2.2. del Capítulo III para el caso de las NPs de vanadato de disprosio, pero introduciendo Nd(OAc)₃ ($4 \cdot 10^{-4}$ M) ($\text{Nd}^{3+}/(\text{Dy}^{3+}+\text{Nd}^{3+}) = 2\%$) junto con el precursor de Dy³⁺ en la disolución de partida y, manteniendo constante la concentración total de cationes lantánidos (0,02 M).

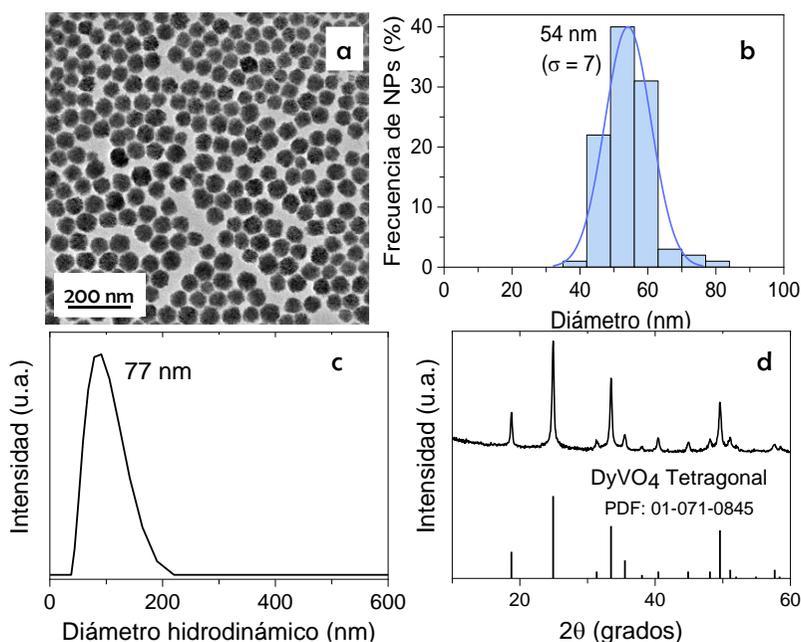


Figura 2. Micrografía TEM (a), histograma de tamaño de partícula (b), curva DLS y diámetro hidrodinámico medidos en suspensión acuosa (c) y diagrama de DRX (d) de la muestra constituida por NPs de DyVO₄ dopado con Nd³⁺. En (d) también se incluye el patrón de la fase tetragonal de DyVO₄ (PDF: 01-076-2476).

En la Fig. 2a se ilustran las NPs obtenidas, las cuales presentaban una forma esférica y un diámetro medio de 54 nm con una distribución de tamaños estrecha ($\sigma = 7$) (Fig. 2b). Este valor de diámetro medio era sólo ligeramente inferior al valor de Dh (77 nm) de estas NPs en suspensión acuosa a pH nativo (7,4) (Fig. 2c), lo cual indica ausencia de agregación. En la Fig. 2d se presenta

el diagrama de DRX obtenido para esta muestra, el cual es compatible con el patrón correspondiente a la fase tetragonal del DyVO_4 (PDF: 01-071-0845).

Por último, mediante análisis ICP, se confirmó la incorporación de los cationes Nd^{3+} a las partículas de DyVO_4 , ya que la relación molar $\text{Nd}^{3+}/(\text{Nd}^{3+} + \text{Dy}^{3+})$ obtenida (2,6 %) era similar al valor nominal (2 %). En adelante, esta muestra se denominará Nd:DyVO_4 .

5.2.2. Nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza

Nanopartículas de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} y recubiertas con una corteza de DyVO_4 . En primer lugar, se procedió a sintetizar los núcleos de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} . Para ello, se utilizó un método de reacción de precipitación homogénea previamente reportado¹⁰ que implicaba el envejecimiento a 120 °C durante 20 h de disoluciones que contenían $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (0,0098 M), $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$ ($2 \cdot 10^{-4}$ M) ($\text{Nd}^{3+}/(\text{La}^{3+} + \text{Nd}^{3+}) = 2\%$), PAA ($6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y Na_3VO_4 (0,1 M), utilizando como disolvente una mezcla constituida por 3,5 mL de EG y 1,5 mL de H_2O .¹¹

En la Fig. 3a y b puede observarse que las NPs obtenidas presentaban una forma ovoidal y un tamaño medio de $73 (\sigma = 13) \times 49 (\sigma = 9)$ nm. El valor de Dh de estas NPs en suspensión acuosa a pH nativo (6,4) era similar (80 nm) (Fig. 3c) a dicho tamaño medio, indicando su carácter disperso. En la Fig. 3d se presenta el diagrama de difracción de rayos X de esta muestra que consiste en un conjunto de reflexiones compatibles con el patrón correspondiente a la fase monoclinica de LaVO_4 (PDF: 00-050-0367).

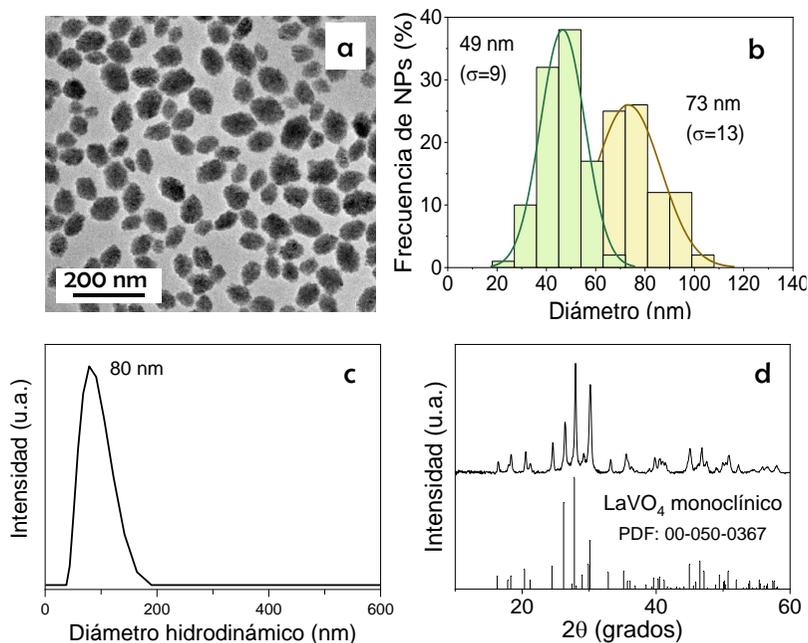


Figura 3. Micrografía TEM (a), histograma de tamaño de partícula (b), curva DLS y diámetro hidrodinámico medidos en suspensión acuosa (c) y diagrama de DRX (d) de la muestra constituida por NPs de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} . En (d) también se incluye el patrón de la fase monoclinica de LaVO_4 (PDF: 00-050-0367).

Estas NPs presentaron un contenido en Nd^{3+} (relación molar $\text{Nd}^{3+}/(\text{Nd}^{3+}+\text{La}^{3+}) = 2,5\%$) similar al valor nominal (2%), según se determinó mediante ICP, confirmando la incorporación cuantitativa de los cationes dopantes a las NPs. A partir de aquí, esta muestra se denominará $\text{Nd}:\text{LaVO}_4$.

Para el proceso de recubrimiento con una corteza de DyVO_4 , 15 mg de las NPs que constituían la muestra $\text{Nd}:\text{LaVO}_4$ se dispersaron en una disolución que contenía $\text{Dy}(\text{OAc})_3$ (0,02 M), Na_3VO_4 (0,1 M) y PAA (2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) utilizando como disolvente una mezcla constituida por 3,5 mL de EG y 1,5 mL de H_2O . La dispersión resultante se envejeció en un horno convencional precalentado a 120 °C durante 20 h.

Este método de recubrimiento dio lugar a NPs con forma similar a las del material del núcleo (Fig. 4a) con un eje corto medio también similar (52 nm) pero un eje largo medio ligeramente más corto (66 nm) siendo la distribución de tamaños estrecha ($\sigma = 10$ para eje corto y $\sigma = 14$ para el eje

largo) (Fig. 4b). Por otra parte, las NPs en suspensión acuosa (pH = 6,1) exhibían un valor de Dh (Fig. 4c) similar (85 nm) a su tamaño medio, lo que indica un alto grado de dispersión de las mismas.

La precipitación de la fase DyVO_4 fue confirmada mediante el diagrama de DRX de las NPs obtenidas tras el proceso de recubrimiento, en el cual se observaban las reflexiones del DyVO_4 tetragonal junto con las del LaVO_4 monoclinico correspondientes a los núcleos (Fig. 4d).

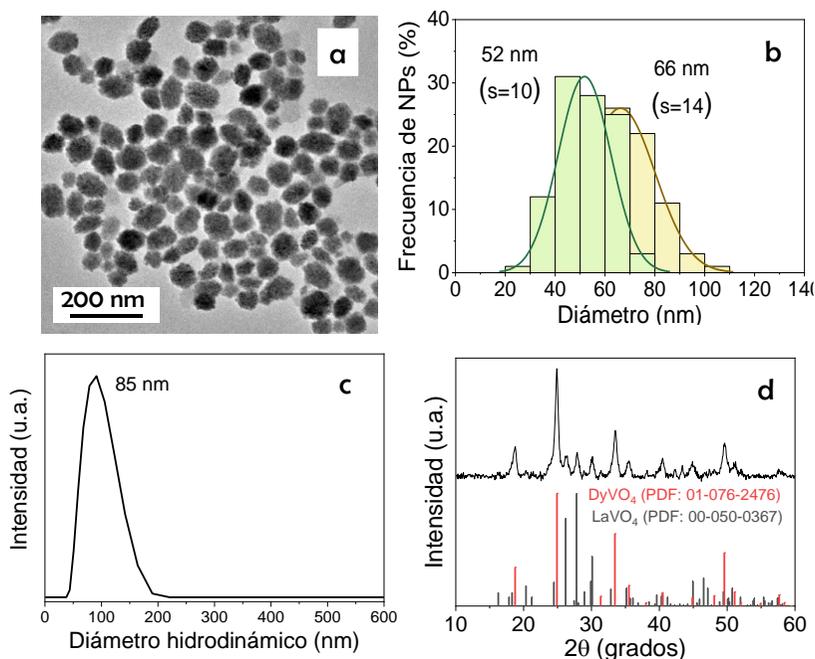


Figura 4. Micrografía TEM (a), histograma de tamaño de partícula (b), curva DLS y diámetro hidrodinámico medidos en suspensión acuosa (c) y diagrama de DRX (d) de la muestra obtenida tras el proceso de recubrimiento de NPs de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} con una corteza de DyVO_4 . En (d) también se incluyen los patrones de la fase tetragonal de DyVO_4 (PDF:01-076-2476) y de la fase monoclinica de LaVO_4 (PDF: 00-050-0367).

No obstante, los mapas de composición obtenidos por EDS para esta muestra (Fig. 5) revelaron claramente la presencia de dos tipos de NPs, unas que contenían sólo cationes Dy^{3+} y otras que contenían cationes Dy^{3+} y La^{3+} . Esta observación indica que, además de la precipitación de la corteza de DyVO_4 sobre los núcleos de $\text{Nd}:\text{LaVO}_4$ deseada, se produjo un proceso de nucleación homogénea de DyVO_4 . Este comportamiento podría deberse a las diferentes

estructuras cristalinas de las dos fases implicadas (LaVO_4 monoclinico y DyVO_4 tetragonal) que dificultaría el proceso de nucleación heterogénea de la fase corteza sobre la superficie de los núcleos.¹² Por tanto, esta arquitectura se descartó para estudios posteriores y se abordó la arquitectura opuesta, es decir, la constituida por NPs de DyVO_4 recubiertas con LaVO_4 dopado con Nd^{3+} (Fig. 1c).

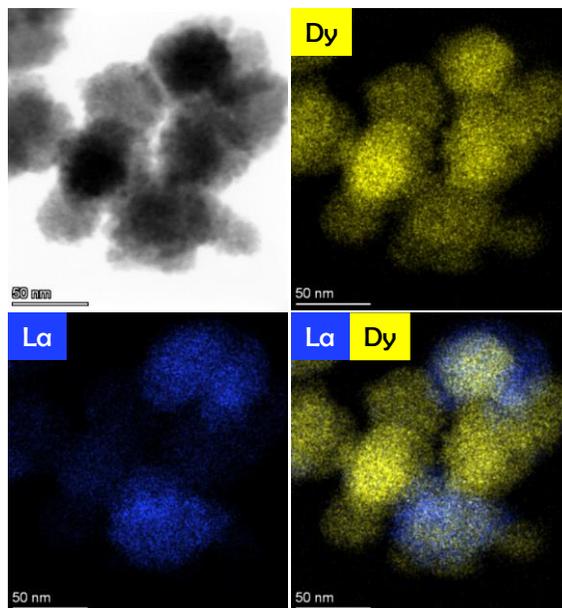


Figura 5. Micrografía STEM (parte superior izquierda) y mapas composicionales obtenidos mediante EDS de La y Dy tras el recubrimiento de las NPs de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} con DyVO_4 .

Nanopartículas de DyVO_4 recubiertas con una corteza de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} Siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 3.2.2. del Capítulo III, se sintetizaron NPs de DyVO_4 con forma esférica y tamaño de 67 nm para ser utilizadas como núcleos en la síntesis de NPs con arquitectura núcleo-corteza (Fig. 1c). Para su recubrimiento con LaVO_4 dopado con Nd^{3+} , se dispersaron 15 mg de estos núcleos en una disolución que contenía $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ (0,0098 M), $\text{Nd}(\text{NO}_3)_3$ ($2 \cdot 10^{-4}$ M) ($\text{Nd}^{3+}/(\text{La}^{3+}+\text{Nd}^{3+}) = 2\%$), Na_3VO_4 (0,1 M) y PAA ($6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) utilizando como disolvente una mezcla constituida por 3,5 mL de EG y 1,5 mL de H_2O . La dispersión resultante se envejeció en un horno convencional precalentado a 120°C durante 20 h.

Este proceso de recubrimiento dio lugar a NPs con forma ovoidal (Fig. 6a) y, por tanto, distinta a la esférica de los núcleos de partida, y con un mayor tamaño (eje más largo = 81 nm, $\sigma = 11$, y eje más corto = 57 nm, $\sigma = 8$) (Fig. 6b). Este tamaño era muy similar al valor del Dh (85 nm) de las NPs en suspensión acuosa (pH nativo = 6,2) (Fig. 6c) indicando la ausencia de agregación.

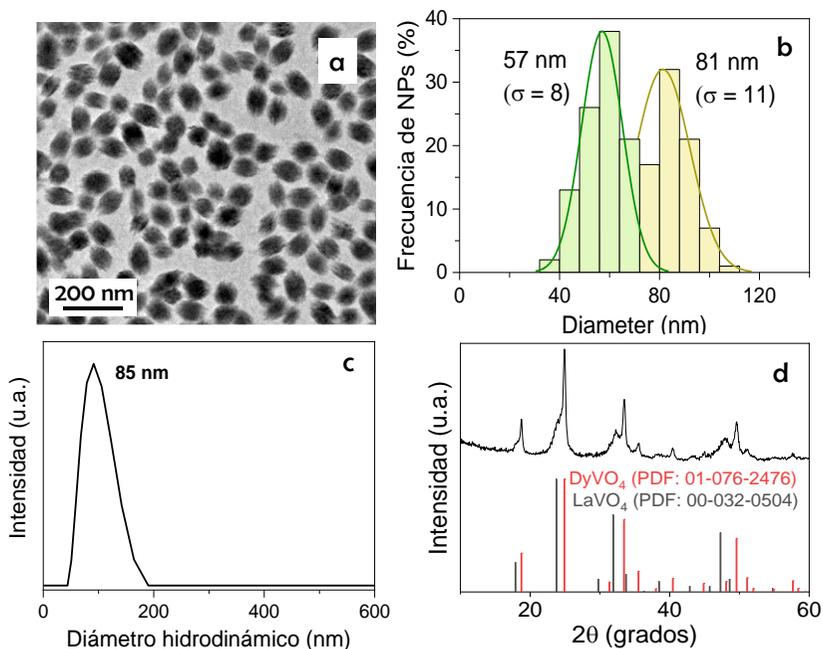


Figura 6. Micrografía TEM (a), histograma de tamaño de partícula (b), curva DLS y diámetro hidrodinámico medidos en suspensión acuosa (c) y diagrama de DRX (d) de la muestra constituida por NPs de DyVO₄ recubiertas con una corteza de LaVO₄ dopado con Nd³⁺. En (d) también se incluyen los patrones de la fase tetragonal de DyVO₄ (PDF: 01-076-2476) y de la fase tetragonal de LaVO₄ (PDF: 00-032-0504).

El aumento de tamaño observado sugiere el éxito del proceso de recubrimiento que fue confirmado mediante mapas EDS de composición. Así, los mapas obtenidos para todas las partículas indicaron claramente que el Dy se localizaba en el núcleo de las NPs y el La en la capa externa, como se ilustra en la Fig. 7 para el caso de una de dichas partículas.

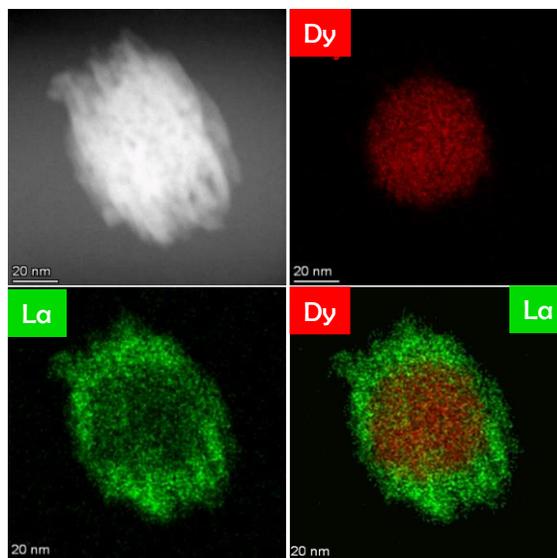


Figura 7. Micrografía STEM (parte superior izquierda) y mapas composicionales de La y Dy obtenidos mediante EDS tras el recubrimiento de las NPs de DyVO_4 con LaVO_4 dopado con Nd^{3+} .

En este caso, el diagrama de DRX de la muestra recubierta presentaba las reflexiones correspondientes a los núcleos de DyVO_4 tetragonal junto con otras consistentes con LaVO_4 con una estructura tetragonal (Fig. 6d) diferente de la fase monoclinica observada para las NPs utilizadas como núcleos en la arquitectura descrita anteriormente. Debe tenerse en cuenta que, aunque la estructura monoclinica es la más común del LaVO_4 , también puede precipitar LaVO_4 tetragonal bajo ciertas condiciones experimentales.¹³ Por tanto, para las NPs sintetizadas, los resultados apuntan a que la fase tetragonal de los núcleos de DyVO_4 promovió la cristalización de Nd:LaVO_4 tetragonal, en lugar de la fase monoclinica, favoreciendo esta similitud de estructuras cristalinas la nucleación heterogénea de Nd:LaVO_4 sobre los núcleos de DyVO_4 .

Finalmente, mediante ICP se determinó la composición química de estas NPs, obteniéndose una relación molar $\text{Dy}^{3+}/\text{La}^{3+}$ muy similar (1,03) a la relación nominal ($\text{Dy}^{3+}/\text{La}^{3+} = 1$) indicando la precipitación estequiométrica de la fase corteza. Por otro lado, el contenido en Nd^{3+} era también similar ($\text{Nd}^{3+}/(\text{La}^{3+}+\text{Nd}^{3+}) = 2,6 \%$) al contenido nominal ($\text{Nd}^{3+}/(\text{La}^{3+}+\text{Nd}^{3+}) = 2 \%$), confirmando la incorporación de los cationes Nd^{3+} a la red de LaVO_4 . En

adelante, esta muestra constituida por NPs de DyVO₄ recubiertas de una capa de LaVO₄ dopado con Nd³⁺, se denominará Dy@Nd:La.

Nanopartículas de DyVO₄ recubiertas con corteza inactiva de LaVO₄ y una corteza exterior de LaVO₄ dopada con Nd³⁺. Para incorporar una corteza intermedia inactiva de LaVO₄ en la arquitectura núcleo-corteza anteriormente descrita (Dy@Nd:La), las NPs de DyVO₄ se recubrieron en primer lugar con una capa de LaVO₄ siguiendo el protocolo utilizado para la síntesis de dicha muestra descrito en la sección anterior, pero en ausencia de cationes Nd³⁺. Posteriormente, las NPs resultantes (30 mg) se dispersaron en una disolución que contenía La(NO₃)₃ (0,0098 M), Nd(NO₃)₃ (2·10⁻⁴ M) (relación molar Nd³⁺/(La³⁺+Nd³⁺) = 2%), Na₃VO₄ (0,1 M) y PAA (6 mg·mL⁻¹) utilizando como disolvente una mezcla constituida por 3,5 mL de EG y 1,5 mL de H₂O. La dispersión resultante se envejeció en un horno convencional precalentado a 120 °C durante 20 h.

Las NPs obtenidas tras los dos procesos de recubrimiento consecutivos tenían una forma similar (Fig. 8a) a la de la muestra con una única corteza (Dy@Nd:La), pero con un tamaño medio (eje largo de 92, $\sigma = 9$, y eje corto de 62 nm, $\sigma = 8$) (Fig. 8b) y un valor de Dh en medio acuoso (110 nm a pH = 6,4) (Fig. 8c) superiores. Este aumento de tamaño sugiere la presencia de la capa intermedia, que también fue observada mediante DRX (Fig. 8d) dado que la intensidad de las reflexiones de LaVO₄ en la muestra con la doble corteza fue mayor que en la muestra sin la capa intermedia de LaVO₄. De acuerdo con esta observación, la relación molar Dy³⁺/La³⁺ obtenida mediante ICP fue notablemente inferior (0,60) a la obtenida para las NPs con una única corteza (1) indicando una mayor cantidad de fase LaVO₄. Respecto al contenido en Nd³⁺, mediante análisis por ICP se obtuvo una relación Nd³⁺/(La³⁺+Nd³⁺) = 1,4 %, que es inferior a la determinada para la muestra con una única corteza (muestra Dy@Nd:La) (Nd³⁺/(La³⁺+Nd³⁺) = 2,6 %), a pesar de que el contenido nominal en la corteza luminiscente era similar en ambos tipos de NPs (2 %). Ello se explica porque a la cantidad de La obtenida en la muestra con doble

corteza contribuye tanto el La^{3+} procedente de la capa intermedia inactiva como de la capa más externa luminiscente.

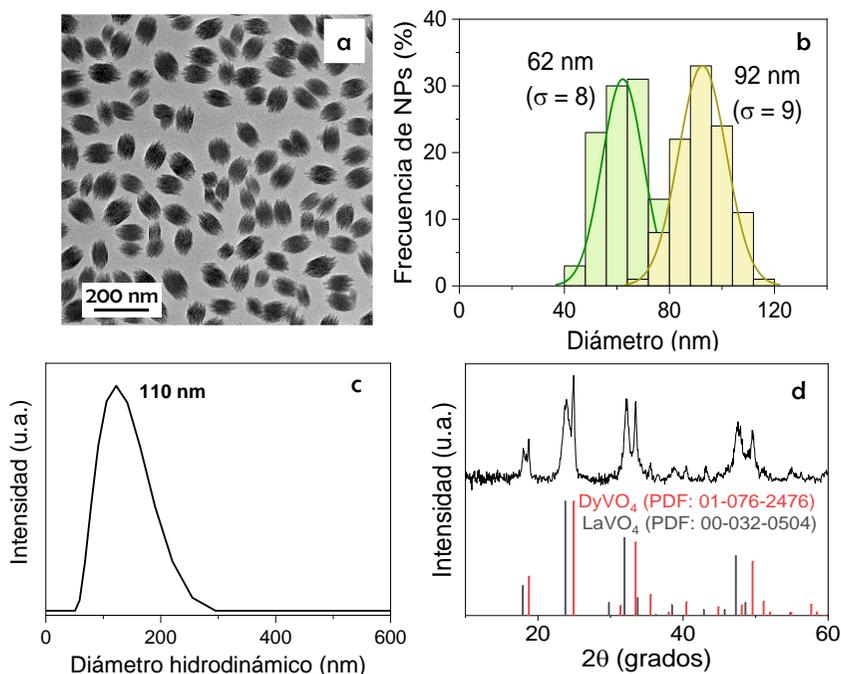


Figura 8. Micrografía TEM (a), histograma de tamaño de partícula (b), curva DLS y diámetro hidrodinámico medidos en suspensión acuosa (c) y diagrama de DRX (d) de la muestra constituida por NPs de DyVO_4 recubiertas con una primera corteza de LaVO_4 y posteriormente con otra corteza de LaVO_4 dopada con Nd^{3+} . En (d) también se incluyen los patrones la fase tetragonal de DyVO_4 (PDF:01-076-2476) y de la fase tetragonal de LaVO_4 (PDF: 00-032-0504).

Finalmente, los mapas de composición por EDS obtenidos confirmaron la formación de la arquitectura núcleo-corteza, puesto que mostraron claramente que el Dy se localizaba en el núcleo y el La en las capas externas. (Fig. 9).

A partir de aquí, la muestra constituida por NPs de DyVO_4 recubiertas con una doble corteza de LaVO_4 (estando dopada la capa más externa con iones Nd^{3+}) se denominará Dy@La@Nd:La .

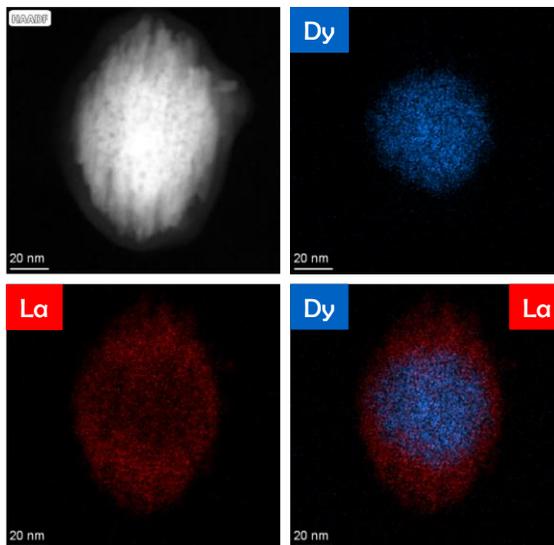


Figura 9. Micrografía STEM (parte superior izquierda) y mapas composicionales de La y Dy obtenidos mediante EDS tras el recubrimiento de las NPs de DyVO_4 con una corteza inactiva de LaVO_4 y una corteza exterior de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} .

5.3. Propiedades luminiscentes

Con objeto de analizar el efecto de las diferentes arquitecturas sintetizadas sobre las propiedades luminiscentes de las NPs núcleo-corteza, se registró en primer lugar, el espectro de emisión de la muestra Nd:DyVO_4 usando una longitud de onda de excitación de 806 nm que corresponde a la excitación óptima de este sistema.¹⁴ Tal y como puede observarse en la Fig. 10, no se obtuvo una emisión luminiscente apreciable. Ello se explicaría por la presencia de procesos de desactivación de la luminiscencia de los cationes Nd^{3+} producida como consecuencia de la transferencia de energía entre los iones Nd^{3+} (en estado excitado) y Dy^{3+} (proceso de relajación cruzada) que se encuentran situados en posiciones cercanas de la red cristalina del DyVO_4 .¹⁵ Por tanto, esta arquitectura no es adecuada para la obtención de NPs con funcionalidad luminiscente.

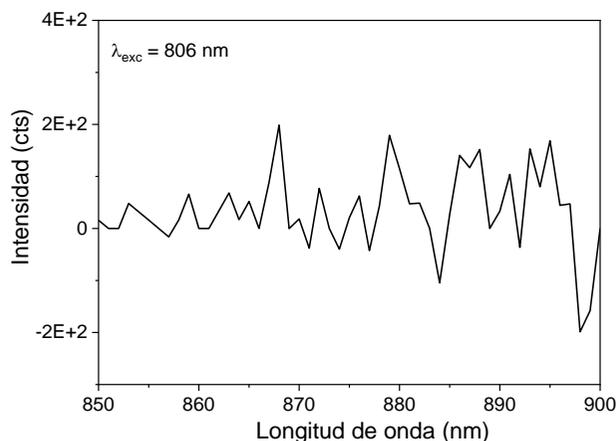


Figura 10. Espectro de emisión de las NPs que constituyen la muestra Nd:DyVO₄ obtenido mediante excitación con una $\lambda_{exc} = 806$ nm.

A continuación se analizaron comparativamente las propiedades luminiscentes correspondientes a las muestras Dy@Nd:La y Dy@La@Nd:La para dilucidar el papel desempeñado por la capa intermedia de LaVO₄ en la intensidad de la luminiscencia.

La Fig. 11a presenta el espectro de excitación de la muestra Dy@Nd:La obtenido en la región NIR al monitorizar la emisión característica del Nd³⁺ a $\lambda_{em} = 877$ nm. En dicho espectro se observan varios conjuntos de bandas estrechas correspondientes a la excitación directa de los iones Nd³⁺ desde el nivel fundamental $^4I_{9/2}$ a estados excitados superiores.¹⁶ El espectro de excitación de la muestra Dy@La@Nd:La es cualitativamente idéntico al obtenido para la muestra Dy@Nd:La. En estos espectros se confirma que la banda de excitación más intensa aparece a una longitud de onda de 806 nm que corresponde a la transición $^4I_{9/2} \rightarrow ^4F_{5/2}, ^2H_{9/2}$ del Nd³⁺.

El espectro de emisión de la muestra sin capa intermedia de LaVO₄ (Dy@Nd:La) registrado excitando a dicha longitud de onda (Fig. 11a, línea azul) exhibía tres conjuntos de bandas correspondientes a las transiciones electrónicas desde el nivel de energía $^4F_{3/2}$ del Nd³⁺ a estados energéticos inferiores, indicadas en la Figura 11a. Este perfil de emisión coincide con el descrito en la bibliografía para LaVO₄ dopado con Nd³⁺.¹⁷

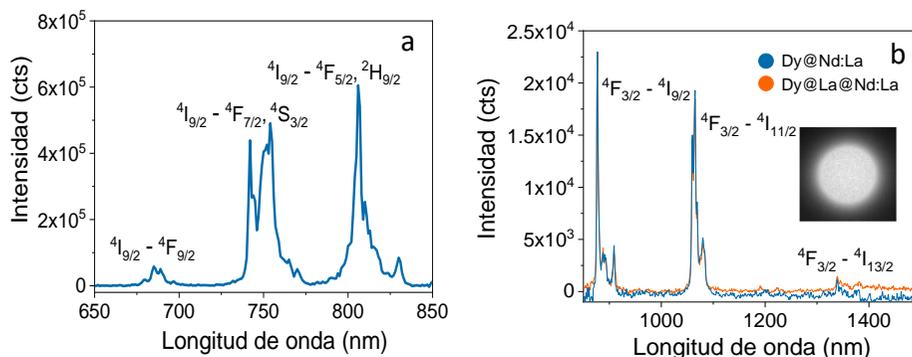


Figura 11. a) Espectro de excitación de la muestra Dy@Nd:La monitorizado a una longitud de onda de emisión de 877 nm. b) Espectro de emisión de las muestras Dy@Nd:La (azul) y Dy@La@Nd:La (naranja) excitadas a una longitud de onda de 806 nm. La fotografía insertada ha sido tomada usando una cámara NIR para la muestra Dy@La@Nd:La iluminada con una longitud de onda de 806 nm.

En el caso de la muestra una capa intermedia de LaVO_4 (Dy@La@Nd:La) incorporada, la intensidad de las bandas de emisión era muy similar al de la muestra sin capa intermedia (Dy@Nd:La) (Fig. 11b, línea naranja), lo que, en principio, podría sugerir que la presencia de la capa intermedia de LaVO_4 no tiene efecto sobre las propiedades luminiscentes del Nd^{3+} . Sin embargo, hay que tener en cuenta que en ambos espectros se registraron en suspensiones acuosas que contenían la misma concentración másica de NPs y que el contenido en Nd^{3+} (relación molar $\text{Nd}^{3+}/(\text{La}^{3+}+\text{Nd}^{3+})$) es mayor para la muestra Dy@Nd:La (2,6 %) que para la muestra Dy@La@Nd:La (1,4 %), de acuerdo con las medidas ICP. Por tanto, se puede concluir que la capa inactiva intermedia contribuyó positivamente a la emisión de Nd^{3+} , ya que ambas muestras mostraron la misma intensidad de emisión a pesar de que la última tenía un menor contenido de centros emisores. Ello fue confirmado por las curvas de decaimiento de la emisión de Nd^{3+} registradas en ambos casos (Fig. 12) para la banda de emisión más intensa (877 nm), correspondiente a la transición $4\text{F}_{3/2} \rightarrow 4\text{I}_{9/2}$, con una longitud de onda de excitación de 806 nm. Ambas curvas pudieron ser ajustadas a un decaimiento biexponencial según la Ecuación 6 (Capítulo II, Sección 2.5.2). Este comportamiento es típico de muestras constituidas por NPs luminiscentes basadas en compuestos de elementos lantánidos.¹⁸⁻²⁰ En estos materiales, el

componente de tiempo más largo se asocia a los iones lantánidos situados en el interior de las NPs y el componente más corto a los iones situados cerca de la superficie de las NPs, cuya luminiscencia se ve afectada por procesos de desactivación (interacción entre los fotones absorbidos y los fonones de moléculas de disolvente o moléculas de ligandos adsorbidas superficialmente).

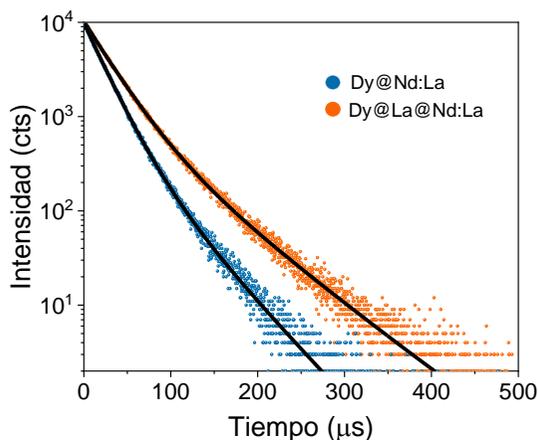


Figura 12. Curvas de decaimiento que corresponden a la transición ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ de las NPs Dy@Nd:La (azul) y Dy@La@Nd:La (naranja); y las líneas negras corresponden al ajuste biexponencial.

En la Tabla 1 se indican los parámetros de ajuste correspondientes junto con los tiempos de vida promedio, $\langle \tau \rangle$, dados por la Ecuación 7 (indicada en la Sección 2.6.2 del Capítulo II).

Como puede observarse, tanto las componentes cortas como las componentes largas, y por tanto los tiempos de vida promedio, son mayores para la muestra con una corteza intermedia de LaVO_4 (Dy@La@Nd:La) que en ausencia de dicha corteza (Dy@Nd:La). Ello indica que la emisión de la primera muestra es más eficiente, lo cual concuerda con la interpretación dada anteriormente y confirma el efecto positivo de la capa intermedia inactiva sobre las propiedades luminiscentes de las NPs sintetizadas. Esta mejora de las propiedades luminiscentes puede explicarse por la mayor separación entre los iones Nd^{3+} y Dy^{3+} inducida por la corteza intermedia de LaVO_4 , que minimiza los fenómenos de relajación cruzada Nd^{3+} - Dy^{3+} anteriormente mencionados.

Tabla 1: Parámetros del ajuste biexponencial de las curvas de decaimiento de luminiscencia de las muestras Dy@Nd:La y Dy@La@Nd:La registradas para la transición ${}^4F_{3/2} \rightarrow {}^4I_{9/2}$ del ion Nd^{3+} (error estimado = 5 %). τ_1 y τ_2 son los tiempos de vida media de los dos componentes de la luminiscencia con intensidades I_{01} e I_{02} , respectivamente y $\langle \tau \rangle$ es el tiempo de vida promedio.

Muestra	τ_1 (μs)	τ_2 (μs)	I_{01}	I_{02}	$\langle \tau \rangle$ (μs)
Dy@Nd:La	20,6	43,8	80,5	19,5	28,5
Dy@La@Nd:La	27,2	60,9	73,7	26,3	42,2

En la Fig. 11b se presenta una fotografía de la muestra Dy@La@Nd:La al ser excitada con una fuente láser pulsada sintonizable a una longitud de onda de 806 nm que fue tomada con una cámara NIR equipada con un detector InGaAs. En ella, puede observarse la intensa emisión que presenta dicha muestra que la hace adecuada para la obtención de bioimágenes en el NIR, por lo que dicha muestra fue seleccionada para los estudios que se presentan a continuación.

5.4. Relajatividades magnéticas

En la Fig. 13a se presentan las imágenes *phantom* de resonancia magnética ponderadas en T_2 obtenidas a 9,4 T para dispersiones acuosas con diferente contenido de NPs correspondientes a la muestra Dy@La@Nd:La. Como se observa, se produjo un oscurecimiento progresivo de las imágenes al aumentar el contenido de NPs, lo que indica que dichas NPs se comportan como un agente de contraste negativo a alto campo magnético. La relajatividad transversal (r_2) asociada a estas NPs fue de $390,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fig. 13b), la cual es un valor superior al publicado en la bibliografía para este tipo de sondas multimodales basadas en Ln^{3+} ($< 240 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$),^{21, 22, 23} lo que representa una ventaja importante de la sonda desarrollada en este trabajo.

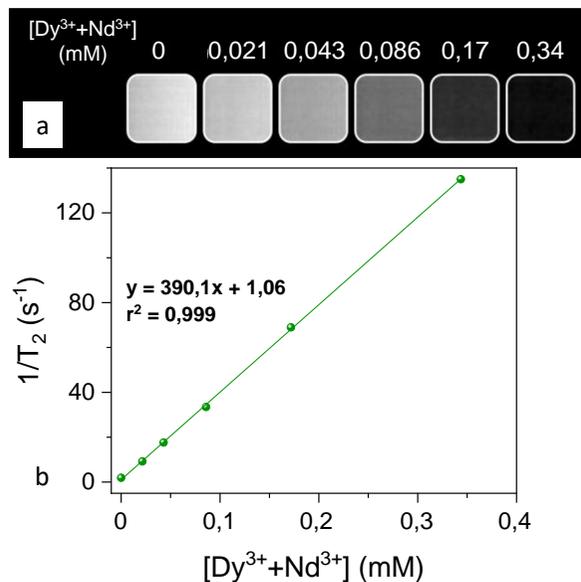


Figura 13. a) Imágenes *phantom* de resonancia magnética ponderadas en T_2 a un campo de 9,4 T de suspensiones acuosas con diferentes concentraciones (mM de $Dy^{3+}+Nd^{3+}$) de las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La. b) Velocidad de relajación transversal ($1/T_2$) frente a la concentración de ($Dy^{3+}+Nd^{3+}$) a 9,4 T.

5.5. Dispersabilidad

Para analizar la dispersabilidad de las NPs que constituían la muestra Dy@La@Nd:La en medio fisiológico se preparó una suspensión de dichas NPs en PBS. Como se observa en la Fig. 14, el valor de D_h obtenido mediante DLS para esta suspensión fue sólo ligeramente superior (175 nm) al diámetro medio de las NPs (92 x 62 nm), lo que indicó la ausencia de una agregación significativa de las NPs en este medio simulador de condiciones fisiológicas.

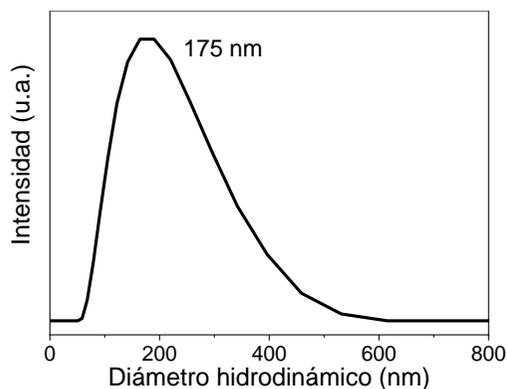


Figura 14. Diámetro hidrodinámico en medio PBS obtenido mediante DLS de las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La.

La dispersabilidad que presentan estas NPs puede atribuirse a la presencia de moléculas de PAA en la superficie de las NPs que se añadieron a las soluciones utilizadas en el procedimiento de síntesis que fue puesta de manifiesto mediante espectroscopía FTIR. Así, en el espectro de esta muestra (Fig. 15a), se detectaron bandas de absorción entre 1400 y 1600 cm^{-1} que son características de los modos vibracionales de tensión simétrico y asimétrico de los aniones carboxilato del PAA. La cantidad de especies de PAA se determinó mediante análisis TG (Fig. 15b) que mostró una pérdida de peso del 4,3 % en el intervalo 250-600 $^{\circ}\text{C}$ atribuida a la descomposición de las moléculas de este polímero adsorbidas sobre la superficie de las NPs.

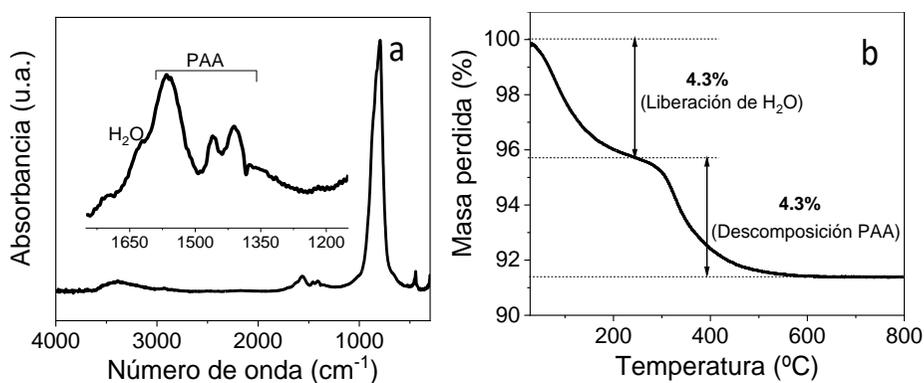


Figura 15. Espectro FTIR (a) y curva TG (b) de las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La.

Por tanto, las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La son dispersables en el medio simulador seleccionado de las condiciones fisiológicas, tal y como se requiere para su aplicación *in vivo*.

5.6. Estabilidad química

El estudio de estabilidad química de las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La se llevó a cabo envejeciendo una dispersión de dichas NPs en PBS a 37 $^{\circ}\text{C}$. Como se observa en la Fig. 16, no se produjeron cambios apreciables en las características morfológicas de las partículas, respecto a su estado inicial (Fig. 16a), tras cinco semanas de tratamiento (Fig. 16b), lo que sugiere una elevada estabilidad química de las mismas. Ello fue confirmado por

los análisis ICP del sobrenadante obtenido por centrifugación de dicha dispersión al cabo de 5 semanas, en el que sólo se detectó un 2,6 % del contenido inicial de vanadio, lo que indica la escasa disolución de estas NPs en el medio simulador de condiciones fisiológicas seleccionado.

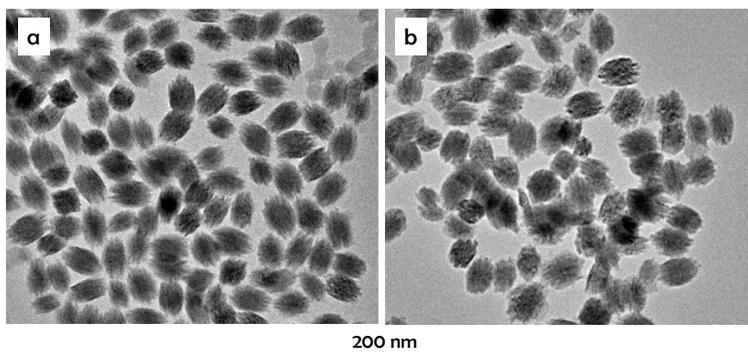


Figura 16. Micrografías TEM obtenidas para la muestra Dy@La@Nd:La antes (a) y después (b) de tratarlas durante 5 semanas en PBS a 37 °C.

5.7. Viabilidad celular

Los resultados de los ensayos vivo-muerto llevados a cabo para evaluar la viabilidad celular de la muestra Dy@La@Nd:La utilizando una línea celular de fibroblastos de prepucio humano (HFF-1) se presentan en las Figuras 17a-e. En ella puede observarse que, al fusionar las imágenes de microscopía de campo claro, con las de fluorescencia correspondientes a la tinción DAPI (azul, células vivas) y TO-PRO-3 (rojo, células muertas), no se detectaron evidencias de cambios en la morfología celular al exponer a las células a concentraciones de NPs $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ (referido al Dy^{3+}), pues todos los fibroblastos mantuvieron su típica forma elipsoidal (Fig. 17a-c).

Además, no se observaron variaciones sustanciales en el número total de células, ya que no se produjo una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en el número de células totales para ninguna de las concentraciones de Dy^{3+} ensayadas ($\leq 100 \mu\text{g/mL}$) (Fig. 17d), lo cual indica que se puede descartar la presencia de necrosis celular.

Asimismo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el porcentaje de células muertas cuando se exponen a las concentraciones ensayadas ($\text{Dy}^{3+} \leq 100 \mu\text{g/mL}$) y el correspondiente al control negativo (muerte celular), lo cual indica que no se produjo apoptosis celular (Fig. 17e).

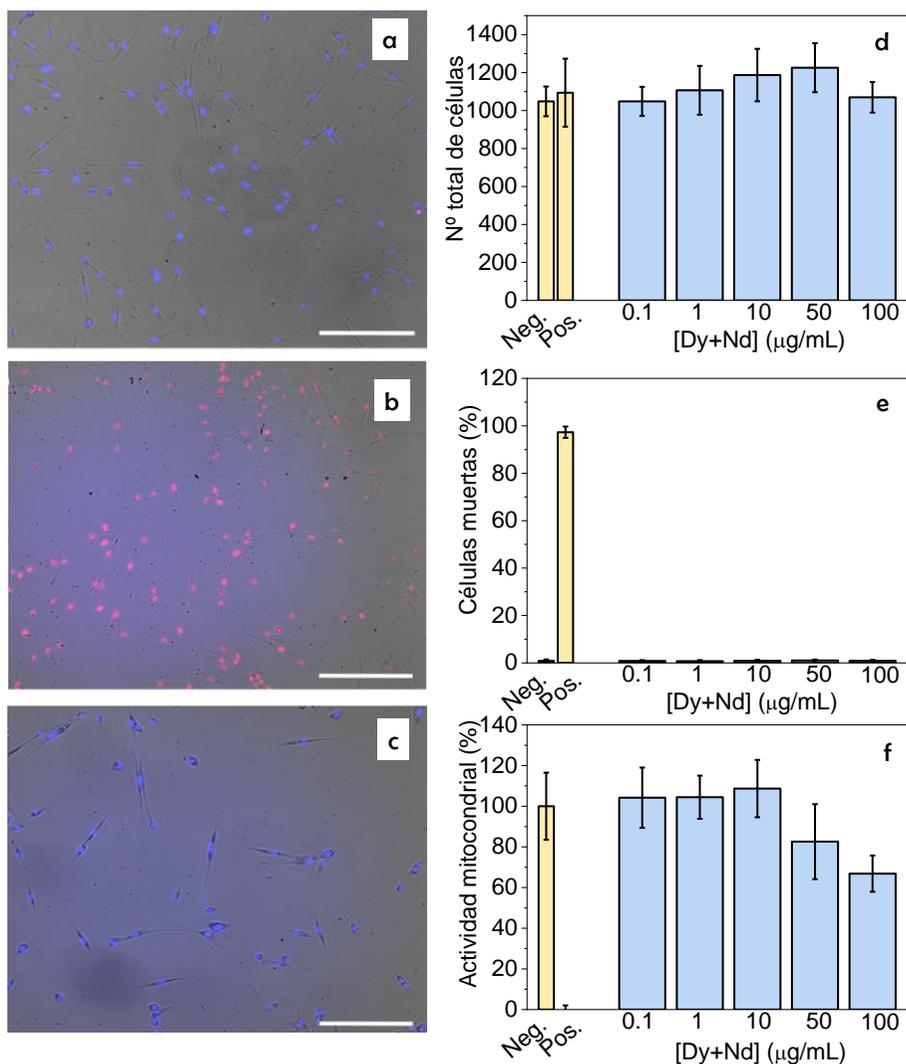


Figura 17. Ensayos de citotoxicidad para la muestra Dy@La@Nd:La: Imágenes de microscopía óptica de fibroblastos HFF-1 resultantes de la fusión de imágenes de campo claro (gris), con tinción DAPI (azul) y tinción TO-PRO-3 (rojo): a) control negativo, b) control positivo, c) células expuestas a 100 μg/ml de Dy. La barra de escala corresponde a 100 μm. Número total de células por pocillo (d), porcentaje de células muertas (e) y ensayo MTT (f) de células expuestas a concentraciones crecientes de NPs.

Por último, el ensayo MTT reveló una ligera disminución de la actividad mitocondrial, para la concentración más alta ensayada ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Fig. 17f), que indica cierta toxicidad para esta concentración de NPs, ya que se encuentra por debajo del 70 % que es el límite por debajo del cual se considera que las NPs son potencialmente citotóxicas (norma UNE-EN ISO 10993-5:2009)²⁴. No obstante, esta concentración es superior a la requerida para la aplicación *in vivo* de las mismas debido a la alta relajatividad de la muestra Dy@La@Nd:La, como se verá más adelante.

Por tanto, los resultados obtenidos de los ensayos vivo-muerto y MTT indican que estas NPs presentan una viabilidad celular adecuada para su uso en aplicaciones de bioimagen.

5.8. Obtención de imágenes

Para evaluar la potencialidad de la muestra Dy@La@Nd:La como sonda bimodal para la obtención de imágenes de resonancia magnética a 9,4 T y luminiscentes en el NIR, se llevó a cabo la administración intravenosa de una cierta cantidad de dicha muestra suspendida en PBS, correspondiente a una concentración de 10 mg Dy/kg animal, en ratones sanos y se adquirieron las imágenes correspondientes.

Como puede observarse en la Fig. 18, las imágenes obtenidas mediante MRI a alto campo ponderadas en T_2 , 1 h después de la inyección, presentaron un marcado oscurecimiento del hígado y del bazo, mientras que no se detectó ningún cambio sustancial en el contraste de los riñones. Este comportamiento indica, en primer lugar, que estas NPs funcionan como agente de contraste T_2 a alto campo, y además pone de manifiesto que las NPs fueron reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear²⁵ y eliminadas del torrente sanguíneo a través de las vías de eliminación hepática y esplénica.^{26, 27}

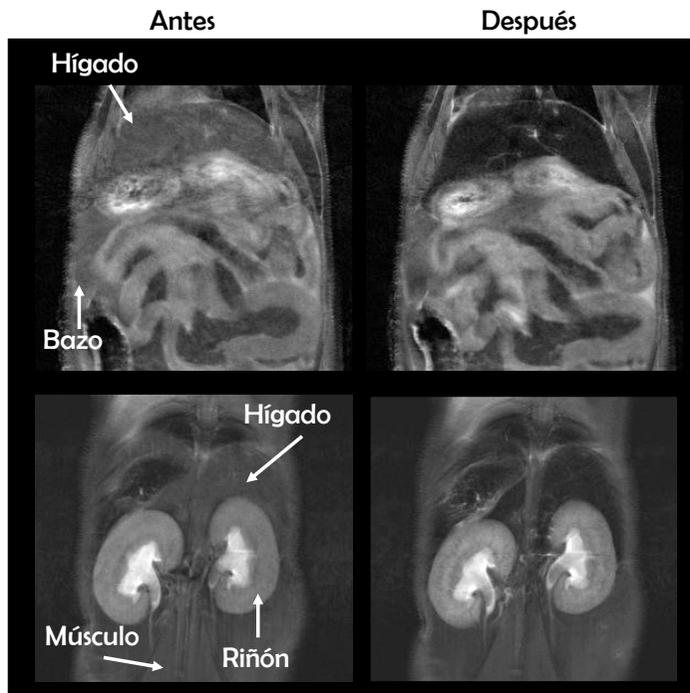


Figura 18. Imágenes representativas *in vivo* de MRI a alto campo ponderadas en T_2 antes (izquierda) y 1 h después (derecha) de la administración de una suspensión de las NPs que constituyen la muestra Dy@La@Nd:La en ratones.

Por otra parte, las imágenes *in vivo* obtenidas mediante luminiscencia NIR no mostraron una intensidad de luminiscencia apreciable, lo cual podría ser debido a la atenuación y dispersión de la luz producida como consecuencia de su interacción con el tejido biológico, junto con la baja sensibilidad del equipo usado para las medidas a una longitud de onda de 800 nm.

A pesar de ello, se extirparon el hígado y el bazo de los ratones a los que se les había inyectado las NPs y se compararon las imágenes *ex vivo* de luminiscencia en el NIR con las obtenidas para ratones control no inyectados. Como puede observarse en la Fig. 19, se detectó un aumento considerable de la luminiscencia en el hígado de los ratones inyectados, siendo este aumento mucho más moderado en el caso del bazo. Estos resultados confirmaron que la principal vía de eliminación de estas NPs era hepática y que la sonda diseñada podría considerarse bimodal pues permite obtener imágenes tanto mediante MRI a alto campo *in vivo* como mediante luminiscencia NIR *ex vivo*.

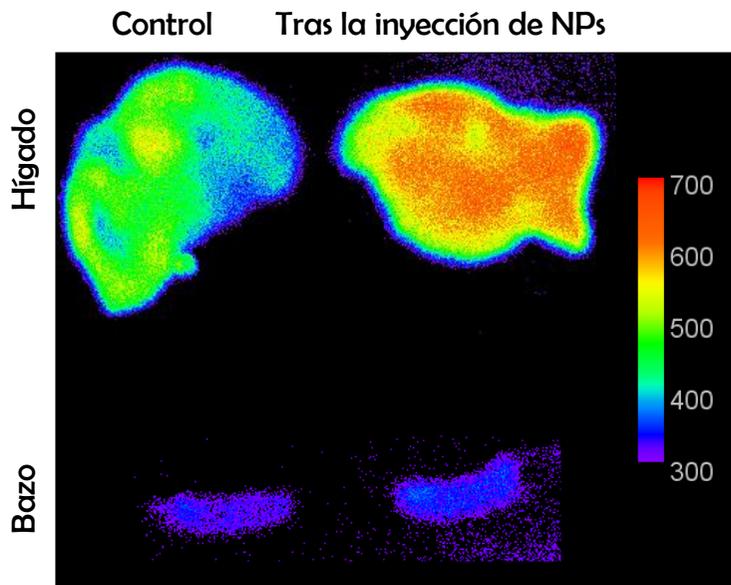


Figura 19. Imágenes representativas *ex vivo* de luminiscencia en el NIR de hígado y bazo de ratones BALB/c control (izquierda) y de ratones tras inyectarles una suspensión de las NPs que constituyen muestra Dy@La@Nd:La.

5.9. Conclusiones

1. Mediante un método de precipitación homogénea en medio poliol se han sintetizado nanopartículas funcionalizadas con ácido poliacrílico constituidas por núcleos de DyVO_4 recubiertos con una corteza de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} , que presentaban forma ovoidal y tamaño medio de 81×57 nm.
2. Empleando un método similar al anterior se han sintetizado y funcionalizado con ácido poliacrílico, nanopartículas con forma ovoidal y un tamaño de 92×62 nm, constituidas por núcleos de DyVO_4 recubiertos con una corteza de LaVO_4 y otra más externa de LaVO_4 dopado con Nd^{3+} .
3. Las nanopartículas con una capa intermedia de LaVO_4 (arquitectura núcleo-corteza-corteza) presentaron una luminiscencia en el infrarrojo cercano con una eficiencia mayor que las nanopartículas que no poseían dicha capa (arquitectura núcleo-corteza).

4. Las nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza-corteza presentaron un alto valor de relajatividad magnética ($r_2 = 390,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) a alto campo (9,4 T), el cual es superior a los reportados en la bibliografía para este tipo de sondas multimodales basadas en Ln^{3+} ($< 240 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
5. Las nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza-corteza resultaron ser dispersables en PBS, probablemente debido a su funcionalización con ácido poliacrílico, y estables químicamente en el mismo medio durante al menos cinco semanas.
6. Las nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza-corteza no presentaron toxicidad apreciable en un cultivo de fibroblastos humanos a una concentración de $\text{Dy}^{3+} \leq 50 \text{ } \mu\text{g/mL}$.
7. Mediante la inyección de dichas nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza en ratones BALB/c, se ha demostrado su utilidad como sondas duales para la obtención de bioimágenes mediante resonancia magnética a alto campo *in vivo* y mediante luminiscencia en el infrarrojo cercano *ex vivo*.

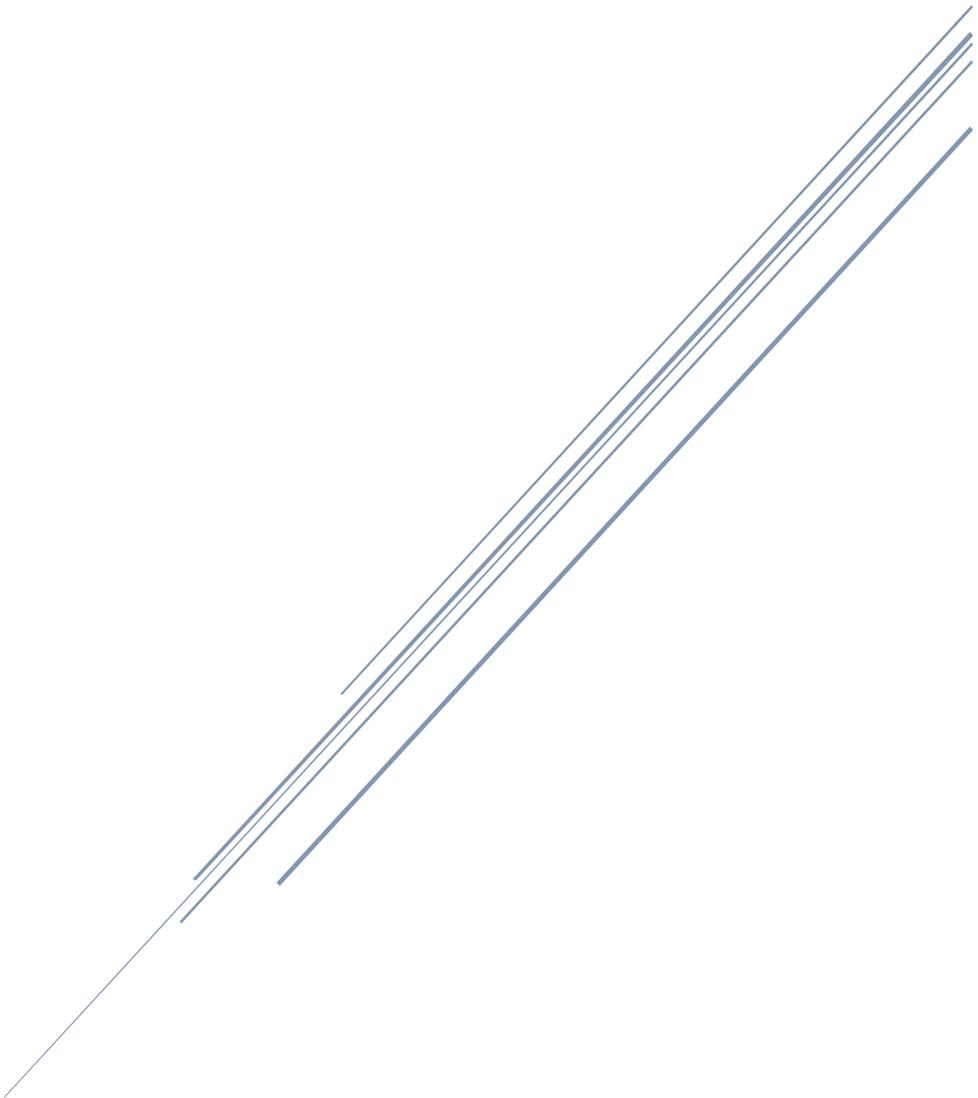
5.10. Bibliografía

1. J. W. Zhao, H. S. Hu, W. Q. Liu and X. Wang, *Nanoscale Advances*, 2021, **3**, 463-470.
2. D. González-Mancebo, A. I. Becerro, R. M. Calderón-Olvera, E. Cantelar, A. Corral, M. Balcerzyk, J. M. de la Fuente and M. Ocaña, *Boletín De La Sociedad Espanola De Ceramica Y Vidrio*, 2022, **61**, S40-S49.
3. N. O. Nunez, F. Cusso, E. Cantelar, B. Martin-Gracia, J. M. de la Fuente, A. Corral, M. Balcerzyk and M. Ocana, *Nanomaterials*, 2020, **10**.
4. D. Gonzalez-Mancebo, A. Isabel Becerro, E. Cantelar, F. Cusso, A. Briat, D. Boyer and M. Ocana, *Dalton Transactions*, 2017, **46**, 6580-6587.
5. Y. Liu, H. Fan, Q. Guo, A. Jiang, X. Du and J. Zhou, *Theranostics*, 2017, **7**, 4217-4228.
6. J. Zhao, H. Hu, W. Liu and X. Wang, *Nanoscale Advances*, 2021, **3**, 463-470.
7. Y. M. Feng, Q. B. Xiao, Y. H. Zhang, F. J. Li, Y. F. Li, C. Y. Li, Q. B. Wang, L. Y. Shi and H. Z. Lin, *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, **5**, 504-510.
8. M. Norek, E. Kampert, U. Zeitler and J. A. Peters, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 5335-5340.
9. R. D. Shannon and C. T. Prewitt, *Acta Crystallographica Section B-Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 1969, **B 25**, 925-946.
10. P. K. Nampoothiri, M. N. Gandhi and A. R. Kulkarni, *Journal of Materials Chemistry C*, 2015, **3**, 1817-1822.
11. N. O. Nunez, P. Zambrano, J. Garcia-Sevillano, E. Cantelar, S. Rivera-Fernandez, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2015, **27**, 4546-4554.
12. H. Dong, L. D. Sun and C. H. Yan, *Journal of the American Chemical Society*, 2021, **143**, 20546-20561.
13. J. L. Zhang, J. X. Shi, J. B. Tan, X. J. Wang and M. L. Gong, *Crystengcomm*, 2010, **12**, 1079-1085.
14. L. Prodi, E. Rampazzo, F. Rastrelli, A. Speghini and N. Zaccheroni, *Chemical Society Reviews*, 2015, **44**, 4922-4952.
15. S. Biju, J. Gallo, M. Banobre-Lopez, B. B. Manshian, S. J. Soenen, U. Himmelreich, L. Vander Elst and T. N. Parac-Vogt, *Chemistry-a European Journal*, 2018, **24**, 7388-7397.
16. J. W. Stouwdam, M. Raudsepp and F. van Veggel, *Langmuir*, 2005, **21**, 7003-7008.
17. S. Sun, H. Zhang, H. Yu, H. Xu, H. Cong and J. Wang, *Journal of Materials Research*, 2012, **27**, 2528-2534.

18. D. Gonzalez Mancebo, A. Isabel Becerro, A. Corral, M. Moros, M. Balcerzyk, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Acs Omega*, 2019, **4**, 765-774.
19. M. Laguna, N. O. Nunez, A. I. Becerro and M. Ocana, *Crystengcomm*, 2017, **19**, 1590-1600.
20. D. Gonzalez-Mancebo, A. I. Becerro, R. M. Calderon-Olvera, E. Cantelar, A. Corral, M. Balcerzyk, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Boletin De La Sociedad Espanola De Ceramica Y Vidrio*, 2022, **61**, S40-S49.
21. J. Zhou, Z. G. Lu, G. G. Shan, S. H. Wang and Y. Liao, *Biomaterials*, 2014, **35**, 368-377.
22. Y. Li, Y. Y. Gu, W. Yuan, T. Y. Cao, K. Li, S. P. Yang, Z. G. Zhou and F. Y. Li, *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**, 19208-19216.
23. D. Gonzalez-Mancebo, A. I. Becerro, A. Corral, S. Garcia-Embid, M. Balcerzyk, M. L. Garcia-Martin, J. M. de la Fuente and M. Ocana, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2020, **573**, 278-286.
24. UNE-EN ISO 10993-5:2009: Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 5: Ensayos de citotoxicidad in vitro. <https://www.aenor.com/>.
25. H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger and H. Ghandehari, *Nano Today*, 2015, **10**, 487-510.
26. M. Longmire, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Nanomedicine*, 2008, **3**, 703-717.
27. F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar and O. C. Farokhzad, *Molecular Pharmaceutics*, 2008, **5**, 505-515.

CONCLUSIONES

GENERALES



CONCLUSIONES GENERALES

1. Se han sintetizado nanopartículas uniformes de DyPO₄ y DyVO₄ funcionalizadas con ácido poliacrílico, que mostraron un alto grado de dispersabilidad en PBS a pH fisiológico, una alta estabilidad química en un medio simulador de condiciones fisiológicas (PBS a 37 °C) y un alto grado de viabilidad celular, por lo que ambos tipos de nanopartículas son adecuadas para su uso en bioaplicaciones *in vivo*.
2. Los valores de relajatividad transversal a 9,4 T de dichas nanopartículas eran muy elevados, siendo excepcionalmente alto (516 mM⁻¹s⁻¹) el correspondiente al sistema DyPO₄ que, además, es muy superior a los publicados en la bibliografía para otros sistemas basados en Dy (100 < r₂ < 380 mM⁻¹s⁻¹).
3. La evaluación del comportamiento *in vivo* de las nanopartículas de DyPO₄ recubiertas con ácido poliacrílico y posteriormente con polietilenglicol, en ratones BALB/c, demostró que no producían daño tisular en los distintos órganos (hígado, riñón, bazo y pulmón), confirmando su alta biocompatibilidad, y que eran excelentes candidatos para su uso como agentes de contraste para la obtención de bioimágenes mediante resonancia magnética a alto campo.
4. Se han sintetizado nanopartículas de DyVO₄ recubiertas con una corteza de GdVO₄ y funcionalizadas con ácido poliacrílico con una alta uniformidad que cumplen los criterios de dispersabilidad y estabilidad química en medio fisiológico y viabilidad celular requeridos para su uso en bioaplicaciones *in vivo*.
5. El valor del cociente entre la relajatividad longitudinal (1,558 mM⁻¹s⁻¹) y transversal (10,248 mM⁻¹s⁻¹) evaluado para dichas nanopartículas basadas en Dy³⁺ y Gd³⁺ a campo magnético bajo (1,44 T) era adecuado (≈ 6) para su uso como agente de contraste para imagen por resonancia magnética en modo dual T₁-T₂.

6. Se han sintetizado nanopartículas de DyVO₄ recubiertas con una corteza de LaVO₄ y otra más externa de LaVO₄ dopado con Nd³⁺ y funcionalizadas con ácido poliacrílico que cumplen los criterios de dispersabilidad y estabilidad química en medio fisiológico y viabilidad celular requeridos para su uso en bioaplicaciones *in vivo*.
7. Las nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza presentaron unos altos valores de relajatividad transversal a 9,4 T (390,1 mM⁻¹s⁻¹) y una luminiscencia intensa en el infrarrojo cercano a una longitud de onda de 877 nm.
8. Mediante la inyección de dichas nanopartículas con arquitectura núcleo-corteza en ratones BALB/c, se ha demostrado su utilidad como sondas duales para la obtención de bioimágenes mediante resonancia magnética a alto campo *in vivo* y mediante luminiscencia en el infrarrojo cercano *ex vivo*.

GENERAL CONCLUSIONS

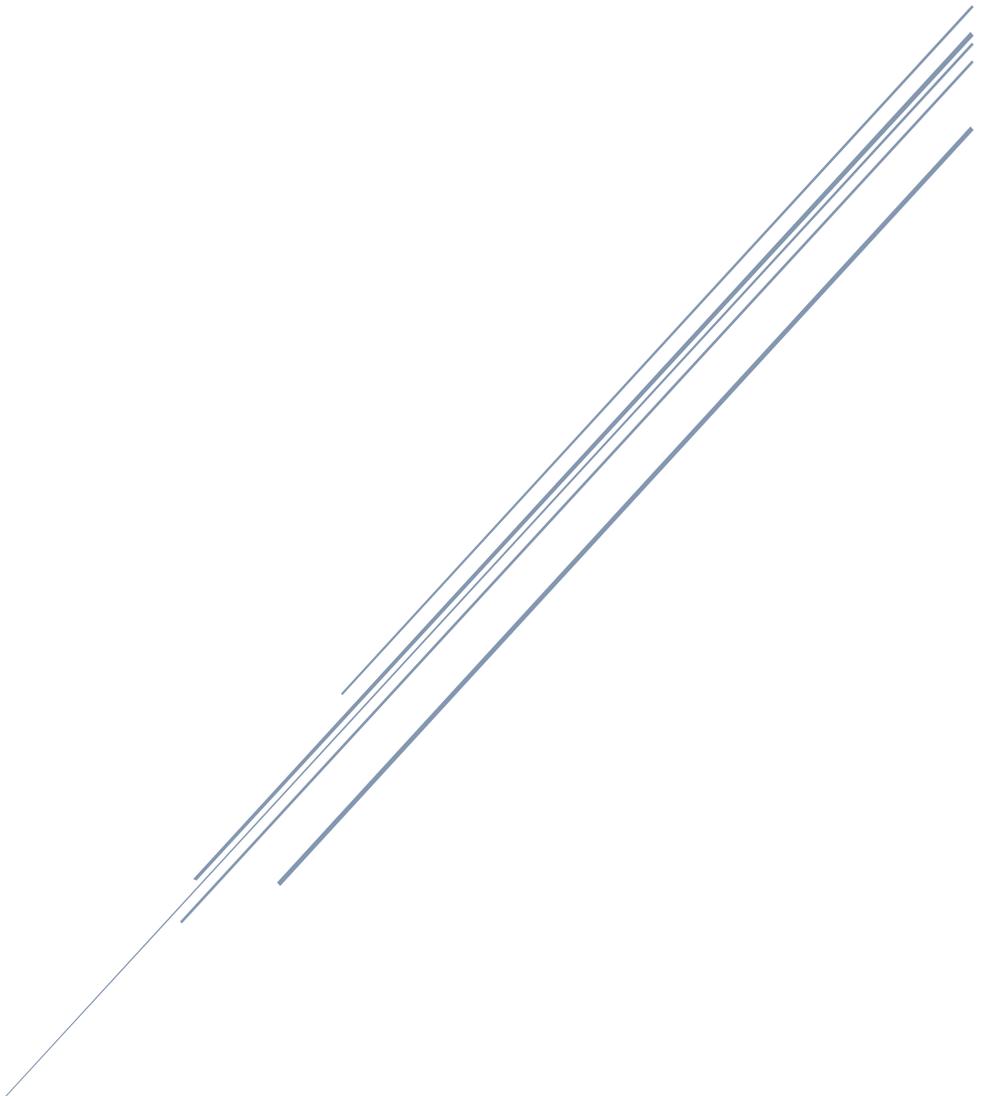
1. Uniform nanoparticles functionalized with polyacrylic acid of both, DyPO₄ and DyVO₄ have been synthesized. They were dispersible in PBS at physiological pH, and exhibited a high chemical stability under physiological conditions (in PBS at 37 °C), and a high cell viability. These properties make both types of nanoparticles suitable for *in vivo* bioapplications.
2. The transverse relaxivity values of both kind of nanoparticles measured at 9.4 T were very high, the highest one (516 mM⁻¹s⁻¹) being that corresponding to DyPO₄ nanoparticles, which is also significantly higher than those reported in the literature for other Dy-based systems ($100 < r_2 < 380 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$).
3. The evaluation of the *in vivo* behavior of the DyPO₄ nanoparticles functionalized with polyacrylic acid and subsequently coated with polyethylene glycol, after injection into BALB/c mice, showed that they did not produce tissue damage in different organs (liver, kidney, spleen and lung) confirming their high biocompatibility, and that they were excellent candidates to be used as contrast agents for high-field magnetic resonance imaging.
4. DyVO₄ particles coated with a GdVO₄ shell and functionalized with polyacrylic acid have been synthesized with high uniformity and nanometer size. These nanoparticles meet the criteria of dispersibility and chemical stability in physiological medium and cell viability required for *in vivo* bioapplications.
5. The value of the ratio between longitudinal (1.558 mM⁻¹s⁻¹) and transverse (10.248 mM⁻¹s⁻¹) relaxivity evaluated for these Dy³⁺ and Gd³⁺-based nanoparticles at low magnetic field (1.44 T) was appropriate (≈ 6) for their use as a contrast agent for dual mode T₁-T₂ magnetic resonance imaging.
6. DyVO₄ nanoparticles coated with an inactive LaVO₄ shell and an outer LaVO₄ shell doped with Nd³⁺ ions, and functionalized with polyacrylic acid, have been synthesized. These nanoparticles meet the criteria of dispersibility

and chemical stability in physiological medium and cell viability required for *in vivo* bioapplications.

7. These core-shell-shell nanoparticles showed high values of transverse relaxivity at 9.4 T ($390.1 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) and intense luminescence in the near infrared at a wavelength of 877 nm.
8. Through the injection of such core-shell-shell nanoparticles into BALB/c mice, it was demonstrated their utility as dual probes for high-field magnetic resonance *in vivo* imaging and *ex vivo* near-infrared luminescence imaging.

APÉNDICE I

FACTORES QUE DETERMINAN LOS
VALORES DE RELAJATIVIDAD MAGNÉTICA DE
AGENTES DE CONTRASTE PARAMAGNÉTICOS



1. Introducción

Todos los iones Ln^{3+} , exceptuando La^{3+} y Lu^{3+} , son paramagnéticos, por lo que principalmente afectan a los núcleos cercanos a través del aumento de la relajación paramagnética (PRE) que depende de la susceptibilidad magnética de cada ion lantánido en particular. La PRE se genera como resultado de la interacción entre los campos magnéticos fluctuantes creados por los electrones desapareados del ion paramagnético con el espín nuclear del protón y se manifiesta como el acortamiento de los tiempos de relajación, $T_{i,M}$, donde $i = 1$ (relajación longitudinal) o 2 (relajación transversal).

La relajación paramagnética puede provenir de tres tipos de contribuciones diversas: de contacto (escalar), dipolo-dipolo y de Curie, por lo que el inverso del tiempo de relajación total (relajatividad, r) viene dado por la Ecuación 1.¹

$$r_i = \frac{1}{T_{i,M}} = \frac{1}{T_{i,\text{contacto}}} + \frac{1}{T_{i,\text{dipolo-dipolo}}} + \frac{1}{T_{i,\text{Curie}}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Por otra parte, desde un punto de vista químico, las contribuciones de las especies paramagnéticas a la relajatividad provienen de tres tipos distintos de interacciones con moléculas de agua (Ecuación 2): coordinación directa con iones paramagnéticos, coordinación indirecta con iones paramagnéticos y difusión traslacional a través de quelatos o nanopartículas, que ocurren en las denominadas esfera interna (EI), segunda esfera (SE) y esfera externa (EE), respectivamente.²

$$r_i = r_i^{EI} + r_i^{SE} + r_i^{EE} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Debido a la dificultad de distinguir experimentalmente entre las moléculas de agua de la segunda esfera y de la esfera externa, estos dos grupos suelen unificarse y denominarse moléculas de agua de la esfera externa conjuntamente. Por lo tanto, la relajación se puede expresar como la suma de dos componentes, según la Ecuación 3.

$$r_i = r_i^{EI} + r_i^{EE} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Debido a la complejidad de la teoría y ecuaciones que rigen el comportamiento de los agentes de contraste para MRI, aquí sólo se hará una breve descripción de las mismas con el fin de facilitar una mejor comprensión de los parámetros más importantes que afectan a la relajatividad.

2. Relajatividad longitudinal

La relajación longitudinal (r_1) del espín del protón depende principalmente de los espines de los iones paramagnéticos presentes en las superficies de las NPs, que interactúan con los espines de los protones cercanos, disminuyendo el tiempo de relajación del protón a lo largo del eje z (T_1).³⁻⁶

La principal contribución a la relajatividad longitudinal proviene de la esfera interna.^{7, 8} En este caso, las contribuciones dipolar y escalar de los mecanismos de relajación magnética vienen dadas por las ecuaciones de Solomon-Bloembergen-Morgan (SBM).⁹⁻¹² En concreto:

$$r_1^{EI} = \frac{qP_m}{T_{1m} + \tau_m} \quad (\text{Ecuación 4})$$

donde:

P_m es la relación molar entre los iones paramagnéticos y el agua,

q es el número de moléculas de agua enlazadas por ion paramagnético,

τ_m , es el tiempo medio de residencia de las moléculas de agua enlazadas, y T_{1m}

es el tiempo de relajación longitudinal de las moléculas de agua enlazadas, que viene dado por:

$$\frac{1}{T_{1m}} = \frac{2}{15} \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\gamma_H^2 g_e^2 \mu_B^2 S(S+1)}{r_{MH}^6} \left[\frac{3\tau_C}{1 + \omega_H^2 \tau_C^2} \right] \quad (\text{Ecuación 5})$$

donde:

γ_H es la relación giromagnética del protón

g_e es el factor g-electrónico

μ_0 es el magnetón de Bohr

S es el momento angular de espín del ion paramagnético correspondiente,

ω_H es la frecuencia de Larmor del protón

r_{MH} es la distancia metal-protón y

τ_c es el tiempo de correlación que viene dado por:

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{\tau_R} + \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_m} \quad (\text{Ecuación 6})$$

donde:

T_{1e} es el tiempo de relajación del espín longitudinal de los electrones, el cual aumenta con el campo magnético aplicado.¹³

τ_R es el tiempo de rotación de los agentes de contraste.

τ_m es el tiempo de vida medio de la molécula de agua en la esfera interna del ion paramagnético.

De las ecuaciones 4 y 5 pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. r_1 aumenta al aumentar $1/T_{1m}$, cuyo valor aumenta según la Ecuación 5 al aumentar el momento angular de espín (S) del ion paramagnético correspondiente. Dado que los iones con mayor valor de S son el Gd^{3+} ($S = 7/2$) y el Mn^{2+} ($S = 5/2$), los agentes de contraste en T_1 (positivos) están basados en estos cationes paramagnéticos y especialmente en el primero, el cual es el componente esencial de los CAs positivos comerciales.
2. Cuanto mayor es la relación molar entre iones paramagnéticos y el agua (P_m), mayor es el valor de r_1 . Por tanto, para aumentar el valor de r_1 es necesario aumentar la cantidad de dichos iones en contacto directo con el agua circundante, los cuales deben encontrarse en la superficie de las NPs. Por tanto, un aumento de la relación superficie/volumen de las NPs, debe dar lugar a un aumento de r_1 . Dicho aumento puede conseguirse disminuyendo el tamaño de las NPs o con morfologías de partícula diferentes a la esfera.
3. Es frecuente recubrir las NPs con una capa de funcionalización superficial para conseguir que estas sean coloidalmente estables en medio acuoso y biocompatibles. La presencia de dicha capa daría lugar a una disminución de r_1 , ya que conllevaría un aumento de r_{MH} , siendo dicha disminución proporcional al espesor de la capa. La composición

de dicha capa (densidad de ligandos orgánicos, hidrofobicidad/hidrofobicidad) es también un factor importante a tener en cuenta pues pueden afectar a la interacción de los iones paramagnéticos con los protones del agua en la esfera interna¹⁴

4. Como resultado del aumento del tiempo de relajación del espín longitudinal de los electrones (T_{1e}) con el incremento del campo magnético aplicado, r_1 disminuye al aumentar la intensidad de dicho campo.^{15, 16}

Hay que señalar que los parámetros temporales implicados en la ecuación 6 dependen de la intensidad de campo magnético, la estructura del CA y de las características físico-químicas de la interfase entre el CA y el entorno acuoso, siendo su efecto sobre r_1 difícil de evaluar.¹⁷

Una vez analizada la influencia de las contribuciones escalar y dipolo-dipolo sobre la PRE, queda por analizar la ocasionada por la contribución debida a la relajación de Curie. Este tipo de relajación sólo contribuye de forma importante a la relajatividad del agua cuando el tiempo de relajación electrónica (T_{1e}) del ion paramagnético es lo suficientemente corto como para permitir que los espines vuelvan a su equilibrio térmico antes de que la molécula cambie de posición. En otras palabras, las moléculas deben estar prácticamente inmóviles durante el tiempo T_{1e} , lo que requiere que $\tau_R \gg T_{1e}$ (siendo τ_R el tiempo de correlación rotacional).¹⁸ Puesto que el Gd^{3+} tiene un estado electrónico fundamental ($^8S_{7/2}$) isótropico (sus 7 orbitales f se encuentran medio llenos con 1 electrón cada uno), estos no presentan un momento orbital neto, siendo la interacción espín-órbita aproximadamente cero. Por tanto, su tiempo de relajación electrónica (T_{1e}) es relativamente largo por lo que no se cumple la condición anterior, siendo despreciable la contribución de Curie al valor de r_1 de los CAs basados en Gd^{3+} . Sin embargo, el valor de T_{1e} para otros iones lantánidos paramagnéticos (incluidos Dy^{3+} y Ho^{3+}) ($\approx 10^{-13}$ s) es alrededor de 4-5 órdenes de magnitud menor que el del Gd^{3+} , debido a que los primeros

presentan estados electrónicos anisotrópicos (sus 7 orbitales f no contienen el mismo número de electrones), lo que origina importantes interacciones espín-órbita.^{19,20} Por lo tanto, para estos iones τ_R es siempre mucho mayor que T_{1e} , y, en consecuencia, el proceso de relajación inducido por el momento de Curie puede llegar a ser importante y ha de tenerse en cuenta junto con las otras dos contribuciones (dipolar y escalar). No obstante, como ya se ha mencionado anteriormente, el valor de r_1 esperado para de este tipo de iones Ln^{3+} es muy bajo debido a su bajo momento angular de espín que hace que la contribución de las componentes escalar y dipolar sea muy pequeñas.

3. Relajatividad transversal

La mejora de la relajación transversal (r_2) inducida por un compuesto paramagnético es el resultado del desfase de los momentos magnéticos de los protones del agua en un campo no homogéneo creado por las pequeñas partículas magnetizadas.¹

El valor de la relajatividad transversal, r_2 , de NPs paramagnéticas se debe principalmente a la contribución del efecto de Curie a la relajatividad transversal en el régimen de la esfera externa, y viene dado por la Ecuación 7 de la teoría mecano-cuántica.^{14, 21, 22}

$$r_2 = \frac{1}{T_2} = \frac{256\pi^2\gamma^2}{405} V^* M_s^2 \frac{a^2}{D(1+\frac{L}{a})} \quad (\text{Ecuación 7})$$

donde:

γ es la relación de espín del protón,

a es el radio efectivo de la NP magnética,

D es el coeficiente de difusión de las moléculas de agua,

L es el espesor de la capa superficial de las NPs,

M_s es la magnetización medida al mismo campo que el que se emplea para medir la relajatividad, siendo su valor:

$$M_s = \chi B_0 \quad (\text{Ecuación 8})$$

donde χ es la susceptibilidad magnética, y B_0 , la intensidad del campo magnético aplicado.

Por último, V^* es la fracción de volumen, que viene dada por la Ecuación 9.

$$V^* = \frac{4\pi a^3}{3000} N_0 M \quad (\text{Ecuación 9})$$

donde N_0 es la constante de Avogadro y, para el caso de las nanopartículas, M es su molaridad.

De acuerdo con a las ecuaciones (7), (8) y (9) se deduce que el valor de r_2 :

1. Aumenta con radio efectivo (a) de las NPs.
2. Es mayor para partículas anisométricas ya que su radio efectivo es mayor que el de NPs esféricas con un volumen similar.²³
3. Disminuye con el grosor de la capa superficial de funcionalización de las mismas.
4. Aumenta con la magnetización del ion paramagnético, que está relacionada con la susceptibilidad magnética y, por tanto, con el momento magnético del ion según la Ley de Curie, que predice que la magnetización aumenta de forma cuadrática con dicho momento. El momento magnético de las NPs paramagnéticas depende del número total iones paramagnéticos por partícula y la magnitud del momento magnético del ion individual. Entre los iones paramagnéticos de mayor valor de momento magnético efectivo (μ_{eff}) se encuentran los cationes lantánidos, Dy^{3+} (10,65 μB) y Ho^{3+} (10,60 μB) siendo también elevados los del Tb^{3+} (9,72 μB) y Er^{3+} (9,59 μB), en contraposición con el bajo valor del momento magnético que presenta el Gd^{3+} (7,29 μB). Debido a ello, la mayor parte de los CAs con relajación transversal basados en Ln^{3+} incluyen en su composición los iones mencionados en primer lugar, y, sobre todo, el Dy^{3+} o el Ho^{3+} .

5. Aumenta con la intensidad del campo magnético ya que dicho aumento origina un aumento de la magnetización.²⁴

Por último, debe mencionarse que el diámetro hidrodinámico (D_h) de las NPs también tiene un efecto sobre la magnitud de r_2 ya que al aumentar D_h , aumenta el área sobre la cual tienen impacto las inhomogeneidades del campo magnético originadas por el agente de contraste si bien a partir de un cierto tamaño límite, r_2 disminuye.¹

Así pues, aunque el magnetismo es una propiedad intrínseca de los materiales, las propiedades de relajatividad magnética de los agentes de contraste basados en NPs, incluyendo las que contienen iones Ln^{3+} paramagnéticos, se ven afectadas de forma significativa por la naturaleza del ion Ln^{3+} , tamaño, forma y las propiedades de su superficie. Por lo tanto, para diseñar CAs para MRI basados en NPs se requiere una modulación cuidadosa de las características de las mismas.

4. Bibliografía

1. R. Antwi-Baah, Y. J. Wang, X. Q. Chen and K. Yu, *Advanced Materials Interfaces*, 2022, **9**, 2101710.
2. J. Wahsner, E. M. Gale, A. Rodriguez-Rodriguez and P. Caravan, *Chemical Reviews*, 2019, **119**, 957-1057.
3. T. Tegafaw, S. Liu, M. Y. Ahmad, A. Saidi, D. Zhao, Y. Liu, S. W. Nam, Y. Chang and G. H. Lee, *Pharmaceutics*, 2023, **15**, 1745.
4. R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1987, **87**, 901-927.
5. A. Roch, R. N. Muller and P. Gillis, *Journal of Chemical Physics*, 1999, **110**, 5403-5411.
6. P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer, *Chemical Reviews*, 1999, **99**, 2293-2352.
7. M. Harris, S. Biju and T. N. Parac-Vogt, *Chemistry-a European Journal*, 2019, **25**, 13838-13847.
8. E. Boros, E. M. Gale and P. Caravan, *Dalton Transactions*, 2015, **44**, 4804-4818.
9. N. Bloembergen and L. O. Morgan, *Journal of Chemical Physics*, 1961, **34**, 842-&.
10. I. Solomon, *Physical Review*, 1955, **99**, 559-565.
11. M. Vega-Vázquez and M.-P. Manuel, *Avances en Ciencia e Ingeniería*, 2010, **1**, 1-16.
12. K. Kristinaityte, T. Zalewski, M. Kempka, S. Sakirzanovas, D. Baziulyte-Paulaviciene, S. Jurga, R. Rotomskis and N. R. Valeviciene, *Applied Magnetic Resonance*, 2019, **50**, 553-561.
13. P. Caravan, C. T. Farrar, L. Frullano and R. Uppal, *Contrast Media & Molecular Imaging*, 2009, **4**, 89-100.
14. H. Du, Q. Y. Wang, Z. Y. Liang, Q. L. Li, F. Y. Li and D. S. Ling, *Nanoscale*, 2022, **14**, 17483-17499.
15. M. Rohrer, H. Bauer, J. Mintorovitch, M. Requardt and H. J. Weinmann, *Investigative Radiology*, 2005, **40**, 715-724.
16. I. M. Noebauer-Huhmann, P. Szomolanyi, V. Juras, O. K. Dipl, M. E. Ladd and S. Trattng, *Investigative Radiology*, 2010, **45**, 554-558.
17. W. Z. Zhang, L. Liu, H. M. Chen, K. Hu, I. Delahunty, S. Gao and J. Xie, *Theranostics*, 2018, **8**, 2521-2548.
18. M. Norek and J. A. Peters, *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 2011, **59**, 64-82.
19. B. M. Alsaadi, F. J. C. Rossotti and R. J. P. Williams, *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions*, 1980, **11**, 2147-2150.
20. I. Bertini, F. Capozzi, C. Luchinat, G. Nicastro and Z. C. Xia, *Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97**, 6351-6354.
21. S. Tong, S. J. Hou, Z. L. Zheng, J. Zhou and G. Bao, *Nano Letters*, 2010, **10**, 4607-4613.
22. S. K. Wan, F. Z. Cui, B. Li, K. L. Zhao, H. N. He, Y. Zhang, J. H. Liu, L. Zhang and K. Liu, *Acs Applied Nano Materials*, 2020, **3**, 9433-9439.

23. Z. J. Zhou, L. J. Yang, J. H. Gao and X. Y. Chen, *Advanced Materials*, 2019, **31**, 1804567.
24. M. Norek, E. Kampert, U. Zeitler and J. A. Peters, *Journal of the American Chemical Society*, 2008, **130**, 5335-5340.

APÉNDICE II

CARACTERÍSTICAS DE LOS PRODUCTOS QUÍMICOS EMPLEADOS

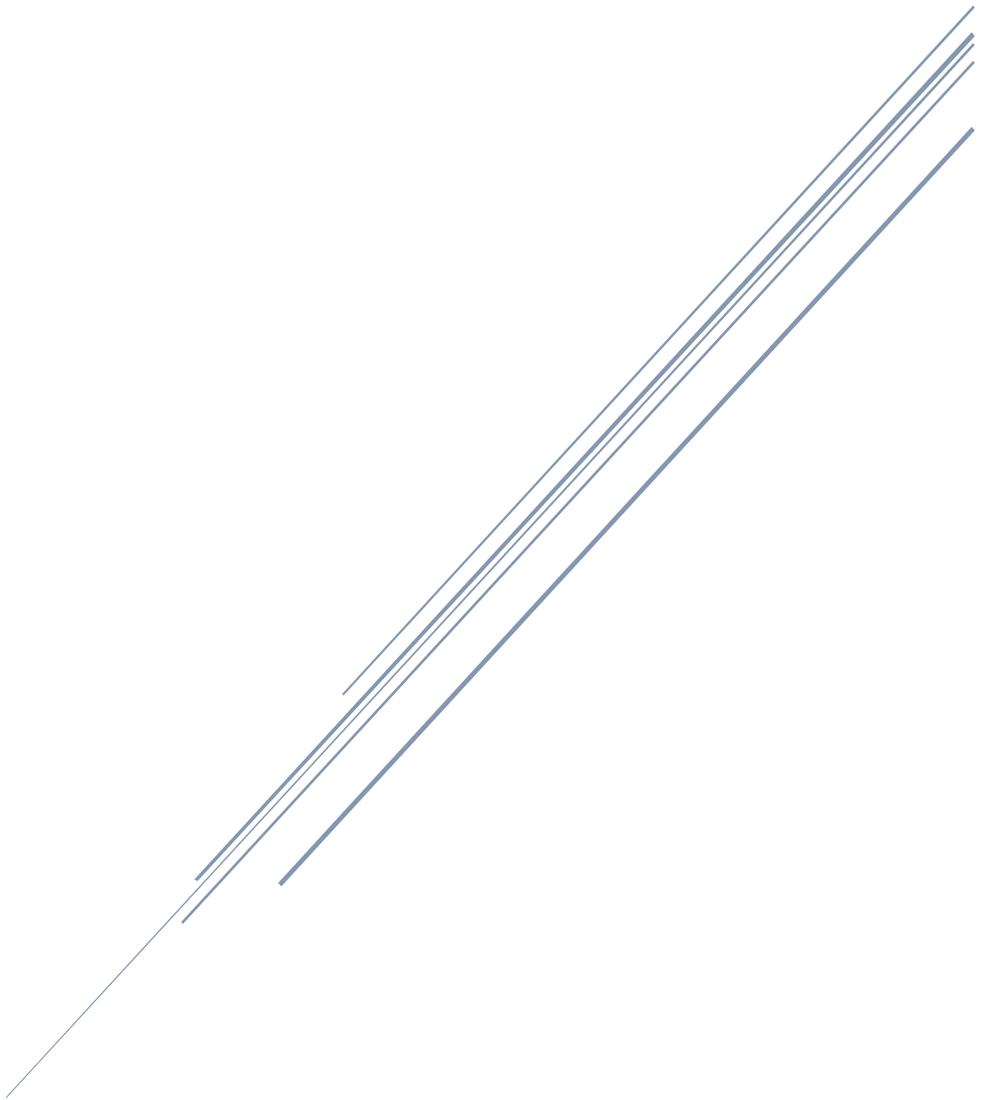


Tabla 1. Precursores catiónicos

Nombre del precursor	Fórmula química	Pureza (%)	Proveedor
Acetato de disprosio hidratado	$\text{Dy}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	99,9	Sigma-Aldrich
Acetato de neodimio (III) hidratado	$\text{Nd}(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	99,9	
Cloruro de disprosio (III) hexahidratado	$\text{DyCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99,9	
Nitrato de disprosio pentahidratado	$\text{Dy}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	99,99	
Nitrato de gadolinio hexahidratado	$\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99,9	
Nitrato de lantano hexahidratado	$\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99,99	
Nitrato de neodimio hexahidratado	$\text{Nd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	99,99	

Tabla 2. Precursores aniónicos

Nombre del precursor	Fórmula química	Pureza (%)	Proveedor
Ácido fosfórico	H_3PO_4	85,0	Sigma-Aldrich
Molibdato de sodio	Na_2MoO_4	$\geq 98,0$	
Ortovanadato de sodio	Na_3VO_4	99,98	
Wolframato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,0$	

Tabla 3. Disolventes

Nombre del disolvente	Fórmula química	Pureza (%)	Proveedor
Butilenglicol	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$	99	Sigma-Aldrich
Etilenglicol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$	99,8	
Butanol	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$	$>99,5$	

Tabla 4. Polímeros empleados en la funcionalización

Nombre del compuesto	Fórmula química	Peso molecular (Da)	Proveedor
α -Metoxi- ω -amino polietilenglicol	CH ₃ O-PEG-NH ₂ PEG: C _{2n+2} H _{4n+6} O _{n+2}	≈ 5000	RappPolymere
Ácido poliacrílico	(C ₃ H ₄ O ₂) _n	≈ 1800	Sigma-Aldrich
Poli(clorhidrato) de alilamina	[CH ₂ CH(CH ₂ NH ₂ ·HCl)] _n	≈ 17500	Sigma-Aldrich

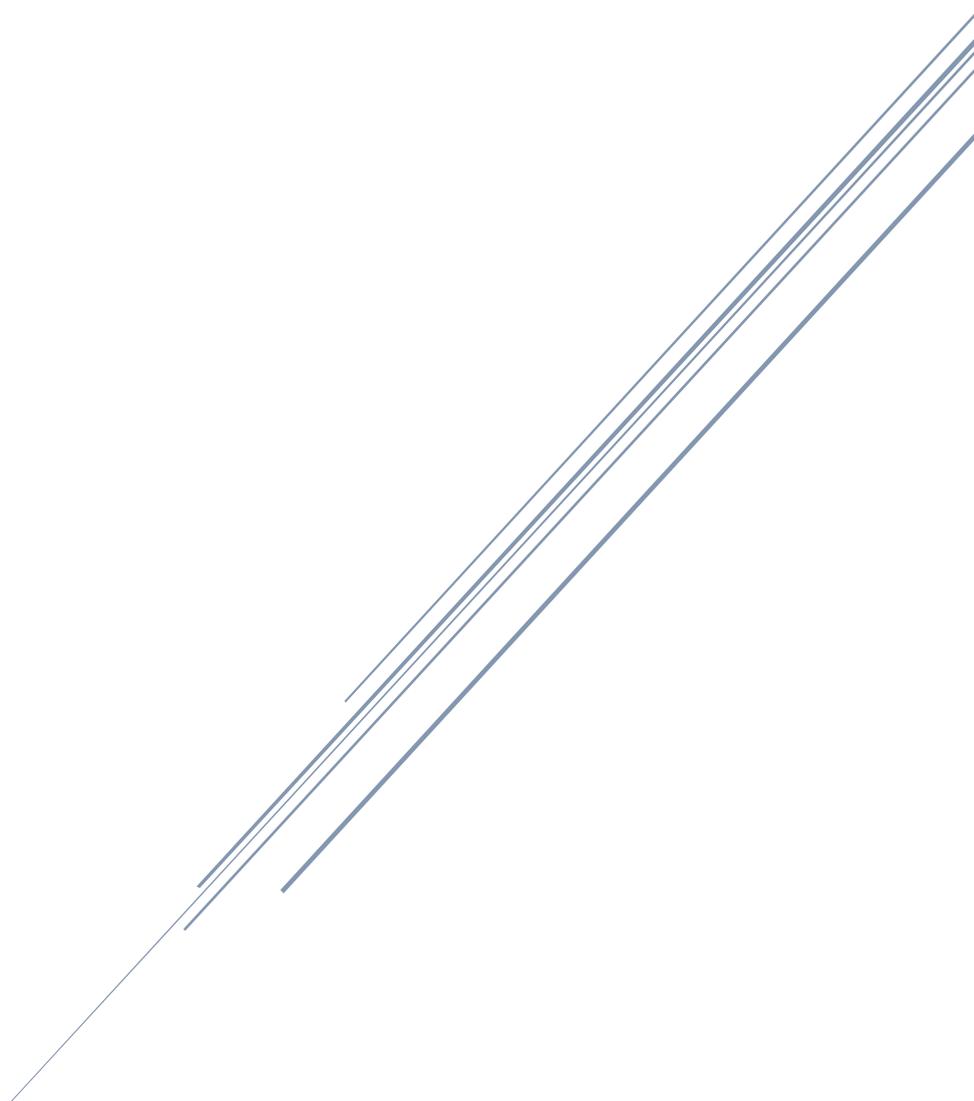
Tabla 5. Reactivos para la funcionalización con polietilenglicol

Nombre del reactivo	Fórmula química	Pureza (%)	Proveedor
1-(3-dimetilaminopropil)- 3-etil carbodiimida hidroclorada	C ₈ H ₁₇ N ₃ ·HCl	>98,0	Acros Organics
Sal sódica de N- hidroxisulfosuccinimida	C ₄ H ₄ NNaO ₆ S	≥98%	Sigma Aldrich
Tetraborato sódico decahidratado	Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	≥99,5	Fluka

6. Productos químicos empleados en análisis de toxicidad

Nombre	Proveedor
Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT)	Sigma Aldrich
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Acros organics
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco
Formaldehído (4 %)	Panreac
TO-PRO-3	Thermo Fisher
Triton X-100	Sigma-Aldrich

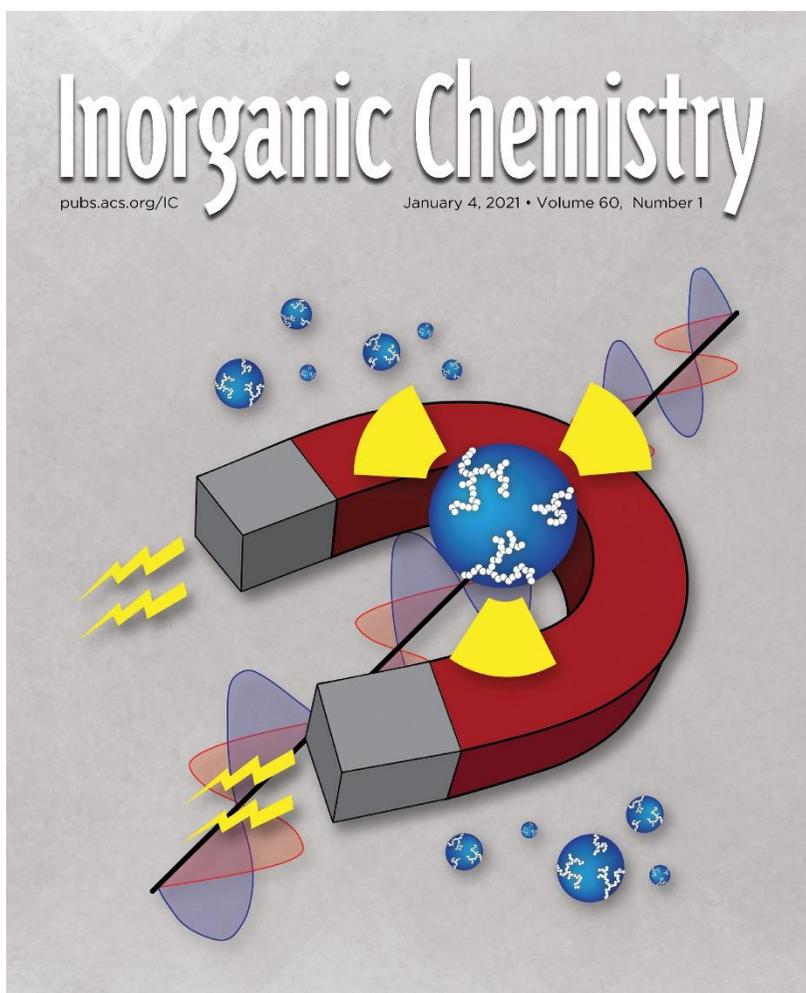
LISTA DE PUBLICACIONES



RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

1. Elisabet Gómez-González, Daniel González-Mancebo, Nuria O. Núñez, Carlos Caro, María L. García-Martín, Ana I. Becerro y Manuel Ocaña. *Lanthanide vanadate-based trimodal probes for near-infrared luminescent bioimaging, high-field magnetic resonance imaging, and X-ray computed tomography*. Journal of Colloid and Interface Science, **2023**, 646, 721-731.
2. Elisabet Gómez-González, Nuria O. Núñez, Carlos Caro, María L. García-Martín y Manuel Ocaña. *Carboxylate functionalized NaDy(MoO₄)₂ nanoparticles with tunable size and shape as high magnetic field MRI contrast agents*. Journal of Colloid and Interface Science, **2023**, 629, 310–321.
3. Elisabet Gómez-González, Carlos Caro, María L. García-Martín, Ana I. Becerro y Manuel Ocaña. *Outstanding MRI contrast with dysprosium phosphate nanoparticles of tuneable size*. Nanoscale, **2022**, 14, 11461-11470.
4. Elisabet Gómez-González, Carlos Caro, Diego Martínez Gutiérrez, María L. García-Martín, Manuel Ocaña y Ana I. Becerro. *Holmium phosphate nanoparticles as negative contrast agents for high-field magnetic resonance imaging: Synthesis, magnetic relaxivity study and in vivo evaluation*. Journal of Colloid and Interface Science, **2021**, 587, 131–140.

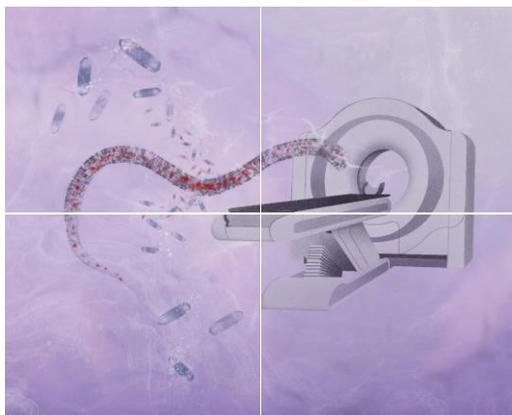
5. Elísabet Gómez-González, Nuria O. Núñez, Carlos Caro, María L. García-Martín, Yilian Fernández Afonso, Jesús M. de la Fuente, Marcin Balcerzyk y Manuel Ocaña. *Dysprosium and Holmium Vanadate Nanoprobes as High Performance Contrast Agents for High-Field Magnetic Resonance and Computed Tomography Imaging*. *Inorganic Chemistry*. **2021**, 60(1), 152-160.



OTRAS PUBLICACIONES

1. Roxana M. Calderón-Olvera, Nuria O. Núñez, Daniel González-Mancebo, José M. Monje-Moreno; Manuel J. Muñoz-Rui; Elisabet Gómez-González; Encarna Arroyo; Beatriz Torres-Herrero, Jesús M. de la Fuente y Manuel Ocaña. *Europium doped-double sodium bismuth molybdate nanoparticles as contrast agents for luminescence bioimaging and X-ray computed tomography*. *Inorganic Chemistry Frontiers*, **2023**, 10, 3202-3212.

Volume 10 | Number 11 | 7 June 2023



INORGANIC CHEMISTRY

FRONTIERS



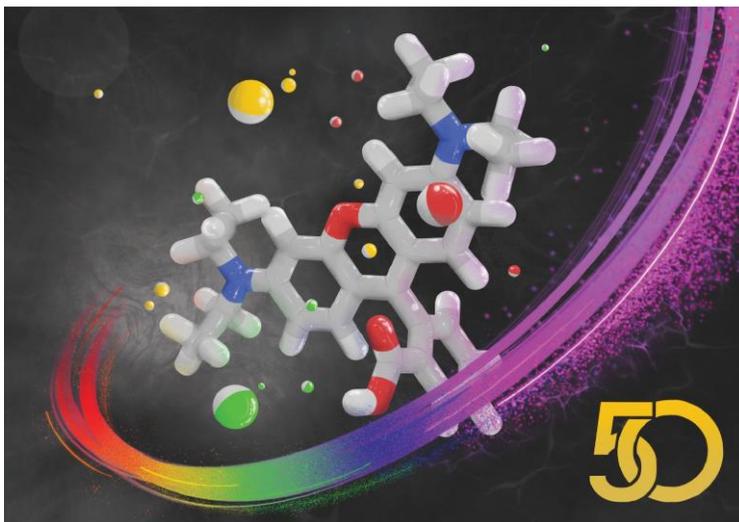
CHINESE
CHEMICAL
SOCIETY



ROYAL SOCIETY
OF CHEMISTRY

rsc.li/frontiers-inorganic

2. Nuria O. Núñez, Elísabet Gómez-González, Roxana M. Calderón-Olvera; Ana I. Becerro, Gerardo Colón y Manuel Ocaña. *NaY(MoO₄)₂-based nanoparticles: synthesis, luminescence and photocatalytic properties*. Dalton Transactions, **2021**, 50, 16539-16547.



Showcasing research from the Colloidal Materials lab at the Institute of Materials Science of Seville (CSIC), Spain.

NaY(MoO₄)₂-based nanoparticles: synthesis, luminescence and photocatalytic properties

Undoped and lanthanide (Eu³⁺, Tb³⁺ and Dy³⁺)-doped NaY(MoO₄)₂ nanoparticles with spherical shape have been synthesized, which show photocatalytic activity for dyes decomposition under visible light illumination. Moreover, under UV illumination, the doped systems, exhibit intense luminescence whose color is determined by the doping cation (red for Eu³⁺, green for Tb³⁺ and yellow for Dy³⁺).

As featured in:



See Manuel Ocaña *et al.*,
Dalton Trans., 2021, 50, 16539.

