

# **NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN BIOMEDICINA.**



**CELIA TOYOS RODRÍGUEZ**

**Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Biotecnología del Medio ambiente  
y la Salud**

Departamento de Química Inorgánica

**Curso 2018-2019**

**Junio 2019**

**Francisco Javier García Alonso**, Catedrático de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “Nanopartículas magnéticas en biomedicina.” ha sido realizado por la Graduada en Biotecnología Dña. **Celia Toyos Rodríguez** en el departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster de la interesada, cuya presentación se autoriza.

Oviedo, a 19 de junio 2019

Fdo.  
Prof. Dr. Francisco Javier García Alonso

VºBº:  
Prof. Dr. Francisco Parra

## **RESUMEN**

El interés por las nanopartículas superparamagnéticas ha ido creciendo en los últimos años debido a sus múltiples aplicaciones biomédicas, entre ellas su potencial como transportadores de fármacos. Su carácter superparamagnético permite que, bajo la presencia de un campo magnético externo, las partículas puedan ser llevadas a un órgano diana y/o quedar retenidas en él durante un tiempo suficientemente largo como para permitir la liberación del fármaco. Esta cualidad es de especial importancia para tratamientos donde la solubilidad del medicamento sea un problema. Este es el caso de la melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine), hormona que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de tumores como el glioblastoma, principal tumor cerebral en humanos. Esta hormona actúa sobre los transportadores ABC de las células madre resistentes a quimioterapia (BTSC, por sus siglas en inglés) presentes en estos tumores.

En este trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de unas partículas superparamagnéticas compuestas de magnetita y recubiertas de ácido oleico, de  $15 \pm 5$  nm de diámetro, con un campo coercitivo de alrededor de 7 Oe y una magnetización de saturación de 70 emu/g, siguiendo un nuevo método, sencillo, reproducible y de bajo coste.

Para generar una matriz capaz de retener la melatonina, las partículas se han recubierto con quitosano, y este ha sido entrecruzado mediante glutaraldehído, consiguiendo unas partículas con un campo coercitivo de 2 Oe y una magnetización de saturación de 60 emu/g de saturación. El proceso se ha llevado a cabo eliminando inicialmente el ácido oleico.

Las nanopartículas recubiertas con quitosano son capaces de retener melatonina, probablemente por formación de múltiples enlaces de hidrógeno. Mediante medidas electroquímicas (voltametría cíclica), se ha determinado que la proporción melatonina cargada es, al menos, de un 20%.

Adicionalmente, y dado su aplicación biomédica, se ha estudiado la toxicidad de estas partículas en cultivos primarios de cerebelo, revelando una toxicidad dependiente de la dosis, siendo la dosis máxima tolerable de 10 mg/ml.

Estos resultados parecen indicar que las nanopartículas de magnetita recubiertas de quitosano pudieran ser un modelo adecuado para el transporte de melatonina.

## **ABSTRACT**

The interest on superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) has increased during the last years due to its multiple biomedical applications, including its potential as drug carriers. Its superparamagnetic behavior allows them to be directed to a target organ under the presence of an external magnetic field and to be retained on it a sufficiently amount of time to allow the release of the drug.

This quality is of special importance for treatments where the solubility of the pharmacological compound is a problem. This is the case of melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), a hormone that has shown to be effective in the treatment of tumors such as glioblastoma, the main brain tumor in humans. Melatonin acts on the ABC transporters of Brain tumor stem cells (BTSC) making them more susceptible to chemotherapeutical treatments.

In this work it has been developed a new, reproducible and simple method for obtaining iron oxide nanoparticles composed of magnetite and coated with oleic acid with a size of  $15 \pm 5$  nm, a coercive field of about 7 Oe and a saturation magnetization of 70 emu/g.

In order to generate a matrix capable of retaining melatonin, nanoparticles have been coated with chitosan crosslinked by glutaraldehyde. The process has been carried out after eliminating oleic acid.

The nanoparticles coated with chitosan are able to retain melatonin, probably by forming multiple hydrogen bonds. By means of electrochemical measurements (cyclic voltammetry), the proportion of melatonin loaded has shown to be about 20%.

On the other hand, it has been studied the potential toxicity of nanoparticles in primary neuronal cell cultures. These studies showed that NP toxicity is dependent on concentration, reaching its maximum tolerable concentration at 10 mg/ml.

These results seem to indicate that the chitosan-coated magnetite nanoparticles could become a suitable model for carrying melatonin to glioblastoma tumor cells.

<b>RESUMEN</b> .....	<b>III</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Los nanomateriales .....	1
1.2. Las nanopartículas magnéticas .....	2
1.3. Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas .....	4
1.4. Las nanopartículas magnéticas en biomedicina.....	6
1.5. El Glioblastoma como ejemplo de aplicación biomédica de interés.....	7
1.6. Potencial toxicidad de las nanopartículas magnéticas.....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>10</b>
3.1. Instrumentación.....	10
3.2. Reactivos y materiales .....	11
3.3. Soluciones .....	12
3.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas .....	12
3.5. Recubrimiento .....	13
3.6. Medidas electroquímicas.....	14
3.7. Incorporación de melatonina.....	14
3.8. Evaluación de la toxicidad en cultivos neurogliales primarios.....	15
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
4.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas .....	17
4.2. Recubrimiento de NPM con quitosano .....	23
4.3. Calibrado de melatonina.....	28
4.4. Incorporación de melatonina.....	30
4.5. Análisis toxicológico .....	32
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>35</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>36</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de (a) partículas, (b) clusters, (c) nanocables, (d) fibras, (e) láminas, (f) superficies estampadas, (g) pilares, (h) dispositivos MEMS. (Aversa et al. 2018)	2
<b>Figura 2.</b> Estructura de espinela inversa de la magnetita. (Kozlenko et al. 2019).	3
<b>Figura 3.</b> Representación de la variación del campo coercitivo de una partícula en función de su tamaño. (J. S. Lee et al. 2015)	4
<b>Figura 4.</b> Ecuación de síntesis de magnetita por descomposición térmica empleando ácido oleico y oleilamina como surfactantes	5
<b>Figura 5.</b> Estructura del quitosano	5
<b>Figura 6.</b> Representación esquemática del proceso de síntesis y carga de nanopartículas superparamagnéticas	8
<b>Figura 7.</b> Imagen del adaptador de DropSense con el soporte magnético	15
<b>Figura 8.</b> Espectro de infrarrojos de NPM con ac. oleico	18
<b>Figura 9.</b> Patrón de difracción de rayos X de las partículas obtenidas tras la primera etapa.	19
<b>Figura 10.</b> Micrografía de NMP tras la primera etapa. Imagen obtenida por TEM. <b>B.</b> Distribución de tamaños de las partículas observadas en las imágenes por TEM. Cálculo realizado con ImageJ.	20
<b>Figura 11.</b> Micrografía de NMP tras la segunda etapa. Imagen obtenida por TEM. <b>B.</b> Distribución de tamaños de las partículas observadas en las imágenes por TEM. Cálculo realizado con ImageJ.	20
<b>Figura 12.</b> Esquema del montaje del proceso de síntesis	21
<b>Figura 13.</b> Curva de temperaturas de la reacción de síntesis de NPM. Datos recogidos durante la primera etapa de calentamiento, antes y después del reflujo.	21
<b>Figura 14.</b> Ciclos de histéresis de <b>A.</b> partículas obtenidas en la primera etapa, <b>B.</b> partículas obtenidas en la segunda etapa.	22
<b>Figura 15.</b> Micrografía obtenida mediante análisis por TEM de las partículas sin recubrir. <b>B.</b> Distribución de tamaños de las partículas observadas mediante TEM.	24
<b>Figura 16.</b> Espectro de infrarrojos de nanopartículas sin recubrimiento.	24
<b>Figura 17.</b> <b>A.</b> Micrografía obtenida mediante análisis por TEM de NPM con un 1% de quitosano. <b>B.</b> Distribución de tamaños de las partículas observadas mediante TEM.	25
<b>Figura 18.</b> Espectro de IR de NPM con 1% quitosano.	25
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática del recubrimiento con quitosano y glutaraldehído.	26
<b>Figura 20.</b> Espectro de IR de nanopartículas con 1% de quitosano + 25% glutaraldehído.	26
<b>Figura 21.</b> Micrografía de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con quitosano y glutaraldehído.	27
<b>Figura 22.</b> Curva de histéresis de las partículas magnéticas recubiertas con quitosano y glutaraldehído.	28
<b>Figura 23.</b> Voltametría cíclica de muestra de melatonina con concentraciones de $10^{-2}$ (roja) frente a $7,5 \times 10^{-3}$ (azul).	29
<b>Figura 24.</b> Representación del proceso de oxidación de la melatonina. (Kumar and Goyal 2017).	29
<b>Figura 25.</b> Curva de calibrado de la melatonina obtenida por voltametría cíclica	30
<b>Figura 26.</b> Resultado obtenido para el análisis por voltametría cíclica de <b>A.</b> Partículas cargadas con melatonina, <b>B.</b> Sobrenadante.	30
<b>Figura 27.</b> Cultivos neuronales en presencia de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano y glutaraldehído tras 24 horas de exposición. <b>A.</b> NPM 1mg/ml. <b>B.</b> 5 mg/ml. <b>C.</b> 10 mg/ml.	33
<b>Figura 28.</b> Microscopía de fluorescencia de cultivos neurogliales con 10 mg/ml. <b>A.</b> NPM con ácido oleico. <b>B.</b> NPM desnudas. <b>C.</b> NPM con quitosano + glutaraldehído.	33

## TABLA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURA</b>	<b>NOMBRE COMPLETO</b>
<b>ABC</b>	Adenosine-triphosphate binding cassette
<b>Ara-C</b>	Arabinosilcitosina
<b>BME</b>	Del inglés <i>Basal Medium Eagle</i>
<b>BSA</b>	Del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>
<b>BTSC</b>	Del inglés <i>Brain Tumor Stem Cells</i>
<b>DAFO</b>	Debilidades, Amenazas, Fortalezas, Oportunidades
<b>DNA<sub>s</sub>al</b>	Desoxiribonucleasa I
<b>EGFR</b>	Del inglés, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
<b>FIA-ED</b>	Del inglés <i>Flow-Injection Analysis with Electrochemical Detection</i>
<b>GPES</b>	Del inglés <i>General Purpose Electrochemical System</i>
<b>IR</b>	Del inglés <i>Infrared radiation</i>
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>PBS</b>	Phosphate buffer solution
<b>PEG</b>	Polietileglicol
<b>ROS</b>	Del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>SPIONs</b>	Del inglés <i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
<b>TEM</b>	Del inglés <i>Transmission electron microscopy</i>
<b>TMZ</b>	Temozolamida
<b>XRD</b>	Del inglés <i>X ray diffraction</i>

# INTRODUCCIÓN

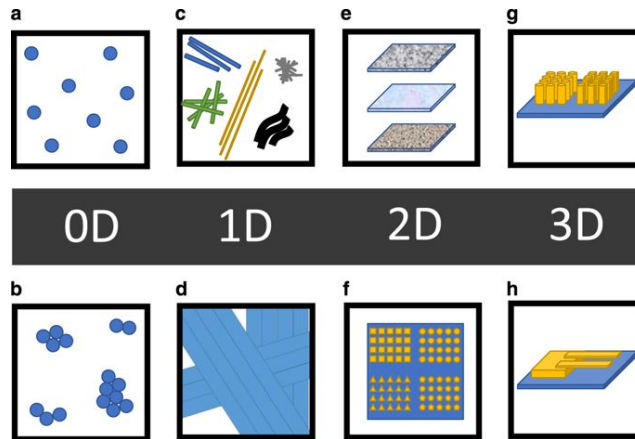
---

## 1.1. Los nanomateriales

Desde la década de 1990, los nanomateriales han ganado cada vez más importancia, debido a sus capacidades diferenciales con respecto a los materiales en escala macrométrica (Sudha et al. 2018).

Los **nanomateriales** se definen según la Comisión Europea (Commission 2018) como materiales “naturales o manufacturados, aisladas o como agregados o aglomerados, que cuentan con un 50% o más de partículas con, al menos, una dimensión en el orden de los nanómetros (1-100 nm)”. Caracterizados por su amplia relación superficie/volumen, son candidatos idóneos para el transporte de sustancias de interés. (Cardoso et al. 2018). Dentro de los nanomateriales se distinguen, en función de sus dimensiones, cuatro tipos de materiales (Trapiella 2013):

- **Materiales 0D:** se caracterizan por presentar todas sus dimensiones en el rango de los nanómetros, e incluyen a los clusters o nanopartículas.
- **Materiales 1D:** cuentan con dos dimensiones en la escala nanométrica. En este grupo se incluyen los nanotubos, nanohilos, nanobarras y nanofibras.
- **Materiales 2D:** solo poseen una dimensión dentro de la nanoescala. Incluyen a las láminas.
- **Materiales 3D:** el material se constituye por un conjunto del resto de tipos de materiales. Se incluyen en esta categoría las nanopartículas unidas formando bloques de escala macrométrica.



**Figura 1.** Representación esquemática de (a) partículas, (b) clusters, (c) nanocables, (d) fibras, (e) láminas, (f) superficies estampadas, (g) pilares, (h) dispositivos MEMS. (Aversa et al. 2018)

Los nanomateriales, en sus múltiples formas, se aplican en múltiples campos que van desde el aprovechamiento energético hasta las ciencias de la salud, siendo en estas últimas de especial importancia las nanopartículas por su potencial como sistemas de diagnóstico y de transporte de fármacos (Cortés 2013).

### **1.2. Las nanopartículas magnéticas**

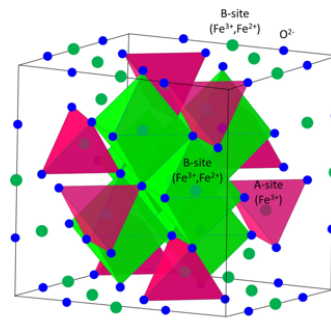
Dentro de las nanopartículas empleadas en aplicaciones biomédicas, las **nanopartículas magnéticas**, en concreto, van adquiriendo una importancia creciente (Guo, Yang, and Wang 2013) por ser fácilmente manipulables mediante el empleo de un campo magnético externo (Leslie-pelecky and Rieke 1996).

Las nanopartículas magnéticas se clasifican tradicionalmente en metales puros, óxidos metálicos y nanocompuestos metálicos. Las nanopartículas más comunes en aplicaciones biomédicas están compuestas por Co, Fe, Ni, Ti, óxido de hierro y ferritas.

De entre todas ellas, la **magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )** es la más empleada, debido a su reducida toxicidad (Li et al. 2016). La magnetita presenta una simetría cúbica con estructura de espinela, en la cual los átomos de oxígeno se colocan en un empaquetamiento cúbico centrado en las caras (ecc), los átomos de  $\text{Fe}^{2+}$  ocupan  $\frac{1}{4}$  de los huecos octahédricos y los átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  están divididos uniformemente entre los huecos octahédricos restantes y  $\frac{1}{8}$  de los huecos tetrahédricos (Figura 2).

La magnetita es sensible a la oxidación y, habitualmente, puede transformarse en **maghemita**, una de las formas polimórficas del  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , en presencia de oxígeno.





**Figura 2.** Estructura de espinela inversa de la magnetita. (Kozlenko et al. 2019).

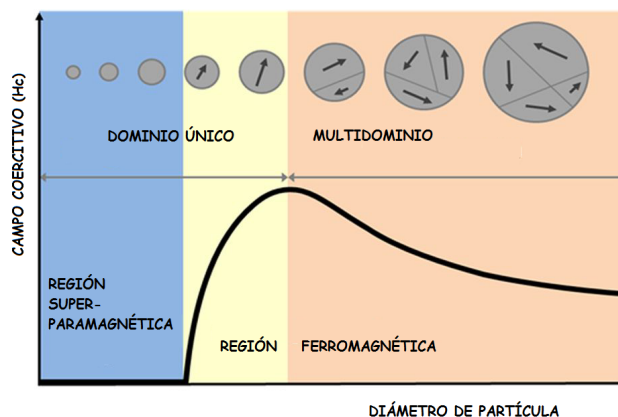
El comportamiento de estos materiales frente a un campo magnético externo viene determinado por la forma en que interactúan los dipolos magnéticos que existen en su interior. Estos dipolos se generan por la existencia de electrones desapareados. En función de cómo se comporten estos dipolos, los materiales se pueden clasificar en: diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos y ferrimagnéticos (Jimeno 2012).

De todos ellos, resultan de especial interés en aplicaciones biomédicas los materiales ferromagnéticos, y dentro de estos los que presentan **superparamagnetismo**. Los materiales ferromagnéticos se caracterizan por presentar dominios magnéticos, en los cuales los dipolos se encuentran ordenados en la misma dirección. En cada dominio, la orientación de los dipolos varía con respecto al dominio adyacente.

Sin embargo, estos dominios desaparecen cuando el tamaño del material decrece hasta un valor crítico, pasando a convertirse en materiales monodominio, y por tanto a considerarse materiales superparamagnéticos. Estos materiales se caracterizan por presentar imanación únicamente en presencia de un campo magnético externo (Guo, Yang, and Wang 2013), de forma que, una vez que se retira el campo magnético la magnetización vuelve a cero. Esta propiedad se mide gracias a la coercividad, es decir, a la intensidad magnética que es necesario aplicar a un material para desmagnetizarlo. En los materiales superparamagnéticos, esta coercividad tiende a cero.

Esta propiedad resulta de especial interés en el campo biomédico ya que evita la formación de aglomeraciones entre las partículas y permite el transporte en una dirección dada y la retención de las partículas.

Por todo ello, el control del tamaño de las partículas es fundamental. Según ha sido descrito, el tamaño de partícula a partir del cual las nanopartículas de magnetita dejan de ser superparamagnéticas es de 20 nm (S. W. Wu and Jiang 2016).



**Figura 3.** Representación de la variación del campo coercitivo de una partícula en función de su tamaño. (J. S. Lee et al. 2015)

### 1.3. Métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas

Debido a su alto interés, la síntesis de SPIONs ha sido objeto de estudio de la comunidad científica durante los últimos años. Sin embargo, el control del tamaño de las partículas obtenidas, el nivel de agregación de las mismas y su estabilidad en diferentes solventes, sigue siendo un problema.

En cuanto a las técnicas empleadas para la formación de nanopartículas magnéticas, los dos métodos más establecidos son la co-precipitación y la descomposición térmica (W. Wu et al. 2015).

El primer método consiste en la mezcla de sales de hierro (II) y hierro (III) en una relación 1:2 en presencia de un medio básico y en ausencia de oxígeno. Sin embargo, este método adolece de un limitado control de la distribución de tamaños (Laurent et al. 2008).

Por otro lado, la descomposición térmica consiste en la preparación de una mezcla de los reactivos de partida a temperatura ambiente, los cuales se calienta de forma progresiva, produciendo la descomposición de los reactivos y generando la formación de nanopartículas de baja polidispersidad. Para este método, es importante la selección de los materiales de partida, siendo uno de los más abundantes el  $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$  (Ling and Hyeon, 2012).

Así mismo es importante la elección de un surfactante adecuado, pues los surfactantes (y la proporción entre ellos si se emplean más de uno) son los que regulan el tamaño y la forma de las nanopartículas (Lenart et al. 2014). Dentro de los surfactantes más comúnmente empleados se encuentran el ácido oleico y la oleilamina.

De especial importancia es, también, la funcionalización de las nanopartículas, tan necesaria en aplicaciones biomédicas. En particular, para el transporte de fármacos es



Figura 4. Ecuación de síntesis de magnetita por descomposición térmica empleando ácido oleico y oleilamina como surfactantes

fundamental la construcción de una malla que rodee a las partículas magnéticas donde puedan anclarse los fármacos. Para ello, es imprescindible el empleo de materiales biocompatibles, tales como el PEG, el dextrano o el quitosano.

El quitosano es un polímero biocompatible y biodegradable, que se obtiene a partir de la quitina, y que presenta en su cadena grupos hidroxilo y grupos amino, funciones que se pueden emplear para anclar diversas especies, así como para formar matrices cerradas (mediante el entrecruzamiento con glutaraldehído).

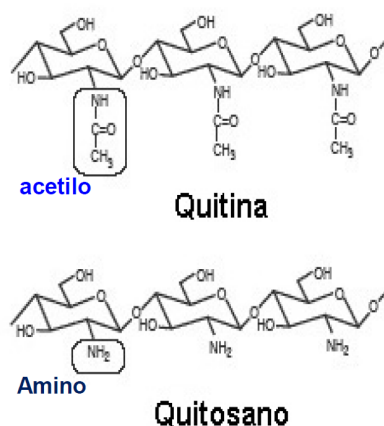


Figura 5. Estructura del quitosano

Además, la carga positiva externa que presenta el quitosano (las aminas tienen una marcada tendencia a cargarse positivamente, dada su basicidad) favorece su entrada a tumores sólidos, ya que las membranas de estos presentan cargas negativas (Khoee, Saadatinia, and Bafkary 2017).

Por todo ello, este polímero parece un candidato idóneo para la funcionalización de nanopartículas magnéticas en aplicaciones biomédicas.

### 1.4. Las nanopartículas magnéticas en biomedicina

Las nanopartículas magnéticas están surgiendo como importantes nanomateriales en biomedicina, siendo utilizados en aplicaciones como la hipertermia, el transporte y liberación de fármacos, la ingeniería de tejidos, la teranóstica o las aplicaciones lab-on-a-chip, debido a sus exclusivas propiedades físico-químicas (Cardoso et al. 2018).

Debido a su carácter superparamagnético, estas partículas pueden ser dirigidas hacia localizaciones concretas, algo imprescindible en aplicaciones como el transporte de fármacos o la terapia génica.

Un ejemplo de nanopartículas magnéticas más efectivas en presencia de un campo magnético externo es el trabajo de Chiang et al. Se trata de nanopartículas magnéticas recubiertas con poly-vinil-alcohol y funcionalizadas con el anticuerpo Trastuzumab para el transporte dirigido de Doxorubicina a células tumorales en modelos de ratón (Chiang et al. 2016), el cual demostró un aumento en 3,25 veces de la reducción del volumen tumoral en aquellos ratones a los que, para las mismas partículas, se les sometió a un campo magnético externo.

Otra de las aplicaciones más punteras de las nanopartículas magnéticas es la hipertermia. Esta técnica consiste en el aumento localizado de la temperatura en una zona corporal concreta, de forma que se elimine el proceso maligno que está teniendo lugar (Cruz et al. 2017). Si bien esta técnica ha sido empleada hasta el momento en tumores superficiales, su eficacia ha sido probada en diversos tumores cerebrales, prostáticos o de mama entre otros. Sin embargo, el principal problema que presenta es la localización y centralización del aumento de la temperatura (Hernando Grande 2007). Este problema se ve parcialmente resuelto por el empleo de nanopartículas magnéticas, ya que, en presencia de un campo magnético externo, estas partículas son capaces de generar calor de forma localizada.

Pero, para que las partículas magnéticas puedan ser empleadas en aplicaciones biomédicas, deben ser tenidas en cuenta varias consideraciones.

La primera de ellas es el control del tamaño, ya que las nanopartículas con un diámetro hidrodinámico inferior a 5,5 nm se excretan rápidamente a través del riñón (Choi et al.

2010), mientras que las nanopartículas grandes, de un tamaño superior a 100 nm, son captadas rápidamente por los fagocitos, y tienden a acumularse en el hígado y el bazo. Aparte de los requerimientos de tamaño, el recubrimiento con materiales biocompatibles es fundamental, no solo para aumentar la biocompatibilidad, sino para modificar las interacciones célula-partícula, la farmacocinética o la biodistribución de las mismas (Calero et al. 2014). Ejemplo de ello es que el uso de recubrimientos como el polietilenglicol puede doblar el tiempo de circulación de nanopartículas magnéticas en sangre, a la par que reduce su acumulación en órganos (Ruiz et al. 2013).

### **1.5. El Glioblastoma como ejemplo de aplicación biomédica de interés**

El glioblastoma es el principal tumor cerebral humano, representando el 1,4% de todos los casos de cáncer (Undabeitia et al. 2018). Está catalogado como de grupo IV por la OMS. (Graus et al. 2013), y presenta una esperanza de vida de apenas 14 meses.

Para su tratamiento, actualmente se emplean tanto la quimioterapia, con fármacos como la temozolamida (TMZ), como la cirugía. Sin embargo, estos métodos son poco efectivos, ya que los glioblastomas se caracterizan por la presencia en el tejido tumoral de células madre resistentes a quimioterapia (BTSC, por sus siglas en inglés). Estas células aparecen como consecuencia de la sobreexpresión de miembros de la familia de transportadores ABC (Galli et al. 2004).

Por ello, la investigación actual en este campo tiende a la búsqueda de terapias que ataquen a estas células, lo que conllevaría a un aumento de la efectividad de los actuales tratamientos quimioterapéuticos.

En este ámbito, se ha visto que la melatonina (N-acetyl-5-methoxytryptamine) es capaz, cuando se administra en concentraciones en el rango milimolar, de suprimir los receptores ABCG2/BCRP (V. Martin et al. 2013).

Sin embargo, la administración de melatonina en estas amplias dosis *in vivo* es dificultosa. Es por ello que, el empleo de SPIONs como transportadores de melatonina se presenta como una alternativa para solventar este problema. Gracias a su comportamiento magnético en presencia de un campo externo (Mosayebi, Kiyasatfar, and Laurent 2017), permiten introducir y dirigir las partículas hacia la zona tumoral,

asegurando su retirada del organismo una vez liberada la melatonina. Adicionalmente, para asegurar la llegada de las partículas al órgano diana, estas podrían ser funcionalizadas con anticuerpos específicos para las células tumorales de glioblastoma, asegurando que se pegan únicamente a estas células (Figura 6).

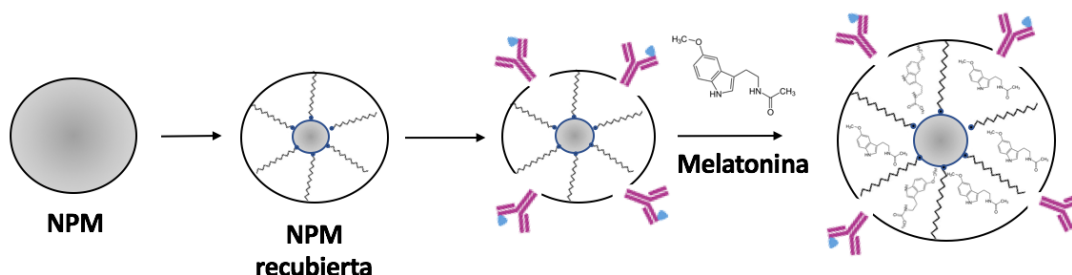


Figura 6. Representación esquemática del proceso de síntesis y carga de nanopartículas superparamagnéticas

### 1.6. Potencial toxicidad de las nanopartículas magnéticas

Si bien las nanopartículas magnéticas han ganado importancia por su potencial biomédico, también se ha debatido ampliamente sobre su inocuidad. La posible metabolización de estas partículas, su farmacocinética y su posible degradación en el organismo son factores cuyo interés ha comenzado a crecer (Mayne, Whiting, and Adamatzky 2018).

Esta preocupación comenzó con la realización de ensayos *in vivo* e *in vitro* que revelaron que muchas partículas magnéticas inducen la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) tras su internalización en las células, lo que conlleva a una alteración en el nivel de expresión de los genes de proliferación celular (Mahmoudi et al. 2011).

Se ha visto que esta toxicidad se ve mermada por la adición de recubrimientos biocompatibles. Por ejemplo, en el estudio realizado por Lotfi y su equipo (Lotfi, Bahari, and Mahjoub 2019), pusieron de manifiesto que un recubrimiento con quitosano y poliácido acrílico limita su toxicidad.

Por ello, la evaluación de la toxicidad de las nanopartículas sintetizadas debe ser, necesariamente, objeto de estudio antes de plantear su potencial como aplicación biomédica.

## OBJETIVOS

---

Los objetivos de este trabajo incluyen<sup>1</sup>:

- La síntesis de nanopartículas magnéticas con un tamaño entorno a los 15 nm (mayor tamaño compatible con la no formación de partículas cuyo diámetro sea superior a 20 nm y tengan comportamiento ferromagnético).
- El recubrimiento de nanopartículas magnéticas con un polímero biocompatible.
- La carga de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con melatonina.
- La puesta a punto de un método de determinación de la concentración de melatonina incorporada a las nanopartículas.
- La determinación de la toxicidad de las nanopartículas magnéticas.

---

<sup>1</sup> Este trabajo se ha llevado a cabo en el marco de la Beca de Iniciación a la Investigación SV-18-GIJÓN-1-14 otorgada por el Instituto Universitario de Tecnología de Asturias (IUTA). El trabajo ha sido reconocido con el premio a mejor ponencia e las V Jornadas de Presentación de Proyectos IUTA 2018.

## PARTE EXPERIMENTAL

---

### 3.1. Instrumentación

La caracterización de las nanopartículas magnéticas resultantes se llevó a cabo mediante el empleo de las técnicas de **espectroscopía de infrarrojo (IR)**, **microscopía electrónica de transmisión (TEM)**, **difracción de rayos X de polvo (XRD)** y medidas de **magnetización a temperatura ambiente**.

El espectrómetro de IR empleado fue el FT-IR Paragon 1000 de PerkinElmer (EE. UU.). Las muestras fueron dispersadas en KBr.

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión se obtuvieron utilizando un JEOL JEM 2100F HRTEM, para las partículas de la primera etapa y JEOL-2000 EX-II TEM, para el resto de partículas, utilizando una rejilla de cobre, usando un voltaje de aceleración de 200 o 160 kV respectivamente. Los cálculos para la estimación del tamaño se obtuvieron con el software *ImageJ*, midiendo la dimensión más grande de cada partícula.

Los difractogramas XRD se obtuvieron con un difractómetro de rayos X Bruker D8 con una fuente de rayos X Keta Cu,  $\lambda = 0.15418$  nm.

Las mediciones de magnetización a temperatura ambiente se realizaron utilizando un sistema de medición de propiedades físicas (PPMS-14T). Este sistema permite aplicar campos magnéticos a las muestras de hasta 14 T, mediante el uso de bobinas superconductoras, en un rango de temperaturas de 1.9 K a 400 K.

Para la elaboración del calibrado de melatonina se ha empleado un potenciostato modelo  $\mu$ AUTOLAB Type II, conectado a un ordenador. Se ha empleado también el conector DRP-DSC (8.0 x 4.0 x 3.5 cm; largo, ancho, alto), proporcionado por DropSens para adaptar los electrodos de trabajo (electrodos serigrafiados de carbono de dimensiones 3.4 x 1.0 x 0.05 cm (largo, ancho, alto)) a este potenciostato. Para las



medidas con partículas magnéticas se empleó el soporte magnético para electrodos serigrafiados modelo DRP-MAGNET de DropSens.

Mediante el empleo del programa GPES-versión 4.9.005 de AUTOLAB se realizaron las medidas electroquímicas por voltametría cíclica.

En cuanto a los ensayos de toxicidad, para el estudio de las células se empleó un microscopio invertido de fluorescencia y contraste de fases Olympus IMT-2, y el programa Scion Frame Grabber Image Acquisition Application 1.0.1. para la toma de las imágenes.

### 3.2. Reactivos y materiales

Para la síntesis, recubrimiento y carga de las partículas se emplearon los siguientes reactivos. Eter de bencilo ( $C_{14}H_{14}O$ , 98%), ácido oleico ( $C_{18}H_{34}O_2$ , 99.99%), acetilacetato de hierro (III) ( $C_{15}H_{21}FeO_6$ , 97%), tolueno ( $C_7H_8$ , 99.8%), acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ , 99.8%), melatonina ( $C_{13}H_{16}N_2O_2$ , 98%), amoníaco ( $NH_3OH$ , 28-30%), tolueno ( $C_7H_8$ , 99.8%), quitosano (bajo peso molecular) y disolución acuosa de glutaraldehído ( $C_5H_9O_2$ , 25%) suministrados por Sigma-Aldrich. 2-propanol ( $C_3H_8O$ , 99.99%), éter de petróleo (40°-60°), 1-butanol ( $C_4H_{10}O$ , 99,9%) y acetona ( $C_6H_3O$ , 99,6%) fueron suministrados por VWR. Oleilamina ( $C_{18}H_{37}N$ , 80-90%) de Acros Organics, ácido perclórico ( $HClO_4$ , 70%) de Panreac, ácido acético ( $C_2H_4O_2$ , 99-100%) y dietileter ( $C_4H_{10}O$ , anhidro) obtenidos de J.T. Baker y etanol ( $C_2H_6O$ , absoluto) de Merck.

Para la realización de las pruebas toxicológicas se emplearon los siguientes reactivos: Hidrobromuro de Poly-L-lysina (mw  $\geq 300,000$ ), NaCl (5M), KCl (3M),  $NH_2PO_4$ , D-glucosa (99,5%), HEPES (99,5%), rojo fenol,  $MgSO_4$ , BSA (98%), tripsina acetilada de páncreas bovino (8500 unidades BAEE/ mg prot.), inhibidor de la tripsina (obtenido de la soja), DNAsa-I (obtenida de páncreas bovino,  $\geq 2000$  Kunitz units/mg), Ara-C, gentamicina (50 mg/ml) y ácido L-glutámico (99%) de Sigma-Aldrich. BME, B27 y FBS de Gibco. Para la tinción por fluorescencia se empleó diacetato de fluoresceína ( $C_{24}H_{16}O_7$ ) obtenido de Sigma-Aldrich.

### 3.3. Soluciones

Se explican en este apartado alguna de las soluciones que ha sido necesario preparar durante este trabajo.

- Soluciones para la preparación de **cultivos primarios**:
  - **Solución 1:** Compuesta por NaCl 124 mM, KCl 5,37 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, D-glucosa 14,5 mM, Hepes 25 mM, rojo fenol 27 μM, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM, seroalbúmina bovina (BSA) 3 mg/ml. La solución se equilibró a pH 7,4 con NaOH.
  - **Solución 2:** Solución 1 suplementada con 0,25 mg/ml de tripsina.
  - **Solución 3:** Solución 1 suplementada con 80 μg/mL de DNAsa I, 0,52 mg/ml de inhibidor de tripsina y MgSO<sub>4</sub> elevado a 2,8 mM.
  - **Solución 4:** Solución 1 suplementada con 25,6 μg/mL de DNAsa I, 166,4 μg/mL de inhibidor de tripsina y MgSO<sub>4</sub> elevado a 1,7 mM.
  - **Solución 5:** Solución 1 suplementada con 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub> y con 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>.

### 3.4. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas se han sintetizado mediante un método consistente en dos etapas de calentamiento y dos de enfriamiento<sup>2</sup>.

En la **primera etapa** de calentamiento, el acetilacetonato de hierro (III) (1,42 g, 4,0 mmol) se dispersó en una mezcla de dibencil éter (20 ml), oleilamina (2,8 ml, 2,27 g, 7,21 mmol) y ácido oleico (2,7 ml, 2,39 g, 8,46 mmol) previamente desoxigenado mediante burbujeo de una corriente de Ar durante 30 min.

La reacción se llevó a cabo en un matraz de 250 ml de fondo redondo de tres bocas, con agitación mecánica, reflujo, atmósfera inerte y calentando con la ayuda de una manta térmica. Se mantuvo la reacción en este punto 15 minutos pasando Ar desde que se alcanza el reflujo.

---

<sup>2</sup> El protocolo aquí descrito ha sido enviado como artículo invitado al Journal of Nanomaterials.

Una vez pasados estos 15 minutos se retiró la manta y se dejó enfriar durante otros 15 minutos. Tras este paso finaliza la primera etapa de las dos en que consiste la reacción. Las partículas obtenidas en esta etapa se aislaron para su posterior caracterización.

La **segunda etapa** de calentamiento consistió en someter a las partículas obtenidas en la anterior etapa a un proceso de calentamiento durante dos horas, manteniendo la agitación mecánica, el reflujo y la atmosfera inerte en todo momento. Tras esta etapa de calentamiento se dejó enfriar durante 30 minutos y se separaron las partículas de los reactivos en exceso mediante lavados por decantación magnética, empleando una mezcla 1:1 (en volumen) de 2-propanol y éter de petróleo. Ocasionalmente, las nanopartículas presentaron ligeras contaminaciones con la silicona utilizada en la glándula de vidrio del agitador, la cual se eliminó efectivamente lavando la muestra con una mezcla 2: 1 (en volumen) de acetato de etilo y tolueno.

Finalmente, las nanopartículas obtenidas se secaron a vacío durante una noche para la posterior caracterización del sólido resultante.

### 3.5. Recubrimiento

En primer lugar se procedió a una etapa inicial de retirada del ácido oleico mediante la utilización de una disolución de **NH<sub>4</sub>OH 1 M en 1-butanol** (C. M. Lee et al. 2009). De esta disolución, se añadieron 5 ml por cada 25 mg de nanopartículas y se sonicaron durante 2 horas. Durante el proceso el baño de agua se calienta alcanzando la temperatura de 55°C.

Tras ese tiempo se lavaron las muestras con una mezcla de tolueno, acetona y etanol (1:1:1) mediante decantación magnética. Las nanopartículas obtenidas mediante esta etapa se han caracterizado por TEM e IR.

Posteriormente a esta etapa se procedió a la incorporación del quitosano. Previo a la incorporación, las partículas se dispersaron en 15 ml de agua destilada y se sonicaron durante 20 minutos. Después, se añadió a estas una disolución de quitosano al 1% (en presencia de un 2% de ácido acético), y se mantuvo en sonicación durante 30 minutos. A continuación, se lavó el sólido secuencialmente con agua y ácido acético, con el

objetivo de retirar la mayor cantidad posible de quitosano sin reaccionar. Las muestras obtenidas se caracterizaron por TEM e IR.

Para la incorporación del glutaraldehído se puso en contacto las partículas con un 1% de quitosano con una disolución acuosa al 25% de glutaraldehído (1,5 ml para 25 mg de partículas) y se dejó bajo agitación mecánica durante 3 horas. Posteriormente se separó magnéticamente el sólido, se lavó secuencialmente con agua miliQ y etanol y se secó a vacío. Las partículas resultantes se caracterizaron por TEM e IR.

### **3.6. Medidas electroquímicas**

Para poder cuantificar la cantidad de melatonina introducida en las partículas se emplearon técnicas electroquímicas basadas en Corujo *et al.*, 2003. En este caso se han realizado las medidas por voltametría cíclica de 0,5-1V, con una velocidad de barrido de 0,05 V/s y un escalón de potencial de 0,002V (Corujo-Antuña *et al.* 2003).

En primer lugar, fue necesaria la elaboración de un calibrado que permitiera relacionar cada potencial con una concentración determinada de melatonina. Para ello, se prepararon disoluciones seriadas de melatonina en PBS 0,1M pH 7,2 de  $10^{-2}$ ,  $7.5 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ ,  $2.5 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $7.5 \times 10^{-4}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $2.5 \times 10^{-4}$  y  $10^{-4}$  M de melatonina en presencia de etanol.

A cada electrodo, sin ningún tratamiento previo, se le adicionaron 10  $\mu$ l de disolución y se dejó depositar el sólido sobre el electrodo durante 5 minutos. Tras este tiempo, se adicionó al mismo 40  $\mu$ l de ácido perclórico 0,1M. Cada medida se realizó diez veces.

Los datos relativos a la gráfica obtenida y, especialmente a los picos de oxidación y reducción observados se recogieron para su posterior análisis.

### **3.7. Incorporación de melatonina**

Una vez que se obtuvieron las partículas magnéticas recubiertas, se procedió a la incorporación de la melatonina en las mismas.

Para ello, se dispersaron las partículas recubiertas en 3 ml de PBS 0,1M pH 7.2 y se pusieron en contacto con 500  $\mu$ l de una solución de melatonina en etanol a una concentración de 15 mg/ml.

## PARTE EXPERIMENTAL

La mezcla se mantuvo en agitación durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se separó el sobrenadante por decantación magnética para su medición. Para la medición de estas partículas se colocaron 10  $\mu\text{l}$  del sobrenadante sobre el electrodo de trabajo y se dejó depositar el sólido durante 5 minutos. Tras este tiempo se añadieron 40  $\mu\text{l}$  de  $\text{HClO}_4$  0,125 M.

Por otro lado, las nanopartículas cargadas con melatonina se resuspendieron en  $\text{HClO}_4$  0,1M y se adicionó al electrodo 50  $\mu\text{l}$  de la solución resultante para su medida. Al tratarse en este caso de nanopartículas magnéticas, se empleó un soporte magnético para concentrar la muestra y aumentar la reproducibilidad de las medidas (Figura 7).

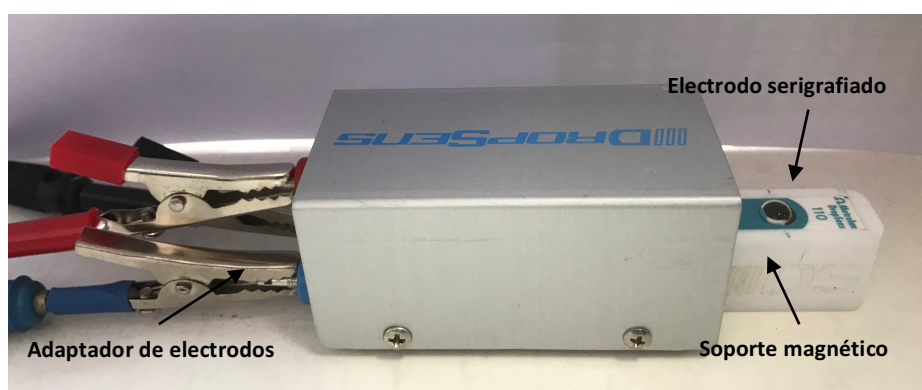


Figura 7. Imagen del adaptador de DropSense con el soporte magnético

Todas las muestras se midieron mediante voltametría cíclica para determinar el contenido de melatonina. Este valor se correlacionó con la cantidad de melatonina inicial para conocer la capacidad de carga de las partículas.

### 3.8. Evaluación de la toxicidad en cultivos neurogliales primarios

Los cultivos celulares se obtuvieron a partir de cerebros de ratas vivas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar proporcionada por el bioterio de la Universidad de Oviedo) de 7-8 días de vida, a las que se les extrajo el cerebelo (Novelli et al. 1988)

Una vez que se tuvieron todos los cerebelos, estos se trituraron y suspendieron en la solución 1<sup>3</sup>. Posteriormente se añadió la solución 2, para iniciar el proceso de

<sup>3</sup> Las soluciones empleadas en este apartado se han explicado detalladamente en el apartado 2.3. Soluciones.

## PARTE EXPERIMENTAL

---

tripsinización de los tejidos. El proceso de tripsinización se detuvo una vez se consiguió una suspensión viscosa mediante la adición de la solución 3. Tras esto, se sometieron los tejidos tripsinizados a una disgregación mecánica con la ayuda de pipetas Pasteur, y se hicieron pasar los tejidos por las soluciones 4 y 5, aplicándoles centrifugación para separar el tejido entre medias. Una vez disgregados, los tejidos se resuspendieron en medio BME, suplementado con 10% FBS, 10 µg/ml de gentamicina, 2 mM de glutamina, 25 mM de KCl y 1% de B27.

Las células se sembraron en una densidad de  $1 \times 10^6$  cells/ml en placas de 35 mm previamente tratadas con poli-L-lisina, asegurando la adherencia de las células a esta. Pasadas 24 horas se añadió Ara-C, 10 µM a las placas para obtener cultivos predominantemente neuronales.

Una vez preparados los cultivos se comenzaron las pruebas de toxicidad. Para ello se probaron, tanto las partículas de partida como las partículas sin recubrimientos y con recubrimiento de quitosano y glutaraldehído en las concentraciones 1, 5 y 10 mg/ml. Las partículas se mantuvieron en el cultivo durante 24 horas, tiempo tras el cual se analizó la toxicidad mediante microscopía de fluorescencia, añadiendo 5µl de diacetato de fluoresceína y dejando actuar durante 5 minutos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

### 4.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Las partículas magnéticas se sintetizaron por descomposición térmica del acetilacetonato de hierro (III) [4 mmol] en atmósfera de Ar, usando dibencileter como disolvente (20 ml) y ácido oleico (8.46 mmol) y oleilamina (7.21 mmol) como surfactantes. Para ello se siguió un proceso en dos etapas.

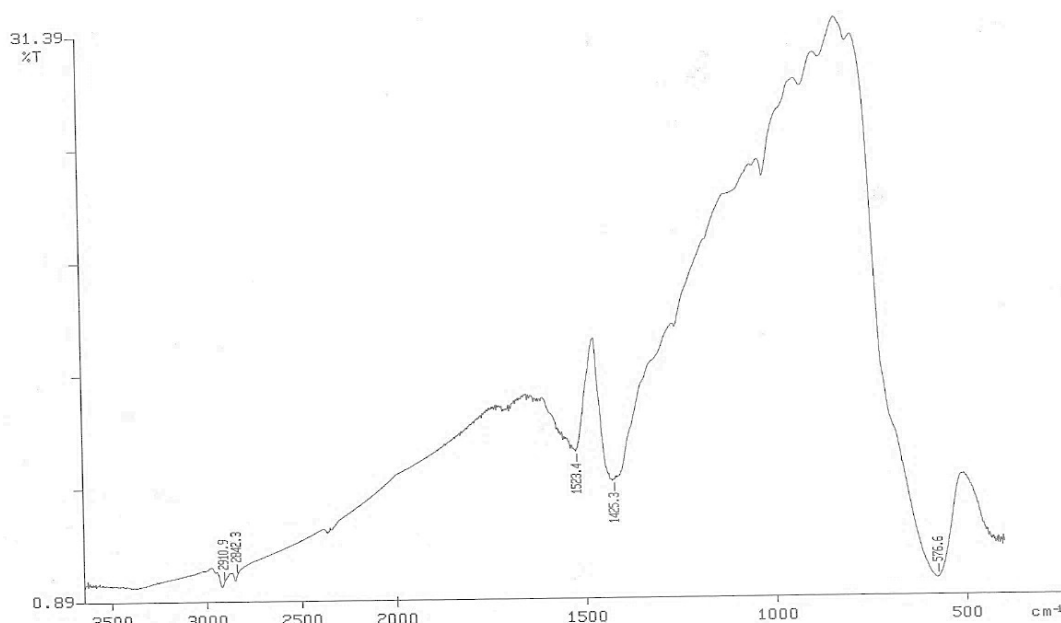
Al terminar la primera, que consiste en calentar la mezcla con agitación mecánica y mantenerla a temperatura de reflujo durante 15 min para posteriormente dejar que la mezcla se enfríe hasta temperatura ambiente, se pueden aislar nanopartículas magnéticas de 9 nm de diámetro y con un rendimiento del 14%.

Si en lugar de parar la reacción para extraer las nanopartículas formadas, se continúa con la segunda etapa, calentando a reflujo 2 horas y dejando enfriar la mezcla hasta alcanzar temperatura ambiente, se obtienen unas nanopartículas de magnetita de unos 15 nm de diámetro y con un rendimiento del 29 %. Aparentemente las nanopartículas obtenidas en la primera etapa actúan como semillas para las preparadas en la segunda etapa (Lenart et al 2014).

El espectro de IR de las nanopartículas obtenidas tras la segunda etapa, que coincide con el espectro obtenido para las partículas aisladas tras la primera etapa, mostró bandas de absorción propias de la magnetita, por un lado, y bandas correspondientes al recubrimiento con oleato por otro. En la Figura 8 se muestran bandas en  $2911\text{ cm}^{-1}$ , w, y  $2842\text{ cm}^{-1}$ , w (tensión de CH) y en  $1523\text{ cm}^{-1}$ , w, br, y ,  $1425\text{ cm}^{-1}$ , m, br (tensión antisimétrico y simétrico del grupo carboxilato), correspondientes al oleato (Fang et al. 2009).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La banda ancha y fuerte observada a  $577\text{ cm}^{-1}$  se debe a las vibraciones de estado sólido de la magnetita. Adicionalmente, en algunos casos se ha detectado presencia en las muestras de pequeñas contaminaciones con silicona, observables por la aparición de bandas en  $1258$ ,  $1092$ ,  $1018$  y  $797\text{ cm}^{-1}$ .



**Figura 8.** Espectro de infrarrojos de NPM con ac. oleico

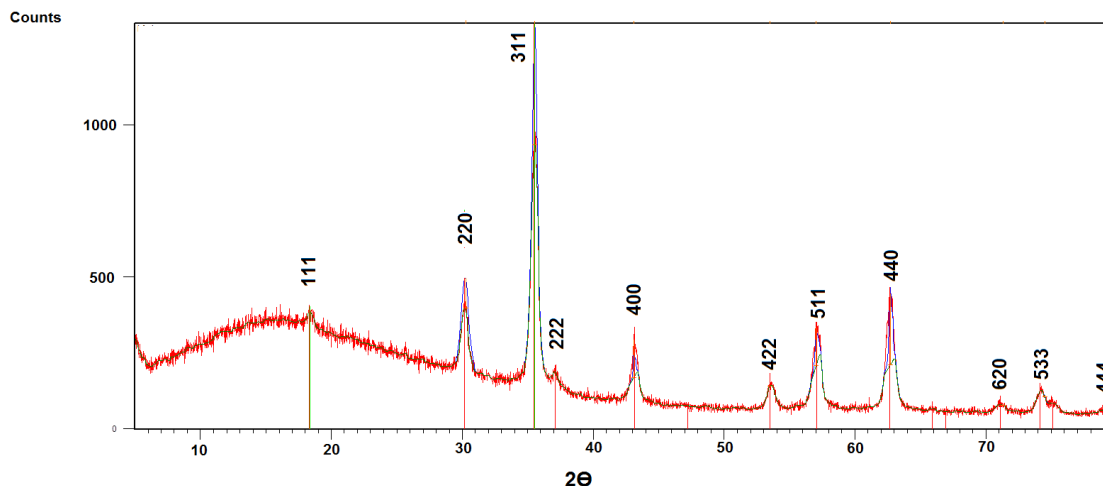
Estas bandas se han conseguido eliminar mediante lavados con una mezcla de acetato de etilo: tolueno (2:1 en volumen).

Para conocer mejor el estado de cristalización de las partículas de magnetita y poder determinar su nivel de pureza, se llevó a cabo un análisis de las muestras por difracción de rayos X. Los resultados obtenidos para las muestras de la primera y segunda etapa son los mismos, por lo que se representa aquí únicamente el difractograma de la primera etapa (Figura 9).

Este difractograma muestra que los picos de difracción no reflejan una cristalización total de la magnetita, como indica la banda ancha a ángulos de difracción bajos. Los ángulos de difracción ( $2\theta$ ) y el espaciado de la red ( $d$  (Å)) de nuestra muestra se han representado en la Tabla 1. En esta se han recogido los valores de espacio atómico estándar para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , así como los índices hkl (Sun et al. 2004).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 9.** Patrón de difracción de rayos X de las partículas obtenidas tras la primera etapa.

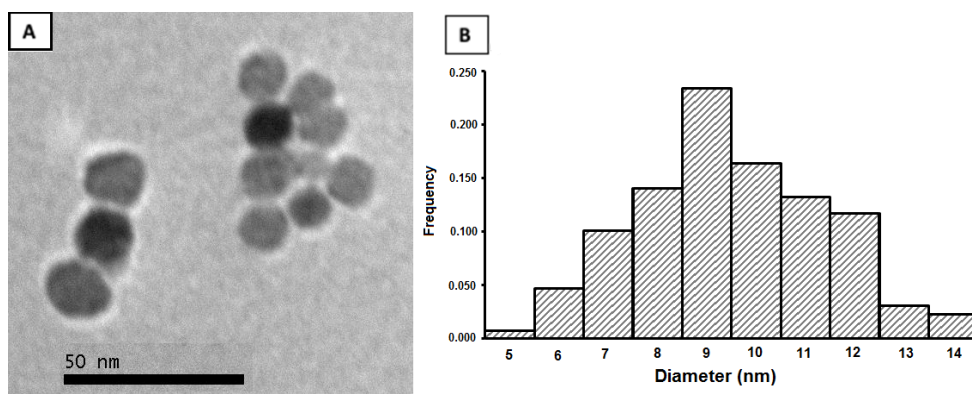
**Tabla 1.** Datos relativos a los ángulos de difracción ( $2\theta$ ) (primera fila) y el espaciado de la red ( $d$  (Å)) (segunda fila) de la muestra, el de la magnetita cristalina (tercera fila) según bibliografía y los  $hkl$  (cuarta fila).

$2\theta$	17.6	30.0	35.4	37.0	43.2	53.7	57.1	62.6	71.2	73.9	79.3
$d$ (Å)	5.04	2.98	2.54	2.43	2.09	1.72	1.61	1.48	1.32	1.28	1.21
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	4.86	2.98	2.53	2.43	2.10	1.71	1.62	1.48	1.33	1.28	1.21
$hkl$	111	220	311	222	400	422	511	440	620	533	444

Asimismo, y dado que es uno de los puntos de especial interés en la síntesis de partículas magnéticas, se estudió la polidispersidad de la muestra y la distribución de tamaños de la misma mediante TEM.

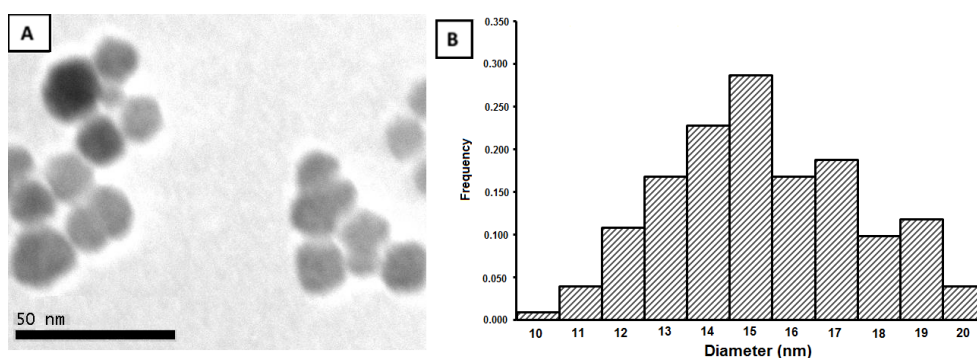
Para las partículas obtenidas tras la primera etapa (Figura 10), el diámetro medio es de  $9 \pm 4$  nm. La distribución de tamaños muestra una buena correlación de los mismos con apenas un porcentaje reducido de partículas con tamaños inferiores a 5 nm o superiores a 13 nm. También, se puede percibir que la forma de las partículas es en todo caso redondeada, sin encontrarse un gran número de partículas con formas cuadráticas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 10.** Micrografía de NMP tras la primera etapa. Imagen obtenida por TEM. **B.** Distribución de tamaños de las partículas observadas en las imágenes por TEM. Cálculo realizado con ImageJ.

En cuanto a las partículas obtenidas tras las dos etapas consecutivas de calentamiento, el tamaño aumenta hasta los  $15 \pm 5$  nm de diámetro. Esto parece confirmar que, mientras en la primera etapa se produce la formación del núcleo o core de la partícula, en la segunda se produce el crecimiento de las mismas. Si bien en esta etapa se observa una distribución de tamaños menos homogénea (Figura 11), sigue estando en márgenes adecuados, manteniendo más del 30% de la población muestral en la media.



**Figura 11.** Micrografía de NMP tras la segunda etapa. Imagen obtenida por TEM. **B.** Distribución de tamaños de las partículas observadas en las imágenes por TEM. Cálculo realizado con ImageJ.

Las distribuciones de tamaños antes descritas se han conseguido gracias a un exhaustivo control de la velocidad de calentamiento de la reacción. Tal y como postula Guardia *et al.* (Guardia, Pe, and Liz-marza 2010), este parámetro es crucial para conseguir una correcta polidispersidad de la muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este caso, la temperatura se midió de forma indirecta mediante el control de la temperatura de los vapores de la reacción recogidos por el termómetro puesto en una de las bocas del matraz de reacción (Figura 12).

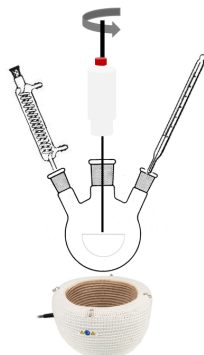


Figura 12. Esquema del montaje del proceso de síntesis

En la figura 13 se puede observar cómo la temperatura de los vapores de reacción aumenta gradualmente hasta unos 117 °C, punto en el que la temperatura pega un salto. Este salto se correlaciona con el inicio del reflujo. En este punto se observa también la aparición de una nube blanca, que se relaciona con la presencia de vapor de agua, producido de la descomposición del oleato de hierro en presencia de ácido oleico para generar 1-octadeceno (Kemp et al. 2016). Un segundo escalón aparece hacia 220°C que coincide con la aparición de un producto de color negro, lo que puede asociarse a la formación de la magnetita (Guardia et al. 2010).

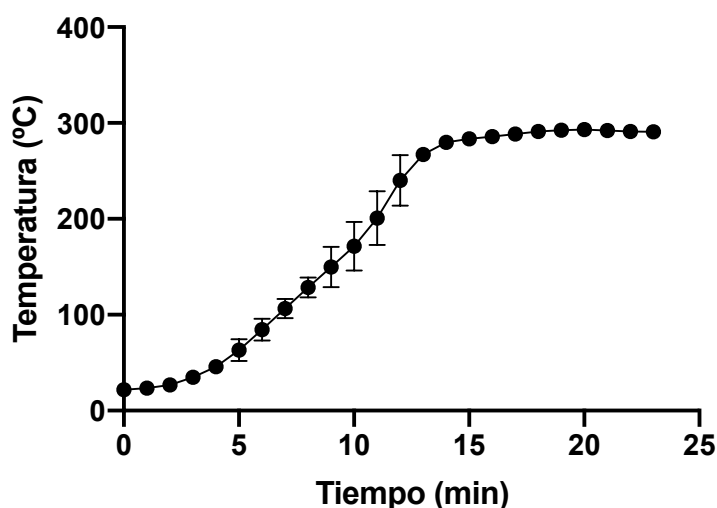
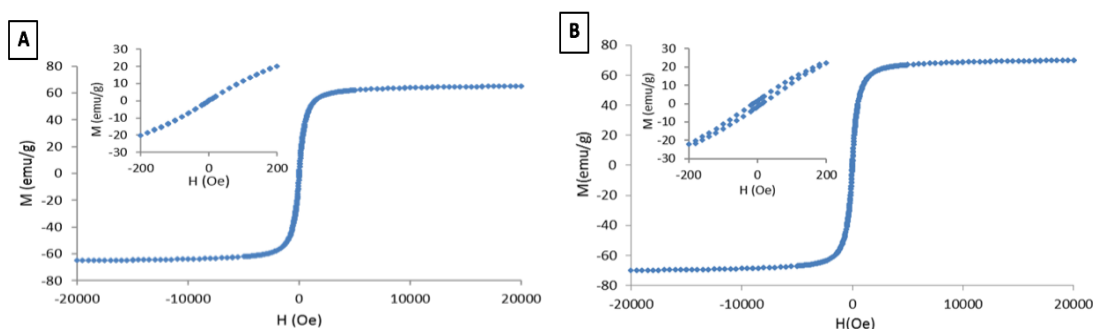


Figura 13. Curva de temperaturas de la reacción de síntesis de NPM. Datos recogidos durante la primera etapa de calentamiento, antes y después del reflujo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pero, si bien la distribución de tamaños y la pureza de la muestra son parámetros importantes en el proceso de síntesis, lo es especialmente el magnetismo final de las partículas obtenidas, ya que será lo que asegure el comportamiento superparamagnético deseado.

Para conocer este parámetro es necesario el estudio de los ciclos de histéresis resultado de las medidas de magnetismo a temperatura ambiente (Figura 14). En este caso, se han medido los ciclos de histéresis, por separado, de las partículas obtenidas tras la primera y la segunda etapa.



**Figura 14.** Ciclos de histéresis de **A.** partículas obtenidas en la primera etapa, **B.** partículas obtenidas en la segunda etapa.

El comportamiento magnético de las partículas del primer paso difiere ligeramente del observado en las partículas finales, ya que las primeras presentan un excelente comportamiento superparamagnético con un campo coercitivo de aproximadamente 1 Oe y una alta magnetización de saturación de aproximadamente 60 emu / g. En el caso de las partículas finales, el campo coercitivo ha aumentado a un valor de alrededor de 7 Oe, sin embargo, están dentro de los límites aceptados como superparamagnéticos. Además, se puede observar que hay un aumento de la magnetización de saturación que en este caso da como resultado unos 70 emu / g, más bajo que el de la magnetita con una cristalinización total (92 emu / g).

En cualquier caso, los valores conseguidos están muy próximos al máximo posible, lo que hace de estas partículas candidatos muy deseables en aplicaciones biomédicas.

### 4.2. Recubrimiento de NPM con quitosano

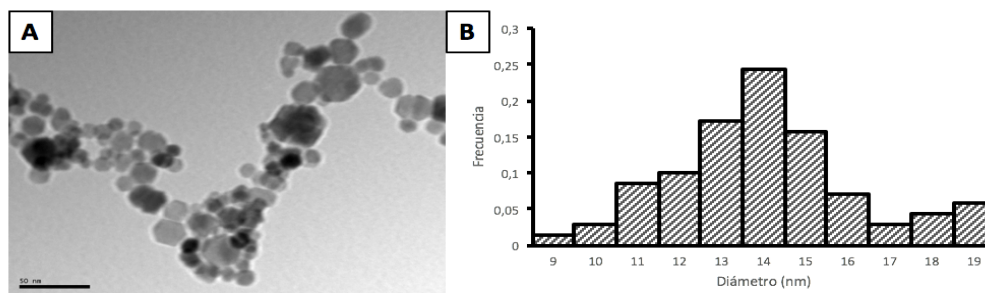
Para lograr el fin que se persigue, el transporte de fármacos guiado magnéticamente, el recubrimiento de las nanopartículas de magnetita es crucial. Dado que debe tratarse de materiales biocompatibles y capaces de retener la melatonina se han estudiado los polímeros polietilenglicol, dextrano y quitosano (entrecruzado con glutaraldehído). Debido a que los resultados más exitosos se han producido con este último recubrimiento, se presentan en este trabajo únicamente los métodos y resultados relativos al quitosano.

Por su tamaño y alta magnetización, se ha decidido emplear las nanopartículas magnéticas correspondientes a la segunda etapa de síntesis para su recubrimiento.

En primera instancia, se intentó recubrir con quitosano las partículas tal cual son obtenidas en el proceso de síntesis, es decir, manteniendo el ácido oleico. El resultado fue la obtención de partículas prácticamente incapaces de ser atraídas por el imán, necesitándose tiempos de deposición sobre este muy elevados. Este comportamiento sugería que la deposición podía deberse más a la precipitación de las partículas por una cuestión de tamaño que al ser atraídas por el imán. Por ello, se tomó la decisión de eliminar el ácido oleico antes de recubrir con quitosano mediante la utilización de una disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1 M en 1-butanol (C. M. Lee et al. 2009).

La caracterización de las partículas sin ácido oleico mediante TEM (Figura 15) ha dejado patente una variación notable en el tamaño con relación a las partículas de partida, mostrando estas primeras un tamaño de 18 nm, con una desviación de  $\pm 6,25$ . Este aumento de tamaño probablemente se deba a un problema de percepción a la hora de observar las micrografías, pudiendo verse como una partícula lo que en verdad son varias partículas juntas debido a una mayor aglomeración causada por la pérdida del surfactante (ácido oleico) (Chem and Liu 2006). Esto explicaría también el aumento del grado de polidispersidad de la muestra. Este aumento de la aglomeración concuerda con la retirada del surfactante, puesto que afecta a la carga en superficie de las partículas, favoreciendo su unión (Chen and Liu 2006).

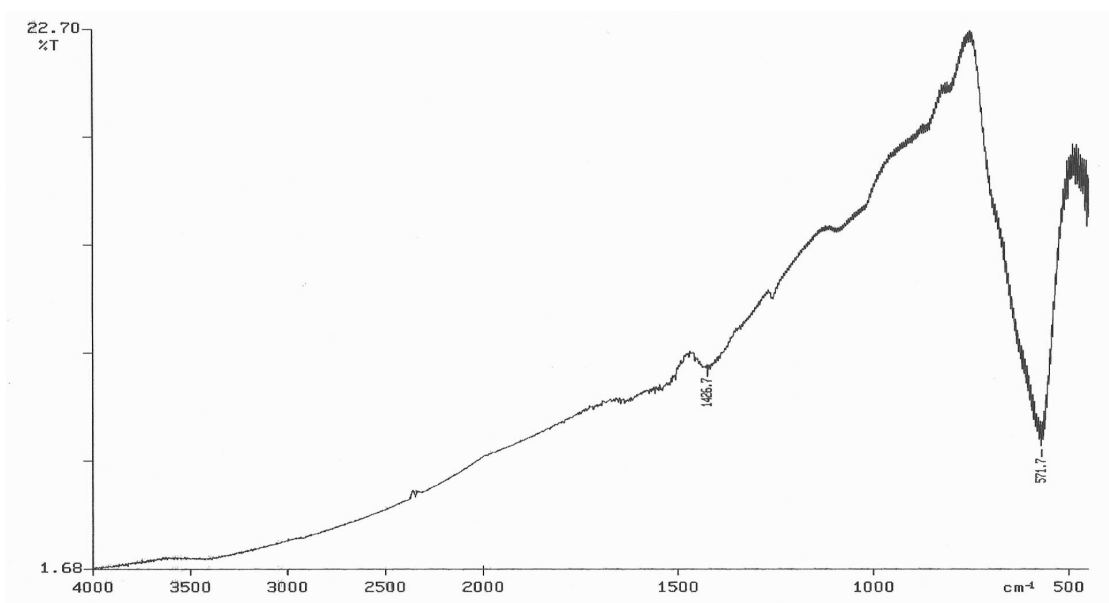
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 15.** Micrografía obtenida mediante análisis por TEM de las partículas sin recubrir. B. Distribución de tamaños de las partículas observadas mediante TEM.

Adicionalmente a las medidas por TEM se realizó un IR de las partículas (Figura 16).

En este se observa cómo la señal correspondiente a la magnetita a  $571.7\text{ cm}^{-1}$  se mantiene, mientras que la señal correspondiente al ácido oleico a  $\sim 1420\text{ cm}^{-1}$  disminuye notablemente, si bien se observan restos del mismo. Esta señal confirma que el ácido oleico se ha retirado en su mayor parte, por lo que se puede proceder al intercambio con otros recubrimientos.

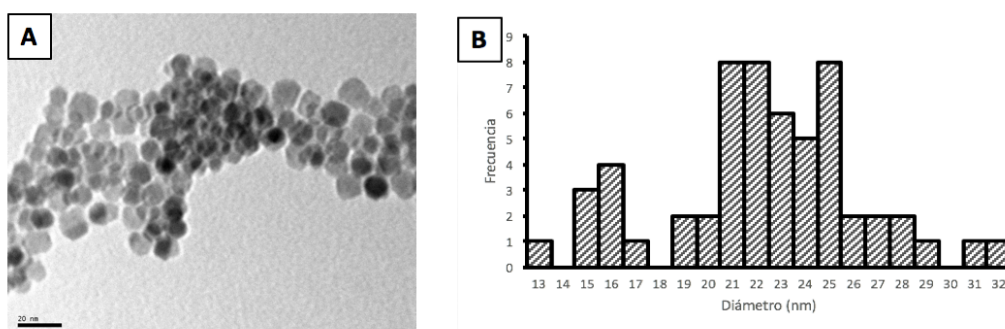


**Figura 16.** Espectro de infrarrojos de nanopartículas sin recubrimiento.

Una vez retirado en su mayor parte el ácido oleico, se procede al recubrimiento de las partículas con una disolución de quitosano al 1%. Las partículas resultantes se caracterizaron, en primer lugar, mediante TEM. Las micrografías obtenidas (Figura 17) mostraron cómo la aglomeración y la polidispersidad de las partículas aumenta, presentando un tamaño medio notablemente mayor, de  $22,3 \pm 4\text{ nm}$ . Este aumento de tamaño podría estar producido por la aparición de una cierta aglomeración.

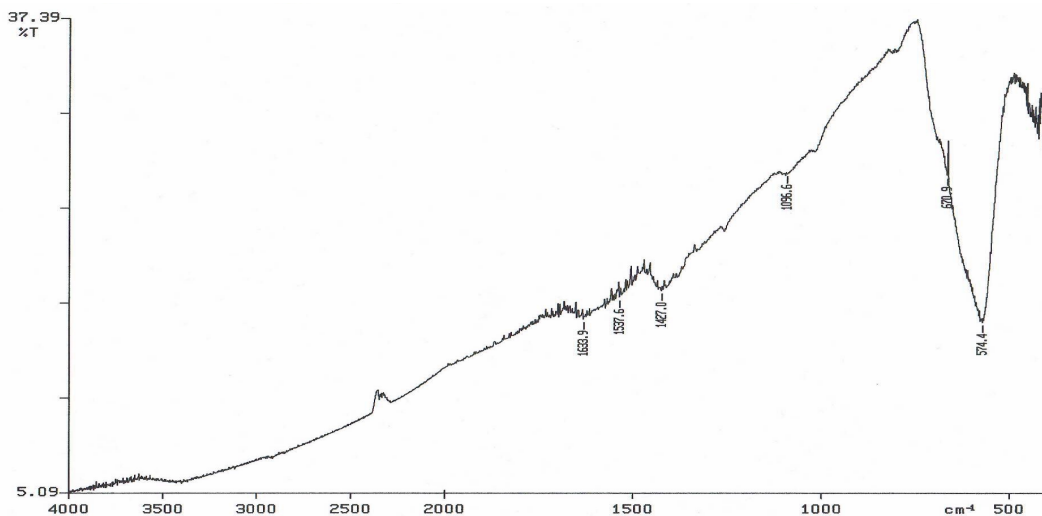
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A su vez, esta aglomeración puede deberse a que el quitosano empleado tiene un peso molecular elevado, lo que produciría la unión del mismo a varias partículas, formando una red que favorezca la agregación y el aumento del tamaño, y dificulte su atracción por el imán. Respecto a esto último, se observa que la red generada por el quitosano provoca la retención del agua usada como solvente de la reacción dentro de la matriz generada, dificultando su atracción por el imán. Esto se confirma ya que, conforme se van retirando los productos secundarios el tiempo necesario para que las partículas se vean atraídas por el imán se reduce notablemente.



**Figura 17.** A. Micrografía obtenida mediante análisis por TEM de NPM con un 1% de quitosano. B. Distribución de tamaños de las partículas observadas mediante TEM.

En cuanto al análisis de las partículas por IR, se observa que las señales correspondientes al quitosano son débiles (Figura 18). Estas señales deberían aparecer a  $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones de tensión y deformación de los N-H (Qu et al. 2010), que pueden estar tapadas por las bandas del  $\text{H}_2\text{O}$ , que aparecen por las mismas zonas, así como la banda a  $\sim 1080\text{ cm}^{-1}$  y  $\sim 1030\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a las vibraciones del enlace C-O (Zhou et al. 2009).



**Figura 18.** Espectro de IR de NPM con 1% quitosano.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La señal a  $1427\text{ cm}^{-1}$  se debe a los grupos  $\text{CH}_2$  del quitosano

Debido a esta débil señal, se decide probar al entrecruzamiento con glutaraldehído tras la incorporación del quitosano.

Este compuesto presenta dos grupos aldehído,  $-\text{C}(=\text{O})\text{H}$ , capaces de reaccionar con los grupos amino  $-\text{NH}_2$  de dos macromoleculas diferentes de quitosano, formando grupos imina,  $-\text{CH}=\text{N}-$  lo que permite cerrar la malla que se espera generar (Qu et al. 2010) alrededor de las nanopartículas (Figura 19).



Figura 19. Representación esquemática del recubrimiento con quitosano y glutaraldehído.

La adición del glutaraldehído permitiría el cierre de la estructura generada alrededor de la partícula y la retención del quitosano, evitando así su salida y eliminación en el proceso de secado (durante el proceso de secado, antes de comenzar el vacío, las nanopartículas se retienen con el imán en la parte alta del matraz dejando caer el agua hacia la parte baja, que arrastra consigo al quitosano).

En primer lugar, el análisis por IR de las partículas obtenidas reveló unas partículas con una señal intensa de quitosano (Figura 20), mucho mayor de la observable hasta el momento.

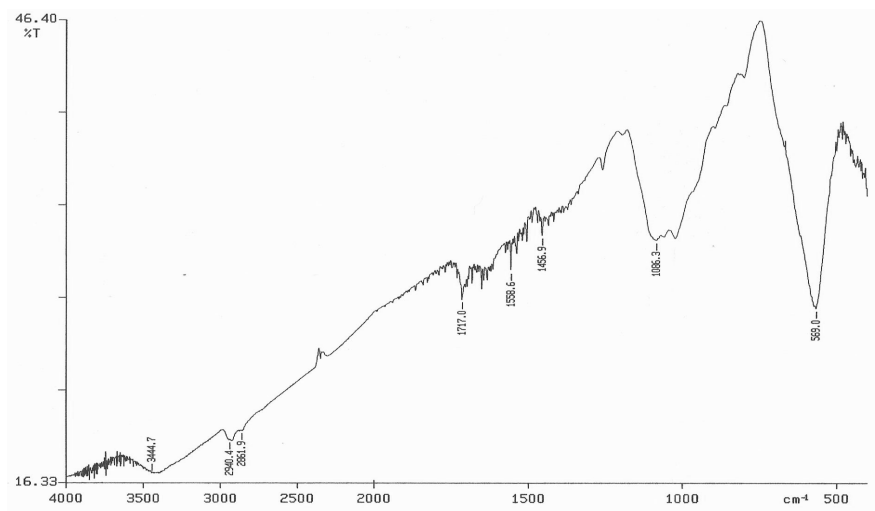


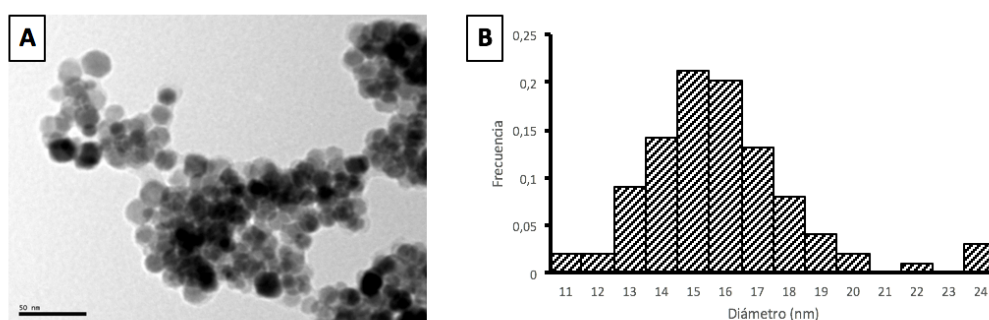
Figura 20. Espectro de IR de nanopartículas con 1% de quitosano + 25% glutaraldehído.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Asimismo, se puede observar una señal alrededor de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al grupo  $-\text{COH}$  del glutaraldehído.

En cuanto al análisis de estas partículas por TEM (Figura 21), estas muestran un tamaño medio de  $15,85 \pm 2,4\text{ nm}$  y una polidispersidad mucho menor. Sin embargo, la aglomeración de las partículas es muy alta. En este caso, a diferencia de en la figura 17, se observa cómo las partículas parecen, en su mayoría, estar unidas entre sí por la presencia del quitosano y el glutaraldehído, viéndose incluso una mayor proporción de partículas superpuestas, así como polímero entre partículas.



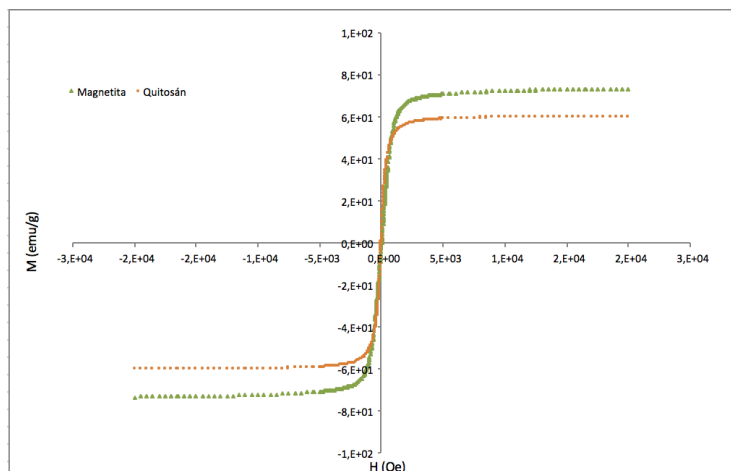
**Figura 21.** Micrografía de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con quitosano y glutaraldehído.

A pesar de que el **grado de aglomeración** y la **polidispersidad** de las partículas no es idóneo, y debe ser un punto de mejora en futuros trabajos, se ha conseguido poner a punto un método que permite la obtención de partículas con un buen recubrimiento de quitosano y glutaraldehído, manteniendo el tamaño y la forma de las partículas de partida.

Dado que tan importante es que las partículas sean capaces de retener melatonina como que mantengan su comportamiento magnético, se han llevado a cabo medidas de magnetismo a temperatura ambiente de las partículas con un 1% de quitosano entrecruzado con glutaraldehído. Estas han revelado que las partículas recubiertas presentan un campo coercitivo de  $3,4\text{ Oe}$  y un magnetismo de saturación de  $60\text{ emu/g}$  (Figura 22). Estos resultados aseguran un comportamiento superparamagnético de las partículas, reduciéndose el campo coercitivo respecto a las partículas de partida, aunque disminuyendo también el magnetismo de saturación. Aunque este haya

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

disminuido, sigue siendo un valor adecuado de imanación, que asegura que las partículas obtenidas podrán ser capaces de seguir un campo magnético alterno.



**Figura 22.** Curva de histéresis de las partículas magnéticas recubiertas con quitosano y glutaraldehido (naranja) frente a las NPM de partida (verde).

### 4.3. Calibrado de melatonina

El proceso de carga de nanopartículas magnéticas con compuestos bioactivos como es la melatonina requiere, también, de un método de detección de la misma, para asegurar que la concentración cargada está en el orden deseado. La melatonina puede ser detectada de dos formas principales, por voltametría cíclica (CV) y por amperometría en un sistema de flujo de inyección (FIA-ED)(Corujo-Antuña et al. 2003).

En este caso las medidas se realizaron por voltametría cíclica de 0,5-1V, con una velocidad de barrido de 0,05 V/s y un escalón de potencial de 0.002V.

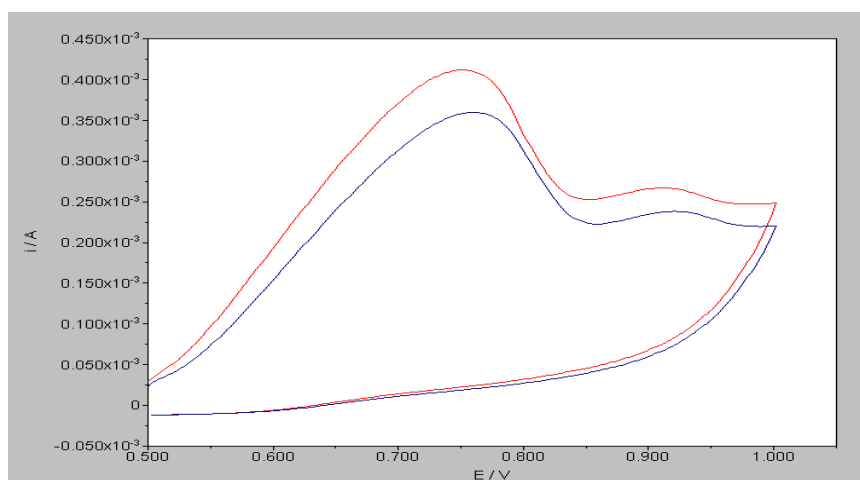
Previo a la carga de las nanopartículas magnéticas con melatonina, es necesaria la puesta a punto de un calibrado, de forma que se pueda correlacionar la concentración de melatonina con la señal amperométrica correspondiente.

En este caso se han seleccionado concentraciones desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta  $1 \times 10^{-4}$  M, ya que la cantidad de melatonina que es necesario cargar para poder administrar niveles terapéuticos es del orden milimolar (V. Martin et al. 2013).

El proceso de voltametría cíclica llevado a cabo reveló la aparición de dos picos de oxidación correspondientes a la melatonina en  $\sim + 0.700$  V, y otro a  $\sim + 0.900$  V (Figura 23). El primero de estos se trata de un pico de mayor intensidad, alcanzando una señal

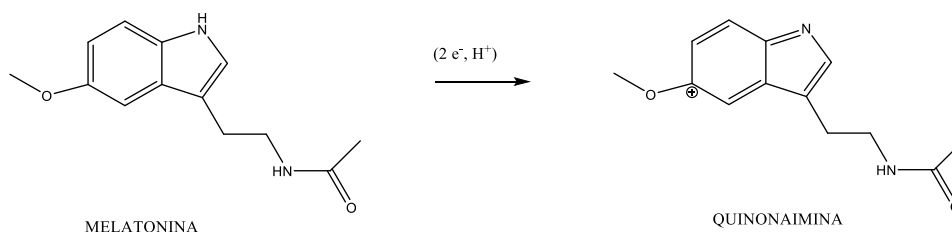
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

media de  $\sim 218 \mu\text{A}$  para la concentración más alta ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ). Debido a esta mayor señal, se ha decidido seleccionar la altura en  $\mu\text{A}$  de este pico como señal electroquímica para la elaboración del calibrado.



**Figura 23.** Voltametría cíclica de muestra de melatonina con concentraciones de  $10^{-2}$  (roja) frente a  $7,5 \times 10^{-3}$  (azul).

El proceso de oxidación ocurrido revela una degradación total de la melatonina, ya que no se observan picos de reducción de la misma. El proceso de oxidación ocurrido consiste en un primer proceso de abstracción de un electrón, que genera un catión radical. Este catión se vuelve a oxidar por la pérdida de un segundo electrón y de un protón, generando una quinoneimina, la cual es susceptible al ataque nucleofílico del agua presente en la solución. El ataque por agua produciría un 4,5-dihidroxi derivado indólico, que está en equilibrio con su forma oxidada (quinona) (Corujo-Antuña et al. 2003) (Figura 24).



**Figura 24.** Representación del proceso de oxidación de la melatonina. (Kumar and Goyal 2017).

Con las alturas correspondientes al primer pico de oxidación de la melatonina se elabora un calibrado ( $n=10$ ) que correlaciona la concentración con la altura del pico (Figura 25). De esta forma se obtiene ya una curva que permite correlacionar la concentración de melatonina con una señal electroquímica, constituyendo así un método de detección de la misma.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

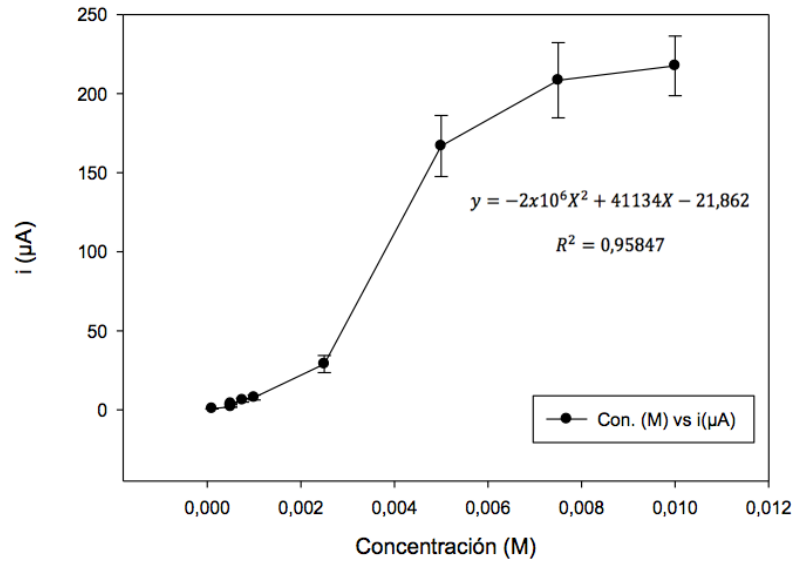


Figura 25. Curva de calibrado de la melatonina obtenida por voltametría cíclica

### 4.4. Incorporación de melatonina

La incorporación de la melatonina se ha producido poniendo en contacto las nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano y la melatonina disuelta en etanol. Tras 24 horas se analizó por voltametría cíclica el sobrenadante y las nanopartículas magnéticas (Tabla 2) (Figura 26).

Tabla 2. Resultados obtenidos para las medidas de carga de melatonina

Muestra	mV	$\mu\text{A}$	RSD (desv/prom)*100
Partículas (n=6)	+ 0,618	41,42 $\pm$ 2,40	5,79%
Sobrenadante (n=6)	+ 0,743	174,0 $\pm$ 13,0	7,47%

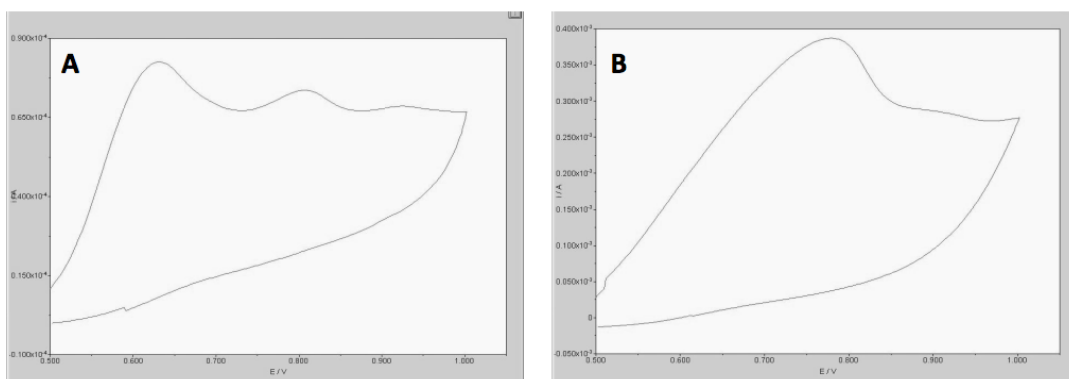


Figura 26. Resultado obtenido para el análisis por voltametría cíclica de A. Partículas cargadas con melatonina, B. Sobrenadante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se observa como la señal detectada es mucho mayor en el caso del sobrenadante que en el de las partículas, algo esperable debido a que la melatonina se ha añadido en gran cantidad. Se observa también que la desviación es mayor en estas muestras, algo que también ocurría en el calibrado de melatonina para concentraciones altas. Sin embargo, la RSD muestra para ambos casos un valor por debajo de 10%, lo cual indica que la **reproducibilidad** de las señales es buena. Esto es imprescindible ya que indica tanto que el método de detección es bueno y permite, en diferentes réplicas (n=3) obtener una señal reproducible, como que la incorporación de melatonina se produce de forma homogénea, incorporándose la misma cantidad en diferentes reacciones (n=2).

Resulta también curiosa la variación respecto a la posición en la que aparece el pico de mayor intensidad, siendo esta en +0.743 mV para el sobrenadante y de + 0.618 mV para las partículas. Esta variación puede deberse simplemente a que, a una concentración de melatonina elevada como es el caso del sobrenadante se observa un achatamiento del pico (Figura 26.A). Sin embargo, el pico observado en las partículas es mucho más definido (Figura 26.B). Este aspecto ocurría también en el calibrado, por lo que no se considera que pueda inducir a error a la hora de correlacionar la señal electroquímica con la concentración de melatonina incorporada.

En cuanto a la proporción de melatonina cargada, se ha calculado la misma empleando el promedio de la medida en  $\mu\text{A}$  obtenida tanto para las partículas como para el sobrenadante (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cálculos de la capacidad de carga de las NPM teniendo en cuenta la curva de calibrado obtenida.

Muestra	Señal $\mu\text{A}$	Concentración (M)	Cantidad melatonina (mg)	Porcentaje
Partículas	$41,42 \pm 2,40$	$3 \times 10^{-3}$ M	2,1	23,22%
Sobrenadante	$174,0 \pm 13,0$	$7,5 \times 10^{-3}$ M	5,23	69,68%

El resultado obtenido muestra una proporción de melatonina cargada del 23%<sup>4</sup>. Si bien la suma del sobrenadante y partículas no supone el 100% de la melatonina inicial, esto puede deberse a errores experimentales, tanto a nivel de pesada y manejo de las

<sup>4</sup> Los resultados de este trabajo, tanto del recubrimiento como de la carga de las partículas, serán expuestos como comunicación oral en el Congreso Anual de Biotecnología (BAC) que tendrá lugar en Madrid del 10-12 de julio.

soluciones, como de la propia medida, ya que se han empleado valores medios para el cálculo de las capacidades de carga.

Adicionalmente, se sabe que el empleo de un imán para atraer al electrodo las partículas magnéticas con melatonina puede concentrar ligeramente la muestra, llevando a la obtención de una concentración ligeramente superior a la real.

Si bien es necesaria la realización de un mayor número de pruebas experimentales, tanto para confirmar lo aquí descrito como para mejorar las capacidades de carga, los resultados expuestos parecen indicar que las partículas sintetizadas son **aptas para la carga y transporte de melatonina**.

### 4.5. Análisis toxicológico

Para este análisis se han seleccionado cultivos neurogliales primarios como modelo de estudio debido a su sensibilidad a la presencia de agentes tóxicos, lo que les hace candidatos idóneos para estudios toxicológicos de este tipo. Asimismo, y dado que el uso de las nanopartículas sintetizadas en este trabajo está pensado para el tratamiento de tumores cerebrales, estas células suponen un modelo fiable de células cerebrales sanas.

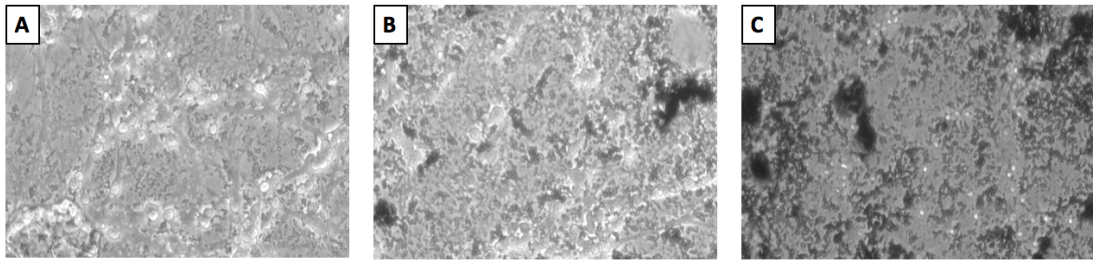
Una vez que se obtuvieron partículas correctamente recubiertas, se procedió a la realización de pruebas toxicológicas. Con este fin, se llevaron a cabo pruebas tanto de las partículas de partidas, como de las partículas sin recubrimiento y de las recubiertas con quitosano y glutaraldehído.

En primer lugar, se observó un problema que dificultó el desarrollo de las pruebas, y es que las nanopartículas tendían a quedarse pegadas al fondo de la placa, impidiendo la visión por microscopio óptico. Esta capacidad para quedarse adheridas a superficies es algo de vital importancia y que debe ser estudiado previo a su administración, ya que podría constituir un problema si las partículas se quedaran pegadas a los tejidos celulares en su camino hacia la zona tumoral.

Los resultados del ensayo de toxicidad revelaron, en primera instancia, una correlación entre la toxicidad de las partículas y la concentración añadida, observándose un aumento notable de la toxicidad para la concentración 10 mg/ml (Figura 27). Por tanto,

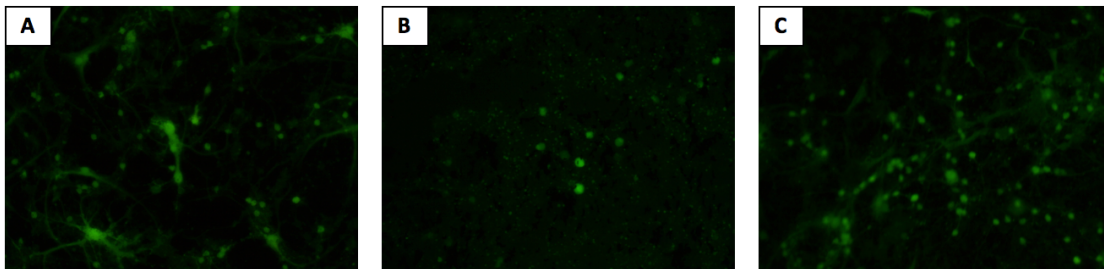
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

si bien se necesitaría pruebas adicionales para confirmarlo, se podría definir la concentración 10 mg/ml como concentración máxima tolerable.



**Figura 27.** Cultivos neuronales en presencia de nanopartículas magnéticas recubiertas con quitosano y glutaraldehído tras 24 horas de exposición. **A.** NPM 1mg/ml. **B.** 5 mg/ml. **C.** 10 mg/ml.

Además de la concentración tóxica para las partículas, se estudió el efecto del recubrimiento de estas (Figura 28). En este caso, las diferencias observadas no fueron significativas entre partículas, si bien se observa que la **proporción de células vivas es ligeramente mayor en los cultivos en presencia de NPM con quitosano y glutaraldehído para una concentración de 10 mg/ml.**



**Figura 28.** Microscopía de fluorescencia de cultivos neurogliales con 10 mg/ml. **A.** NPM con ácido oleico. **B.** NPM desnudas. **C.** NPM con quitosano + glutaraldehído.

Si se comparan los resultados obtenidos en estos ensayos con las toxicidades descritas en la bibliografía (Liu et al. 2013), se observa que los niveles de tolerancia en nuestro caso son mucho más altos, siendo el rango de concentración máxima tolerable en torno a 100  $\mu\text{g/ml}$ . Esta diferencia puede deberse, en primer lugar, a las diferencias en el modelo celular elegido, siendo el más próximo empleado la línea celular GL261 de células tumorales cerebrales de ratón (A. L. Martin et al. 2008). Asimismo, también difiere el método de determinación de la supervivencia celular, ya que el ensayo mayoritariamente empleado en la bibliografía es el ensayo colorimétrico con MTT. Por tanto, la presencia de partículas de óxido de hierro podría reducir el MTT proporcionando falsos positivos. En cambio, en nuestro caso se puede observar directamente las células y no tener únicamente un resultado cuantitativo, sino que

además se puede distinguir el efecto diferencial de la toxicidad de las partículas en células neuronales y gliales. Como se ve en la figura 28.A., a pesar de que la toxicidad en células neuronales sea alta, se sigue observando la presencia de células gliales vivas, a las que no parece afectarles de igual forma la presencia de nanopartículas magnéticas en su entorno.

En cuanto a la causa de la toxicidad, la toxicidad registrada en zonas donde no hay acúmulos de partículas (Figura 27.B) parece indicar que la citotoxicidad propia de estas partículas no se debe a la captación de las mismas por parte de las células sino más a algún compuesto que puedan liberar. Tal y como ha sido descrito en la bibliografía con anterioridad, las partículas de óxidos de hierro pueden generar especies reactivas de oxígeno, lo que puede conllevar a la alteración de las funciones fisiológicas de las células, así como a la apoptosis de las mismas (Soenen and Cuyper 2010).

Si bien los resultados aquí descritos constituyen una **prueba de concepto** tanto de la validez de los cultivos neurogliales primarios como modelo de toxicidad, como de la necesidad de estas pruebas para la determinación de la dosis máxima tolerable, sería necesaria la realización de pruebas complementarias para confirmar estos resultados, así como determinar las posibles causas de la toxicidad.



## CONCLUSIONES

---

Gracias a los resultados de este trabajo se han podido concluir los siguientes puntos:

El método de descomposición térmica de  $\text{Fe}[\text{acac}]_3$  en presencia de ácido oleico y oleilamina permite la obtención de nanopartículas de un tamaño de  $15 \pm 5$  nm de diámetro, con una buena polidispersidad, de forma sencilla y reproducible.

El recubrimiento de las partículas magnéticas obtenidas con un entrecruzamiento de quitosano y glutaraldehído proporciona partículas con un buen magnetismo de saturación (60 emu/g) y con un bajo campo coercitivo (2 Oe).

Las partículas sintetizadas permiten cargar melatonina, consiguiéndose una capacidad de carga del 23%, un valor sustancial.

La voltametría cíclica constituye un método adecuado para conocer la concentración de melatonina cargada en las partículas.

Los ensayos de toxicidad revelan una dosis máxima tolerable de 10 mg/ml para todos los casos. También parece observarse un cierto efecto protector del recubrimiento de quitosano y glutaraldehído.

A pesar de que serían necesarias más pruebas para confirmar los resultados aquí descritos, estas partículas parecen constituir un sistema adecuado para el transporte de melatonina.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Alphandéry, Edouard. 2018. "Glioblastoma Treatments: An Account of Recent Industrial Developments." *Frontiers in Pharmacology* 9(SEP): 1–31.
- Asociación española para la Calidad. 2019. "Transferencia de Tecnología."
- Aversa, Rossella et al. 2018. "Data Descriptor : The First Annotated Set of Scanning Electron Microscopy Images for Nanoscience." *Nature Publishing Group* 5: 1–8. <http://dx.doi.org/10.1038/sdata.2018.172>.
- Calero, Macarena et al. 2014. "Efficient and Safe Internalization of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles : Two Fundamental Requirements for Biomedical Applications." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*: 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2013.11.010>.
- Cardoso, Vanessa Fernandes et al. 2018. "Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications." *Advanced Healthcare Materials* 1700845: 1–35.
- Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial. 2019. "Proyectos Neotec." <https://www.cdti.es/index.asp?MP=100&MS=818&MN=2&TR=C&IDR=2776> (June 16, 2019).
- Chen, Shuang, and Weimin Liu. 2006. "Oleic Acid Capped PbS Nanoparticles : Synthesis , Characterization and Tribological Properties." 98: 183–89.
- Chiang, Chih-sheng, Yi-shang Shen, Jun-jen Liu, and Woei-cherng Shyu. 2016. "Synergistic Combination of Multistage Magnetic Guidance and Optimized Ligand Density in Targeting a NanoplatforM for Enhanced Cancer Therapy." *Advanced Healthcare Materials*: 1–11.
- Choi, Hak Soo et al. 2010. "Design Considerations for Tumor-Targeted Nanoparticles Hak." 5(1): 42–47.
- Comision Europea. 2014. *HORIZON 2020 En Breve. El Programa Marco de Investigación E Innovación de La Unión Europea*.
- Commission, European. 2018. "Definition of a Nanomaterial." [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm) (June 12, 2019).
- Cortés, Javier. 2013. *Nanotecnología En Medicina*. Transworld.
- Corujo-Antuña, J.L., E.M. Abad-Villar, M.T. Fernández-Abedul, and A. Costa-García. 2003. "Voltammetric and Flow Amperometric Methods for the Determination of Melatonin in Pharmaceuticals." 31: 421–29.
- Cruz, Maria Margarida, Paula Ferreira, Margarida Godinho, and Maria Deus Carvalho. 2017. Nanostructures for Cancer Therapy *Chapter 19 - Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3/00019-2>.
- Fang, Chen, Narayan Bhattarai, Conroy Sun, and Miqin Zhang. 2009. "Functionalized Nanoparticles with Long-Term Stability in Biological Media \*\*." : 1637–41.
- Fundación Conocimiento y Desarrollo. 2017. "Capítulo 3. Investigación Y Transferencia En Las Universidades Españolas."
-

- Fundación Española para la ciencia y la tecnología FECYT, and Observatorio Español de I+D+I ICONO. 2018. "Evolución de La Nanotecnología En España." : 1–40.
- Galli, Rossella et al. 2004. "Isolation and Characterization of Tumorigenic , Stem-like Neural Precursors from Human Glioblastoma." *Cancer Research* 64: 7011–21.
- Giniatullina, Asiya, Marco Boorsma, Geert-jan Mulder, and Sander Van Deventer. 2013. "Building for Big Pharma." *Nature Publishing Group Bioentrepreneur* 2012: 1–4. <http://dx.doi.org/10.1038/bioe.2013.3>.
- Grauer, Oliver et al. 2019. "Combined Intracavitary Thermo-therapy with Iron Oxide Nanoparticles and Radiotherapy as Local Treatment Modality in Recurrent Glioblastoma Patients." *Journal of Neuro-Oncology* 141(1): 83–94. <http://dx.doi.org/10.1007/s11060-018-03005-x>.
- Graus, Francesc et al. 2013. "Patterns of Care and Outcome for Patients with Glioblastoma Diagnosed during 2008–2010 in Spain." *Neuro-Oncology* 15(6): 797–805.
- Guardia, Pablo, Jorge Pe, and Luis M Liz-marza. 2010. "Heating Rate Influence on the Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles : The Case of Decanoic Acid W." : 6108–10.
- Guardia, Pablo, Nicolás Pérez, Amilcar Labarta, and Xavier Batlle. 2010. "Controlled Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles over a Wide Size Range." *Langmuir Article* 212(21): 5843–47.
- Guo, Jia, Wuli Yang, and Changchun Wang. 2013. "Magnetic Colloidal Supraparticles : Design , Fabrication and Biomedical Applications." : 1–19.
- Hernando Grande, Antonio. 2007. "Nanotecnología y nanopartículas magnéticas : la física actual en lucha contra la enfermedad." *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat.* 101: 321–27.
- Horizon2020. 2018. "Financiamiento de Un Proyecto de Investigación En 2018." <https://www.horizon2020.es/financiamiento-de-un-proyecto-de-investigacion-2018/> (June 16, 2019).
- ICONO, Observatorio Español de I+D+i. 2019. "Indicadores E Informes de Ciencia, Tecnología E Innovación." <https://icono.fecyt.es> (June 13, 2019).
- Jimeno, Sonia García. 2012. "Nanopartículas Magnéticas Para Aplicaciones Biomédicas." Universitat de Barcelona.
- Kemp, Scott J, R Matthew Ferguson, P Khandhar, and Kannan M Krishnan. 2016. "Monodisperse Magnetite Nanoparticles with Nearly Ideal Saturation Magnetization." *RSC Advances* 6: 77452–64. <http://dx.doi.org/10.1039/C6RA12072E>.
- Khoei, Sepideh, Ali Saadatinia, and Reza Bafkary. 2017. "Ultrasound-Assisted Synthesis of pH-Responsive Nanovector Based on PEG/chitosan Coated Magnetite Nanoparticles for 5-FU Delivery." *Ultrasonics Sonochemistry* 39(April): 144–52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.04.025>.
- Kozlenko, D P et al. 2019. "Magnetic and Electronic Properties of Magnetite across the High Pressure Anomaly." *Scientific Reports* (February): 1–9. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41184-3>.
- Kumar, Neeraj, and Rajendra N. Goyal. 2017. "Electrochemical Behavior of Melatonin and Its Sensing in Pharmaceutical Formulations and in Human Urine." *Current Pharmaceutical Analysis* 13(1): 85–90.
- Laurent, Sophie et al. 2008. "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications." *Chemical Reviews* 108(6): 2064–2110. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr068445e>.
- Lee, Chang Moon et al. 2009. "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as a Dual Imaging Probe for Targeting Hepatocytes in Vivo." *Magnetic Resonance in Medicine* 62(6): 1440–46.
- Lee, Ji Sung et al. 2015. "Magnetic Multi-Granule Nanoclusters : A Model System That Exhibits Universal Size Effect of Magnetic Coercivity." *Nature Publishing Group* (June): 1–7. <http://dx.doi.org/10.1038/srep12135>.
- Lenart, Vinicius M., Sergio L. Gómez, Maria P. Calatayud, and Gerardo R. F. Goya. 2014. "Size

## BIBLIOGRAFÍA

---

- and Shape Control of Magnetite Nanoparticles with a Nonselective Binding Surfactants.” : 19–20. <http://arxiv.org/abs/1402.1134>.
- Leslie-pelecky, Diandra L, and Reuben D Rieke. 1996. “Magnetic Properties of Nanostructured Materials.” 4756(96): 1770–83.
- Li, Xiaoming et al. 2016. “Current Investigations into Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications.” *Wiley Online Library*: 1285–96.
- Ling, Daishun, and Taeghwan Hyeon. 2012. “Chemical Design of Biocompatible Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications.” *Small*: 1–17.
- Liu, Gang, Jinhao Gao, Hua Ai, and Xiaoyuan Chen. 2013. “Applications and Potential Toxicity of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles.” *Small* 9(9–10): 1533–45.
- Lotfi, Sheida, Ali Bahari, and Soleiman Mahjoub. 2019. “In Vitro Biological Evaluations of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Compared with Core–shell Structures of Chitosan-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Polyacrylic Acid-Coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles.” *Research on Chemical Intermediates* (123456789). <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03804-5>.
- Luján, G Gil et al. 2005. “Dosificación de Fármacos En Administración Cerebroespinal.” *Farmacia Hospitalaria* 29: 185–90.
- Mahmoudi, Morteza, Sophie Laurent, Mohammad A Shokrgozar, and Mohsen Hosseinkhani. 2011. “Toxicity Evaluations of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles : Cell ‘ Vision ’ versus Physicochemical Properties of.” *ACS Nano* (9): 7263–76.
- Martin, Amanda L et al. 2008. “Enhanced Cell Uptake of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized with Dendritic Guanidines.” : 2375–84.
- Martin, Linda, Melissa Hutchens, Conrad Hawkins, and Alaina Radnov. 2017. “How Much Do Clinical Trials Cost ?” *Nature Reviews Drug Discovery* 16(6): 381–82. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd.2017.70>.
- Martin, V et al. 2013. “Melatonin-Induced Methylation of the ABCG2 / BCRP Promoter as a Novel Mechanism to Overcome Multidrug Resistance in Brain Tumour Stem Cells.” *British Journal of Cancer* 108(April): 2005–12.
- Mayne, Richard, James Whiting, and Andrew Adamatzky. 2018. “Toxicity and Applications of Internalised Magnetite Nanoparticles Within Live Paramecium Caudatum Cells.” *BioNanoScience* 8(1): 90–94.
- MedScape. 2018. “Temozolomide (Rx).” <https://reference.medscape.com/drug/temodar-temozolomide-342229> (June 15, 2019).
- Ministerio de Ciencia Innovación y Universidades. 2019. “Ayudas a Empresas Y Otros Agentes de I+d+i.” <http://www.ciencia.gob.es/portal/site/MICINN/menuitem.7eeac5cd345b4f34f09dfd1001432ea0/?vgnnextoid=4d44a8f3785b4410vgnVCM1000001d04140aRCRD>.
- Mosayebi, Jalal, Mehdi Kiyasatfar, and Sophie Laurent. 2017. 1700306 *Synthesis , Functionalization , and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications*.
- Nanotecnología, Red Española de. 2016. “Catalogue of Nanoscience & Nanotechnology Companies in Spain 2016.” <http://www.nanospain.org/docs.php?p=d> (June 16, 2019).
- Novelli, A, J A Reilly, P G Lysko, and R C Henneberry. 1988. “Glutamate Becomes Neurotoxic via the N-Methyl-D-Aspartate Receptor When Intracellular Energy Levels Are Reduced.” 451: 205–12.
- Qu, Jingmiao, Guang Liu, Yiming Wang, and Ruoyu Hong. 2010. “Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> – Chitosan Nanoparticles Used for Hyperthermia.” *Advanced Powder Technology* 21(4): 461–67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apt.2010.01.008>.
- Ruiz, A et al. 2013. “Biodistribution and Pharmacokinetics of Uniform Magnetite Nanoparticles Chemically Modified with Polyethylene Glycol.” *Nanoscale*.
- Soenen, S.J.H., and De Cuyper. 2010. “Assessing Iron Oxide Nanoparticle Toxicity in Vitro : Current Status and Future Prospects R Eview.” *Future Medicine* 5: 1261–75.
- Sudha, Parappurath N, Kirubanandam Sangeetha, Kumar Vijayalakshmi, and Ahmed Barhoum. 2018. Emerging Applications of Nanoparticles and Architecture Nanostructures *Chapter 12*

## BIBLIOGRAFÍA

---

- *Nanomaterials History, Classification, Unique Properties, Production and Market*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1/00012-9>.
- Sun, Shouheng et al. 2004. "Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) Nanoparticles." *J. Am. Chem. Soc.* 4(1): 126–32.
- Tropiella, Laura. 2013. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo "Síntesis Y Evaluación de Nanomateriales Metálicos Fluorescentes Como Marcadores En El Desarrollo de Inmunoensayos."
- Undabeitia, J. et al. 2018. "Costes Indirectos Asociados Al Glioblastoma. Experiencia En Un Centro." *Neurología (English Edition)* 33(2): 85–91.
- Universidades, Ministerio de Ciencia Innovación y. 2019. "Transferencia de Tecnología."
- Whittle, James R. et al. 2015. "First in Human Nanotechnology Doxorubicin Delivery System to Target Epidermal Growth Factor Receptors in Recurrent Glioblastoma." *Journal of Clinical Neuroscience* 22(12): 1889–94.
- Wu, See Wei, and Chang Zhong Jiang. 2016. "Designed Synthesis and Surface Engineering Strategies of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications." *Nanoscale* 8: 19421–74. <http://dx.doi.org/10.1039/c6nr07542h>.
- Wu, Wei et al. 2015. "Recent Progress on Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Surface Functional Strategies and Biomedical Applications." *Science and Technology of Advanced Materials* 16(2): 23501. <http://dx.doi.org/10.1088/1468-6996/16/2/023501>.
- Yang, Che-chuan et al. 2014. "Development of Antibody Functionalized Magnetic Nanoparticles for the Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen : A Feasibility Study for Clinical Use." *Journal of Nanobiotechnology*: 1–9.
- Zhou, Yu-ting et al. 2009. "Removal of Cu<sup>2+</sup> from Aqueous Solution by Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles Modified with  $\alpha$ -Ketoglutaric Acid." *Journal of Colloid and Interface Science* 330(1): 29–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2008.10.026>.