



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CON APLICACIONES BIOMÉDICAS

TESIS DOCTORAL

CON MENCIÓN EUROPEA

Elsa Valero Romero

Granada, Abril 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Elsa Valero Romero
D.L.: GR 2386-2011
ISBN: 978-84-694-3605-9

Nanopartículas metálicas con aplicaciones biomédicas

Memoria presentada por **D^a. Elsa Valero Romero** para aspirar
al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Granada, Abril del 2011

Fdo. Elsa Valero Romero

LOS DIRECTORES DE LA MEMORIA

Dra. Natividad Gálvez Rodríguez.

Profesora Titular del Departamento de
Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

Dr. José Manuel Domínguez Vera.

Catedrático del Departamento
de Química Inorgánica.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada

*A mis padres,
Antonia y Juan Diego*

*Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.*

Gregorio Marañón

En primer lugar quiero agradecer a mis directores, Josema y Nati, la oportunidad que me han brindado para que esta tesis se haya podido hacer realidad. A ambos, muchas gracias por hacerme partícipe de vuestras ideas tan geniales en la ciencia y para la ciencia. Sobre todo, gracias por vuestra confianza, apoyo y generosidad durante estos cuatro años.

Gracias también al resto de los miembros de mi grupo, Puri y Rafa. Gracias, Puri, por estar siempre ahí, por tu incondicional apoyo. Gracias, Rafa, por tus magníficos diseños.

Por último, no por ello menos importante, Josema, Nati, Puri, Rafa, gracias por vuestra excelente calidad humana.

Muchas gracias, Belén, por introducirme en el apasionante mundo de la investigación, y por todos los buenos momentos que como amigas hemos compartido, tanto en el trabajo como en nuestros ratos de ocio.

A todos los miembros del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, agradezco que estos cuatro años hayan sido tan llevaderos gracias a su apoyo y amabilidad. En especial, gracias al grupo de Coordinación, dirigido por el Prof. Enrique Colacio, integrado además por Antonio Mota, Juanma, Pepe y Antoñillo; a todos, gracias por tan buenos momentos compartidos.

Gracias a Antonio de la Torre y a Mari Carmen, que sin su excelente trabajo no podríamos "funcionar" en este Departamento.

Especial agradecimiento a todos mis compañeros de "salita": gracias, Chiqui y Ana, por estar ahí desde el principio, por ser mis amigas, por compartir conmigo muchos momentos inolvidables. Gracias, Elsa, Sara, Carmen, Silvia, Cala, Noelia, Laura y Víctor, por vuestra simpatía y compañerismo.

Por supuesto, muchas gracias a mis compañeros de laboratorio, Fernando, Davide y Ewelina, por haber compartido conmigo mi mejor año en nuestro laboratorio, por vuestra genialidad y simpatía, por alegrar el día a día.

Gracias al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada por permitirme usar sus instalaciones. Gracias, D^a M^a del Mar Abad Ortega, responsable del HREM, D. Alfredo Molina Quesada, responsable del SQUID, D^a Bendición Funes Martín, responsable de AAS y D. José Romero Garzón, responsable de Difracción de RX.

Gracias al grupo del Profesor D. José Juan Calvino del Departamento de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica de la Universidad de Cádiz, en especial a Juan de Dios López, D^a. Susana Trasobares y D. Juan José Delgado, por las excelentes medidas de EDX, HREM y EELS.

Gracias al Profesor D. Alessandro Lascialfari del Istituto di Fisiologia Generale e Chimica Biologica "G.Esposito" de la Università degli studi di Milano (Italia), por las medidas de NMR.

Gracias a los Profesores D. Norberto Masciocchi de la Università dell'Insubria de Como (Italia) y D^a Antonietta Guagliardi del Istituto di Cristallografia del CNR de Bari, (Italia) por los análisis de XRD.

Gracias al Profesor D. Francisco Santoyo, al Profesor D. Javier Jaramillo y al Doctor Mariano Ortega, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, por la síntesis de los carbohidratos NAG- y Manosa- vinil sulfona y por los ensayos ELISA.

Gracias al Profesor D. Roger Alberto del Instituto de Química Inorgánica de la Universidad de Zurich, (Suiza) por permitirme utilizar sus instalaciones para los estudios de "radiolabelling" incluidos en esta tesis.

Un ringraziamento speciale ai professori Andrea Sbarbati, Pasquina Marzola, Laura Calderan e Federico Boschi di averemi avviato nelle tecniche di MRI e OI, per la vostra cortesia e gentilezza. Grazie mille ai miei colleghi durante i miei tre mesi a Verona, Silvia, Stefano e Elena per la vostra compagnia, simpatia e per fare del pranzo il migliore momento della giornata. Grazie Stefano per il tempo impiegato nel

trattamento dei dati MRI. Grazie Silvia per la tua amicizia, per i bei momenti condivisi con gli amici in piazza delle Erbe con lo Spritz.

Gracias, Rosa, Raquel, Elo y Diego, por vuestra amistad y por los buenos momentos compartidos.

Annie, thank you so much for your kindness and your patience.

Gracias a toda mi familia porque sois lo más importante de mi vida. Gracias, abuela Encarna y tito Antonio, por estar siempre pendientes de mis progresos científicos; y, aunque ya no estés con nosotros, gracias abuelo Juan Diego, que seguro estarías muy orgulloso de tu nieta. Gracias abuelos Carmen y José María. Gracias, Carmen, Lola y Chema. Gracias a mis padres, Antonia y Juan Diego, por ser mi apoyo constante, por animarme siempre que me vengo abajo, por confiar siempre en mí. Gracias, Sandra y Fran por vuestro apoyo y por creer en mí. Gracias a mis sobrinillas, Sandra y Martina, por vuestras sonrisas y ocurrencias.

Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de mi beca predoctoral FPI y del proyecto CTQ2006-02840 que ha financiado la investigación llevada a cabo durante estos cuatro años.

ÍNDICE

◊ Acrónimos

◊ Resumen (pág. 1)

◊ Summary (pág. 5)

◊ Capítulo 1: Introducción (pág. 8)

1.1. Nanociencia y Nanotecnología

1.2. Nanomedicina

1.3. Preparación de nanopartículas metálicas

1.4. La Ferritina

1.5. Nanopartículas multifuncionales

◊ Capítulo 2: Nanopartículas magnéticas encapsuladas en apoferritina (pág. 22)

2.1. Nanopartículas magnéticas de oxi-hidróxido de Gd

- *Caracterización de Apoferritina-Gd como potencial agente de contraste en MRI*

2.2. Nanopartículas magnéticas bimetálicas CoNi

2.3. Nanopartículas magnéticas de Pd

◊ Capítulo 3: Nuevas nanopartículas como agentes de contraste para MRI (pag. 65)

3.1. Nanopartículas de maghemita encapsulada en apoferritina: Apomaghemita.

3.2. Estudio de Apomaghemita como nuevos agentes de contraste en MRI.

3.3. Estudio de la biodistribución de la Apomaghemita.

◊ Capítulo 4: Nanopartículas Bifuncionales (pág. 86)

4.1. Dopado de ferritina con metales

4.1.1. Dopado de la ferritina con Cu^{2+}

4.2. Nanoestructuras magnéticas fluorescentes

4.2.1. Bioconjugado Apomaghemita-AF790nm

4.2.2. Bioconjugado Apomaghemita-QD800nm

4.3. Funcionalización de nanopartículas con carbohidratos

◊ Capítulo 5: Procedimiento experimental (pág. 111)

5.1. Nanopartículas magnéticas encapsuladas en apoferritina.

Síntesis de Apoferritina-Gd

Síntesis de Apoferritina-CoNi

Síntesis de Apoferritina-Pd

5.2. Nuevas nanopartículas como agentes de contraste para MRI.

Preparación de coloide de maghemita

Encapsulación de las nanopartículas de óxido de hierro magnéticas por la apoferritina

5.3. Nanopartículas bifuncionales.

5.3.1. Dopado de Ferritina con metales

Dopado de ferritina con ^{99m}Tc

Dopado de ferritina con Cu^{2+}

5.2.2. Nanopartículas magnéticas fluorescentes.

Síntesis del bioconjugado Apomaghemita- Alexa Flúor 790nm (AF790)

Síntesis del bioconjugado Apomaghemita- Quantum dot 800nm

5.2.3. Funcionalización de nanopartículas con carbohidratos.

Glicosilación de la apomaghemita con N-Acetil glucosamina (NAG) o manosa- vinil sulfona.

Instrumental empleado (pág. 120)

- Diálisis
- Cromatografía por exclusión de tamaño
- Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)
- Espectroscopía Uv-visible
- Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS)
- Microscopía de transmisión electrónica (TEM)
- Espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)
- Espectroscopía de energía dispersiva de Rayos-X (EDX)
- Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS)
- Medidas de magnetismo
- Difracción de rayos X en polvo (XRD)

- Imagen por resonancia magnética nuclear (MRI)
- Relaxometría de campo ciclado RMN
- Imagen óptica (OI)

◇ Conclusiones (pág. 152)

◇ Conclusions (pág. 156)

◇ Anexos: Artículos publicados.

ACRÓNIMOS

En la siguiente tabla se presentan los acrónimos de las especies químicas y técnicas experimentales frecuentemente usadas a lo largo de todo el texto.

AAS: Espectroscopia de absorción atómica.

AF790: Fluoróforo de la familia Alexa Flúor (emisión a 790nm).

AMPSO: Tampón ácido sulfónico N-(1,1-Dimetil-2-hidroxi-etil)-3-amino-2-hidroxi-propano.

CBF: Flujo sanguíneo cerebral.

CBV: Volumen sanguíneo cerebral.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

EDX: Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X.

EELS: Espectroscopia de pérdida de energía de electrones.

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.

HAADF: Campo oscuro de alto ángulo.

H_c: Coercitividad magnética.

H_{EB}: Interacción de canje.

HREM: Microscopia electrónica de transmisión de alta resolución.

ICP:

Mops: Tampón 3-(N-morfolino) ácido propanosulfónico.

M_s: Magnetización de saturación.

M_R: Magnetización remanente.

MRI: Imagen de Resonancia Magnética.

NIR: Longitudes de onda cercanas al infrarrojo.

NMR: Resonancia magnética nuclear.

OI: Imagen Óptica.

PBS: Tampón salino fostato.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PET: Tomografía por emisión de positrones.

QDs: Quantum Dots.

QD800: Quantum Dots con emisión a 800nm.

r₁: Relaxitividad longitudinal.

r₂: Relaxitividad transversal.

rCBV: Volumen sanguíneo cerebral regional.

SPECT: Tomografía computerizada por emisión de fotones

T_B: Temperatura de bloqueo

TEM: Microscopia electrónica de transmisión.

T1: Relajación longitudinal (relajación spin-red).

T2: Relajación transversal (relajación spin-spin).

TRIS: Tris (hidroximetil)aminometano.

UV-vis: Espectroscopia Ultravioleta visible.

XAS: Espectroscopia de absorción de Rayos X.

XANES: Espectroscopia de absorción de Rayos X cerca del borde.

XRD: Difracción de Rayos X en polvo.

ZFC-FC: Enfriamiento a campo nulo/ enfriamiento a campo no nulo.

RESUMEN

En los últimos años ha emergido una nueva disciplina producto de la incursión de la Nanotecnología en Medicina: Nanomedicina, en la que se diseñan y preparan nanomateriales con aplicaciones terapéuticas y de diagnosis variadas. De entre todas las nanoestructuras con aplicaciones en Nanomedicina, las nanopartículas magnéticas acaparan un protagonismo especial, por su utilización como agentes de contraste en MRI, una de las técnicas de diagnóstico más potente en la actualidad. En este sentido, hoy en día, uno de los grandes retos es la preparación de nuevas nanopartículas superparamagnéticas como agentes de contraste en MRI, para el diagnóstico cada vez mas precoz de patologías severas y de gran impacto social.

Una ruta para la preparación de nanoparticulas metálicas es el uso de bioplataformas que actuen como nanoreactores donde albergar nanopartículas de tamaño controlado. La proteína ferritina es un ejemplo genuino puesto que permite el uso de su cavidad de 8nm para la preparación de nanopartículas inorgánicas y al mismo tiempo impide la agregación y hace las nanopartículas solubles en agua. Su capa proteica externa posee grupos amino que pueden ser usados para unir covalentemente moléculas o nuevas especies químicas que le confieran una nueva funcionalidad a la nanoestructura final.

Específicamente en un **PRIMER CAPÍTULO** se recoge la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de Gd, nanopartículas bimetálicas CoNi y nanopartículas de Pd encapsulados en ferritina.

- Las nanopartículas de Apoferritina-Gd, con un comportamiento paramagnético, presentaron unas propiedades de relajación singulares, con valores de r_1 y r_2 sensiblemente superiores a los fármacos para contraste de MRI existentes en el mercado basados en complejos de Gd.

- En las nanopartículas bimetálicas Co_xNi_y se puede controlar la cantidad de cada uno de los metales ferromagnéticos. Todas ellas presentaron comportamiento superparamagnético con T_B entre 11 y 80K. El hecho de que se pueda modular la estequiometría entre metales, le confiere a este método una gran potencialidad para la preparación de nanopartículas que puedan contener dos, tres, o incluso más metales.

- Las nanopartículas de Pd exhiben magnetismo permanente a temperatura ambiente, siendo este uno de los escasos ejemplos que existen en la bibliografía de nanopartículas ferromagnéticas basadas en un metal estrictamente no magnético, basados en un metal que a escala clásica es estrictamente no magnético.

- Los ensayos in vivo como agentes de contraste en MRI no fueron viables bien por la toxicidad de los metales (Gd) o bien por la oxidación de las nanopartículas (CoNi y Pd) que repercutió de forma desfavorable en sus propiedades magnéticas.

En el **CAPÍTULO TRES** usamos el proceso de disociación-asociación de la apoferritina en función de pH para encapsular nanopartículas preformadas de maghemita. En un primer paso se abordó la preparación de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) con tamaños medios de 4 y 6 nm. En un segundo paso dichas nanopartículas fueron encapsuladas en la apoferritina. Estas nuevas nanopartículas

denominadas Apomag-4 y Apomag-6 presentaron unos valores para r_2 de $68.5 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $102.0 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente, siendo el valor de r_2 de la Apomag-6 comparable con el valor de $94.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ previamente publicado para el Endorem® (agente de contraste comercial). De modo que nuestros compuestos presentan una alta eficacia como posibles agentes de contraste. Se llevó a cabo un estudio exhaustivo de MRI para conocer la biodistribución de estas nanopartículas, concluyendo que se acumulan preferencialmente en hígado donde permanecen sin biodegradarse un largo periodo de tiempo. Esta estabilidad inusual no se ha observado en agentes de contraste MRI que están en el mercado y representa por tanto una vía para la obtención de agentes de contraste "de largo plazo", que permitan la adquisición prolongada de imágenes MRI en hígado durante un largo periodo de tiempo sin necesidad de una segunda inyección.

En el **CAPITULO CUATRO** se han preparado y caracterizado nanopartículas con una doble funcionalidad, bien por dopado metálico del núcleo ferritínico nativo o bien por la funcionalización del nanoprecursor apomaghemita con especies químicas que le añaden fluorescencia o especificidad por un tejido.

- Esta nueva funcionalidad se obtuvo mediante dopado de ferritina con Cu^{2+} y $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$. La incorporación del radionúclido $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nos ha permitido obtener una nanoestructura con mejores características que los compuestos comerciales actuales al almacenar hasta 20 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por proteína, teniendo potencial aplicación en SPECT. El dopado con Cu^{+2} nos abre el camino para dopar la ferritina con ^{64}Cu , un emisor de positrones, que podría permitir el uso de esta nanopartícula en PET.

- Recientemente han adquirido un especial interés los sistemas multimodales que permiten analizar la imagen con más de una técnica de imagen. Por lo que la síntesis de nanopartículas con una bifuncionalidad magnético-fluorescente es bastante interesante para estudios combinados de bioimagen. Se pueden usar

diferentes compuestos con propiedades ópticas, como son los fluoróforos Alexa Flúor (AF) o los Quantum Dots (QDs) que den lugar a nanoestructuras con emisión fluorescente variable. En este sentido, el QD800 y el AF790, cuya emisión de fluorescencia se extiende hasta la región del infrarrojo cercano, permite aumentar la profundidad de penetración en los tejidos. El estudio *in vivo* por OI de la nanoestructura Apomaghemita-QD800 revela su acumulación preferencial en el pulmón, diferenciándose drásticamente de la biodistribución del QD800 libre no conjugado. Mientras que la nanoestructura Apomaghemita-AF790 se acumula preferencialmente en el hígado. Estos resultados junto con los datos obtenidos del estudio de biodistribución mediante MRI vienen a poner de manifiesto que dichas nanoestructuras podrían ser útiles como sondas bimodales para el estudio anatómico y morfológico de hígado.

- Por último se llevó a cabo la funcionalización de la Apomag-4 con dos tipos diferentes de carbohidratos: NAG-vinil sulfona y Manosa-vinil sulfonando lugar a una nanoestructura bifuncional que exhibe dos características: la posibilidad de diagnóstico por MRI y su acumulación específica en un tejido. La interacción de las gliconanopartículas con sus lectinas correspondientes le confieren una alta selectividad y sensibilidad para muchas aplicaciones biológicas.

En definitiva hemos logrado obtener una "librería" de nanoestructuras multifuncionales solubles en agua con interés en el campo biomédico.

SUMMARY

Nanomedicine, the application of nanotechnology in healthcare, offers numerous-very promising possibilities to significantly improve medical diagnosis and therapy. Of all nanostructures with applications in nanomedicine, magnetic nanoparticles have been extensively studied, because of their use as contrast agents in MRI (Magnetic Resonance Imaging).

An extremely efficient amazing method obtaining non-aggregated, size-controlled magnetic nanoparticles is the use of a preorganized matrix as a chemical and spatial nanocage where the nanoparticles are formed. The protein ferritin was the first protein cage to be used for the synthesis of inorganic nanoparticles. This protein has an interior cavity of 8 nm in diameter in which nanoparticles are formed. The exterior surface of this protein has amine groups that can be used to covalently couple molecules or chemical species that confer a new functionality to the final nanostructure.

Specifically in the **FIRST CHAPTER**, the synthesis and characterization of apoferritin-encapsulated Gadolinium oxide, CoNi and Pd nanoparticles are presented.

- Gd-apoferritin nanoparticles with paramagnetic behavior, showed unique relaxation properties, with r_1 and r_2 values significantly much higher than the MRI contrast agents clinically approved based on Gd complexes.

- In bimetallic Co_xNi_y nanoparticles the ratio of ferromagnetic metals can be tuned. The CoNi series showed superparamagnetic behavior with T_B varying between 11 and 80K. There is great potential in this synthetic method for the preparation of nanoparticles, which may contain two, three or even more metals.

- Pd nanoparticles exhibit permanent magnetism at room temperature. This is one of the few examples reported in the literature of ferromagnetic nanoparticles based on a metal that is strictly non-magnetic, such as Pd.

Experiments *in vivo* were not viable either by the toxicity of metals (Gd) or by the partial oxidation of the nanoparticles (CoNi and Pd) that unfavorably impacted on their magnetic properties.

In the **THIRD CHAPTER**, the pH-driven disassembly-assembly process occurring in multimeric apoferritin was used to encapsulate maghemite nanoparticles. In a first step, maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) with an average size of 4 and 6 nm were prepared. In a second step the nanoparticles were encapsulated in apoferritin (apomaghemite). The so-called Apomag-4 and Apomag-6 had r_2 values of 68.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 102.0 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively. The r_2 value for the Apomag-6 is comparable to the value of 94.8 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ previously reported for Endorem®, suggesting that our compounds could be used as perspective superparamagnetic contrast agents. We carried out an exhaustive MRI study to determine the biodistribution of these nanoparticles, concluding that they accumulate preferentially in the liver where they remain without biodegradation for a long period of time. This unusually high stability has not been observed in commercial MRI contrast agents. Therefore represents a new method for obtaining "long term" probes for the acquisition of liver MRI images over a long period of time without a second injection.

In **CHAPTER FOUR**, bifunctional nanoparticles have been prepared and characterized.

- A new functionality was obtained by doping ferritin with Cu^{2+} and $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$. The incorporation of the radionuclide $^{99\text{m}}\text{Tc}$ resulted in a nanostructure capable of storing up to 20 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ in one ferritin nanoparticle. This improved nanoparticle, as compared with current commercial compounds, could have potential applications as a probe in SPECT (Single photon emission computed tomography). Doping the ferritin with Cu^{2+} opens the way for doping it with ^{64}Cu , a positron emitter, which could allow the use of these nanoparticles in PET (Positron emission tomography).

- Recently multimodal systems have acquired a special interest. The complementary abilities of different imaging modalities could be exploited by using them in tandem. For example, MRI-Optical probes in which magnetic nanoparticles are fused with optical dyes or fluorescent quantum dots have been reported. In this sense, we have used the organic fluorophore: Alexa Fluor AF790 and the quantum dot: QD800 to functionalize the magnetic nanoprecursor Apomaghemite. It is worthy to note that the QD800 and AF790 fluorescence emission extends to the near infrared region, increasing the depth of tissue penetration. The *In vivo* study of the nanostructure Apomaghemite-QD800 by Optical Imaging revealed their preferential accumulation in the lungs, differing dramatically from the biodistribution of free unconjugated QD800. However, the nanostructure Apomaghemite-AF790 accumulates preferentially in liver. These results together with the data obtained from the MRI biodistribution study shows that both nanostructures could be useful as bimodal probes for anatomical and morphological imaging of the liver.

- Finally, the functionalization of Apomag-4 with two different types of carbohydrates: NAG-vinyl sulfone and Mannose-vinyl sulfone was carried out. The resulting bifunctional nanostructure exhibited two functionalities: the possibility of diagnosis by MRI and its tissue specific accumulation. The interaction of these glyconanoparticles with their corresponding lectins gives a high selectivity and sensitivity for many biological applications.

In summary we have achieved a "library" of water-soluble multifunctional nanostructures, of interest to the biomedical field.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1. Nanociencia y Nanotecnología

La Nanociencia es la disciplina que estudia las nuevas propiedades que surgen en los materiales que existen en la escala nanométrica (1-100nm). La nanotecnología aborda los procedimientos utilizados para la creación de nuevas funcionalidades que sólo son posibles mediante la manipulación de la materia a esta escala.

El potencial de esta tecnología radica en el hecho de que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica, lo cual se debe principalmente a dos efectos: el efecto de reducir el tamaño y el del denominado confinamiento cuántico. Propiedades como la conductividad eléctrica, la resistencia mecánica, la reactividad, entre otras, varían si se comparan con las presentadas por los mismos elementos/compuestos a escala convencional.

El reto para el químico es poder manipular la materia y conseguir preparar nanoestructuras con propiedades deseadas para aplicaciones concretas.

Las nanopartículas metálicas son un tipo de material importante y versátil para su aplicación en el campo de la nanotecnología. Debido a su tamaño poseen propiedades magnéticas, eléctricas, ópticas, etc, diferentes al material a escala clásica^[1]: colores diferentes y fácilmente modificables por cambios sutiles de tamaño o ambiente químico; aparición de fluorescencia intensa con un amplio rango de longitudes de onda de excitación y emisión; magnetización espontánea, incluso a temperatura ambiente, cuando el material a escala clásica es estrictamente no magnético, etc.

La escala nanométrica implica la coexistencia de dos hechos fundamentales e interrelacionados:

- Un aumento del porcentaje de átomos superficiales, átomos que son diferentes al resto del material por disminuir su número de coordinación de forma sensible.
- La disminución del tamaño de la materia conlleva un mayor confinamiento electrónico y una cuantización mayor, de tal forma que la comprensión de las propiedades de la materia a escala nanométrica requieren una mayor contribución de un enfoque atómico.

Estos hechos hacen que, en definitiva, las propiedades cambien al pasar de la escala clásica a la escala nanométrica. Entre las propiedades más representativas que comúnmente se modifican en la escala nanométrica se pueden citar:

1) Nuevas propiedades ópticas de los nanomateriales: Las propiedades ópticas de las nanopartículas metálicas surgen de un complejo efecto electrodinámico que está fuertemente influenciado por el circundante medio

dieléctrico. La luz incide sobre las partículas metálicas causando una oscilación colectiva de los electrones en la banda de valencia del metal, los denominados plasmones. Tal oscilación coherente ocurre en la interfaz del metal con el medio circundante dieléctrico y para el caso de algunos metales la frecuencia de esta oscilación cae en la región del espectro visible. Esto da lugar a la aparición de una banda de absorbanza denominada resonancia de plasmones de superficie que confiere color al nanomaterial.

2) Materiales inorgánicos semiconductores se hacen fluorescentes cuando su tamaño alcanza la talla nanométrica: Estas partículas, frecuentemente son denominadas puntos cuánticos (Quantum Dots, QDs). Cuando los electrones en los semiconductores se limitan a regiones pequeñas se producen dos efectos importantes. En primer lugar, la diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción (los niveles HOMO y LUMO, respectivamente) aumenta con respecto al valor observado en el material masivo. En segundo lugar, los niveles de energía en el LUMO y en el HOMO están cuantizados. Ambos efectos juegan un papel importante en la determinación de las propiedades ópticas de los QDs.

El confinamiento cuántico, es decir, la captura de electrones y huecos en regiones pequeñas, proporciona un método para modular la banda prohibida en los materiales semiconductores. La característica fundamental es que, cuando la dimensión crítica de un material disminuye, la diferencia entre las bandas de valencia y de conducción aumenta. Las transiciones entre los estados de la banda de valencia (HOMO) y la banda de conducción (los estados LUMO) se denominan transiciones interbandas, y la energía mínima necesaria para estas transiciones se ve incrementada en los QDs comparativamente con los semiconductores en estado masivo. Las longitudes de onda de las transiciones entre bandas dependerán del tamaño de los QD y por tanto, es posible modular la luminiscencia obtenida simplemente cambiando el tamaño del QD. El ejemplo más habitual de este tipo de

Quantum Dot es el CdSe. Al variar el tamaño de las nanopartículas de CdSe es posible obtener emisiones de fluorescencia en todo el espectro visible, lo que les hace ideales para tecnologías de pantalla LED, células solares, pantallas fluorescentes así como aplicaciones en biomedicina *in vitro*. Un ejemplo muy concreto del uso de estas nanopartículas es la visualización de células cancerosas y células nerviosas.

3) Aparición de superparamagnetismo: el superparamagnetismo es un fenómeno por el que los materiales exhiben un comportamiento similar al paramagnetismo por debajo de la temperatura de Curie o de Néel. La energía requerida para cambiar la dirección del momento magnético de la partícula es comparable con la energía térmica y por tanto las partículas, aleatoriamente cambiarán el signo de magnetización sobrepasando una barrera de energía anisotrópica. Pero por debajo de una temperatura, denominada temperatura de bloqueo, el momento magnético se bloquea. Además, la aplicación de un campo magnético externo por debajo de esta temperatura de bloqueo genera la orientación del momento magnético de forma paralela a dicho campo, llegando a magnetizarse la nanopartícula y comportándose como un imán, pero la supresión del campo magnético externo no provoca la desmagnetización: el momento magnético de la partícula "no sigue" al campo magnético externo, sino que relaja en una situación fuera de equilibrio, dando lugar a la aparición de fenómenos de histéresis magnéticas.

Todas estas propiedades hacen que las nanopartículas metálicas tengan un amplio repertorio de aplicaciones tecnológicas y algunas ya las estamos utilizando en nuestro día a día.

Entre todas las aplicaciones que ofrece la nanotecnología, es especialmente en el campo biomédico donde ya ha dado más frutos y donde parece haber un mayor potencial de aplicaciones. Y es que la posibilidad de introducir en el cuerpo humano nanopartículas metálicas ofrece enormes posibilidades en medicina, tanto desde el

punto de vista de diagnóstico como terapéutico^[2]. Algunas de estas posibilidades son ya realidades en el mercado biomédico y otras son sueños con grandes visos de ser realidad a corto o medio plazo.

1.2. Nanomedicina

La integración de la Nanotecnología en Medicina ha hecho emerger una nueva disciplina: la Nanomedicina. En este campo, se diseñan y preparan nanomateriales con aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico variadas: nanopartículas magnéticas como agentes de bioimagen mediante Resonancia Magnética (MRI), nanosistemas para liberación controlada de fármacos o especies activas (Drug Delivery), nanopartículas magnéticas para tratamiento del cáncer por hipertermia local, nanosistemas para la regeneración de tejidos, etc.

El mercado farmacológico ofrece ya un buen número de productos *nano*, tanto a nivel de kits para ensayos *in vitro* como fármacos para su uso *in vivo*. A tenor de muchos informes internacionales, todo apunta a un crecimiento exponencial en este sector.

De entre todas las nanoestructuras con aplicaciones en Nanomedicina, las nanopartículas magnéticas y en particular las de magnetita (Fe_3O_4)-maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) acaparan un protagonismo especial. Las denominadas SPIOs (Superparamagnetic Iron Oxides, con un radio hidrodinámico mayor de 15-20 nm) o bien USPIOs (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides, con un radio menor de 15 nm) son ya una realidad en el mercado como agentes de diagnóstico en MRI^[3] y han sido recientemente aprobadas para su uso en cáncer terminal mediante hipertermia (magforce®).

Un punto crucial para el desarrollo de la Nanomedicina en el diseño de dichas nanopartículas para que puedan ser empleadas en el campo biomédico, es conseguir

tiempos altos de circulación en el torrente sanguíneo. El tiempo que nuestro organismo tarda en detectar y eliminar estas partículas es vital para que puedan llevar a cabo su actividad. Cuanto mayor es el tamaño de las partículas, más fácil resulta su detección por los macrófagos, más rápidamente son eliminadas y por consiguiente, menor es el tiempo de circulación en sangre.

De gran importancia es también tratar de dirigir las nanopartículas al sitio deseado de la forma más específica posible, *vectorizar las nanopartículas* a la "diana" (órgano o tejido) deseada^[4]. De entre las muchas estrategias existentes para esta vectorización específica, podemos nombrar (a) el uso de partículas magnéticas que puedan ser llevadas al órgano adecuado por aplicación de un campo magnético externo; (b) otra estrategia, química, se basa en el principio de la interacción específica antígeno-anticuerpo o del par biotina-avidina; (c) una tercera vía, muy por explorar es lograr que las nanopartículas puedan ser endocitadas o reconocidas a nivel de membrana y puedan penetrar en la célula.

1.3. Preparación de nanopartículas metálicas

Todo el desarrollo de las aplicaciones de las nanopartículas en el campo biomédico (y otros), va ligado al desarrollo en sí de métodos de preparación de nanopartículas metálicas. Este es uno de los grandes retos en la nanotecnología actual, el desarrollo de métodos sencillos, que requieran condiciones experimentales suaves y que cumplan, en la medida de lo posible, los siguientes requisitos:

1. *Control del tamaño de la partícula.* Controlar es programar un experimento en el que introducimos unos valores en los parámetros experimentales: concentración metálica, pH, etc. Para obtener el tamaño deseado y además que este tamaño sea homogéneo. Hay que tener presente que las propiedades se hacen muy

dependientes del tamaño en la escala nano y por tanto la homogeneidad de tamaño es obligada.

2. *Evitar la aglomeración* de las partículas, ya que de lo contrario se podrían perder las propiedades inherentes a este tamaño nanométrico.

3. Idear un método que sirva para poder preparar partículas muy *variadas* en su *composición química*. Este es precisamente uno de los puntos más críticos y dónde probablemente se haya avanzado menos. La mayoría de los métodos existentes son válidos para la preparación de un solo tipo de partícula y difícilmente puede ser extendido para la preparación de partículas más variadas en composición química y por ende en propiedades y aplicaciones.

Algunos autores^[4], con objeto de conseguir estos requisitos, han utilizado macromoléculas (proteínas, ciclodextrinas, cápsides de virus, etc) que dispongan de una cavidad de tamaño nanométrico para ser usada como nanoreactor donde construir dicha partícula metálica y que permitan su funcionalización posterior permitiendo por ejemplo la vectorización. De esta forma se controla el tamaño de la nanopartícula, puesto que estaría limitado por el tamaño propio de la cavidad de la macromolécula y se evita aglomeración, debido a que la capa orgánica de la macromolécula aísla el núcleo metálico que alberga. Un ejemplo genuino de este tipo de macromolécula lo representa la **ferritina**.

1.4. La Ferritina

La ferritina es la proteína encargada de almacenar hierro en los organismos vivos. Su estructura consiste en una especie de esfera hueca formada por el autoensamblaje de 24 subunidades polipeptídicas (apoferritina)^[5] cuyo peso molecular es 450KDa, con un diámetro de unos 12 nm y una cavidad de unos 8 nm

(figura 1). La ferritina es capaz de almacenar en su interior hasta 4500 átomos de Fe/molécula, aunque las cantidades habituales son de unos 2000 átomos de Fe/molécula.

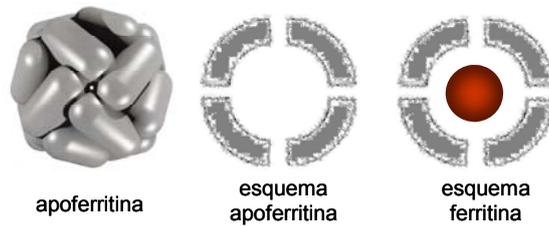


Figura 1. Esquema de la proteína.

En la estructura cuaternaria las subunidades se autoensamblan de tal forma que generan dos tipos de poros o canales generados por la intersección de tres o cuatro subunidades peptídicas, que conectan la cavidad interior con el medio exterior: seis de naturaleza hidrofóbica y ocho de naturaleza hidrofílica.

En cada una de las subunidades que componen la capa proteica de la ferritina existen tres grupos amino pertenecientes a residuos de lisinas. Concretamente en la ferritina de bazo de caballo que tradicionalmente se ha utilizado como ferritina estándar existen un total un total de 72 residuos de lisinas dirigidos hacia el exterior (figura 2).

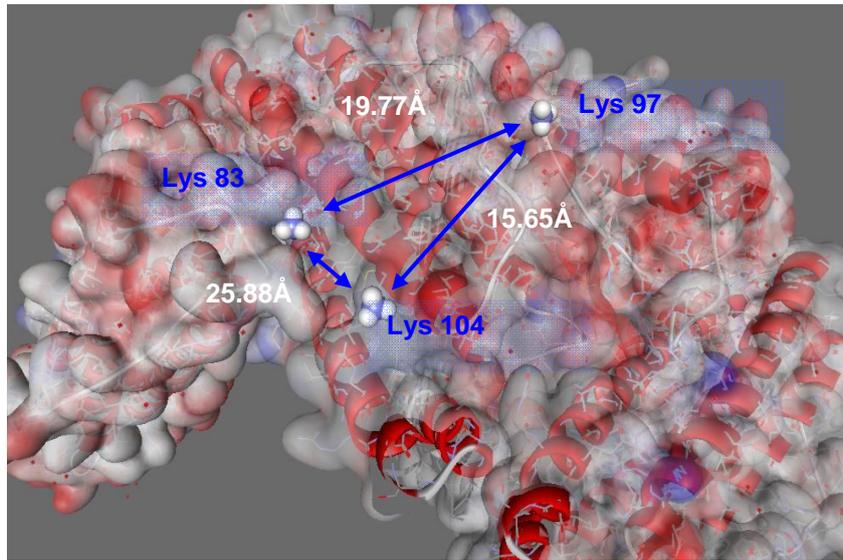


Figura 2. Subunidad tipo de la apoferritina mostrando las tres lisinas que expone en su superficie y las distancias que hay entre ellas.

Los poros hidrofílicos, de aproximadamente 5\AA , y de simetría C_3 poseen una mayor composición de residuos tipo aspartato y glutamato. Estos canales permiten la entrada y salida de la cavidad al medio exterior, y viceversa, de moléculas de agua, iones metálicos y moléculas orgánicas de tamaño adecuado. A través de estos canales entran los iones de Fe (II), que mediante oxidación catalítica generarían el mineral de Fe en la cavidad interior, igualmente estos canales son críticos para la función de la ferritina de liberar Fe de forma controlada. Hasta 4500 Fe pueden ser encapsulados en el interior de la apoferritina en forma de óxido de Fe (III), tradicionalmente considerado de tipo ferrihidrita,^[6] aunque nuestro grupo ha puesto de manifiesto recientemente que se trata de un material polifásico cuyo composición es dependiente del contenido en Fe^[7]. En contraste, los canales de simetría C_4 ,

debido a la intersección de las cuatro subunidades peptídicas son mayoritariamente hidrofóbicos y de diámetro irregular y angosto.

Mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se pueden obtener imágenes reales de la estructura de la ferritina diferenciándose claramente los núcleos metálicos correspondientes al mineral de Fe, ya que presentan una mayor electrodensidad, la morfología de los núcleos metálicos es bastante homogénea y con una distribución muy estrecha de tallas. Al contrastar una imagen de este tipo con acetato de uranilo (AcOU) conseguimos poner de manifiesto simultáneamente el núcleo metálico y la cubierta polipeptídica que hace de envoltorio al núcleo metálico, como se puede observar en la figura 3.

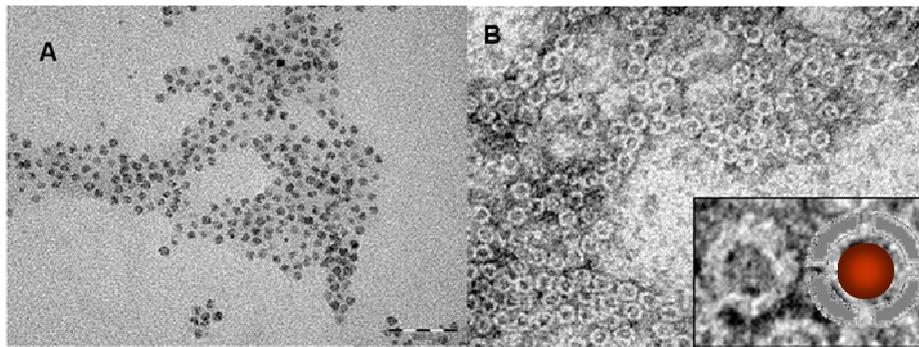


Figura 3. (A) Imagen de TEM de la ferritina nativa, (B) Imagen de TEM de la ferritina nativa contrastada con AcOU (En el recuadro inferior se muestra una partícula de ferritina aumentada y su esquema.).

El material polifásico encapsulado en la ferritina es antiferromagnético por debajo de 140 K, pero presenta un momento magnético debido a la no compensación de los espines, sobre todo los dispuestos en la superficie del mineral. Esto hace que la ferritina se comporte como un material superparamagnético por debajo de 20 K. Por debajo de la temperatura de bloqueo, $T_B \approx 15$ K, la energía térmica no es suficiente para permitir la oscilación de los momentos magnéticos a través de la barrera anisotrópica y por tanto los momentos magnéticos se bloquean.

Como consecuencia de dichas propiedades magnéticas, las curvas de magnetización Zero Field Cooled (ZFC) y Field Cooled (FC) presentan diferente comportamiento a temperaturas inferiores a la de bloqueo (figura 4). La ZFC presenta un máximo proporcional a la T_B y la curva FC aumenta continuamente conforme disminuye la temperatura. Otra consecuencia de la aparición de la T_B es que por debajo de dicha temperatura aparece un marcado ciclo de histéresis (recuadro superior de la figura 4)^[8].

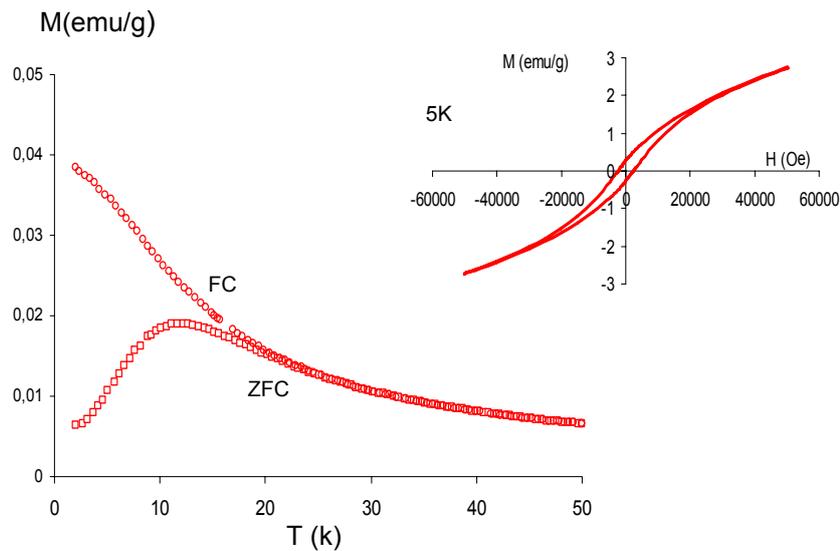


Figura 4. Curvas ZFC y FC de la ferritina nativa. En la parte superior se observa el ciclo de histéresis a 5 K.

La envuelta proteica (la apoferritina) es muy estable a la degradación térmica y química debido a las fuertes interacciones presentes entre las subunidades. Soporta temperaturas de hasta 85°C y un intervalo de pH de entre 3.5-8.5. Se trata por tanto de una proteína robusta que permite una manipulación química suave sin detrimento de alterar su estructura esencial. Es muy importante señalar que es una proteína soluble en agua, lo que permite mantener en disolución los materiales que encapsula. En este sentido, la ferritina nativa, cuando tiene almacenado 4500 átomos

de Fe, alcanza concentraciones de Fe en disolución de 0.25M, algo extraordinario si se considera la baja solubilidad del Fe (III) debido a su gran poder polarizante.

1.5. Nanopartículas multifuncionales

Uno de los grandes retos en la nanomedicina actual es la preparación de nanopartículas multifuncionales para sus aplicaciones tanto en diagnóstico como en terapia^[9]. Resulta complejo concebir una entidad molecular multifuncional, sin embargo, la manipulación con nanoestructuras nos permite la asociación de múltiples funcionalidades en una misma plataforma química.

En este sentido uno de las grandes aplicaciones de las nanopartículas multifuncionales es su uso como agentes de contraste multimodales en bioimagen para diagnóstico médica. Resulta fascinante poder preparar nanoestructuras que contengan bloques funcionales para diferentes técnicas de bioimagen.

Las técnicas de imagen, MRI (Magnetic Resonance Imaging), PET (Positron Emission Tomography), CT (Computed X-ray Tomography), SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography) etc., son de especial importancia en biomedicina para el diagnóstico de numerosas enfermedades.

Cada una de estas técnicas (MRI, PET, CT, SPECT etc.) poseen ciertas ventajas y desventajas para cada tipo de diagnóstico, pero ninguna de ellas por si sola es capaz de analizar la imagen con la suficiente resolución, por ello son de especial interés los sistemas multimodales que permiten analizar la imagen con más de una técnica de imagen.

En este sentido la ferritina puede ser empleada como plataforma para la preparación de sistemas multifuncionales puesto que su cavidad interna puede ser

utilizada para albergar nanopartículas inorgánicas y su superficie externa para el acoplamiento de moléculas o especies químicas con una funcionalidad adicional.

Bibliografía:

- 1) Taeghwan Hyeon: "Chemical síntesis of magnetic nanoparticles". *Chem. Commun.* **2003**, 927-934.
- 2) Fabio Sonvico, Catherine Dubernet, Paolo Colombo and Patrik Couvreur; *Current Pharmaceutical Desing*, **2005**, *11*, 2091-2105.
- 3) (a) Dallman P.; Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. **1990**. (b) Deiss A.; Iron metabolism in reticuloendothelial cells. *Semin Hematol.* **1983**, *20*, 81-90.
- 4) (a) Masaki Uchida et al.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16626-16633. (b) Mei Li, Kim K. W.Wong, and Stephen Mann; *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 23-26.
- 5) (a) Harrison P. M.; Arosio P.; *Biochim. Biophys. Acta*, **1996**, *1275*, 161. (b) Theil E. C.; Takagi, H.; Small G. W.; He L.; Tripton A. R.; Danger D.; *Inorg. Chim. Acta*, **2000**, *297*, 242-251.
- 6) (a) Chasteen N. D.; Harrison P. M.; *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 182. (b) Liu X.; Theil E. C.; *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 167.
- 7) N. Gálvez, B. Fernández, P. Sánchez, R. Cuesta, M. Ceolín, M. Clemente-León, S. Trasobares, M. López-Haro, J. J. Calvino, O. Stéphan and José M. Domínguez-Vera.; *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8062.
- 8) Miguel Clemente-León, Eugenio Coronado, Alejandra Soriano-Portillo, Enrique Colacio, José M. Domínguez-Vera, Natividad Gálvez, Rafael Madueño and María T. Martín-Romero.; *Langmuir*, **2006**, *22*, 6993-7000.
- 9) Jinhao Gao, Hongwei Gu, and Bing Xu.; *Accounts of Chemical Research*, **2009**, *42*, 1097-1107

CAPÍTULO 2

NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ENCAPSULADAS EN APOFERRITINA

De entre todas las nanoestructuras con aplicaciones en biomedicina las nanopartículas magnéticas acaparan un protagonismo especialmente como agentes de contraste para resonancia magnética (MRI)^[1].

Hay que señalar que la utilidad de dichas nanopartículas para aplicaciones biomédicas depende directamente de su solubilidad en agua, su grado de agregación, sus propiedades magnéticas. En este sentido nos planteamos la preparación de una serie de nanopartículas de materiales magnéticos solubles en agua que pudieran ser empleadas como agentes de contraste en MRI. Para ello se eligieron materiales magnéticos, como son el Gd, aleaciones CoNi y Pd encapsulados en la proteína apoferritina con la idea de que fueran solubles en agua. Se eligió el Gd porque tiene un comportamiento paramagnético y es el ejemplo clásico de agente de contraste ya que Gd(III), con sus siete electrones no apareados, proporciona un momento magnético adecuado. El Co y Ni poseen de forma independiente un comportamiento ferromagnético y la obtención de nanopartículas bimetalicas ferromagnéticas CoNi

son de particular interés por la posibilidad de aumentar los valores de magnetización por gramo con respecto a las nanopartículas superparamagnéticas basadas en óxido de hierro existentes en el mercado. En este sentido es importante señalar que el valor de magnetización por gramo correlaciona directamente con la capacidad de contraste en MRI. El Pd presenta el atractivo de que al pasar a tamaño nanométrico puede adquirir propiedades magnéticas muy variadas desde magnetización espontánea a temperatura ambiente hasta comportamiento de un material paramagneto clásico.

Todas estas nanopartículas han sido preparadas usando apoferritina como nanoreactor donde el crecimiento espacial está limitado por la talla de la cavidad de la proteína y la capa de la proteína evita la agregación de las partículas metálicas, haciéndolas solubles en agua, lo que permite que puedan ser eventualmente ensayadas in vivo como agentes de contraste en MRI.

Históricamente la ferritina es la primera proteína que se utilizó como plataforma para la síntesis de nanopartículas metálicas^[2]. La utilización de la ferritina como "host" donde albergar una nanopartícula metálica fue desarrollada fundamentalmente por el grupo de S. Mann, que fueron capaces de reconstituir de forma artificial la ferritina desde la proteína vacía (apoferritina) sintetizando nanopartículas de Fe_3O_4 (o $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^[3], óxidos y/o hidróxidos de manganeso y cobalto^[4], así como otros materiales del tipo FeS ^[5] y CdS ^[6].

Hay principalmente tres enfoques en la utilización de la apoferritina como nanoreactor en la preparación de nanopartículas:

a) Un primer enfoque consiste en reproducir el mecanismo de biomineralización que conlleva a la formación de ferritina a partir de apoferritina pero cambiando, bien el ión metálico o bien las condiciones experimentales de síntesis. De esta forma se ha logrado obtener nanopartículas de óxidos o hidróxidos de distintos metales^[7], $\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{Ni}(\text{OH})_3$ ^[8], $\text{Co}(\text{O})\text{OH}$, Co_3O_4 ^[9], In_2O_3 ^[10].

b) Un segundo enfoque consiste en encapsular cationes metálicos en la apoferritina y hacerlo reaccionar con una especie química de talla adecuada, para atravesar los túneles de la proteína dando lugar a sistemas tridimensionales confinados, de talla controlada por la propia cavidad de la proteína. De esta forma se han conseguido obtener nanopartículas de metal^[11], nanopartículas de sulfuros y seleniuros de distintos metales^[12-15] y derivados del azul de Prusia^[16].

c) Un tercer enfoque consiste en hacer uso del proceso de disociación de las subunidades de la proteína apoferritina y posterior autoensamblaje. Siguiendo este protocolo se han logrado obtener nanopartículas muy variadas del tipo de azul de Prusia^[17], Au^[18] e incluso la encapsulación de fármacos orgánicos.

Por tanto como indican los antecedentes bibliográficos la ferritina nos da la posibilidad de intercambiar su material interno, permitiéndonos introducir en su interior otro material inorgánico, diferente al óxido de Fe nativo. Siguiendo esta estrategia mostrada en el figura 5, nuestro grupo de investigación ha logrado obtener recientemente nanopartículas de Cu, Ni, Co y Ag.

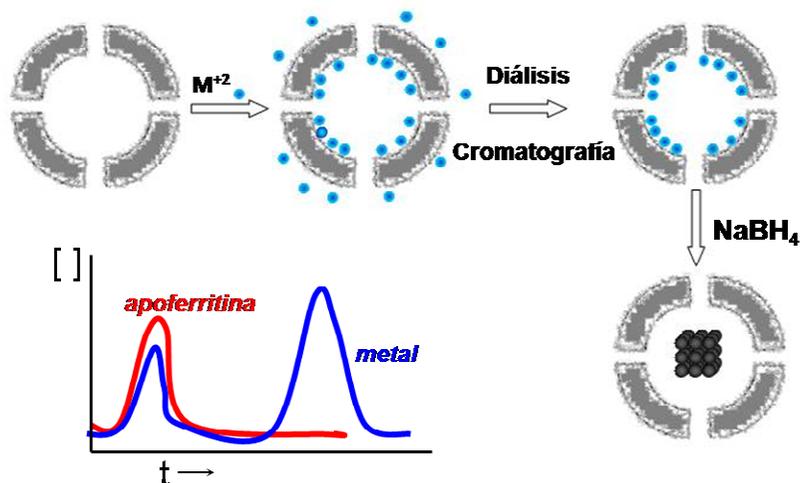


Figura 5. Esquema general de la modificación del material interno de la ferritina. En la parte superior se observa un perfil general de cromatografía en una columna del tipo Sephadex G-25.

2.1. Nanopartículas magnéticas de oxi-hidróxido de Gd

La apoferritina fue incubada con una disolución de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en tampón AMPSO pH 8.4 durante 24h a 4°C produciendo una suspensión blanquecina. A esta mezcla resultante se le adicionó $\text{Na}_3\text{HEDTA} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ con objeto de redissolver el Gd(III) no encapsulado en el interior de la cavidad de la proteína dando lugar a una disolución incolora. Posteriormente se dializó y cromatografió (figura 1). Las fracciones que contenían apoferritina y Gd (Apoferritina-Gd) fueron aisladas y las concentraciones de apoferritina y Gd medidas por el valor de absorbancia a 280nm en el espectro Uv-vis ($\epsilon^{280} = 468000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e ICP, respectivamente. De los datos de ICP se puede deducir la cantidad final de catión encapsulado, siendo de 1700 Gd por molécula de apoferritina. La muestra Apoferritina-Gd se analizó mediante gel de poliacrilamida (PAGE), bajo condiciones nativas (no desnaturalizantes) y se comparó con la apoferritina nativa (figura2). La comigración de ambas (apoferritina-Gd y apoferritina) indica primero que la proteína permanece intacta después de la unión de Gd(III) y segundo, que los iones de Gd(III) están, de hecho, unidos a la apoferritina.

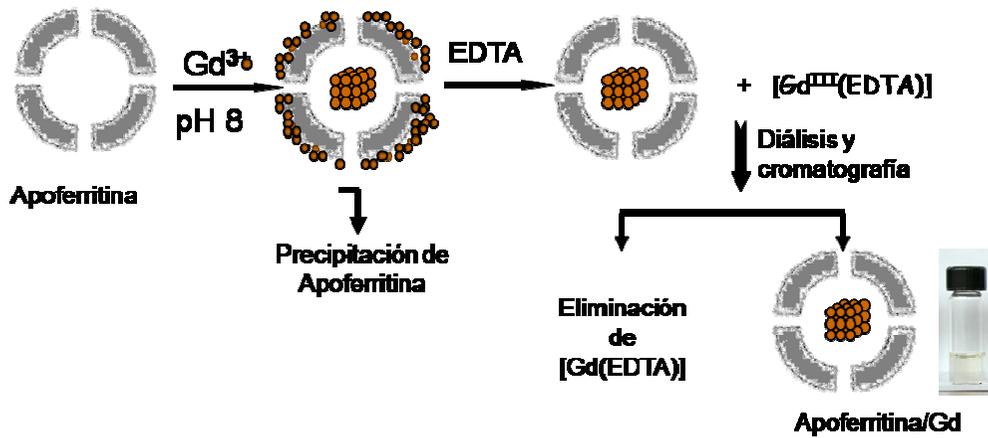


Figura 1. Esquema representativo de la síntesis de Apoferritina-Gd

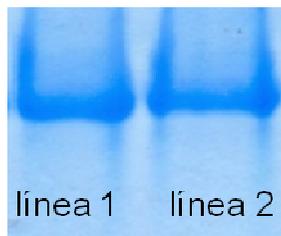


Figura 2. Electroforesis gel poliacrilamida (PAGE). Línea 1: apoferritina de bazo de caballo nativa y línea 2: Apoferritina-Gd.

La disolución de Apoferritina-Gd se trató con un exceso de EDTA (el cual debido a su gran tamaño no puede penetrar a través de los canales de la apoferritina) durante 1 hora a temperatura ambiente. En la disolución resultante dializada no se detectó Gd por ICP lo que pone de manifiesto la existencia de un material de Gd estable encapsulado en la proteína.

En la figura 3 se muestra una imagen representativa de TEM de las nanopartículas de Apoferritina-Gd, observando núcleos electro-densos aislados que presentan una forma generalmente esférica. El diámetro principal estadísticamente medido es de $5.0 \pm 0.7\text{nm}$. Como era de esperar el tamaño de las partículas metálicas es menor que la cavidad de la apoferritina. Asimismo no se observó agregación alguna de las partículas, indicando que de acuerdo a lo esperado la capa proteica evita la aglomeración de las partículas y las hace solubles en agua.

Las medidas de EDX confirmaron que las partículas contenían Gd, no observándose la presencia de este metal fuera de dichas partículas. La tinción de la proteína con acetato de uranilo mostró que la capa de la apoferritina estaba intacta y confirma, de nuevo, que las partículas metálicas fueron producidas dentro de la apoferritina.

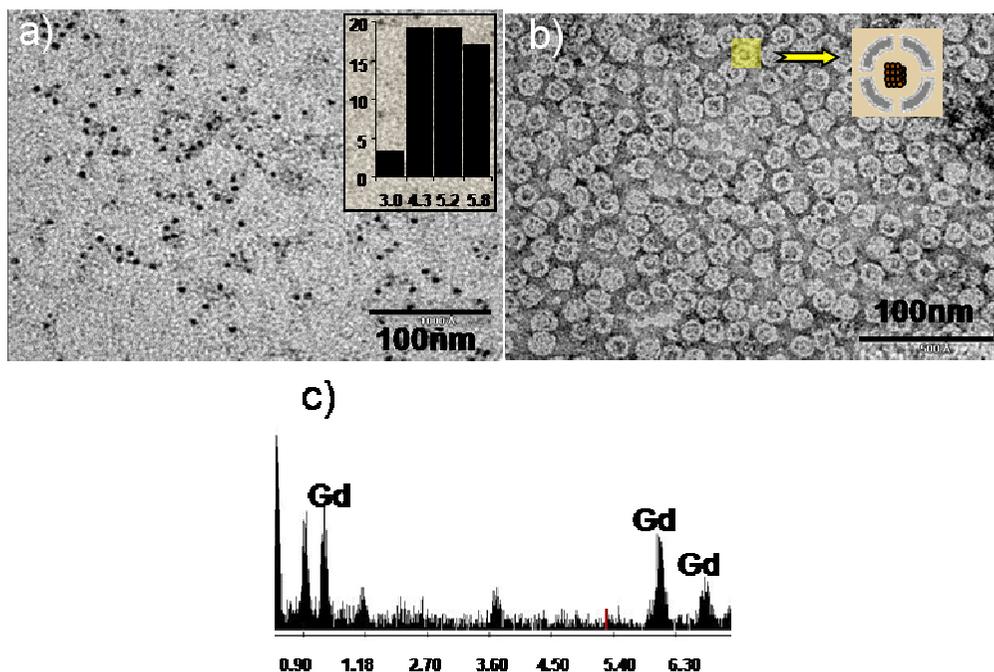


Figura 3. (a) Imagen representativa de TEM de las partículas de Apoferritina-Gd. Recuadro: histograma del tamaño. (b) imagen TEM contrastada con acetato de uranilo, mostrando la capa de la proteína transparente a los electrones. (c) Espectro EDX que muestra las señales correspondientes a la presencia de Gd.

Con el objeto de evaluar la estabilidad de Gd(III) en el interior de la apoferritina en relación con su posible toxicidad *in vivo*, se llevó a cabo un estudio de diálisis de la disolución Apoferritina-Gd frente a una disolución fisiológica (tampón TRIS pH 7.4, 0.1M NaCl) con el tiempo. El contenido de Gd de la membrana de diálisis y del depósito (tampón TRIS) fue medido por ICP cada 24h. Después de 7 días, se detectó una pérdida de sólo un 5% de Gd, indicando que, en principio, el Gd(III) está estabilizado en la apoferritina y que solo una pequeña cantidad del mismo es liberado a la solución externa.

Se llevó a cabo un estudio estructural mediante DRX. Los difractogramas mostraron que las muestras sintetizadas eran amorfas hasta 400°C, después de lo cual se observó un pico de intensidad cada vez mayor con el aumento de la temperatura de calcinación, lo que indica un mayor aumento de la cristalinidad. Se observó una fase cristalina correspondiente a Gd₂O₃. La estructura cristalina fue determinada por los valores *d* observados. Estos análisis muestran que la muestra calcinada tiene una estructura fcc con $a=5.36\text{Å}$. Los valores de espaciado *d* y los planos hkl calculados son: $2\theta= 28.8^\circ$, $d = 3.097 \text{ Å}$, (111); $2\theta= 33.1^\circ$, $d = 2.704 \text{ Å}$, (200); $2\theta= 47.8^\circ$, $d =1.901 \text{ Å}$, (220); $2\theta=56.5^\circ$, $d =1.627 \text{ Å}$, (311), que están de acuerdo con los datos previamente citados para Gd₂O₃^[19].

Se realizó un estudio de las propiedades magnéticas para la caracterización de las nanopartículas Apoferritina-Gd. En la figura 4 se muestran las curvas de magnetización de zero field- cooling/field-cooling (ZFC/FC), realizadas a campo constante de $H=5 \text{ mT}$ variando la temperatura entre 2K y 300K. Como puede observarse, las curvas ZFC y FC solapan lo que demuestra que el sistema es paramagnético en todo el rango de temperatura. La inversa de la susceptibilidad a temperaturas mayores de 30K para las nanopartículas de Apoferritina-Gd se ajustan a la ley de Curie-Weiss, $\chi= C/(T-\theta)$, donde θ es la temperatura paramagnética de Curie con un valor de -11K, próximo a los valores observados para Gd₂O₃ paramagnético ($\theta=-13\text{K}$)^[20].

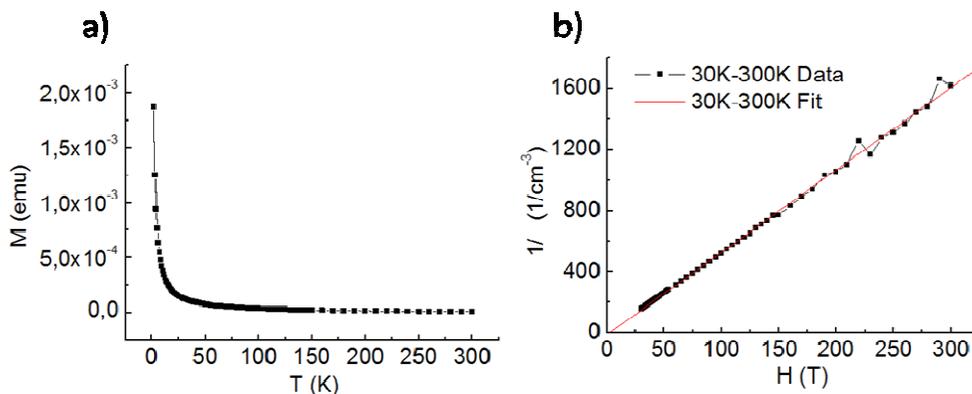


Figura 4. a) Magnetización ZFC-FC de Apoferritina-Gd medido con un campo aplicado de 5mT. b) Curie-Weiss en forma inversa a la susceptibilidad en el rango de temperaturas de 30-300K.

• **Caracterización de Apoferritina-Gd como potencial agente de contraste en MRI**

Se realizaron estudios de relaxometría NMR para probar la eficiencia de la muestra Apoferritina-Gd como agente de contraste para MRI. Como ya se ha comentado en el capítulo 2 los agentes de contraste se basan en los cambios de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2 o T_2^*) de los protones de las moléculas de agua y otros componentes biológicos presentes en el tejido a estudiar. Los agentes de contraste paramagnéticos se denominan agentes de contraste positivos debido al aumento del brillo que producen en los tejidos donde se acumulan ya que acortan T_1 , mientras que los agentes de contraste superparamagnéticos son conocidos como agentes de contraste negativos porque dan una señal más oscura ya que acortan T_2 . Los complejos de Gd(III) y las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de Fe (SPIOs) son genuinos ejemplos de agentes T_1 y T_2 , respectivamente.

El carácter de un agente de contraste está basado en la relación r_2/r_1 que distingue precisamente los dos tipos de agentes de contraste, T1 o T2. Para complejos paramagnéticos (agentes T1), la relación r_2/r_1 es generalmente < 2 (siendo el efecto dominante el aumento de $1/T1$), mientras que para USPIOs (agentes T2), la relación r_2/r_1 es mayor de 2 (prevalece el aumento de $1/T2$ en la imagen de contraste)^[21].

Las nanopartículas Apoferritin-Gd no muestran comportamiento superparamagnético y podrían ser consideradas como sistemas más cercanos a agentes del tipo T1 (complejos de Gd^{3+}), a través del intercambio de moléculas de H_2O en las esferas de coordinación de los Gd^{3+} superficiales, sin embargo, el alto contenido de Gd en la cavidad ferritínica (superficiales y no superficiales) plantea la duda de un posible efecto como agente T2. Con objeto de analizar este complejo sistema de nanopartículas Apoferritina-Gd, se midieron los tiempos de relajación r_1 y r_2 en los rangos de frecuencia $10 \text{ KHz} \leq \nu \leq 65 \text{ MHz}$ y $15 \text{ MHz} \leq \nu \leq 65 \text{ MHz}$, respectivamente, a temperatura ambiente. En las figuras 5(a) y 5(b) se muestran los denominados perfiles de dispersión NMR, es decir, $r_1(\nu)$ y $r_2(\nu)$ en comparación con los mismos datos ^[22], de los compuestos comerciales Omniscan® y Gd-DTPA®. Como se puede observar en todo el rango de frecuencias, la relajación r_1 de Apoferritina-Gd es del orden de 10-25 veces mayor que los valores en dichos compuestos comerciales. Asimismo, r_2 se mantiene aproximadamente 70 veces mayor.

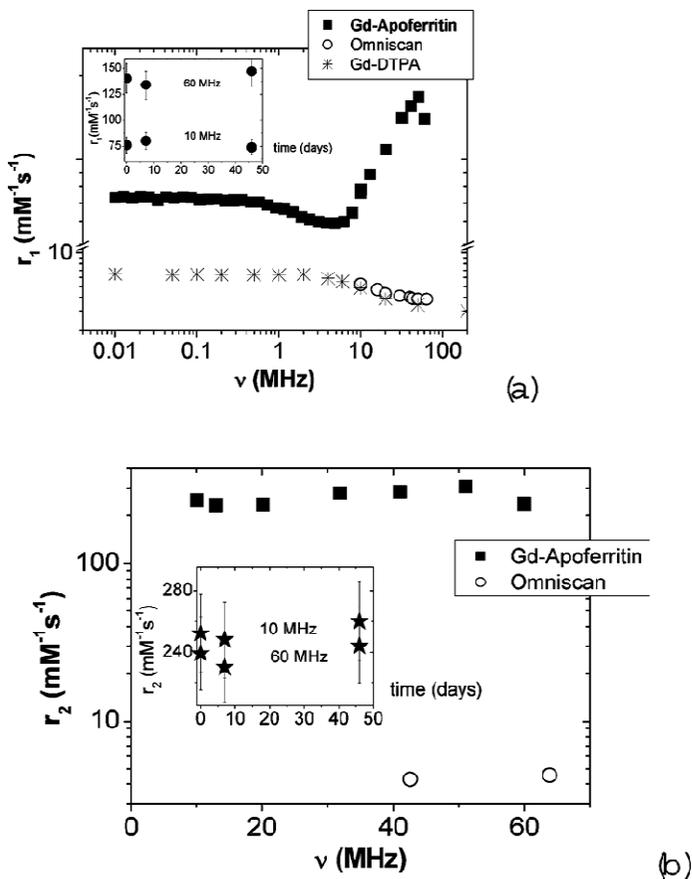


Figura 5. Relaxitividad longitudinal r_1 (a) y transversal r_2 (b) de Apoferritina-Gd medidos en función de la frecuencia. Los datos de los compuestos comerciales Omniscan® y Gd-DTPA® también se muestran. En los recuadros se muestran r_1 y r_2 medidos en función del tiempo a 10 y 60 MHz.

Por lo tanto se puede concluir que a las frecuencias clínicas típicas, es decir, imágenes de cuerpo entero medidas a 1.5T ($\nu \sim 64$ MHz) así como imágenes medidas a campos bajos de 0.2T ($\nu \sim 8$ MHz) y $\sim 0,5$ T ($\nu \sim 20$ MHz), las muestras de Apoferritina-Gd tienen valores de r_1 y r_2 mucho mayores que los complejos de Gd comerciales. Hay que señalar que en trabajos recientes, la encapsulación de complejos de Gd del tipo [Gd(HPDO3A)] y la de nanopartículas de Gd en nanotubos de carbono, da lugar a valores de r_1 y r_2 similares^[23].

Por otro lado, como se ha comentado con anterioridad, la relación r_2/r_1 define el carácter como agente de contraste T1 (positivos, señal brillante) o T2 (negativos, señal oscura). Como puede observarse en la Figura 6, la relación r_2/r_1 para las nanopartículas de Apoferritina-Gd es muy dependiente de la frecuencia, de tal forma que cambia desde valores $r_2/r_1 < 2$ a $r_2/r_1 > 2$ en torno a 30MHz. Este comportamiento abre la posibilidad de tener una clase de agentes de contraste modulable, que pase de agente de contraste negativo a positivo cambiando el campo magnético externo, lo que añade un interés adicional a las nanopartículas de Apoferritina-Gd.

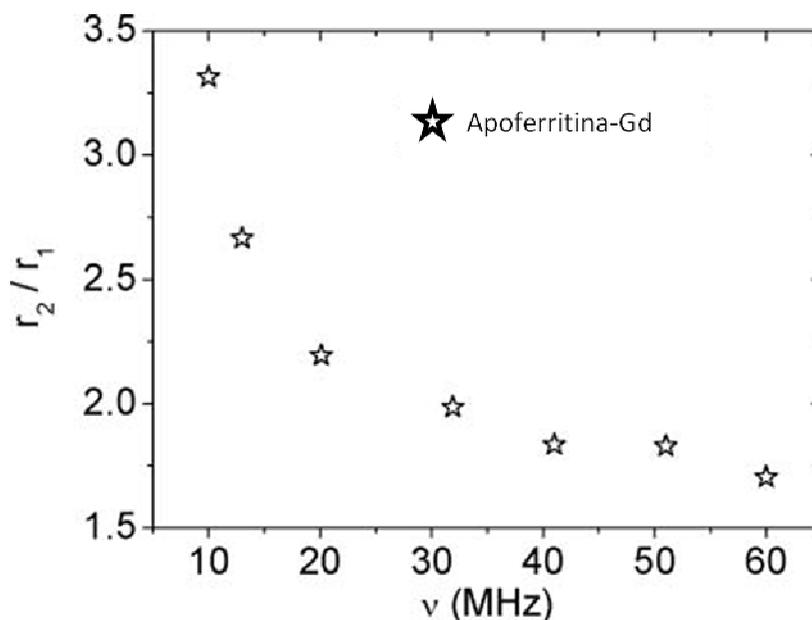


Figura 6. Tasa de Relaxividad r_2/r_1 en función de la frecuencia en nuestra muestra.

En definitiva, el sistema Apoferritina-Gd, dado sus características de nanopartículas paramagnéticas con alto contenido de iones Gd^{3+} superficiales le confiere un carácter de agente de contraste mixto T1-T2, modulable en función del pulso de radiofrecuencia externo. Este tipo de agentes son de gran interés puesto

que permiten visualizar el tejido a estudiar en condiciones de contraste brillante u oscuro, permitiendo, en definitiva, un estudio anatómico y morfológico más detallado.

En vista de estas características, decidimos llevar a cabo un estudio *in vivo* de la capacidad real como agente de contraste de las nanopartículas Apoferritina-Gd en ratones sanos. Sin embargo, estos estudios no pudieron concluirse puesto que desgraciadamente los seis ratones ensayados murieron a los pocos instantes de la inyección intravenosa, producto probablemente de la toxicidad de las nanopartículas. Esta toxicidad podría proceder de la liberación *in vivo* de iones Gd, que podría ser significativamente más importante que las medidas en experimentos llevados a cabo *in vitro* (5% tras una semana), y viene a poner de manifiesto las complicaciones existentes en los procesos que tienen lugar *in vivo* y las limitaciones de los datos *in vitro* de cara a un desarrollo real de nuevos fármacos.

2.2. Nanopartículas magnéticas bimetálicas CoNi

Las nanopartículas magnéticas basadas en aleaciones constituyen una clase de materiales muy atractivos, dado que sus propiedades magnéticas pueden ser modificadas por efectos de combinación de la talla y la composición de la aleación^[24]. Sin embargo, no es fácil la síntesis de nanopartículas bimetálicas o trimetálicas, dado la dificultad de controlar la estequiometría y la composición de la superficie de la partícula.

En esta línea las nanopartículas bimetálicas ferromagnéticas CoNi son de particular interés por su potencial para superar el límite superparamagnético de ultra-alta densidad de grabación magnética y para mejorar el contraste en la resonancia magnética^[24]. A parte del método sonoquímico publicado por Gedanken^[25] et al. en 1998, solo se encuentran en la literatura cuatro ejemplos principales que exploran rutas químicas para la síntesis de nanopartículas de CoNi con composición variada: 1) método sol-gel para la preparación de nanoclusters CoNi depositados en silica gel^[26], 2) crecimiento de nanopartículas CoNi mediado por alginato^[27], 3) reducción de Co-Ni en poliol líquido^[28] y 4) una estrategia "guest-host" usando doble capa de hidróxidos como un host^[29].

En este capítulo se presenta la preparación de una serie de nanopartículas bimetálicas con diferentes proporciones Co/Ni (Co₇₅/Ni₂₅, Co₅₀/Ni₅₀, Co₂₅/Ni₇₅) usando apoferritina como nanoreactor.

Siguiendo un protocolo desarrollado en los últimos años por nuestro grupo de investigación^[30], la apoferritina fue incubada con diferentes proporciones de Co/Ni (75:25, 50:50 y 25:75) a pH 8 durante 24h. Las fracciones que contienen la proteína fueron aisladas usando cromatografía de exclusión por tamaño y reducidas

por la adición de un exceso de NaBH_4 . La solución negra homogénea obtenida fue dializada para eliminar los productos que no han reaccionado.

Al cromatografiar la mezcla de incubación: apoferritina con sales de Co(II) y Ni(II) , se obtienen una serie de fracciones cuyo contenido en apoferritina y los diferentes iones metálicos puede ser analizado por la absorbancia a 280nm en el espectro UV-visible y por espectroscopia de absorción atómica, respectivamente.

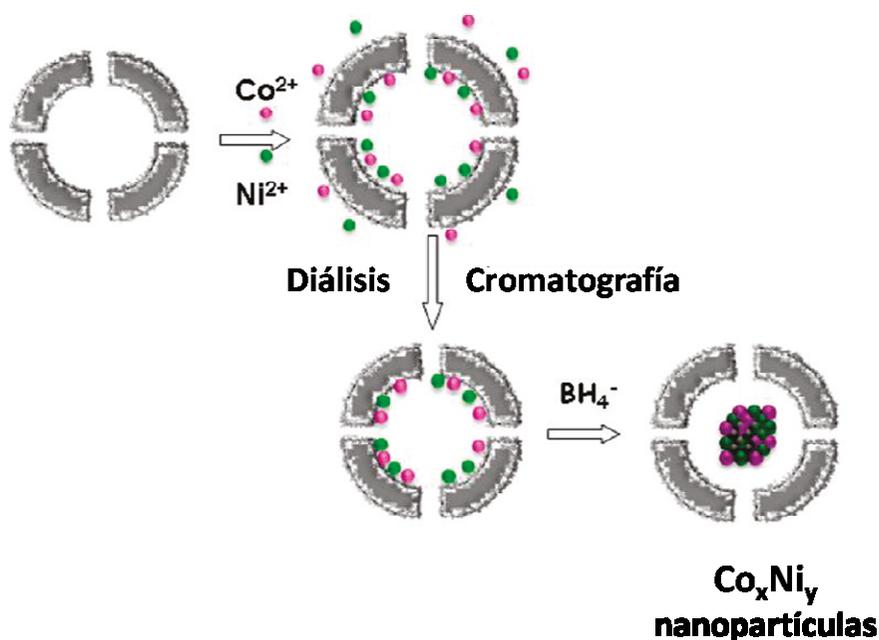


Figura 1. Esquema representativo de la preparación de las nanopartículas bimetálicas CoNi encapsuladas por Apoferritina.

Como ejemplo, en la figura 2 se muestra la evolución del espectro óptico de las muestras de $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$. La banda a 280nm ($\epsilon^{280}=468\ 000\ \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) se corresponde con la proteína y la banda a 390nm con el núcleo metálico. El espectro de la apoferritina no mostró absorción a 390nm, y por tanto la banda a 390nm es una indicación cualitativa de que la reducción metálica se llevó a cabo^[31]. La coelución de

la proteína y el metal indica que ambos, proteína y núcleo metálico, están íntimamente asociados después de la reducción. La composición química de las nanopartículas bimetalicas fue cuantificada por espectroscopía de absorción atómica y por espectroscopía EDX. La proporción final Co/Ni en las nanopartículas es similar a la presente en la mezcla inicial (tabla 1). Por tanto, se puede deducir que la cantidad final de cationes encapsulados está directamente relacionada con la proporción Co/Ni utilizada en la disolución inicial.

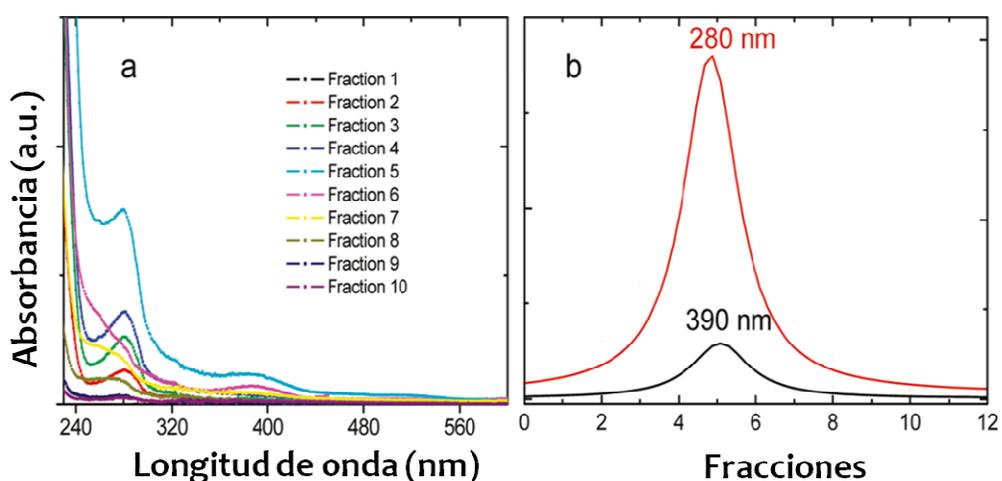


Figura 2. (a) espectroscopia UV-vis de las fracciones eluidas de la muestra Co₇₅Ni₂₅. (b) Perfil de coelución de la cromatografía por exclusión de tamaño para la muestra monitorizada a 280 (rojo) y 390 nm (negro).

	Relación inicial Co/Ni	Relación final Co/Ni
Co₂₅Ni₇₅	0.33	0.46
Co₅₀Ni₅₀	1	1.16
Co₇₅Ni₂₅	3	3.3
Co₁₀₀	0	0
Ni₁₀₀	0	0

Tabla 1. Relación molar inicial de Co/Ni introducida durante la síntesis y relación atómica final obtenida por espectroscopia de absorción atómica.

Las muestras se caracterizaron mediante TEM. En la figura 3 se muestra una imagen representativa de las muestras CoNi, donde se puede apreciar que se han formado nanopartículas metálicas con un tamaño relativamente homogéneo y sin formación de agregados (Figura 3a). Se realizó un análisis estadístico del tamaño de las partículas para las diferentes muestras y se observó que no hay una diferencia significativa entre ellas. Así el diámetro medido para las nanopartículas $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$, $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$, y $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$ fue de 4 ± 2.1 , 4.5 ± 1.6 y 3.9 ± 1.6 nm, respectivamente. Los núcleos metálicos tienen una forma generalmente esférica. La muestra se contrastó con acetato de uranilo lo que permitió la visualización de la capa proteica encapsulando al núcleo metálico (figura 3b). El espectro de EDX confirma la presencia de Co y Ni. Estos metales no fueron detectados fuera de las partículas (figura 3c). La presencia de la capa de apoferritina evita la agregación irreversible de las nanopartículas metálicas y las hace solubles en agua. Cabe destacar que la preparación de las nanopartículas de CoNi en un medio libre de apoferritina resulta en la precipitación de un agregado de color negro. El difractograma de rayos X de las muestras en polvo confirmó que se trataba de un material amorfo.

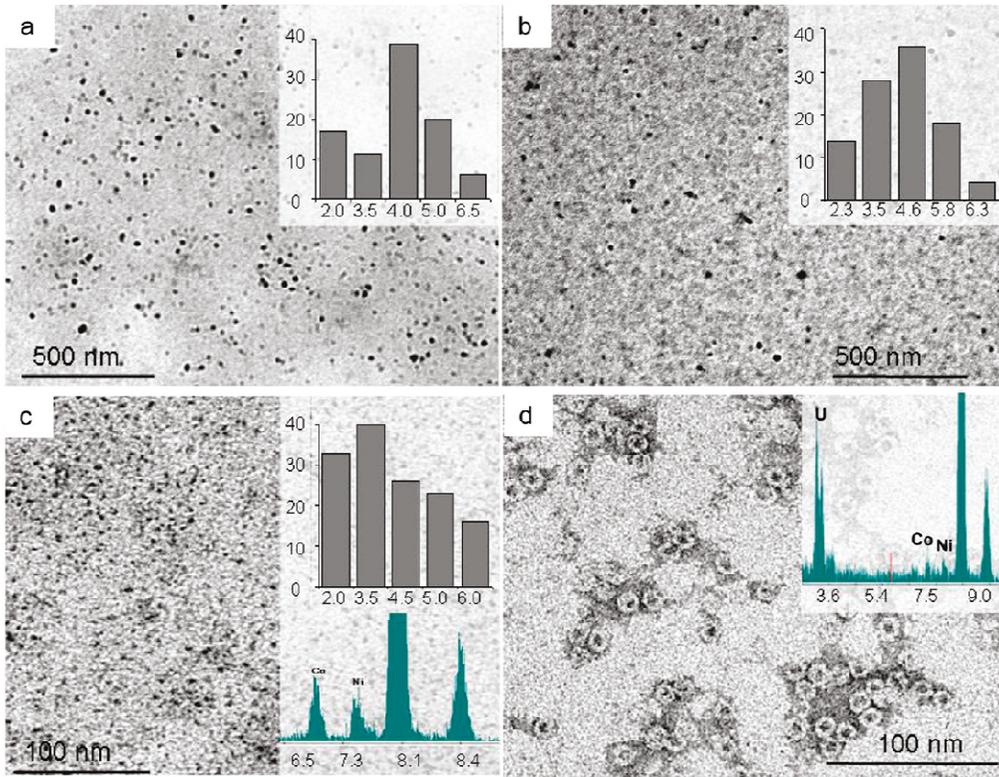


Figura 3. Imágenes de TEM de (a) $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$, (b) $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$, y (c) $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$ que muestran nanopartículas esféricas; (d) $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$ contrastada con acetato de uranilo. Recuadro: histograma de la talla de las partículas y el espectro EDX.

Con el estudio de TEM de las muestras confirmamos que las nanopartículas se han formado dentro de la proteína, pero para afirmar que se trata de un sistema bimetálico la primera pregunta que debemos plantearnos es si los dos metales realmente están combinados en cada una de las nanopartículas. Una segunda cuestión a contestar es si los dos metales están asociados formando estructuras tipo "core-shell" (corteza-núcleo) o repartidos homogéneamente a lo largo de la partícula. Para ello se hicieron medidas espectroscópicas de pérdida de energía de los electrones (EELS) y de energía dispersada de rayos X (EDX).

La espectroscopía EDX es una técnica muy útil para la caracterización química de una muestra. Se llevaron a cabo espectros de EDX puntuales en ventanas de dimensiones similares al tamaño de las nanopartículas, para medir la proporción de Co y Ni en cada una de estas nanopartículas. En la figura 4 se muestra los resultados de la espectroscopía EDX realizada sobre 20 nanopartículas de la muestra $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$. Como puede observarse hay cierta heterogeneidad en la relación Ni/Co. Los valores de composición media obtenida de estas 20 nanopartículas fue de 38% de Co y 62% de Ni, por lo que la relación de $\text{Ni/Co} = 1.6$, superior al medido experimentalmente por análisis químico (1.15).

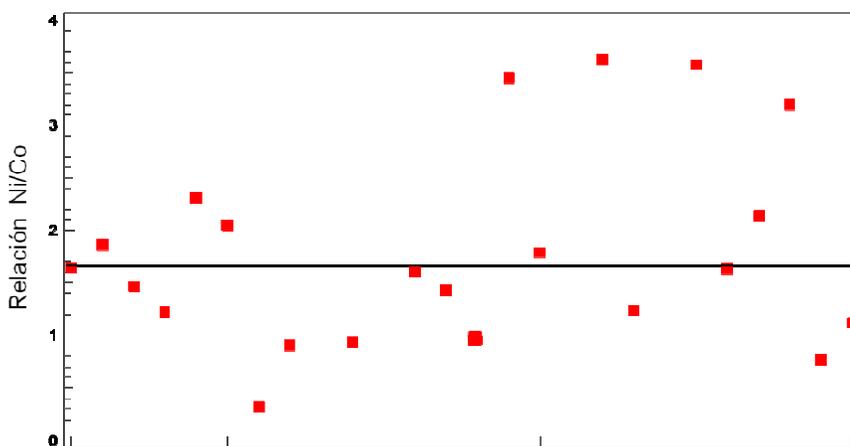


Figura 4. Espectroscopia EDX realizada sobre las nanopartículas en el que se muestra la proporción media de Ni/Co.

Los espectros de EDX nos muestran que Co y Ni están asociados dentro de la misma nanopartícula, no obstante, con las medidas de EDX no podemos obtener información sobre cómo están distribuidos dichos metales en cada nanopartícula. Para abordar esta cuestión hemos utilizado la espectroscopía EELS que permite una

mayor resolución ya que trabaja con una sonda de unos pocos Angstroms. Para ello se hace un análisis de una serie de nanopartículas, usando la técnica llamada espectro lineal (SL). Para realizar estas medidas se adquiere secuencialmente una recopilación de espectros EEL mediante un barrido de una fina sonda electrónica a lo largo de una trayectoria predefinida. En nuestro caso concreto, se tomó una serie de 29 espectros de EELS con una sonda (haz de electrones) de 50 Å de ancho, un intervalo de 0.4nm entre espectros, una energía de dispersión de 0.3 eV y un tiempo de adquisición de 1s por espectro.

A modo de ejemplo la figura 5 muestra los espectros EELS en línea para dos nanopartículas individuales de la muestra $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$. La imagen de alto ángulo de campo oscuro (HAADF) (figura 4a) muestra dos nanopartículas de $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$ sobre las cuales se ha realizado el análisis (línea blanca). Los espectros de EELS se tomaron a lo largo de la línea que recorre ambas partículas. La ilustración 3D (figura 4b) de los espectros adquiridos a lo largo de dos nanopartículas muestra la variación de la señal de Co-L_{2,3} y Ni-L_{2,3} a 780.0 eV y 853.0 eV, respectivamente. A medida que se va recorriendo la línea y se va penetrando en la primera partícula, las señales de los espectros se van haciendo mayor, siendo estas señales más intensas cuando se alcanza el centro de la partícula. Como era de esperar la señal de los espectros decae en el espacio interparticular. Al penetrar en la segunda partícula se puede notar como las señales de los espectros vuelve a crecer siendo de nuevo más intensa al alcanzar el centro de esta segunda partícula. Por tanto estos resultados ponen de manifiesto que Co y Ni están asociados en ambas nanopartículas.

Por otra parte en los espectros EELS no se ha observado la señal característica de O (O-K). Lo que sugiere que estas nanopartículas están formadas por Co y Ni en su estado de oxidación 0.

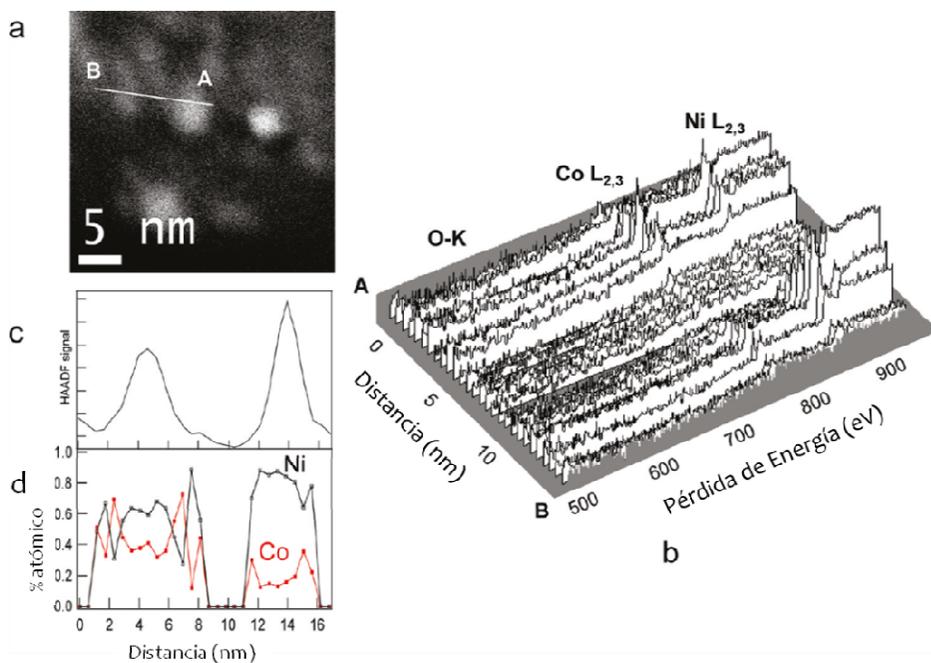


Figura 4: (a) Imagen de HAADF-STEM que muestra dos de las nanopartículas de CoNi. (b) Imagen de EELS-LS que muestra 29 espectros a través de las dos partículas, representando el cambio del espectro EEL en la región de pérdida de energía del CoL_{2,3} y NiL_{2,3}. (c) Imagen que representa la intensidad del perfil lineal que muestra la variación HAADF a lo largo de la partícula. (d) Variación de la composición química a lo largo de ambas nanopartículas; en rojo la proporción atómica de Co y en negro la de Ni.

Se llevó a cabo un estudio de las propiedades magnéticas de la serie de nanopartículas bimetálicas CoNi (Co₇₅/Ni₂₅, Co₅₀/Ni₅₀, Co₂₅/Ni₇₅). Todas ellas presentaron comportamiento superparamagnético por encima de una temperatura de bloqueo (T_B). Como consecuencia de esto, por debajo de la temperatura de bloqueo las curvas de enfriamiento a campo cero (Zero Field Cooled-ZFC) y enfriamiento en presencia de un campo magnético (Field cooled-FC) divergen, presentando la curva ZFC un máximo correspondiente a T_B . Asimismo por debajo de T_B las nanopartículas presentan una marcada histéresis magnética.

En la figura 6 se muestran las curvas de magnetización de ZFC/FC. Para todas las muestras de la serie CoNi las curvas ZFC muestran un solo máximo que varía entre 11-80K, a medida que el contenido de Co aumenta, y delimita la transición ferromagnética-superparamagnética. Por encima de la temperatura de bloqueo las curvas de ZFC y FC se superponen perfectamente, por lo que podemos descartar la presencia de una gran agregación en nuestras muestras. Hay que indicar que el rango de valores de T_b de estas nanopartículas (11-80K) son coherentes con los valores extremos observados para las nanopartículas de Apoferritina-Ni y Apoferritina-Co puro de 6 y 70 K, respectivamente^[32] (tabla2). La presencia de un solo pico claramente definido en la curva ZFC es un argumento más a favor de la formación de nanopartículas de CoNi, con propiedades químicas y físicas casi homogéneas^[33].

	M_R/M_S (2K)	H_C (Oe)	T_B (K)	Inicial Co/Ni	Final Co/Ni
Co₂₅Ni₇₅	0.0364	500	11	0.33	0.46
Co₅₀Ni₅₀	0.07826	1000	40	1	0.95
Co₇₅Ni₂₅	0.21905	1100	80	3	3.3
Co₁₀₀	0.39888	1250	70	0	0
Ni₁₀₀	0.0264	390	6	0	0

Tabla 2. Propiedades magnéticas: magnetización remanente (M_R/M_S), campo coercitivo (H_C) y temperatura de bloqueo (T_b) de la serie Apoferritina-Co/Ni comparadas con las fases puras de Apoferritina-Co y Apoferritina-Ni.

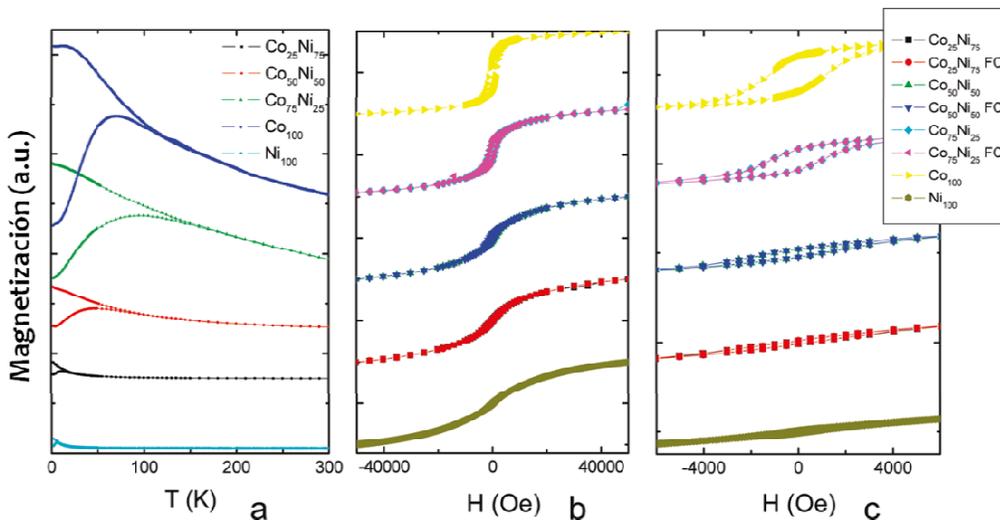


Figura 6. (a) Curvas Field-Cooled (FC) y Zero Field-Cooled (ZFC) de las muestras CoNi a 500e. (b) Ciclo de histéresis a 2 K y ciclo histéresis a 2 K en un field-cooled a 5 T. (c) Zoom de las curvas M-H mostrando la histéresis (H_c) y la ausencia de desplazamiento de los ciclos de histéresis (Exchange bias) en el eje del campo magnético.

La figura 6b muestra los ciclos de histéresis de estas nanopartículas bimetálicas CoNi. El campo coercitivo aumenta en el rango entre 500 y 1100 Oe cuando aumenta la cantidad de Co. En cualquier caso, el valor de H_c para esta serie de nanopartículas CoNi bimetálicas se encuentra entre los 390 Oe de las nanopartículas puras de Ni y 1200 Oe de las nanopartículas puras de Co^[31] (tabla 2).

Las curvas de histéresis fueron registradas además en un régimen de enfriamiento aplicando un campo (5T) sin observarse desplazamiento alguno de los ciclos de histéresis en el eje del campo magnético, evidenciando la falta de interacción de canje (H_{EB}).

Una cuestión interesante en el sistema CoNi es la posibilidad de oxidación que de estructuras "core-shell" del tipo: Co/CoO, Ni/NiO, Co/NiO, o Ni/CoO. Este tipo de estructuras pueden presentar el fenómeno de anisotropía de canje. Dicho fenómeno se produce por interacción en la interfase formada por un material ferromagnético y un material antiferromagnético (FM-AFM), cuyo efecto más visible

consiste en el desplazamiento de los ciclos de histéresis (Exchange bias) en el eje del campo magnético. Esta interacción aumenta la anisotropía magnética efectiva de los núcleos (Co o Ni).

Por esta razón, llevamos a cabo la caracterización estructural y magnética de las mismas muestras de CoNi después de una oxidación intencionada. La figura 7 muestra los resultados extraídos de los análisis de SL-EELS. Se adquirieron una serie de 50 espectros con una energía de dispersión de 0,5eV y un tiempo de adquisición de 2s por espectro mientras una sonda de 0,5nm de ancho escanea a través de las nanopartículas individuales. Las señales de O-K, Co-L_{2,3} y Ni-L_{2,3} aparecen a lo largo de las partículas. Se observa como en los espectros 1 y 3, que se corresponden con una localización superficial, el pico de O es más intenso que en el espectro 2, correspondiente al núcleo de la nanopartícula, indicando la presencia de oxígeno, principalmente, en la superficie. La cuantificación de O, Co y Ni fueron llevadas a cabo analizando la señales de O-K, Co-L_{2,3} y Ni-L_{2,3}.

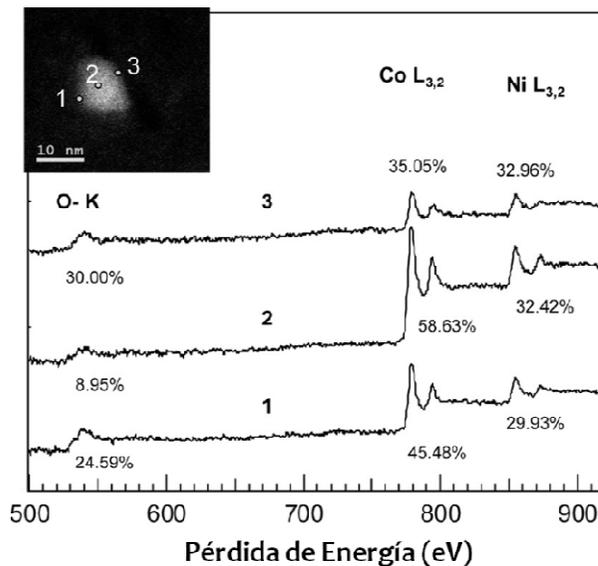


Figura 7. Espectro EEL en la región de pérdida de energía de las señales de O-K, Co-L_{2,3}, y Ni-L_{2,3}, extraídas del espectro lineal adquirido de la muestra Co₇₅Ni₂₅ (recuadro: imagen STEM-HAADF).

El cambio en los espectros EELS tras el proceso de oxidación sugieren una oxidación parcial de las nanopartículas CoNi, especialmente a nivel de superficie. Para confirmar este extremo se llevo a cabo estudios mediante espectroscopía XANES (figura 8). La línea gruesa sólida se corresponde con el espectro obtenido para las muestras de CoNi y la línea delgada sólida corresponde al espectro de referencia. Tanto la forma general y la estructura de los espectros así como sus derivadas indican claramente que las especies CoNi tras oxidación intencionada consisten en una mezcla de óxidos y nanopartículas metálicas. Los datos XANES se ajustan por mínimos cuadrados e indican que el Co está presente como Co, Co_3O_4 , y $\text{Co}(\text{OH})_2$ y el Ni como Ni y NiO, siendo los óxidos las fases principales (tabla 3).

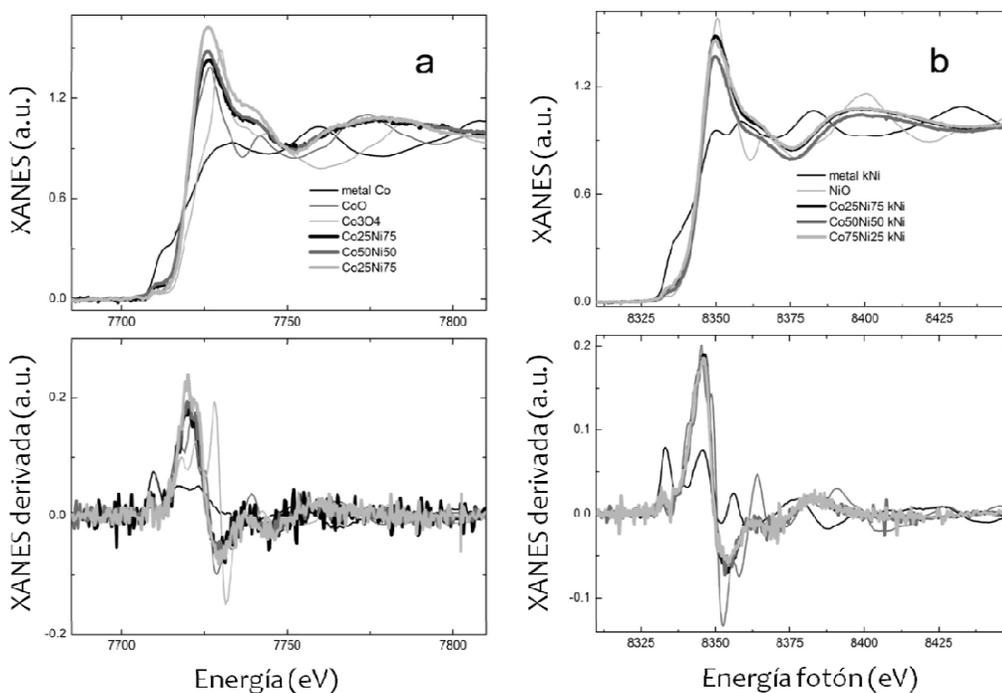


Figura 8. Espectro XANES (panel superior) y sus primeras derivadas (panel inferior) de la serie CoNi en la señal de Co-K (a) y la señal Ni-K (b).

	% Co(OH)	% Co	% Co ₃ O ₄	% Ni	% NiO
Co₂₅Ni₇₅	38±1	13±1	49±1	23±1	77±1
Co₅₀Ni₅₀	41±1	10±1	49±1	23±1	77±1
Co₇₅Ni₂₅	37±1	26±1	37±1	28±1	72±2

Tabla 3. Proporción de Co, Co₃O₄, Co(OH)₂, Ni y NiO en las series CoNi extraídas de los experimentos de XANES.

El estudio de las propiedades magnéticas muestran que la temperatura de bloqueo para las muestras oxidadas varía desde los 2 a los 60K cuando el contenido de Co aumenta (figura 9a). Los valores más bajos de T_B en la serie de las muestras CoNi oxidadas intencionadamente con respecto a las bimetálicas puras confirman un proceso de oxidación^[33,27]. Los ciclos de histéresis (figura 9b) muestran valores de coercitividad para las muestras oxidadas entre 80 y 500 Oe cuando aumenta el contenido en Co. En la tabla 4 se recogen los valores de H_c , T_B y M_R para las muestras oxidadas. Los valores más bajos obtenidos para H_c , así como los valores ligeramente más altos obtenidos para M_s (magnetización de saturación), en comparación con las muestras no oxidadas, son coherentes con una oxidación parcial de la fase metálica. Los valores más altos de M_s son probablemente debido a un incremento de las especies paramagnéticas^[34,35]. Las curvas de magnetización obtenidas en el régimen del field cooled (5T) no muestran un desplazamiento de los ciclos de histéresis (figura 9c). El intercambio de canje depende de la efectividad del acoplamiento en la interfaz FM/AFM, que está íntimamente relacionado con la cristalinidad de la estructura "core-shell" así como con la forma de las nanopartículas. En nuestras muestras, a pesar de la presencia de óxidos de Ni y Co, observados por XANES, y de que los experimentos de EELS sugirieron un incremento de oxígeno en la superficie de la partícula, no hay evidencia de interacción de canje. Probablemente esto se debe a que no se ha formado una estructura "core-shell" compacta y regular a lo largo de toda la partícula que impide la interacción de canje entre la "shell" de oxidación y el núcleo metálico. Finalmente, el hecho de que el óxido Co₃O₄ es menos efectivo que el óxido CoO en producir esta interacción de canje^[36] podría ser otro factor a tener en

cuenta, remarcando que los factores que determinan la fuerza de la interacción de intercambio de canje siguen sin comprenderse totalmente.

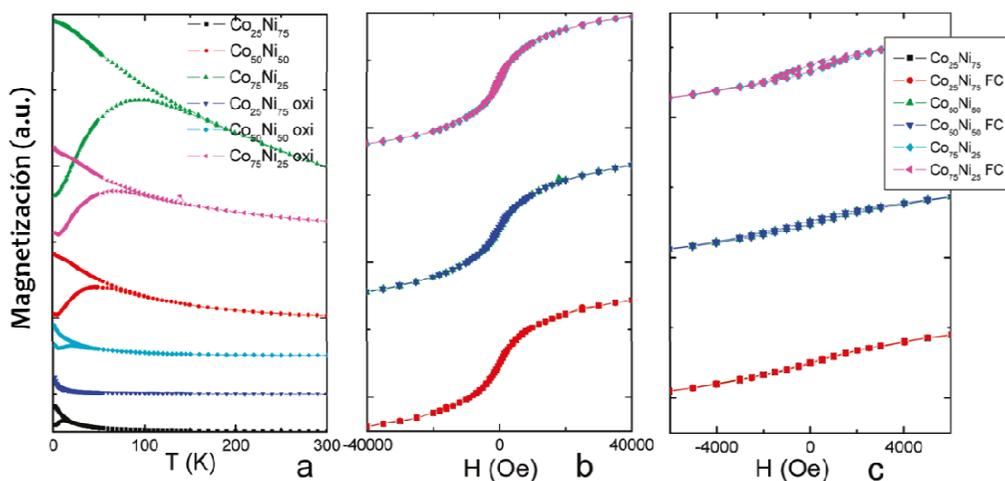


Figura 9. (a) Curvas Field-Cooled (FC) y Zero-Field-Cooled (ZFC) de las muestras CoNi oxidadas a 50 eV. (b) Ciclo de histéresis a 2K y ciclo de histéresis a 2K en un field-cooled a 5 T. (c) Zoom de las curvas M-H que muestran H_c y la ausencia de desplazamiento de los ciclos de histéresis.

Muestras oxidadas	$M_R/M_S(2k)$	$H_c(Oe)$	$T_B(K)$
$Co_{25}Ni_{75}$	0.00848	80	No
$Co_{50}Ni_{50}$	0.022	270	20
$Co_{75}Ni_{25}$	0.05	500	90

Tabla 4. Propiedades magnéticas: magnetización remanente (M_R/M_S), campo coercitivo (H_c) y temperatura de bloqueo (T_B) de las muestras oxidadas.

Por tanto hemos conseguido preparar nanopartículas bimetalicas CoNi de diferentes composiciones encapsuladas dentro de la cavidad de la apoferritina, lo que hace a estas partículas solubles en agua, que es un requisito indispensable para posibles aplicaciones biomédicas. Y se demuestra la conveniencia del uso de la apoferritina como un medio de confinamiento donde estas nanopartículas

bimetálicas pueden ser sintetizadas bajo unas condiciones químicas leves. Las tres series CoNi muestran valores importantes de H_c y T_B , que varían con la composición. Las muestras oxidadas mostraron una disminución de la temperatura de bloqueo superparamagnética (T_B) y de la coercitividad (H_c), así como la ausencia de interacción de canje.

La oxidación de estas nanopartículas CoNi en la superficie de dichas nanopartículas es un impedimento para su experimentación *in vivo* como potenciales agentes de contraste para MRI ya que disminuyen de forma significativa los valores de magnetización por gramo. No obstante hay que señalar que el método que hemos desarrollado para la síntesis de nanopartículas bimetálicas CoNi con diferente composición, abre una nueva vía de preparación de nanopartículas que pueden contener dos, tres o incluso más metales. Este método tiene una gran potencialidad para la preparación de una enorme cantidad de nanopartículas de naturaleza muy variada gracias a que, a priori, se pueda modular la cantidad final y la estequiometría entre metales. Y además permite establecer correlaciones entre contenido metálico y propiedades.

2.3. Nanopartículas magnéticas de Pd

La aparición de ferromagnetismo en materiales usualmente no magnéticos como Pd y los metales de transición últimos de la serie 4d atrae gran atención desde un punto de vista tanto teórico como experimental. El Pd como material masivo solo muestra comportamiento paramagnético, puesto que la densidad de estado en el nivel de Fermi no es suficiente para cumplir el criterio de ferromagnetismo de Stoner^[37].

En la década pasada se publicaron nanoestructuras de Pd que mostraban ferromagnetismo^[38]. En 1997, Taniyama et al. encontraron evidencias experimentales de un momento magnético en nanopartículas de Pd evaporadas a gas con un radio medio en torno a 7nm^[39]. Un estudio más completo llevado a cabo por los mismos autores en 2003 puso de manifiesto la observación experimental de ferromagnetismo superficial, el cual fue atribuido a las caras (100) de la partícula^[40]. La temperatura de Curie de estas nanopartículas fue mayor de 400K. Hernando et al. encontraron ciclos de histéresis a temperatura ambiente para nanopartículas de Pd protegidas con grupos alquilamonio^[41] y con grupos tiol^[42] en el rango de tamaños entre 1.2 y 2.4nm. El origen de este comportamiento magnético fue explicado en base a dos mecanismos diferentes: a) cuando la nanopartícula es un clúster puro de Pd metálico sin enlaces covalentes Pd-S en la superficie o sin una capa de pasivación de óxido, ocurre el ferromagnetismo, lo que puede ser atribuido al incremento en la densidad de los estados cercanos al nivel de Fermi; b) cuando se forma una estructura superficial con vacantes, con enlaces químicos Pd-S o Pd-O en la superficie, aparece en la muestra magnetismo permanente fuertemente anisotrópico como resultado del incremento de la densidad de los huecos 4d en el Pd superficial^[43]. En un artículo reciente se sugiere que la magnetización aumenta con la

disminución de la talla de la partícula, indicando el importante papel que juegan los átomos superficiales de Pd^[44].

En trabajos recientes se ha observado ferromagnetismo incluso a temperatura ambiente en nanopartículas de Pd nanométricas que poseían una capa de pasivación de óxido, así como en nanopartículas de Pd nanométricas encapsuladas en apoferritina^[45]. En este último caso el comportamiento magnético de las nanopartículas de Pd conteniendo 500 átomos (2.4nm) sugirió la coexistencia de entidades ferromagnéticas, superparamagnéticas y paramagnéticas. Se planteó que el origen del magnetismo permanente procedía principalmente de los átomos superficiales de Pd próximos a la capa de PdO.

Teniendo en cuenta la novedad y la naturaleza controvertida del comportamiento magnético de las nanopartículas de Pd publicadas hasta ahora, usamos la apoferritina para preparar nanopartículas de Pd solubles en agua controlando la oxidación de la superficie del núcleo de Pd. Concretamente se prepararon y caracterizaron dos tipos de nanopartículas de Pd encapsuladas en el interior de la apoferritina, una en atmósfera de oxígeno, Pd(O₂) y otra en atmósfera de argón, Pd(Ar). Asimismo ambas fueron calentadas a 500°C, Pd(O₂/500) y Pd(Ar/500).

Los estudios TEM realizados para estas muestras se exponen en la figura 1. En estas imágenes se observan claramente núcleos discretos electro-densos con forma esférica. El diámetro principal fue estadísticamente medido, siendo de $2.4 \pm 0.19\text{nm}$ para Pd(O₂) (figura 1a) y $2.5 \pm 0.19\text{nm}$ para la muestra Pd(Ar) (figura 1b). Para las muestras Pd(O₂/500) (figura 1c) y Pd(Ar/500) se forman agregados de diferentes tallas.

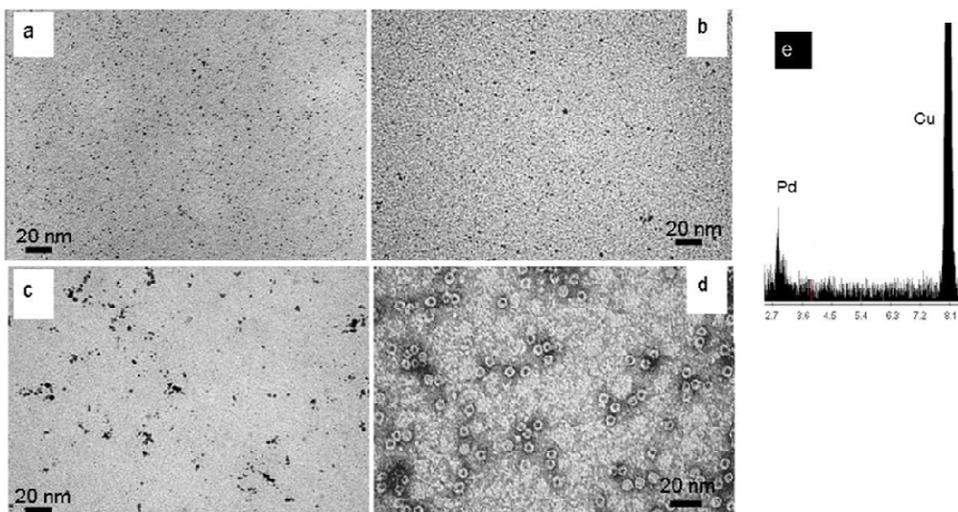


Figure 1. Imágenes TEM de: (a) nanopartículas de Pd preparadas bajo una atmósfera de oxígeno; (b) nanopartículas de Pd preparadas bajo una atmósfera de Ar; (c) muestra (a) calentada a 500° C; (d) muestras (a) contrastada con acetato de uranilo; (e) espectro EDX de la muestras (a), espectros similares fueron obtenidos para las otras tres muestras.

Las imágenes de la muestra Pd(O₂) contrastada con acetato de uranilo (para visualizar la capa de la proteína) (figura 1d) confirman que las partículas están encapsuladas en el interior de la apoferritina. La espectroscopía EDX (figura 1e) confirma que todas las muestras contienen Pd. La presencia de la capa de apoferritina previene la agregación irreversible de las partículas metálicas y su subsecuente precipitación.

El patrón de DRX de las muestras Pd(O₂) y Pd(Ar) es, como puede observarse en la figura 2, diferente. Mientras que el primero se corresponde con un material esencialmente amorfo, el patrón de la segunda muestra (Pd (Ar)) tiene un pico centrado alrededor de $2\theta=40^\circ$, lo que sugiere la presencia de nanocristales de Pd muy pequeños. En ambos casos como era de esperar, también se observan dos picos anchos a bajo ángulo ($2\theta=11^\circ$ y 20°) correspondientes a la proteína, que se eliminaron, para mayor claridad, del análisis estructural que veremos más adelante.

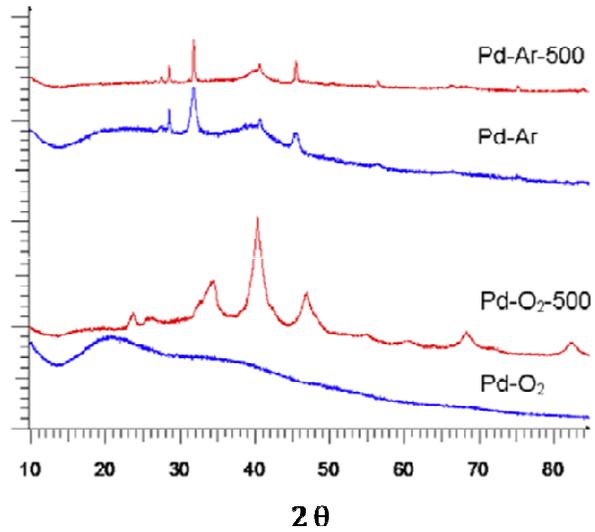


Figura 2. Gráfico de los datos puros de XRD de las muestras nanocristalinas.

En el caso del calentamiento a 500°C ambas muestras sufrieron sinterización, aunque en diferente medida (tabla 1). Además en la muestra tratada al aire (PdO₂) se observa una oxidación parcial a PdO (fase tetragonal)^[46].

Material	Dimensiones medias Pd (nm)	Tipo de estructura Pd (rel. %)	Dimensiones medias PdO (nm)	Relación PdO/Pd
Pd (Ar)	<i>Icosaédrico</i> 1.7 <i>Decaédrico</i> 1.6 (1.7)	<i>Icosaédrico</i> 88% <i>Decaédrico</i> 12%	—	0
Pd (Ar/500)	<i>Icosaédrico</i> 3.0 <i>Decaédrico</i> 3.3 <i>fcc</i> 4.3 (2.6)	<i>Icosaédrico</i> 37% <i>Decaédrico</i> 23% <i>fcc</i> 40%	—	0
Pd (O₂)	(amorfo)	—	—	—
Pd (O₂/500)	<i>Icosaédrico</i> 2.7 <i>fcc</i> 4.6 <i>fcc</i> 12.1 (5.7)	<i>Icosaédrico</i> 6% <i>fcc</i> 46% <i>fcc</i> 12%	2.7 (5.0)	0.54:1 (0.47:1)

Tabla 1. Resumen de los resultados del análisis de difracción de rayos X.

El análisis estructural se llevó a cabo por los doctores N. Masciocchi y A. Guagliardi (parte experimental) siguiendo dos métodos de modelización, el método más convencional "Aproximación de los parámetros fundamentales" (FPA)^[47] y el método basado en la función Debye de dispersión total (DF)^[48].

Un ejemplo de los resultados obtenidos usando estas modelizaciones se muestra, para la muestra Pd(Ar) en la figura 3.

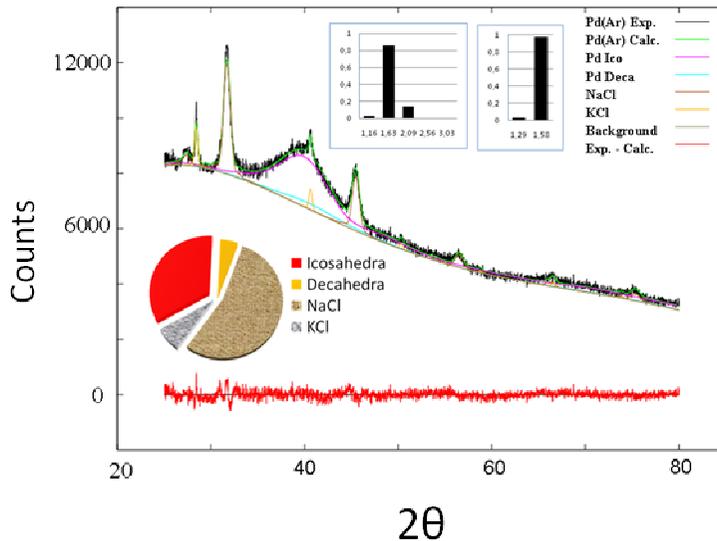


Figura 3. Resumen del estudio estructural de las partículas Pd (Ar), que muestra la presencia de nanopartículas icosaédricas y una pequeña fracción de decaédricas. Sus distribuciones de tamaño se muestran en los recuadros.

A modo de resumen se puede concluir que cuando las nanopartículas de Pd son preparadas bajo una atmósfera inerte a temperatura ambiente (muestra Pd(Ar)), se detectan estructuras icosaédricas y una pequeña fracción de estructuras decaédricas (con un diámetro de 1.7nm), mientras que el calentamiento a 500°C promueve la formación de clústeres fcc (cubooctaédrica) (muestra Pd(Ar/500)). El Pd amorfo obtenido para la muestra preparada en aire a temperatura ambiente (Pd(O₂)), se transforma después del calentamiento en una mezcla de PdO y (principalmente) Pd fcc.

Se llevaron a cabo medidas magnéticas del conjunto de las cuatro muestras empleando un SQUID. La figura 4 muestra las curvas de magnetización (M) frente al campo (H) a diferentes temperaturas. Los altos valores de coercitividad (H_c) y magnetización (M_s) medidos son evidencias del magnetismo permanente en todos los casos.

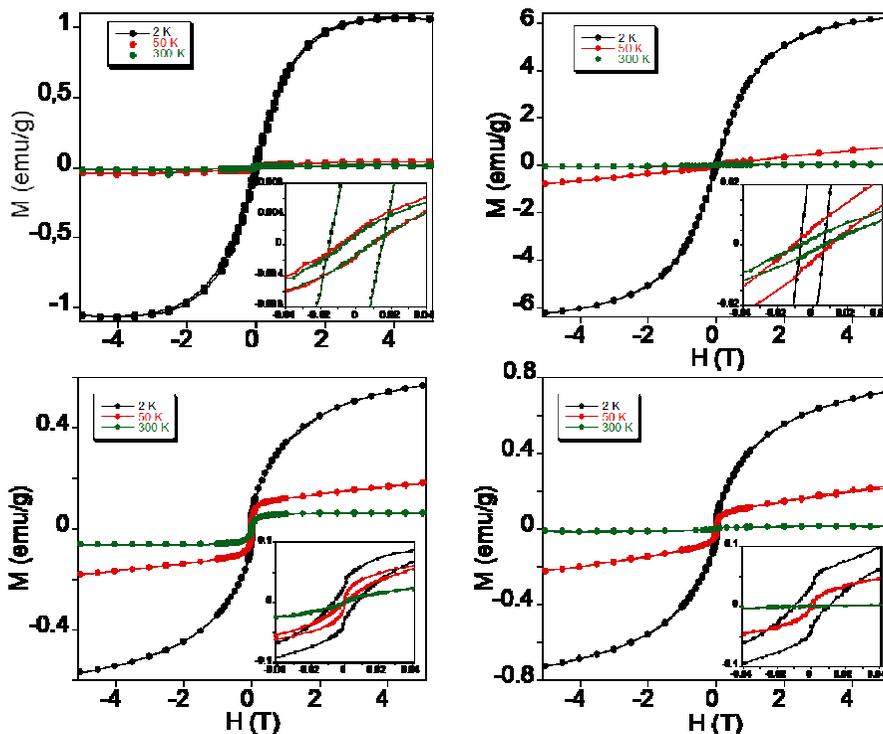


Figura 4. Magnetización (M) frente al campo (H) de (a) Pd(Ar), (b) Pd(O₂), (c) Pd(Ar/500), (d) Pd(O₂/500) a diferentes temperaturas: T = 2 K línea negra, T = 50 K línea roja, y T = 300 K línea verde. Recuadros: muestran una ampliación de las regiones a bajo campo.

Para las muestras sintetizadas a temperatura ambiente se observa un ciclo de histéresis en el rango de 2-300K. Los valores de coercitividad son del mismo orden: 70 Oe y 100 Oe a 2K y 70 Oe y 90 Oe a 300K para Pd(O₂) y Pd(Ar), respectivamente (tabla 2)^[44-46,49]. La curva de magnetización (M) frente al campo (H) por encima de 100K muestra un fuerte incremento a campos bajos y una tendencia a la saturación a altos campos. En este rango, no se aprecian cambios en estas curvas con la temperatura. A bajas temperaturas (por debajo de 100K) la magnetización del Pd (O₂) está muy lejos de la saturación y la curvas muestran una dependencia significativa con la temperatura, mientras que el Pd(Ar) muestra una clara tendencia a la saturación (figura 4b y 4c).

	Pd (Ar)	Pd (O₂)	Pd (Ar/500)	Pd (O₂/500)
Ms (emu g⁻¹) 2K	1.1	6.2	0.6	0.7
Hc (Oe) a 2K	100	70	70	100
Ms (emu g⁻¹) 300K	0.02	0.03	0.06	0.02
Hc (Oe) a 300K	90	70	0	0

Tabla 2. Magnetización de saturación (Ms) y coercitividad (Hc) de las nanopartículas de Pd preparadas a temperatura ambiente y a 500 °C a 2K y 300K.

Los valores de Ms y campo coercitivo para la muestra de Pd(Ar), entre 50-300K, son cercanos a los observados para otras nanopartículas de Pd de tamaño similar publicados en la bibliografía^[43-45,50]. Por ejemplo, las nanopartículas de Pd de 2.4nm protegidas con tetra-alkilamonio preparadas por Hernando et al^[43] presentan valores de Ms en torno a 0.04emu/g a temperatura ambiente que son valores cercanos a los obtenidos en nuestras muestras. Los datos de DRX de la muestra Pd(Ar) indica que el núcleo de Pd está compuesto por combinación de estructuras decaédrica e icosaédrica. Estas estructuras con simetría reducida pueden ser el origen del magnetismo permanente observado. Ha sido predicho teóricamente que la estructura icosaédrica en lugar de la simetría típica fcc podría ser el origen del ferromagnetismo en las nanopartículas de Pd^[41].

El fuerte incremento de Ms a 2K en la muestra Pd(Ar) no es coherente con el comportamiento magnético de las nanopartículas de Pd publicadas en la bibliografía en las que no hay una capa de PdO. Una explicación posible para este comportamiento a baja temperatura es la coexistencia de entidades ferromagnéticas, responsables del magnetismo permanente a altas temperaturas, con presumibles contribuciones superparamagnéticas y paramagnéticas, responsables del incremento de Ms a bajas temperaturas. Esta contribución menor puede surgir de las nanopartículas de Pd con menores temperaturas de bloqueo y a la presencia de centros residuales paramagnéticos. La baja cristalinidad de estas muestras comparadas con otras nanopartículas de Pd descritas en la literatura, su

polidispersidad o la coexistencia de diferentes tipos de estructura de Pd podrían ser responsables de este comportamiento

El comportamiento magnético de la muestra preparada en atmósfera de aire Pd(O₂) a temperatura ambiente no puede ser correlacionada con los datos de DRX, ya que es amorfa. Es posible estudiar los efectos de la presencia de aire durante la síntesis en las propiedades magnéticas. La principales diferencias con respecto a la muestra de Pd(Ar) se observa en la magnetización medida a bajas temperaturas. Los valores de Ms a 2K de ambas muestras se incrementan dos órdenes de magnitud con respecto a las medidas a temperatura ambiente, pero el incremento es más importante para la muestra de Pd(O₂) que presenta una Ms seis veces mayor que la de Pd(Ar). Además, la magnetización de Pd(O₂) a 2 y 50K no satura a 5T mientras que la muestra Pd(Ar) presenta una clara tendencia a la saturación. Estas diferencias indican que las contribuciones para- y superparamagnéticas son más importantes en la muestra preparada bajo aire y esto puede ser atribuido a la oxidación parcial de las nanopartículas de Pd preparados bajo aire. En una estructura de tipo "shell" con vacantes gracias a la presencia de átomos de S u O, estos provocan un aumento de la densidad de huecos 4d y una localización del momento magnético, lo que conduce a la presencia magnetismo permanente en la muestra. Hay que señalar que observamos este fenómeno solamente a bajas temperaturas cuando se forma una capa de PdO. De todos modos, la falta de cristalinidad de la muestra de Pd(O₂) no permite probar esta hipótesis.

Para las muestras calentadas, en aire o en atmósfera de argón, el comportamiento magnético es diferente comparado con las no tratadas térmicamente. En ambos casos, se observa un ciclo de histéresis de la magnetización con un campo coercitivo de 70 y 100 Oe a 2K para Pd(O₂/500) y Pd (Ar/500), que se desvanece a 100 y 200K respectivamente, sugiriendo que la temperatura de bloqueo de estas muestras está por debajo de la temperatura ambiente. Los datos de DRX y TEM mostraron que el calentamiento a 500°C causa un proceso de sinterización de

las nanopartículas que incrementa su tamaño. Hyeon et al ha publicado, recientemente nanopartículas de Pd funcionalizadas con trioctilfosfina con tamaños de 2 a 10nm^[44], donde el ferromagnetismo crece fuertemente con la reducción del tamaño de la partícula, indicando el importante papel que juegan los átomos superficiales de Pd. Estos autores prepararon agregados de Pd de 100nm mostrando magnetización no saturada y una coercitividad insignificante. En nuestro caso, el tratamiento con calor no produce nanopartículas o agregados lo suficientemente grandes como para dar lugar a la pérdida de magnetismo permanente, pero si un decrecimiento de la temperatura de bloqueo. De hecho el tamaño máximo de estos agregados observados por TEM son de 20nm para Pd(Ar/500) y 50nm para Pd(O₂/500). La baja temperatura de bloqueo de la muestra de Pd(O₂/500) puede estar relacionado con su gran tamaño comparado con la muestra de Pd(Ar/500).

Por otra parte, para las nuestras sintetizadas bajo atmósfera de argón, el valor Ms de Pd(Ar/500) a 300K (0.06emu/g) es mayor que el de Pd(Ar) (0.02emu/g). Si tenemos en cuenta que el tamaño de las nanopartículas de Pd(Ar/500) es mayor que las de Pd(Ar), este incremento de Ms con el tamaño de la nanopartícula contrasta con lo publicado previamente. Sin embargo, el incremento de Ms podría estar relacionado con los cambios estructurales que experimenta después de la calcinación (presencia de clústers fcc, aumento de la cristalinidad, etc). Este efecto no es observado en la muestra Pd(O₂/500) que presenta un aumento más marcado del tamaño después del calentamiento. Además, la presencia de aire solo induce mayor Ms a bajas temperaturas y una baja tendencia a la saturación, como se observa en las muestras preparadas a temperatura ambiente. Este efecto puede estar relacionado con la presencia de una capa de PdO que es detectada por DXR.

Podemos concluir que hemos preparado nanopartículas de Pd en aire y en atmósfera de argón, encapsuladas dentro de la cavidad de la apoferritina que muestran un magnetismo permanente a temperatura ambiente. El comportamiento magnético de estas nanopartículas ha sido correlacionado con el análisis de DRX. Un

punto importante a remarcar en todas las muestras son los altos valores de coercitividad y magnetización a saturación comparados con los publicados hasta el momento, que proporciona un apoyo adicional para el magnetismo permanente observado en estas nanopartículas de Pd. Para muestras preparadas bajo una atmosfera de argón, la presencia de fases de Pd icosaédricas o decaédricas podría ser responsable de las propiedades magnéticas. Esto está de acuerdo con los cálculos teóricos que predicen un incremento de la densidad de los estados cercanos al nivel de Fermi bajo simetría de campo no cúbica suficientes para cumplir el criterio Stoner. Para las nanopartículas de Pd sintetizadas en atmósfera de aire, las propiedades magnéticas a bajas temperaturas pueden estar dominadas por los átomos superficiales de Pd localizados cerca de la capa de PdO, que induce el magnetismo permanente observado. El sistema Apoferritina-Pd constituye uno de los pocos ejemplos reportados en la literatura que presenta ese comportamiento magnético tan complejo e interesante para nanopartículas de metales estrictamente no magnéticas.

Bibliografía:

- 1) (a) S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet; *J. Mater. Chem.*, **2004**, 14, 2161; (b) F. Sonvico, C. Dubernet, P. Colombo and P. Couvreur; *Curr. Pharm. Des.*, **2005**, 11, 2091; (c) P. Caravan, J. J. Elison, T. J. McMurry and R. B. Lauffer; *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2293.
- 2) T. Douglas; *Biomimetic Materials Chemistry* (Ed.: S. Mann), **1996**, 91 – 115.
- 3) Mann S.; Archibald D. D.; Dydimus J. M.; Doulgas T.; Heywood B.R.; Meldrum F. C.; Reeves N. J.; *Science*, **1993**, 261, 1286.
- 4) P. Mackle, J.M. Charnock, C.D. Garner, F.C. Meldrum and S. Mann; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8471.
- 5) Douglas T.; Dickson, D.P.; Betteridges S.; Charnock J; Garner C. D.; Mann S.; *Science*, **1995**, 269, 54.
- 6) Wong Kim K. W.; Mann S.; *Adv. Mater.* **1996**, 8, 928.
- 7) Uchida M.; Klem M. T.; Allen M.; Suci P.; Flenniken M.; Gillitzer E.; Varpness Z.; Liepold L. O.; Young M.; Douglas T.; *Adv. Mater.* **2007**, 19, 1025.
- 8) Mitsuhiro Okuda, Kenji Iwahori, Ichiro Yamashita, Hideyuki Yoshimura; *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 84, 187.
- 9) Jae-Woo Kim, Sang H. Choi, Peter T. Lillehei, Sang-Hyon Chu, Glen C. King and Gerald D. Watt; *Chem. Comm.* **2005**, 4101.
- 10) Mitsuhiro Okuda, Yusaku Kobayashi, Kazuomi Suzuki, Katsuhisa Sonoda, Tetsuro Kondoh, Akitoshi Wagawa, Akira Kondo, and Hideyuki Yoshimura; *Nano Lett.* **2005**, 5, 991.

- 11) Natividad Gálvez; Purificación Sánchez; José M. Domínguez-Vera; Alejandra Soriano-Portillo; Miguel Clemente-León and Eugenio Coronado; *J. Mater. Chem.*, **2006**, 16, 2757-2761.
- 12) N. Gálvez, P. Sánchez, and J.M. Domínguez-Vera; *Dalton Trans.* **2005**, 2492.
- 13) N. Gálvez, P. Sánchez, J.M. Domínguez-Vera, A. Soriano-Portillo, M. Clemente-Leon, and E. Coronado; *J. Mat. Chem.* **2006**, 16, 2757-2761.
- 14) M. Ceolín, N. Gálvez, P. Sánchez, B. Fernández and José M. Domínguez-Vera; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2008**, 795.
- 15) José M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, P. Sánchez, A. J. Mota, S. Trasobares, J. C. Hernández and J. J. Calvino; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4823.
- 16) T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Watanabe; *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 2527.
- 17) Jose M. Domínguez-Vera and Enrique Colacio; *Inorg. Chem.*, **2003**, 42, 6983-6985.
- 18) Swift, J.; Butts, C. A.; Cheung-Lau, J.; Yerubandi, V.; Dmo-chowski, I. J.; *Langmuir*, **2009**, 25, 5219–5225.
- 19) (a) F. Söderlind, H. Pedersen, R. M. Pectoral Jr., P.O. Käll and K. Uvdal; *J. of Col. Interf. Sci.*, **2005**, 288, 140–148; (b) T. Tsuzuki, E. Pirault and P. G. McCormick; *Nanostr. Mat.*, **1999**, 11, 125–131.
- 20) C. D. Graham; *J. Appl. Phys.*, **1965**, 36, 1135.
- 21) E. Taboada, E. Rodriguez, A. Roig, J. Oro', A. Roch and R. N. Muller; *Langmuir*, **2007**, 23, 4583.
- 22) S. Laurent, L. Vander Elst, A. Roch and R. N. Müller; in *NMR-MRI, μ SR and Mossbauer Spectroscopies in Molecular Magnets*, ed. P. Carretta and A. Lascialfari, Springer-Verlag, Italia, **2007**, p. 71.

- 23) (a) B. Sitharaman, K. R. Kissell, K. B. Hartman, L. A. Tran, A. Baikalov, I. Rusakova, Y. Sun, H. A. Khant, S. J. Ludtke, W. Chiu, S. Laus, Ę. Tóth, L. Helm, A. E. Merbach and L. J. Wilson; *Chem. Com.*, **2005**, 3915–3917; (b) K. B. Hartman, S. Laus, R. D. Bolskar, R. Muthupillai, L. Helm, E. Toth, A. E. Merbach and L. J. Wilson; *Nano Lett.*, **2008**, *8*, 415–419.
- 24) Fernando R.; Jellinek J.; Johnston R. L.; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 845 and references therein.
- 25) Shafi K. V. P.; Gedanken A.; Prozorov R.; *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 769.
- 26) Mattei G.; de Julián Fernández C.; Mazzoldi P.; Sada C.; De G.; Battaglin G.; Sangregorio C.; Gatteschi D.; *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3440.
- 27) Brayner R.; Vaulay M. J.; Fievet F.; Coradin T.; *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1190.
- 28) Ung D.; Soumare Y.; Chakroune N.; Viau G.; Vaulay M. J.; Richard V.; Fievet F.; *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2084.
- 29) Tarasov K. A.; Isupov V. P.; Bokhonov B. B.; Gaponov Y. A.; Tolochko B. P.; Yulikov M. M.; Yudanov V. F.; Davidson A.; Beaunier P.; Marceau E.; Che M., *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 202.
- 30) Natividad Gálvez; Purificación Sánchez; José M. Domínguez-Vera; Alejandra Soriano-Portillo; Miguel Clemente-León and Eugenio Coronado; *J. Mater. Chem.*, **2006**, *16*, 2757-2761.
- 31) Egerton R. F. *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, **1996**.
- 32) Gálvez N., Sánchez P., Domínguez-Vera J. M., Soriano-Portillo A., Clemente-León M., Coronado E., *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2757.
- 33) Poddar P., Srinath S., Gass J., Prasad B. L. V., Srikanth H., *J. Phys. Chem.* **2007**, *111*, 14060.

- 34) Verelst M.; Ould Ely T.; Amiens C.; Snoeck E.; Lecante P.; Mosset A.; Respaud M.; Broto J. M.; Chaudret B., *Chem. Mater.* **1999**, 11, 2702.
- 35) Chen J. P.; Sorensen C. M.; Klabunde K. J.; Hadjipanayis G. C., *Phys. Rev. B.* **1995**, 51, 11527.
- 36) Srikala D.; Singh V. N.; Banerjee A.; Mehta B. R.; Patnaik S.; *J. Phys. Chem. C.* **2008**, 112, 13882.
- 37) Takano N., Kai T., Shiiki K. and Terasaki F.; *Solid State Commun.* **1996**, 97, 153
- 38) (a) Zhu M. J., Bylander D. M. and Kleinman L.; *Phys. Rev. B.* **1990**, 42, 2874. (b) Eriksson O., Alberts R. C. and Boring A. M.; *Phys. Rev. Lett.* **1991**, 66, 1350. (c) Blügel S.; *Europhys. Lett.* **1992**, 18, 257
- 39) Taniyama T., Ohta E. and Sato T.; *Europhys. Lett.* **1997**, 38, 195
- 40) Shinohara T., Sato T. and Taniyam T. ; *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 197201
- 41) Sampedro B., Crespo P., Hernando A., Litrán R., Sánchez-López J. C., López-Cartes C., Fernández A., Ramírez J., González-Calbet J. and Vallet M.; *Phys. Rev. Lett.* **2003**, 91, 23203
- 42) Hernando A., Sampedro B., Litrán R., Rojas T. C., Sánchez-López J. C. and Fernández A.; *Nanotechnology* **2006**, 16, 1449
- 43) Litrán R., Sampedro B., Rojas T. C., Multigner M., Sánchez-López J. C., Crespo P., López-Cartes C., García M. A., Hernando A. and Fernández A.; *Phys. Rev. B.* **2006**, 73, 054404
- 44) Angappane S., Park J., Jang Y., Hyeon T. and Park J. G.; *J. Phys. Condens. Matter.* **2008**, 20, 295209
- 45) (a) Clemente-León M., Coronado E., Soriano-Portillo A., Gálvez N. and Domínguez-Vera J. M.; *J. Mater. Chem.* **2007**, 17, 49 (b) Coronado E., Ribera A., García-Martínez J., Linares N. and Liz-Marzán L. M.; *J. Mater. Chem.* **2008**, 18, 5682

- 46) X-Ray Powder Diffraction File JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards International Centre for Diffraction Data) 46-1043 for Pd fcc and 46-1211 for PdO.
- 47) Cheary R. W. and Coelho A. A.; *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, 25, 109
- 48) Debye P.; *Ann. Phys. Lpz.* **1915**, 46, 809
- 49) (a) Gálvez N., Sánchez P. and Domínguez-Vera J. M.; *Dalton Trans.* **2005**, 2492 (b) Gálvez N., Sánchez P., Domínguez-Vera J. M., Soriano-Portillo A., Clemente-León M. and Coronado E.; *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 2757
- 50) Jeon Y. T. and Lee G. H.; *J. Appl. Phys.* **2008**, 103, 094313

CAPÍTULO 3

NUEVAS NANOPARTÍCULAS COMO AGENTES DE CONTRASTE PARA MRI

De entre todos las nanoestructuras con aplicaciones en Nanomedicina, las nanopartículas magnéticas y en particular las de magnetita (Fe_3O_4)-maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) acaparan un protagonismo especial. Las denominadas SPIOs (Superparamagnetic Iron Oxides, con un radio hidrodinámico mayor de 15-20 nm) o bien USPIOs (Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxides, con un radio menor de 15 nm) son ya una realidad en el mercado como agentes de diagnóstico en MRI^[1] y han sido recientemente aprobadas para su uso en cáncer terminal mediante hipertermia (magforce®).

Las nanopartículas SPIO y USPIOs están constituidas por un núcleo de magnetita-maghemita rodeado de una corteza orgánica, que frecuentemente responde a un polímero del tipo polisacárido: dextrano, quitosano, almidón, etc.

La magnetita es un material ferrimagnético a escala clásica. A tamaño nanométrico (por debajo del borde de Bloch, unos 20 nm para los óxidos de Fe), la estructuración en dominios magnéticos no es favorable energéticamente y las nanopartículas de SPIO y USPIOs contienen un único dominio magnético, con una única dirección privilegiada de magnetización. La acción de un campo magnético externo puede provocar la rotación de la magnetización total si logra vencer la anisotropía magnetocristalina KV (K representa la energía por unidad de volumen necesaria para orientar la magnetización de una dirección privilegiada a una dirección diferente y V el volumen de la partícula). En nanopartículas, esta magnetización vuelve al equilibrio dominado por la relajación de Neel. Esta relajación es rápida y hace que la curva de magnetización en función del campo sea reversible puesto que el sistema está constantemente en condiciones de equilibrio termodinámico. Sin embargo, por debajo de una temperatura de bloqueo T_B , el material permanece magnetizado después de la eliminación del campo externo, puesto que la energía térmica $kT < KV$. Como consecuencia, por debajo de esta temperatura, el material presenta histéresis magnética. Esta temperatura separa en definitiva el estado super- del ferromagnético y define un rango de temperatura ($T > T_B$) donde el material es superparamagnético.

La técnica de MRI es actualmente una de las técnicas de diagnóstico más potentes. Entre sus ventajas cabe enumerar su gran resolución espacial y su rápida adquisición. Las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIO y USPIO) están consideradas como las nanoestructuras más prometedoras para aplicaciones biomédicas que incluyen bioimagen mediante MRI, Drug delivery e hipertermia. SPIOs tales como Ferumoxide (Endorem® en Europa, Feridex® EEUU y Japón) y Ferucarbotran (Resovist® en Europa y Japón) están siendo comercializados para diagnóstico precoz de tumor de hígado^[2]. Asimismo varios USPIOs tales como Ferumoxtran-10, VSOP, Feruglose, SHU555C o P904, están bajo investigación clínica para su uso como agentes de contraste en MRI de diferentes órganos^[3,4]. En definitiva la aplicación de estas nanopartículas en biomedicina es ya una realidad en

el mercado, ofreciendo diferentes productos en diferentes áreas y a tenor de los diferentes informes internacionales, todo apunta a un crecimiento exponencial en este sector tanto a nivel de investigación básica como aplicada.

3.1. Nanopartículas de maghemita encapsulada en apoferritina: Apomaghemita.

La síntesis de las nanopartículas de maghemita se llevó a cabo por el método de co-precipitación de sales de hierro en agua. Mediante este método el tamaño de las nanopartículas de magnetita pueden ser modificadas por control de pH y fuerza iónica del medio de síntesis, como previamente se ha publicado^[5].

El método de co-precipitación acuosa tiene ventajas sobre las rutas organometálicas no polares^[6], ya que la síntesis acuosa es mas reproducible, barata y no tóxica y las muestras así preparadas tienen una alta estabilidad acuosa y alta compatibilidad biológica. Además las nanopartículas de magnetita obtenidas en disolventes orgánicos usualmente están estabilizados usualmente por surfactantes hidrofóbicos no degradables y tienen por consiguiente el problema añadido del reemplazamiento de estos surfactantes por otros hidrofílicos.

En esta se han preparado nanopartículas de magnetita de 4 y 6 nm de tamaño medio. La oxidación de la magnetita en condiciones ácidas resulta en un coloide de nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), las cuales son químicamente estables a pH 2^[7].

Una vez obtenido el coloide ácido de nanopartículas de maghemita se incubó con apoferritina dissociada en sus 24 subunidades, a pH 2 para luego autoasociarse por aumento del pH hasta 8. De modo que se permite que las nanopartículas de maghemita queden atrapadas en el interior de la cavidad proteica,

ya en la presencia de estas nanopartículas sirven como plantilla para que las subunidades de la proteína se autoensamblen. A partir de ahora las nanopartículas de 4nm y 6nm se denominarán respectivamente Apomag-4 y Apomag-6.

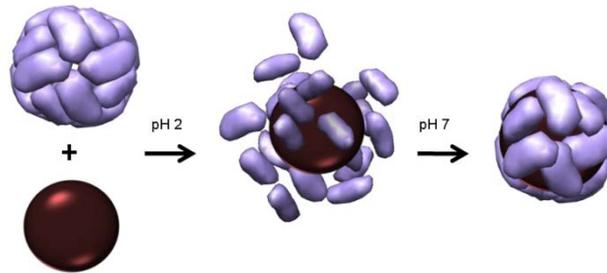


Figura 1. Encapsulación de la maghemita en el interior de la apoferritina gracias al papel que juega el pH en el proceso de disociación- asociación de la proteína.

La ventaja de emplear este coloide estable preformado de nanopartículas de maghemita sobre los trabajos publicados anteriormente para la síntesis in situ de magnetita dentro de la apoferritina, es que no evoluciona químicamente y previene la precipitación eventual del material fuera de la proteína^[8]. Además de esta forma se evita trabajar a altas temperaturas y por consiguiente una desnaturalización parcial de la proteína.

Encapsuladas las nanopartículas de maghemita en el interior de la apoferritina se lleva a cabo la purificación del sistema por cromatografía de exclusión de tamaño (figura 2) y diálisis. Aislado finalmente las fracciones que contenían proteína y nanopartículas magnéticas.

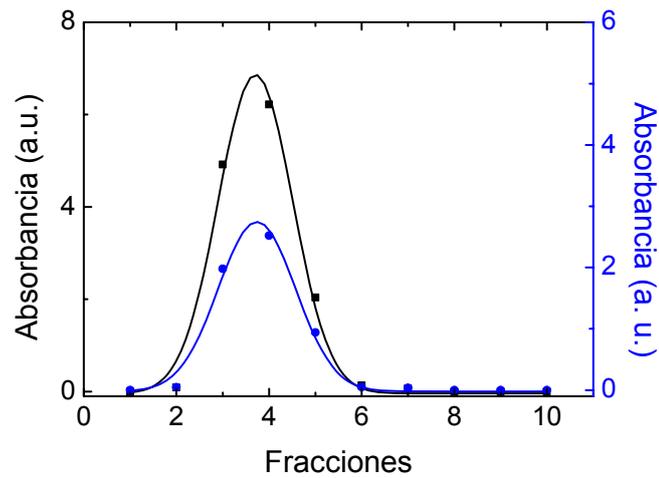


Figura 2: Perfil de coelución. En negro está representada la concentración de apoferritina (A_{280nm}) y en azul la concentración de óxido de hierro (A_{330nm}).

En la figura 3 se presentan las micrografías TEM de las muestras. En las imágenes de los coloides magnéticos se puede observar que, principalmente, son nanopartículas esféricas irregulares (figura 3a y 3b). Como es de esperar, una vez que las nanopartículas de maghemita son encapsuladas por la apoferritina, éstas se encuentran completamente aisladas (figura 3c). La confirmación de que las nanopartículas están realmente encapsuladas en la proteína, se llevó a cabo, como se ha hecho a lo largo de esta tesis, mediante imagen TEM contrastada con acetato de uranilo (figura 3d). De esta imagen se infiere una alta eficacia en el procedimiento de encapsulación de estas nanopartículas (del orden del 75%).

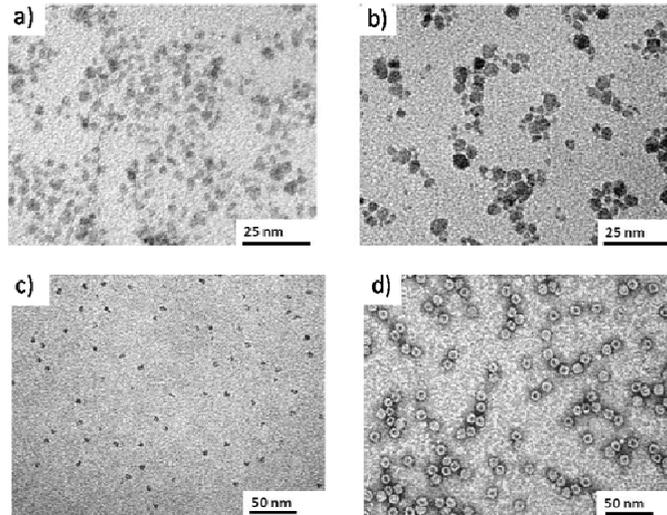


Figura 3. a) Coloide de maghemita de 4nm antes de la encapsulación; b) coloide de 6nm de maghemita previo a la encapsulación; (c) imagen TEM de Apomag-4; (d) contraste negativo con acetato de uranilo. Imágenes similares se han obtenido para la muestras de Apomag-6.

Se hicieron medidas DRX en polvo de los coloides magnéticos y de las nanopartículas de maghemita encapsuladas por la apoferritina (apomaghemitas) para su determinación estructural. Las medidas de rayos-X de los coloides magnéticos muestran un patrón típico de DRX de óxido de magnetita y/o maghemita^[5] (figura 4). El difractograma de las muestras apomaghemitas muestran dos picos en torno a $2\theta=10^\circ$ y $2\theta=20^\circ$, que son típicos de la apoferritina, y picos correspondientes a maghemita/magnetita: (311) alrededor de $2\theta=35^\circ$ y (440) alrededor de $2\theta=65^\circ$. Mediante la expresión Debye-Scherrer se obtiene un tamaño medio de 3,8nm para Apomag-4, y de 6,5nm para Apomag-6.

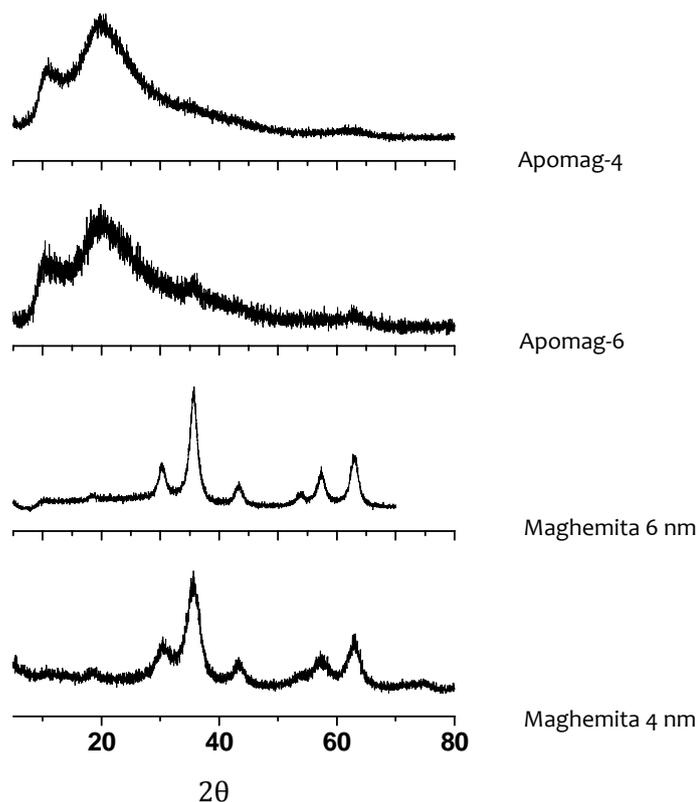


Figura 4. Patrones de difracción de Rayos-X (XRD) de los coloides magnéticos y de las muestras apomaghemitas.

La figura 5 muestra las imágenes de microscopía electrónica de alta resolución (HREM) de ambas muestras de apomaghemitas. El patrón de difracción digital (DDP) de una partícula claramente muestra ocho "spot" que corresponden a cuatro familias de planos cristalográficos equivalentes. Un análisis exhaustivo de DDP usando el software de eje $Z^{[9]}$ indica que el espaciado d y los ángulos calculados entre los diferentes planos solo pueden ser interpretados considerando la estructura de magnetita o maghemita.

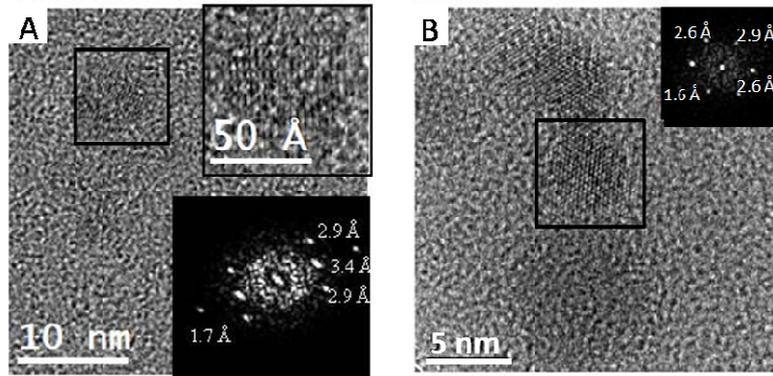


Figura 5. Imagen HREM de apomag-4. El cuadro negro muestra una nanopartícula. Recuadro: DDP de la partícula seleccionada; B lo mismo que A para la muestra de apomag-6.

Las imágenes HAADF-STEM de las muestras apomaghemitas (figura 6a y 6c) muestran que las partículas presentan la forma esférica característica. Midiendo un promedio de 100 partículas en una imagen HAADF se ha calculado el tamaño medio de la partículas, siendo éste de 4.2 ± 0.2 nm y 6.5 ± 0.2 nm para la Apomag-4 y Apomag-6, respectivamente (figura 6b y 6d).

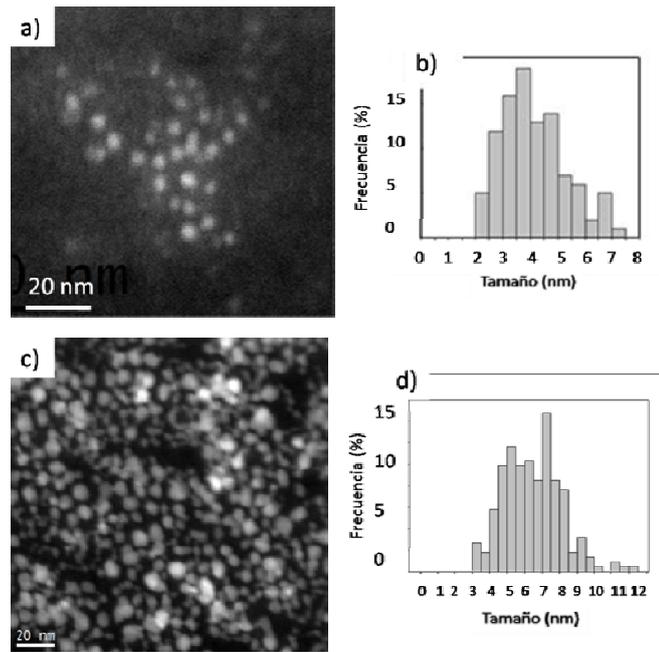


Figura 6. a) imagen HAADF de la muestra de Apomag-4, b) distribución del tamaño de las partículas Apomag-4; c) imagen HAADF de la muestra Apomag-6 y c) distribución del tamaño de las partículas Apomag-6.

Hemos estudiado las propiedades magnéticas de las apomaghemitas mediante la técnica SQUID (figura 7), y se comprueba que exhiben el típico comportamiento de nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ^[10]. La curva de magnetización Zero Field Cooled-Field Cooled (ZFC-FC) en función de la temperatura (2-300K) y en un campo de $H=50$ Oe se muestra en la figura 7b. Las temperaturas de bloqueo obtenidas fueron de 20K y 35K para Apomag-4 y Apomag-6 respectivamente. Por encima de la temperatura de bloqueo las curvas ZFC y FC se superponen perfectamente, lo que nos permite descartar la presencia de agregación. Hay que indicar que los valores de T_b obtenidos son comparables a nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ del mismo tamaño previamente reportadas^[10,11].

La figura 7a muestra las histéresis a 2K. Las partículas muestran un comportamiento ferrimagnético a esta temperatura. La curva de magnetización (M)

medida frente al campo aplicado (H) refleja la anisotropía de la partícula. El valor del radio de la magnetización remanente (M_R) frente a la magnetización a saturación (M_S) es de $M_R/M_S < 0.5$, característico de un conjunto de nanopartículas con anisotropía uniaxial de dominio único orientadas al azar. El campo coercitivo (H_C) fue 336 Oe para Apomag-4 y 345 Oe para Apomag-6 y la magnetización a saturación 64 emu/g Fe y 51 emu/g Fe para Apomag-4 y Apomag-6 respectivamente, de acuerdo con los valores publicados previamente para este tipo nanomaterial de igual tamaño^[11]. De acuerdo a lo esperado la magnetización a 300K no muestra campo coercitivo.

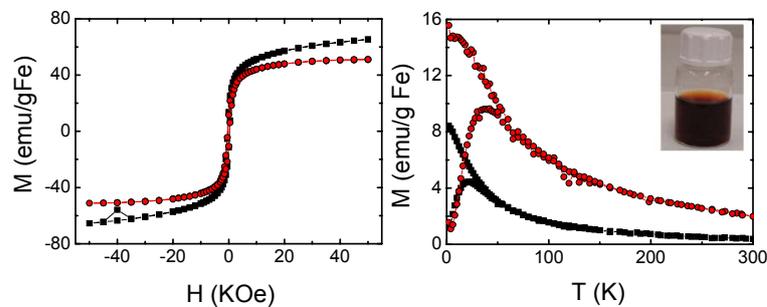


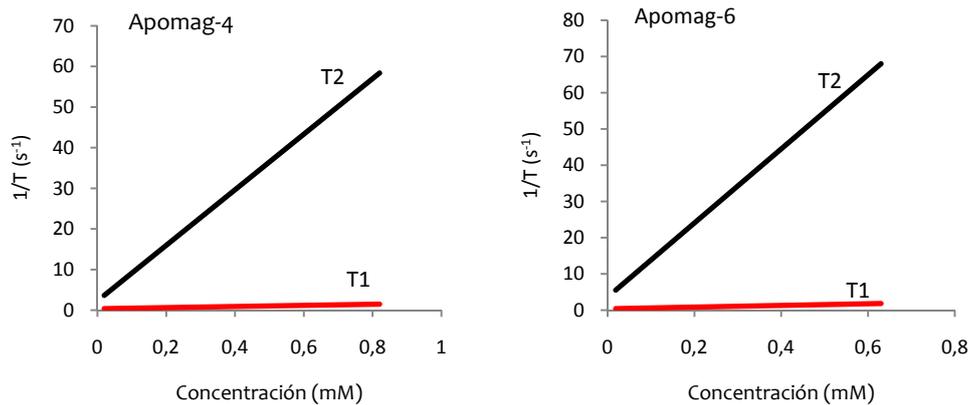
Figura 7. (a) Ciclo de histéresis de las muestras de Apomag-4 (cuadros negros) y Apomag-6 (círculos rojos a $T=2K$); (b) Curvas Zero Field Cooled-Field Cooled registradas a un campo (H) de 50 Oe. Recuadro: Muestra de Apomag-4.

3.2. Estudio de Apomaghemita como nuevos agentes de contraste en MRI.

Dado el comportamiento magnético de las muestras de apomaghemita se procedió a su estudio como posibles agentes de contraste para MRI. Para ello, en primer lugar se hizo un estudio comparativo, *in vitro*, de los valores de relajación transversal (T2) y longitudinal (T1) de las muestras con el agente de contraste comercial Endorem[®] que habitualmente se toma como referencia.

El compuesto comercial Endorem® es ampliamente empleado como agente de contraste superparamagnético. Posee un núcleo de magnetita (6-9nm de diámetro) cubierto con un capa de dextrano, lo que resulta en un radio hidrodinámico final de ~ 150nm.

Como se ha comentado anteriormente el contraste en MRI está directamente relacionados con los valores de relajación de las nanopartículas medidas un equipo System Biospec Tomograph (Bruker, Karlsruhe, Germany) con un campo fijo de 4.7T. Los tiempos de relajación transversal y longitudinal obtenidos ($1/T_2$ y $1/T_1$) se representaron frente a la concentración molar (expresada en mM) de Fe presente en las muestras de apomaghemita (figura 8). Y a partir de estas curvas se obtuvieron los valores de r_1 $1.36\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $2.32\text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y de r_2 $68.5\text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $102.0\text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Apomag-4 y Apomag-6, respectivamente.



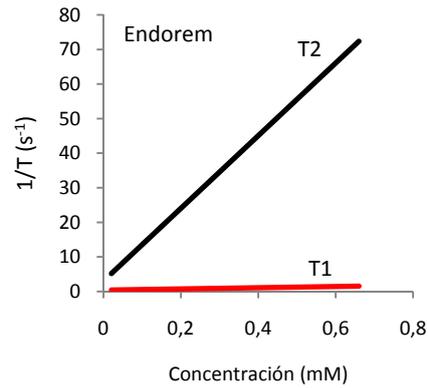


Figura 8. Representación de los tiempos de relajación T1 y T2 frente a la concentración de Fe para las muestras de Apomag-4, Apomag-6 y Endorem®.

El valor de r_2 para la Apomag-6 es comparable con el valor de Endorem® ($94.8 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)^[12]. Podemos decir que ambas nanopartículas presentan una alta eficacia como agentes de contraste e incluso la de Apomag-6 es mayor que la del Endorem.

Estos estudios *in vitro* demuestran, por tanto, que estas nanopartículas son buenos candidatos para la exploración como agentes MRI y decidimos, por tanto, llevar a cabo un estudio *in vivo*.

Estos experimentos *in vivo* se realizaron con ratones Balb-c con un peso de 20g. Se usaron 5 animales por cada muestra, es decir, 5 animales para apomag-4, 5 para apomag-6 y otros cinco para los experimentos control Endorem®. En cada uno de los animales se inyectó una dosis 23.5mg Fe/kg.

Los experimentos *in vivo* se realizaron en un equipo System Biospec Tomograph con un campo fijo de 4.7T (200MHz).

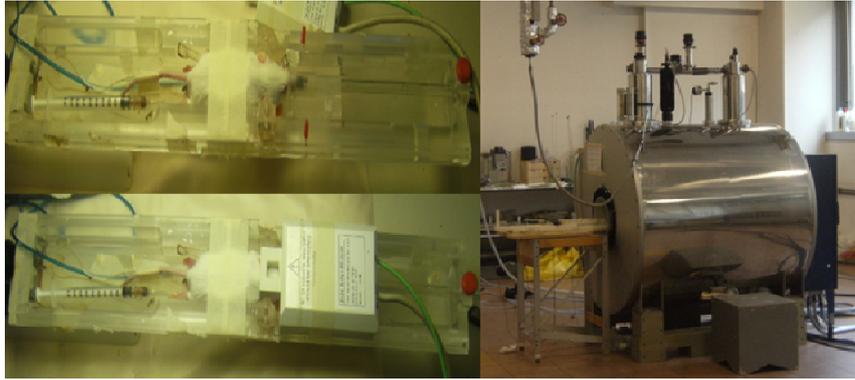


Figura 9. Equipo System Biospec Tomograph (Bruker, Karlsruhe, Germany) y disposición del ratón Balb-c en la bobina para los experimentos in vivo.

La figura 10 muestra una curva representativa del first-passage obtenida por representación de la intensidad de la señal (SI) en el cerebro en función del tiempo de la adquisición de la imagen para la muestra Apomag-6. Los datos fueron normalizados usando la siguiente relación:

$$\text{Normalizado SI\%} = 100 \cdot [SI(t) - SI(0)] / SI(0)$$

dónde SI(0) representa la intensidad de señal promedio antes de la inyección y SI(t) la intensidad de la señal a tiempo t. La comparación cuantitativa entre la eficiencia de la muestras de apomaghemita y el Endorem® fueron obtenidos por medida de la caída máxima de la señal. Los resultados, expuestos en la tabla 1, muestran que las ambas apomaghemitas de 4nm y 6nm que inducen una caída comparable con Endorem® y por tanto, es viable el uso de este tipo de nanopartículas para la adquisición de medidas first-passage.

Normalizado SI(%)	
APOMAG-4	70.5±9.8
APOMAG-6	76.5±7.2
ENDOREM	73.6±4.1

Table 1. Caída máxima de la señal (media ± desviación estándar) en las curvas first passage para Apomag-4, Apomag-6 y Endorem. Los valores de la SI se normalizan como se describe en el texto.

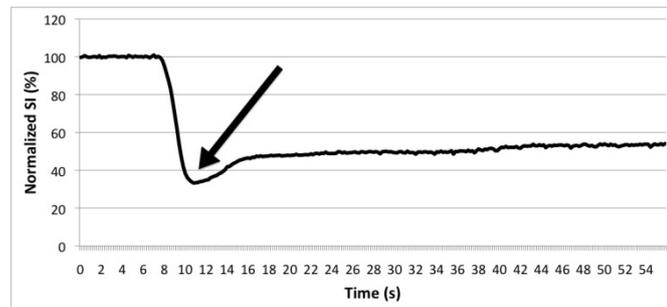


Figure 10. Curva representativa de first passage obtenida para la muestra Apomag-6. La flecha indica el punto del tiempo de la caída máxima de la señal.

Los experimentos *in vivo* fueron llevados a cabo mediante el estudio de un volumen sanguíneo cerebral (CBV) y del flujo sanguíneo cerebral (CBF). La figura 11 muestra imágenes representativas pre- y post- suministro del agente de contraste. Las imágenes post-contraste T2*-ponderadas fueron adquiridas 120s después de la inyección de las muestras de apomaghemitas y Endorem®. Se llevó a cabo un estudio mediante evaluaciones cuantitativas de CBF y CBV mediante el método del "Bolus Tracking", en el que las imágenes se adquieren con una alta resolución temporal durante el first passage del agente de contraste en el cerebro. Después de la inyección del agente de contraste, la señal spin-echo cae y esta caída está relacionada pixel por pixel con el valor del volumen sanguíneo cerebral regional (rCBV), lo que permite el escaneo de la distribución relativa de rCBV^[13,14]. Por tanto el seguimiento de los cambios de la intensidad de la señal eléctrica en el experimento MRI con respecto al tiempo, representado mediante los valores de $r2$ o $r2^*$, permite la monitorización de los cambios relativos del volumen sanguíneo, ya que la variación

de los valores de r_2 o r_2^* pre y post suministro del agente de contraste son linealmente proporcionales a la concentración media del agente de contraste en el volumen sanguíneo medio.

El CBV regional puede ser medido usando agentes de contraste "intravasculares", a la concentración en estado estacionario del agente de contraste en la sangre, mediante la adquisición de las imágenes T2* antes y después de la inyección del agente de contraste y usando la siguiente ecuación:

- En $rCBV = k \cdot \ln(SI \text{ pre} / SI \text{ post})$

donde k es una constante en función de parámetros instrumentales, $SI \text{ pre}$ y $SI \text{ post}$ son los valores de la intensidad de señal del cerebro antes y después de la inyección del agente de contraste. Los mapas del volumen sanguíneo cerebral regional (rCBV) calculado para Apomag-4, Apomag-6 y Endorem® quedan representados en la figura 11. En esta figura podemos observar, tanto en las imágenes post-contraste como en los mapas rCBV que el sistema de vasos sanguíneos cerebrales se visualizan de forma muy nítida, poniendo de manifiesto que efectivamente nuestras nanopartículas funcionan adecuadamente como agentes de contraste.

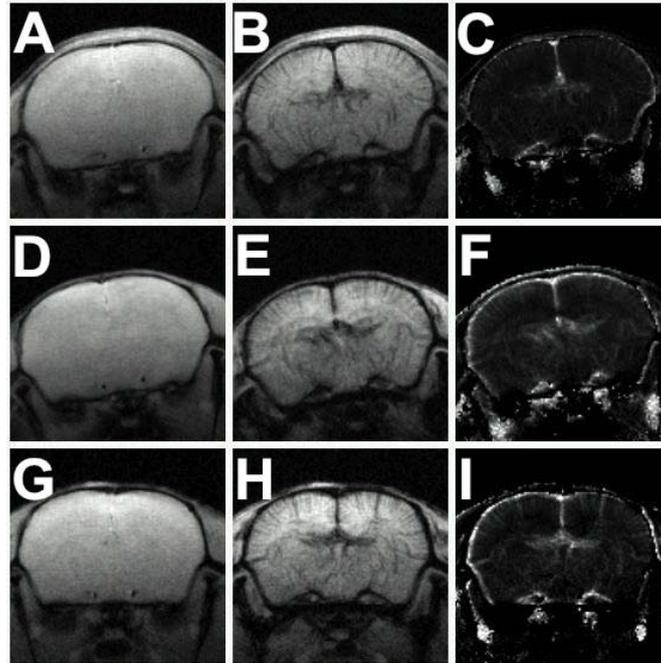


Figure 11. Representación de las imágenes adquiridas del cerebro de ratón antes y después de 120s de la administración de los agentes de contraste y los mapas rCBV correspondientes. Línea superior: precontraste (A), postcontraste (B) y mapa rCBV (C) obtenido con Apomag-4. Línea media: precontraste (D), postcontraste (E) y mapa rCBV (F) obtenido con Apomag-6. Línea inferior: precontraste (G), postcontraste (H) y mapa rCBV (I) obtenido con Endorem.

Los tiempos de vida media en sangre de Apomag-4 y de Apomag-6 se estimaron mediante el ajuste de la dependencia de la intensidad de la señal con el tiempo en las imágenes T2w del cerebro ^[15]. Se obtuvieron tiempos de vida media en sangre de alrededor de 2 y 3 h para Apomag-4 y Apomag-6, respectivamente.

3.3. Estudio de la biodistribución de la Apomaghemita.

Se llevó a cabo un estudio riguroso de la biodistribución de las nanopartículas de apomaghemita en los distintos órganos del ratón. Dichas medidas se llevaron a

cabo en dos animales para cada una de las muestras incluido como control Endorem®. En cada uno de los animales se inyectó una dosis de 23.5mg Fe/kg.

Estos experimentos se realizan en las mismas condiciones que los del cerebro, pero en este caso las imágenes post-contraste T2*-ponderadas fueron adquiridas 120 minutos después de la inyección de las muestras de apomaghemita y Endorem®. En la figura 12 se muestran las imágenes ventrales del ratón en las que se puede apreciar que las nanopartículas de apomaghemitas se acumulan preferentemente en el hígado y en menor cantidad en riñón.



Figure 12. Representación de las imágenes adquiridas del cuerpo de ratón antes y después de 120 minutos de la administración de los agentes de contraste. A) precontraste de Apomag-4 y B) postcontraste de Apomag-4. C) precontraste de Apomag-6 y D) postcontraste de Apomag-6. La flechas indican el hígado.

Para confirmar la biodistribución diferencial en hígado y riñón se llevó un estudio pormenorizado de la cinética de acumulación de las nanopartículas de ambas muestras (figura 13). Como se puede apreciar a través de la caída de la señal eléctrica hay una mayor y más rápida acumulación de nanopartículas en hígado.

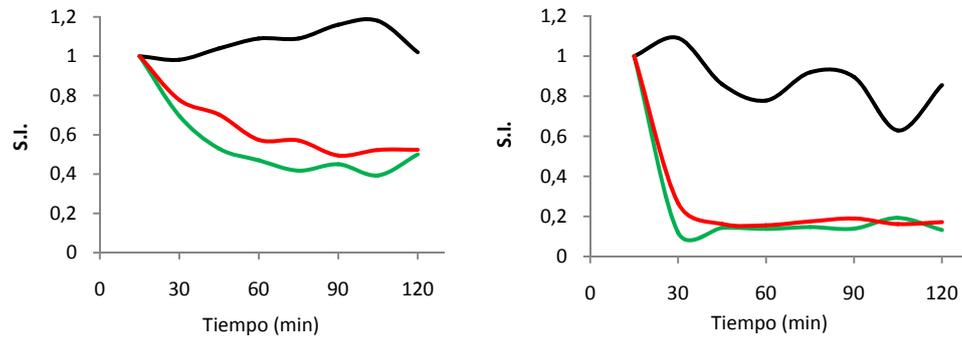


Figura 13. Biodistribución de los agentes de contraste en el riñón (izq) y en el hígado (dcha) en el ratón a diferentes tiempos después de la administración de éstos. La línea negra representa al Endorem, la línea roja la Apomag-4 y la línea verde Apomag-6.

Comparando la biodistribución de los agentes de contraste se puede observar que nuestras partículas se acumulan rápidamente (en los primeros 30 minutos) en riñón y en hígado, y permanecen en dichos órganos de forma estable durante el tiempo en el que transcurren dichos experimentos.

Es importante resaltar que en la curva correspondiente a la cinética de acumulación de las tres partículas (Apomag-4, Apomag-6 y Endorem) se observa que Endorem comparativamente con nuestras nanopartículas se acumula menos y más tarde, a pesar de que Endorem es un producto comercial específico para patologías hepáticas. Este aspecto es importante ya que el tiempo de acumulación redundaría directamente en la eficacia de un agente de contraste puesto que hay que considerar que la imagen MRI debe ser adquirida en un tiempo relativamente corto de lo contrario el paciente debería tener que prolongar su estancia en el centro médico.

Por otro parte, hay que señalar que la señal en el hígado es relativamente efectiva tras un mes para las nanopartículas Apomag-6 y tras 15 días para Apomag-4, poniendo de manifiesto que las nanopartículas en estos tiempos no han sufrido una

biodegradación significativa (figura 14). Estos datos son extraordinario si lo comparamos con los tiempos de biodegradación de agentes de contraste que están en el mercado o bajo estudios clínicos: ENDOREM® (2 días), RESOVIST® (6 días), P904® (9 días). Esto abre la puerta a la obtención de agentes de contraste "de largo plazo", que permitiría la adquisición prolongada de imágenes MRI en hígado durante un periodo amplio de tiempo sin necesidad de una segunda inyección.

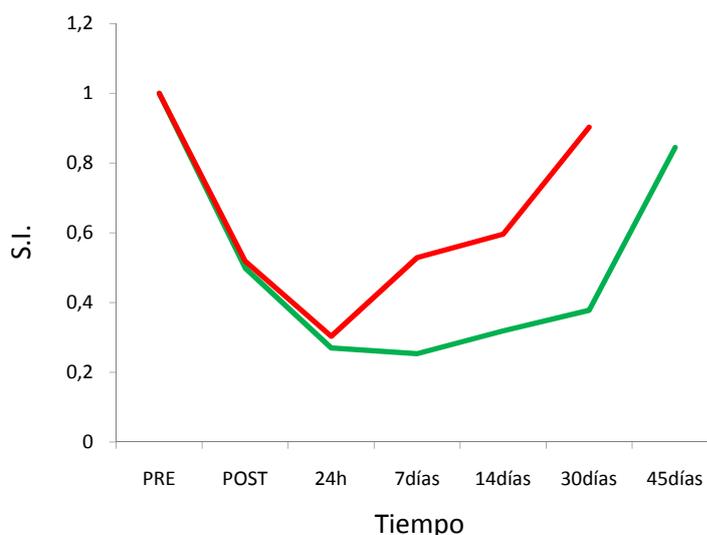


Figura 14. Biodistribución de las nanopartículas de apomaghemita en el hígado durante un periodo de 1 mes desde su inyección. La línea verde es Apomag-6 y la línea roja Apomag-4.

En la figura 15 están representadas las imágenes del cuerpo del ratón antes de la administración de las partículas de apomaghemita y después de la administración durante un periodo de 1 mes para Apomag-4 y 45 días para Apomag-6. Estas imágenes vienen a corroborar la eficacia en el tiempo de las partículas de Apomag-4 y Apomag-6 como potenciales agentes de contraste en hígado.

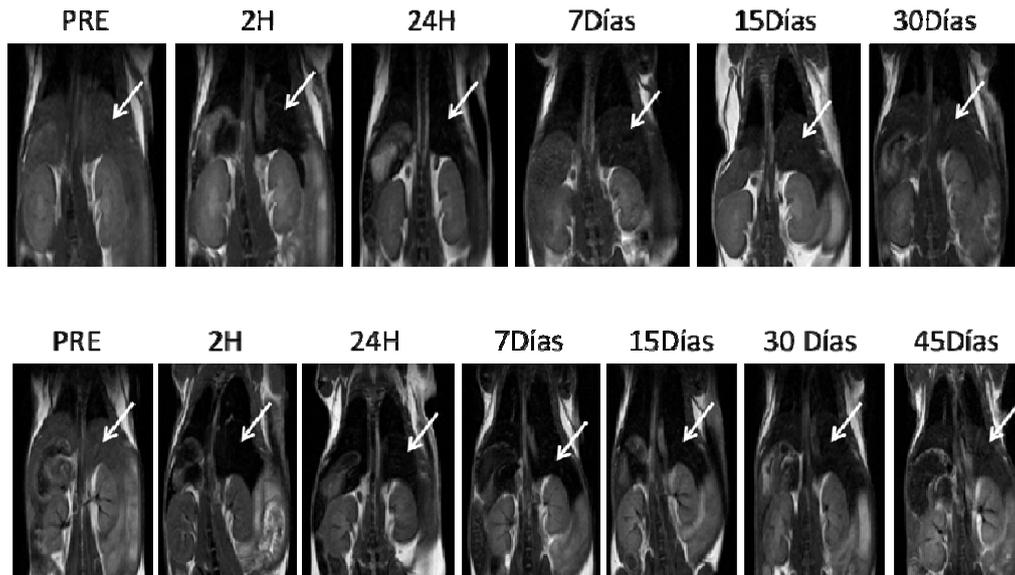


Figura 15. Imágenes de cuerpo entero del ratón antes (PRE) de la administración de las partículas y después durante un periodo de 30 días para Apomag-4(arriba) y 45 días para Apomag-6 (abajo). La flecha indica el hígado.

Aunque la explicación de la diferente biodegradación entre las nanopartículas de 4 y 6nm requiere más estudios, una posible interpretación podría ser el mayor grado de eficiencia en la formación de la cápsula proteica en torno a la partícula de 6nm que en la de 4nm, puesto que el tamaño de la cavidad de la proteína nativa es del orden de 8nm. En definitiva, según nuestro argumento la encapsulación de las nanopartículas de 4nm no sería tan "perfecta" como la de 6nm, lo que repercutiría en una menor estabilidad química y por tanto una biodegradación más rápida en las partículas de 4nm.

Bibliografía:

- 1) (a) Dallman P.; Iron. Present knowledge in nutrition. Sixth edition. International Life Sciences Institute. ILSI. North America. **1990**. (b) Deiss A.; Iron metabolism in reticuloendothelial cells. *Semin Hematol.* **1983**, 20, 81-90.
- 2) P. Reimer, B. Tombach, Hepatic MRI with SPIO detection and characterization of focal liver lesions, *Eur. Radiol.* **1998**, 8, 1198–1204.
- 3) Di Marco, M.; Sadun, Caludia; Port, Marc; Guilbert, Irene; Couvreur, Patrick; Dubernet, Catherine. *International Journal of Nanomedicine*; **2007**, 2(4), 609-622.
- 4) C. Corot, P. Robert, J.-M. Idée, M. Port. *Advanced Drug Delivery Reviews.* **2006**, 58, 1471–1504.
- 5) L. Vayssières, C. Chanéac, E. Tronc, J. P. Jolivet; *J. Coll. Interf. Sci.* **1998**, 205, 205–212.
- 6) A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1222-1244.
- 7) R. Massart; *IEE Trans. Magn.* **1981**, MAG-17, 1247-1248.
- 8) (a) S. Mann, D. D. Archibald, J. M. Didymus, T. Douglas, B. R. Heywood, F. C. Meldrum, N. J. Reeves; *Science* **1993**, 261, 1286- 1292; (b) K. K. W. Wong, T. Douglas, S. Gider, D. D. Awschalom, S. Mann; *Chem. Mater.* **1998**, 10, 279-285; (c) F. C. Meldrum, B. R. Heywood, S. Mann; *Science* **1992**, 257, 522-523.
- 9) http://www2.uca.es/dept/cmat_qinor/catalisis/tem-uca-server.htm
- 10) E. Tronc, D. Fiorani, M. Nogués, A.M. Testa, F. Lucari, D’Orazio, J. Grenèche, W. Wernsdorfer, N. Galvez, C. Chanéac, D. Mailly, J. P. Jolivet; *J. Magn. Magn. Mater.* **2003**, 262, 6–14.

- 11) (a) T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park, Y. Chung, H. B. Na; *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 12798-12801; (b) Y. Jun, Y.M. Huh, J.S. Choi, J. H. Lee, H. T. Song, S. J. Kim, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh, J. Cheon; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 5732-5733.
- 12) A. Masotti, A. Pitta, G. Ortaggi, M. Corti, C. Innocenti, A. Lascialfari, M. Marinone, P. Marzola, A. Daducci, A. Sbarbati, E. Micotti, F. Orsini, G. Poletti, C. Sangregorio; *Magn. Reson. Mater. Phy.* **2009**, 22, 77-87.
- 13) Sbarbati A., Reggiani A., Lunati E., Arban R., Nicolato E., Marzola P., Asperio R. M., Bernardi P., Osculati F.; *Neuroimage*. **2000**, 12, 418-424.
- 14) Schwarz A. J.; Reese T.; Gozzi A.; Bifone A.; *Magn. Reson. Imaging*. **2003**, 21, 191-200.
- 15) (a) B.G. Davis; *Chem. Rev.* **2002**, 102, 579-601; (b) D.P. Gamblin, E.M. Scanlan, B.G. Davis; *Chem Rev.* **2009**, 109, 131-163.

CAPÍTULO 4

NANOPARTÍCULAS BIFUNCIONALES

4.1. Dopado de ferritina con metales

Como se ha comentado en la introducción, la función de la proteína ferritina en los sistemas biológicos es la de capturar y almacenar el exceso de hierro y liberarlo en la célula en respuesta a las fluctuaciones de éste en el medio ambiente o en la dieta^[1]. Junto con el hierro, la ferritina también acumula fosfato en el interior de su cavidad^[2,3]. El contenido de fosfato asociado con el núcleo de mineral de hierro varía en función del tipo de ferritina. La ferritina de mamíferos contienen aproximadamente 10 átomos de hierro / grupo fosfato^[4], mientras que en las de plantas^[5] y bacterias^[6-10] el contenido de fosfato es mucho mayor, con una relación de hierro-fosfato de aproximadamente 1:1 en la ferritina bacteriana. En la ferritina de mamíferos, el fosfato aparece principalmente unido en la superficie del mineral de hierro y se ha demostrado que proporciona sitios de unión para los átomos de hierro entrantes^[3,6,11]. De hecho recientemente se ha propuesto que podría jugar un papel en la catálisis de oxidación de Fe^{2+} en la superficie del núcleo de la ferritina^[12].

Recientemente, se ha demostrado que aniones arsenato, vanadato y molibdato también pueden incorporarse al óxido de hierro de la ferritina [13]. De tal forma que se puede obtener ferritina en cuya cavidad coexisten estos oxo-aniones y hierro en una relación con el hierro mayor de 1:1.

En vista de estos resultados nos planteamos la posibilidad de dopar la ferritina con especies metálicas que incorporen una nueva funcionalidad. Una buena elección podría ser el uso de radionúclidos de interés biomédico, especialmente en el campo de la bioimagen.

Radionúclidos emisores gamma como el $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se utilizan habitualmente para obtener imágenes radionucleares mediante técnica planar o Tomografía Computerizada por Emisión de Fotones Individuales (SPECT) [14,15]. El interés de esta técnica de gammagrafía se debe a su simplicidad y su alta sensibilidad, puesto que requiere concentraciones de radionúclidos del orden 10^{-10}M en los tejidos [16,17].

El empleo de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ para diagnóstico mediante gammagrafía SPECT está ampliamente generalizado en Medicina Nuclear. Las amplias posibilidades diagnósticas se deben fundamentalmente, a las excelentes propiedades radiofísicas y radioquímicas del ^{99m}Tc . El ^{99m}Tc es un radioisótopo metaestable que emite una radiación gamma de 141KeV cuando pasa a su estado fundamental ^{99}Tc . Tiene un periodo de vida media corto de 6 h, que es suficientemente alto para llevar a cabo una adquisición de la imagen y al mismo tiempo suficientemente bajo para provocar daño al paciente por la radiación. El $^{99m}\text{TcO}_4^-$ se origina por desintegración del $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$. En el mercado hay un buen número de fármacos de este radionúclido (Ceretek®, Tc-MAG®, Cardiolite®, etc), la mayoría de los cuales están en forma de complejos con Tc de diferentes estados de oxidación y que son obtenidos in situ mediante reacción con diferentes ligandos [18,19].

Considerando estos aspectos nos planteamos reconstituir la ferritina con hierro en presencia de este radioisótopo (figura1). Para ello se empleó un generador

de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Mallinckrodt en la Universidad de Zurich en el grupo del Prof. Roger Alberto. Tras 12 horas de incubación la muestra reconstituida se cromatografió en una columna Sephadex G-25 (cromatografía de exclusión por tamaño) y se recogieron las fracciones que contenían proteína, Fe^{+2} y que mostraban radiación gamma.

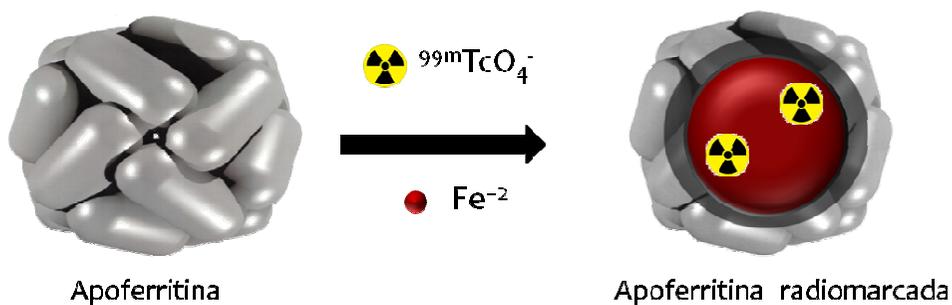


Figura 1. Esquema representativo de la síntesis de Apoferritina radiomarcada con $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

En la figura 2 queda representada la curva de coelución en la que se muestra la proteína y el radionúclido. De los estudios de la absorbancia a 280nm en el espectro UV-visible y de la actividad radiactiva en ccpm mediante un detector γ (LB 507 o LB 509; Berthold, Germany) en las fracciones de coelución se obtuvo un valor de entre 10 y 20 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por proteína.

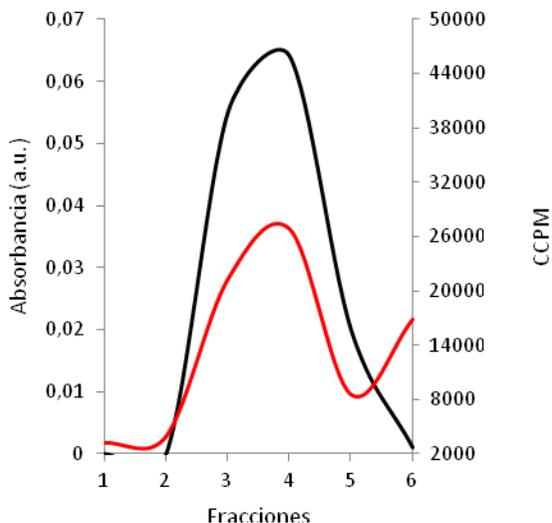


Figura 2. Curva de coelución. En negro está representada la concentración de Apoferritina (A_{280nm}) y en rojo la actividad radiactiva en ccpm de las fracciones recogidas en la cromatografía.

Por lo tanto hemos logrado diseñar un método para la preparación de un radiofármaco aprovechando la capacidad de la proteína ferritina de almacenar aniones en su interior en forma de oxo-aniones de manera similar al anión fosfato nativo. Y la ventaja del empleo de la apoferritina para la síntesis de este radiofármaco es que lo hace soluble en agua y con posibilidad de implementación en el organismo.

Mediante este método hemos sido capaces de encapsular un número importante de ^{99m}Tc por ferritina, lo que representa una ventaja sobre los fármacos que hay en el mercado que solo tienen un ^{99m}Tc por molécula, ya que a la hora de su empleo *in vivo* es más fácil acumular en un tejido una ferritina con 20 ^{99m}Tc que 20 moléculas con 1 ^{99m}Tc cada uno. No hay al día de hoy descritas en bibliografía nanoestructuras dopadas con radioemisores gamma. De modo que estos resultados abren una nueva vía para la síntesis de radiofármacos que podrían ser empleados en SPECT con mejores características que los actuales.

4.1.1. Dopado de la ferritina con Cu^{2+}

Así como en el apartado anterior hemos logrado encapsular aniones en la ferritina, es también factible el dopado de ésta con cationes metálicos^[20]. Siguiendo la filosofía de este capítulo una buena elección sería el dopado de ferritina con Cu^{2+} puesto que el isótopo ^{64}Cu es un emisor de positrones. Esto nos abre la posibilidad de sustituir el Cu^{2+} por su isótopo ^{64}Cu . El ^{64}Cu es el más versátil de todos los radionúclidos de cobre debido a su comportamiento único de desintegración^[21]. Tiene una vida media de 12,7 h lo cual permite su empleo en imagen PET (Tomografía por emisión de positrones o en inglés Positron Emission Tomography). Además de la capacidad en la técnica de imagen PET del ^{64}Cu , este radionúclido también es un emisor β^- lo cual es adecuado para ciertas aplicaciones terapéuticas.

Tradicionalmente, el dopado de ^{64}Cu sobre nanoestructuras se ha llevado a cabo mediante preconjugación con agentes quelantes, como DOTA y NOTA, en biovectores, ya que el ^{64}Cu puede acomplejarse con dichos agentes quelantes. El empleo de la ferritina para encapsular el radionúclido ^{64}Cu en su interior es muy favorable porque (1) no hay necesidad de introducir agentes quelantes sobre la superficie de la ferritina, (2) es rápido y eficiente, (3) se aumenta considerablemente el número de radioisótopos por partícula. De hecho siguiendo nuestra metodología (ver procedimiento experimental, sección 2.3.1.) hemos logrado incorporar 300 Cu por partícula de ferritina.

Las nanopartículas de ferritina dopada con Cu se caracterizaron por TEM y EDX estableciéndose inequívocamente que ambos metales, Fe y Cu, se encuentran encapsulados en la proteína (figura2).

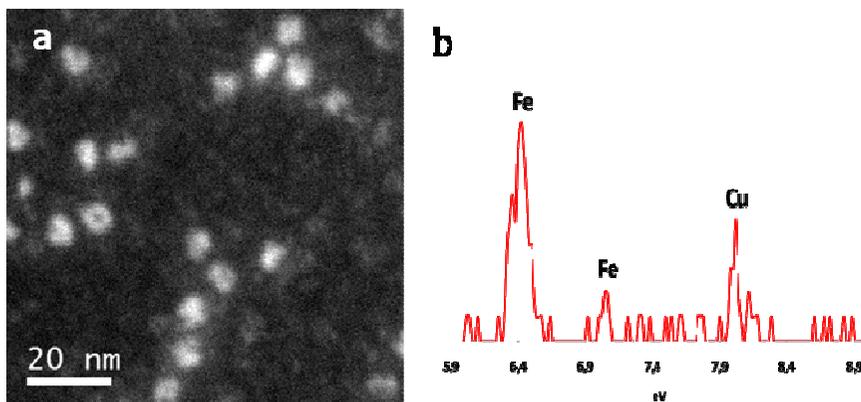


Figura 2. a) Imagen de HAADF de la muestra Apoferritina-Fe-Cu. b) Espectro EDX, mostrando la presencia de ambos metales Fe y Cu.

En este sentido hay que señalar que recientemente y utilizando una ferritina recombinante se ha logrado preparar, siguiendo un protocolo diferente al nuestro, ferritina dopada con ^{64}Cu y cuya imagen PET ha demostrado la valía de esta nanopartícula para actuar como agente de contraste para bioimagen médica.

4.2 Nanoestructuras magnéticas fluorescentes

La conjugación de nanopartículas magnéticas y compuestos con propiedad óptica, como los fluoróforos o Quantum Dots, permite obtener nanosondas multifuncionales que combinan imagen por resonancia magnética (MRI) e imagen óptica (OI)^[22]. Este enfoque se basa en la consideración de que cada una de estas dos modalidades tiene sus ventajas, y un enfoque integrado puede conducir a beneficios sinérgicos. Por ello tales estructuras podrían proporcionar una plataforma para la mejora de imagen médica.

La mayoría de los sistemas de imágenes de fluorescencia *in vivo* se desarrollaron por primera vez para la imagen en la región visible del espectro. Sin embargo la luz no penetra profundamente en los tejidos en el rango visible, por debajo de 700nm. Esto se debe principalmente al nivel de dispersión y al alto número de absorbentes endógenos (moléculas biológicas), incluyendo la oxihemoglobina, desoxihemoglobina, lípidos y agua^[23,24]. Recientemente, los investigadores se han centrado en los beneficios de las imágenes en el infrarrojo cercano (NIR), especialmente alrededor de 800nm. Esta técnica de imagen de fluorescencia NIR permite la obtención de imágenes *in vivo* de funciones fisiológicas, metabólicas y moleculares. Y además existe una ventana en la región del espectro de absorción cercana al infrarrojo (700-900nm) que se denomina "ventana de diagnóstico" donde los coeficientes de absorción de las moléculas biológicas se encuentran al mínimo. La facilidad del método, el costo relativamente bajo, una mejor resolución temporal, y el uso de las radiaciones no ionizantes son algunas de las ventajas de la imagen óptica.

Por ello es bastante interesante el empleo del fluoróforo Alexa-Flúor 790nm (AF790 con $\lambda_{\text{excitación}}=732\text{nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}}=805\text{nm}$) y del Quantum Dot 800nm (QD800, $\lambda_{\text{emisión}}=800\text{nm}$) para ampliar la emisión a la región cercana al infrarrojo, buscando la mejora de la penetración de la radiación en los tejidos profundos.

En el capítulo 4 hemos visto la potencialidad de la apomaghemita como agente de contraste para MRI y aprovechando que la proteína puede unir covalentemente moléculas gracias a los grupos amino, expuestos hacia el exterior, de los residuos de lisina que se encuentran localizados en su superficie hemos llevado a cabo la síntesis de los bioconjugados Apomaghemita-AF790 y Apomaghemita-QD800 con el fin de obtener potenciales agentes bimodales MRI-OI.

Se llevaron a cabo estudios de Imagen Óptica (OI), para comprobar la capacidad de actuación de éstos bioconjugados como marcadores bimodales magnético-ópticos. Los experimentos de Imagen Óptica se han realizado en

colaboración con el Dr. Federico Boschi y la Dra. Laura Calderan de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona, en un equipo Vivo Vision Systems, IVIS® 200 Series (Xenogen Corporation, Alameda USA) y las imágenes se adquirieron y analizaron con el software Living Image 2.6 y Living Image 3D (Xenogen Corporation, Alameda USA).

4.2.1. Bioconjugado Apomaghemita-AF790nm

Los colorantes Alexa Flúor son fluoróforos orgánicos con emisiones de fluorescencia que abarcan todo el espectro visible e incluso la región cercana a infrarrojo (NRI). Las conjugaciones con Alexa Flúor exhiben una fluorescencia más brillante y con una mayor fotoestabilidad que los conjugados de otros fluoróforos espectralmente similares. Estas características permiten capturar imágenes que antes eran inalcanzables con los fluoróforos convencionales. Además estos fluoróforos son solubles en agua y estables en el rango de pH 4-10 y son bastantes seguros para su empleo en estudios *in vivo* ya que no son tóxicos para el organismo.

Los derivados de Alexa Flúor que poseen grupos succinimidil éster, son ideales para unir covalente el fluoróforo a grupos aminas de diferentes sustratos. De acuerdo con esto, hemos preparado el bioconjugado Apomaghemita-AF790 (ver capítulo cinco, sección 5.2.2.) mediante la reacción entre el derivado succinimidil éster del fluoróforo y los grupos amino de la superficie de la Apomag-6 (figura 4).

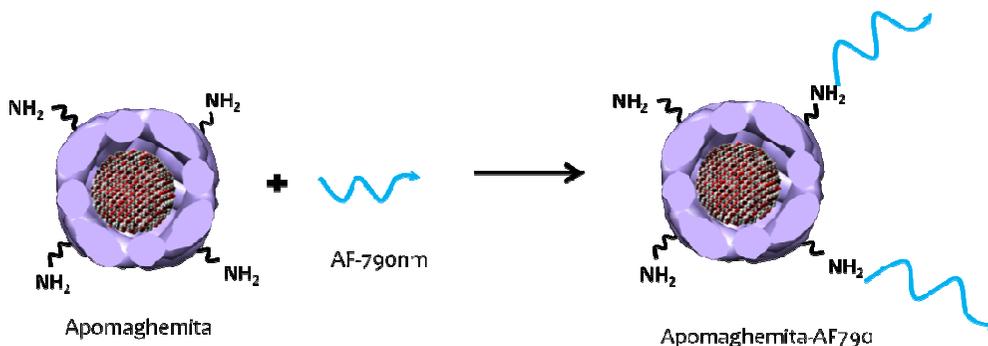


Figura 4. Síntesis bioconjugado Apomaghemita-AF790

Previo al estudio *in vivo* de Imagen Óptica se hizo un estudio *in vitro* de la eficiencia cuántica del compuesto Apomaghemita-AF790. Se calculó la emisión de fluorescencia de la disolución Apomaghemita-AF790 usando el filtro de excitación de 710-760nm (ICG). Los valores de fluorescencia medios obtenidos daban una eficiencia de señal compatible con los valores necesarios para realizar un experimento *in vivo*.

Los primeros experimentos *in vivo* se han realizado empleando el filtro ICG en dos ratones tipo Nude-Nude. A cada ratón se le inyectaron 10 μ l del compuesto Apomaghemita-AF790 por gramo de ratón a través de la vena de la cola (200 μ l/20g). Las imágenes de fluorescencia se adquirieron antes de la inyección (pre suministro del compuesto) y durante las 3 h posteriores a la inyección, de forma consecutiva.

Las medidas se tomaron en la proyección del plano horizontal de tres órganos de interés: cerebro, pulmones e hígado. En la figura 5 se muestra una reconstrucción en 3D del cuerpo del ratón y dichos órganos de interés.

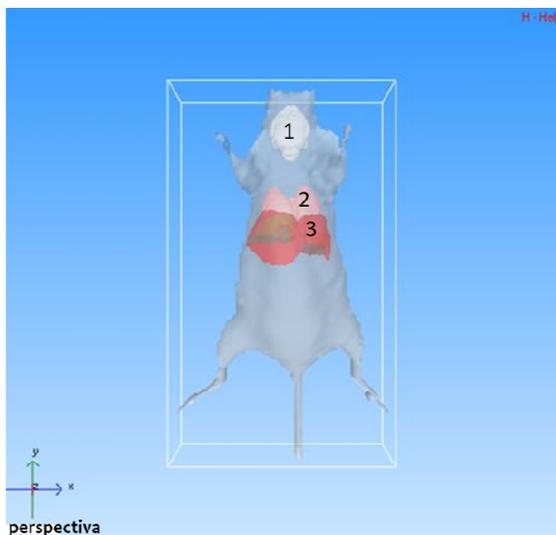


Figura 5. Proyección del plano horizontal de 1: cerebro; 2: pulmones y 3: hígado.

En la figura 6 se muestran las imágenes de fluorescencia del compuesto Apomaghemita-AF790 después de 3 horas de la inyección del compuesto. En primer lugar hay que señalar, que la presencia del AF790 anclado covalentemente a la apomaghemita, permite conocer la biodistribución de la nanoestructura en el ratón. Se puede observar en estas imágenes que hay un máximo de fluorescencia en la región del riñón y de la médula espinal, que serían por tanto las zonas de mayor acumulación de la nanoestructura.

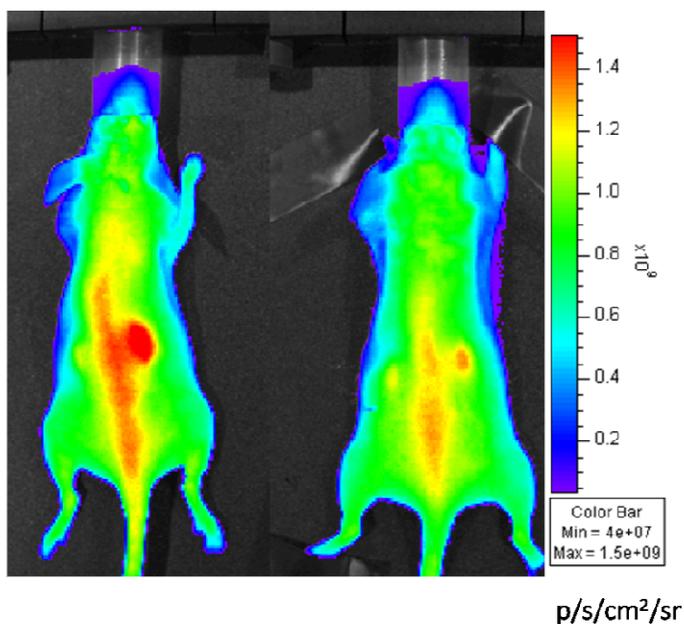


Figura 6. Imágenes de fluorescencia de dos ratones (vista dorsal) después de 3 horas de la administración del compuesto Apomaghemita-AF790. Se muestra la barra de intensidades de fluorescencia (máximo de intensidad de $1.5e^{+09}$ y mínimo $4e^{+07}$).

En la figura 7 se muestra un estudio preliminar de la biodistribución en el tiempo de la nanoestructura compuesto Apomaghemita-AF790. Se midieron tres regiones de interés (ROIs): cerebro, pulmón e hígado con objeto de confrontar las imágenes de OI con las imágenes MRI mostradas en el capítulo 4. Se puede apreciar que durante las 3 horas en las que se han adquirido las imágenes, no hay diferencias significativas en la biodistribución del compuesto en estos tres órganos, aunque a las 3 horas de la administración del compuesto, éste ha aumentado ligeramente su concentración en hígado.

Estos datos ponen de manifiesto que una fracción de nanopartículas Apomaghemita-AF790 se acumulan en hígado, lo que, de acuerdo con las conclusiones que extrajimos de los datos del estudio de biodistribución mediante MRI vienen a poner de manifiesto que la nanoestructura Apomaghemita-AF790

podría ser útil como sondas bimodales para el estudio anatómico y morfológico de hígado.

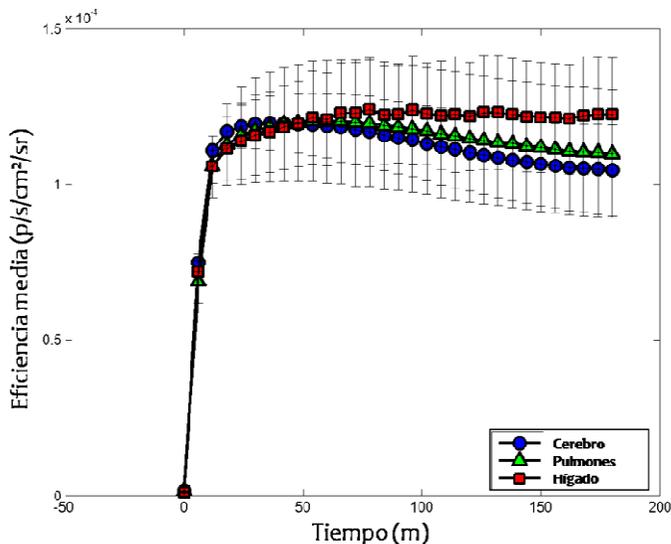


Figura 7. Eficiencia media de la fluorescencia con el tiempo del compuesto Apomaghemita-AF790 en tres regiones de interés (ROIs) correspondientes a cerebro (azul), pulmones (verde) e hígado (rojo).

4.2.2. Bioconjugado Apomaghemita-QD800nm

Los Quantum Dots (QDs) son nanocristales de semiconductores inorgánicos que poseen un amplio espectro de excitación y un estrecho espectro de emisión. Pueden ser excitados por una sola fuente de luz y emitir en una amplia gama de longitudes de onda, desde el ultravioleta a NIR^[25-28], dependiendo de su tamaño y composición. Las emisiones en la zona NIR presentan la ventaja de una mayor penetración en los tejidos.

El QD800nm está compuesto por un núcleo metálico de CdSeTe y una capa de ZnS y a su vez rodeado de una capa de polímero orgánico para su empleo *in vivo*.

Incluye Te en su composición química para ampliar la emisión a la región cercana al infrarrojo.

Se llevó a cabo la preparación de la nanoestructura Apomaghemita-QD800 siguiendo el mismo esquema de síntesis que para la nanoestructura Apomaghemita-AF790. La reacción entre la Apomaghemita y el QD800 ocurre entre los grupos amino de la superficie de la proteína y los grupos carboxílicos del QD800 (figura 8).

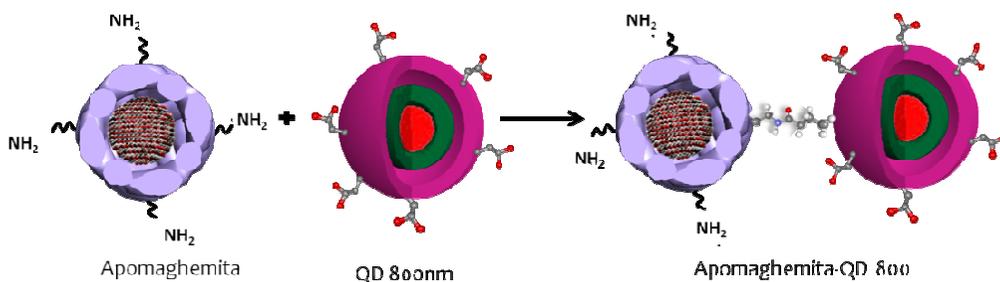


Figura 8. Síntesis bioconjugado Apomaghemita-QD800.

Primeramente se hizo un estudio *in vitro* de la eficiencia cuántica del compuesto Apomaghemita-QD800. Se calculó la emisión de fluorescencia de la disolución del compuesto usando un abanico de filtros de excitación que barren el espectro Uv-visible desde el azul hasta el IR, de acuerdo con el amplio espectro de excitación que muestra el QD800 libre. Los valores de fluorescencia medios obtenidos daban una eficiencia de señal compatible con los valores necesarios para realizar un experimento *in vivo*, siendo el filtro de excitación 610-665nm (Cy 5.5) el que mayor eficiencia mostró.

Los experimentos *in vivo* se realizaron por tanto utilizando el filtro Cy 5.5 en dos ratones tipo Nude-Nude, suministrándole a cada ratón 10 μ l del compuesto Apomaghemita-QD800/g de ratón a través de la vena de la cola (200 μ l/20g). Las

imágenes de fluorescencia se adquirieron antes de la inyección (pre suministro del compuesto) y durante las 3 h posteriores a la inyección, de forma consecutiva.

En la figura 9 se expone las imágenes de fluorescencia de los dos ratones después de tres horas de haberles inyectado el compuesto Apmaghemita-QD800. Se puede apreciar que dicho compuesto se acumula preferentemente en pulmón y en menor medida en el hígado.

Estos datos ponen de manifiesto que la presencia del QD acoplado a la maghemita cambia drásticamente su patrón de biodistribución, de tal forma que el órgano "diana" de la nanoestructura Apomaghemita-QD800 es ahora el pulmón y no el hígado como habíamos constatado mediante MRI para la apomaghemita.

La explicación de este cambio de biodistribución no es trivial pero una primera hipótesis de trabajo pudiera ser el incremento de tamaño que posee el bioconjugado (12+15nm) con respecto a la apomaghemita (12nm). Este mayor tamaño impediría una circulación fácil a través de los capilares pulmonares, cuyo tamaño medio es del orden unas pocas micras, que actuarían en cierta forma de "cuello de botella" para la normal biodistribución de la nanoestructura.

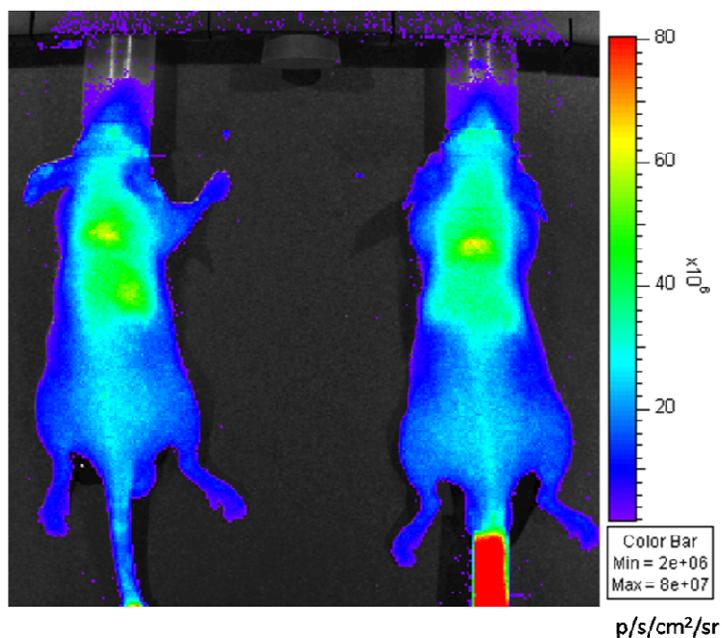


Figura 9. Imágenes de fluorescencia de dos ratones (vista dorsal) con la muestra después de 3 horas de la administración del compuesto Apomaghemita-QD800nm. Se muestra la barra de intensidades de fluorescencia (máximo de intensidad de 2×10^6 y mínimo 8×10^7).

A continuación en la figura 10 se muestra la biodistribución del compuesto Apomaghemita-QD800 en tres regiones de interés (ROIs) correspondientes a cerebro, pulmones e hígado. Se puede apreciar que no hay diferencias significativas visibles entre la ROIs del cerebro y el hígado, sin embargo sí las hay entre la ROIs de estos dos órganos y la ROIs de los pulmones. Podemos decir que el compuesto se acumula preferentemente en los pulmones, y que aumenta ligeramente su concentración en dicho órgano a las 3 horas de su administración en el ratón.

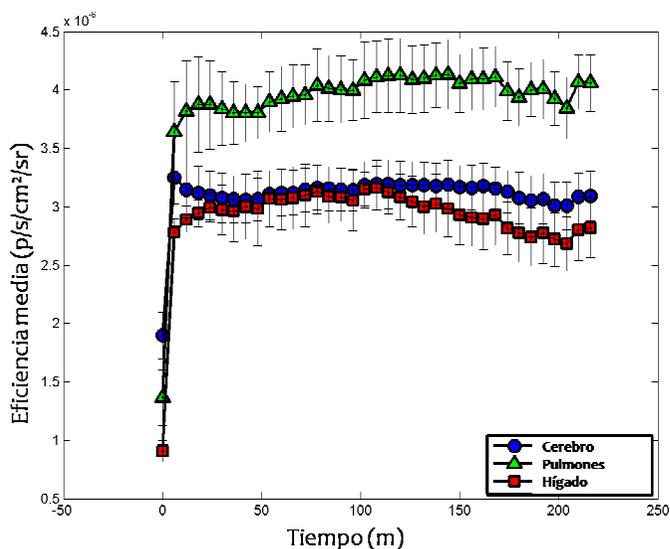


Figura 10. Eficiencia media de la fluorescencia con el tiempo del compuesto Apomaghemita-QD800 en tres regiones de interés (ROIs) correspondientes a cerebro (azul), pulmones (verde) e hígado (rojo).

También se hizo un estudio *in vivo* comparativo con el QD800 libre empleando el filtro Cy 5.5 y suministrando a cada ratón 10µl QD800/g de ratón a través de la cola. En el estudio de la distribución después de 3horas de la inyección del QD800 se observa una fuerte acumulación en el hígado (figura 11).

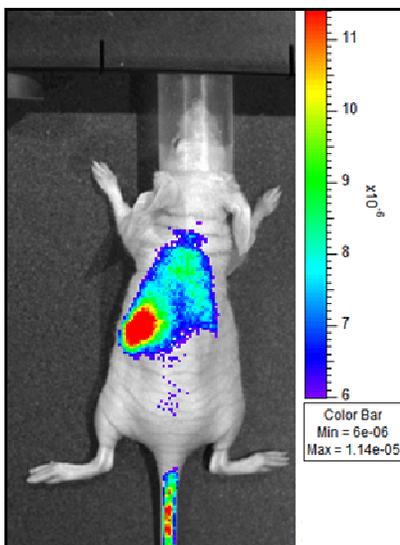


Figura 11. Patrón de biodistribución de QD800 libre 3 horas después de su administración.

Como conclusión podemos decir que hemos logrado sintetizar dos compuestos potenciales como agentes bimodales MRI-OI. El empleo del fluoróforo AF790 o del QD800 permite obtener imágenes *in vivo* con una mayor profundidad en los tejidos, lo que junto con las imágenes obtenidas en MRI por las nanopartículas de maghemita superparamagnéticas (Apomaghemita) posibilitaría la obtención de bioimágenes para diagnóstico.

4.3. Funcionalización de nanopartículas con carbohidratos

Hay numerosos ligandos que pueden utilizarse como dianas específicas; entre ellos los sacáridos que son un grupo de biomoléculas que actúan como marcadores de reconocimiento en numerosos procesos biológicos^[29].

Las lectinas unen mono y oligosacáridos reversiblemente y con alta especificidad^[30]. En los últimos años han entrado en la vanguardia de la investigación

biológica ya que sirven como herramientas de gran valor para el examen de los cambios que se producen en la superficie celular durante procesos fisiológicos y patológicos de la diferenciación celular en el cáncer.

En la literatura existen numerosos ejemplos de nanopartículas magnéticas recubiertas con polisacáridos o polímeros biocompatibles (dextran, albúmina, etc)^[31]. Sin embargo, son muy pocos los ejemplos que hay de nanopartículas funcionalizadas con oligosacáridos biológicamente significantes, donde los sacáridos verdaderamente confieren una nueva funcionalidad biológica a la partícula inorgánica y no como una simple estabilización^[32].

Siguiendo el protocolo de biofuncionalización utilizado en este capítulo, llevamos a cabo la funcionalización de la apomaghemita con N-acetilglucosamina (NAG) y D-manosa.

La funcionalización con estos carbohidratos es una opción atractiva debido al potencial de la interacción lectina-carbohidrato a nivel de numerosos tejidos. En concreto, la presencia de receptores para N-acetil-D-glucosamina en hepatocitos y de D-manosa en hígado, bazo y macrófagos alveolares.

La funcionalización se llevó a cabo a partir de derivados vinil sulfona de los carbohidratos preparados por el grupo del Profesor Santoyo de la Universidad de Granada. En la figura 1 se muestra la estructura de dichas moléculas.

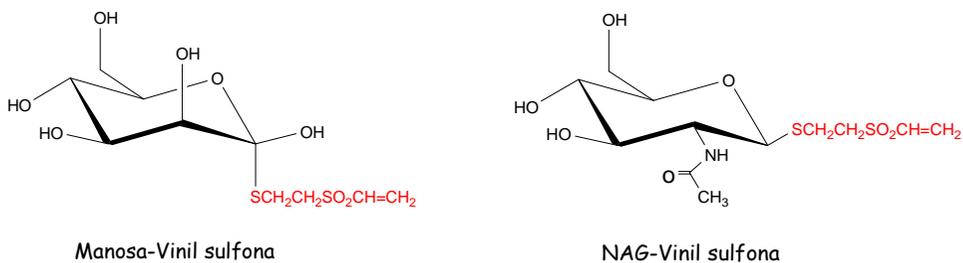


Figura 1. Estructura de las moléculas Manosa vinil sulfona y N-acetil-glucosamina (NAG) vinil sulfona.

La elección de los derivados vinil sulfona radica en la conocida reactividad de los grupos vinil sulfona con los grupos amino de los aminoácidos lisina de la capa externa de la apoferritina, como ha sido previamente puesto de manifiesto por nuestro grupo de investigación^[33] (figura 2).

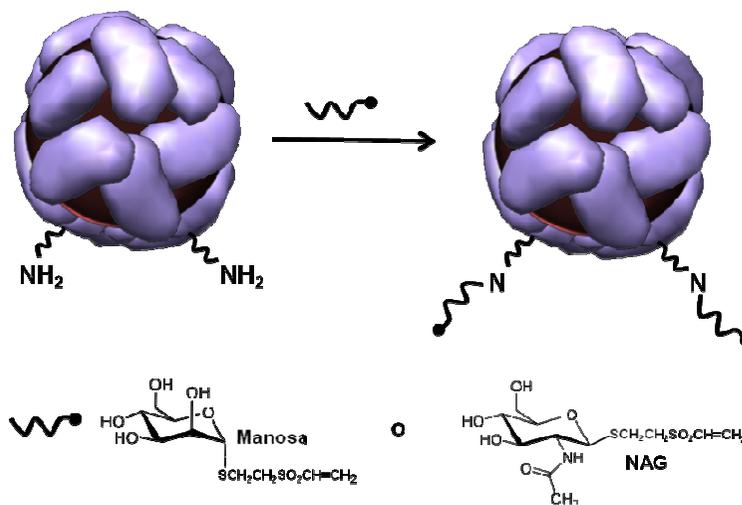


Figura 2. Glicosilación de las nanopartículas de Apomaghemita con N-acetil-D-glucosamina o D-manosa vinil sulfona derivatiados.

La finalidad de funcionalizar la apomaghemita con carbohidratos consiste en hacer uso de las interacciones específicas carbohidratos-lectina. Si consideramos que cada tejido celular tienen un patrón de lectina diferente y que la interacción lectina-carbohidrato es específico, podemos plantear la preparación de una "librería" de nanopartículas glicosiladas que se puedan distribuir de forma específica en diferentes órganos.

La Apomag-4 funcionalizada con NAG reaccionaría con su lectina específica aglutinina de germen de trigo (WGA) y presente en células hepáticas y la Apomag-4 funcionalizada con D-manosa reaccionaría con su lectina específica concanavalina A (ConA). Con objeto de confirmar dicha interacción se llevó a cabo un *Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas* (ELISA)(figura 3). Las nanopartículas fueron fijadas en una placa ELISA y la presencia de la fracción carbohidrato fue revelado por incubación con la lectina aglutinina del germen de trigo conjugada a la enzima Peroxidasa de Rábano Silvestre (WGA-HRP). La glicosilación transforma las partículas de apomaghemita en glicoproteínas reconocidas por las lectinas que específicamente unen N-acetil-D-glicosamina o D-manosa. Como era de esperar, la apomaghemita no funcionalizada no es reconocida por las lectinas. Un análisis más detallado reveló que las dos concentraciones de monosacárido vinil sulfona probadas producen diferentes intensidades, sugiriendo un grado diferente de glicosilación. Este hecho es relevante puesto que las interacciones proteína-carbohidrato son débiles y la multivalencia juega un papel importante. Así en el receptor de la manosa, como en otras proteínas que unen carbohidratos, varios dominios individuales de lectina con afinidad débil por el azúcar se agrupan para lograr una alta afinidad de unión a los oligosacáridos^[34].

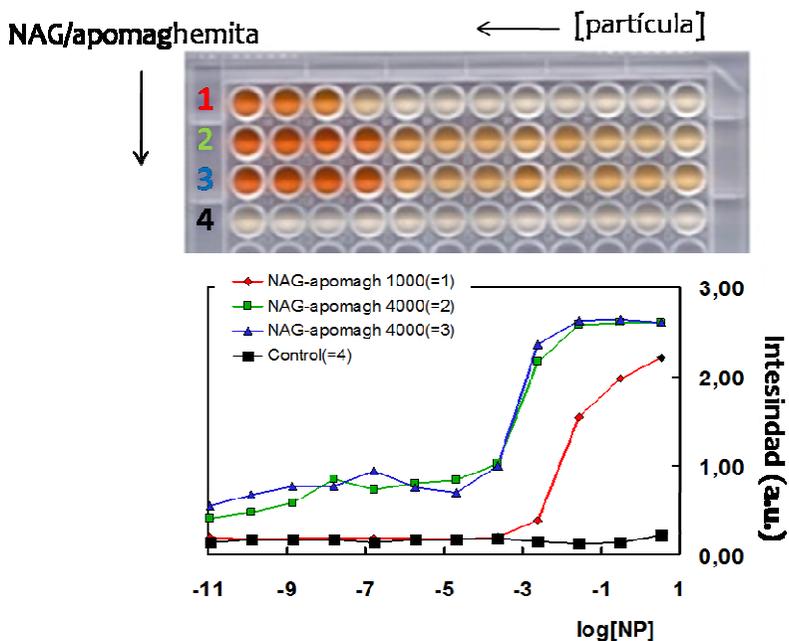


Figura 3. Imagen de la placa ELISA después de la incubación de concentraciones decrecientes de las nanopartículas de Apomaghemita glicosilada con el bioconjugado peroxidasa-lectina de rábano. De arriba a abajo, filas 1 y 2: Apomaghemita glicosilada con 1000 y 4000 moles de N-acetil-D-glucosamina vinil sulfona, fila 3: duplicado de la fila 2 (control de la reproducibilidad del ensayo), fila 4: nanopartículas de Aphomaghemita no glicosiladas (control de la no interacción específica lectina-Apomaghemita). La gráfica representa la cuantificación de la placa. Representación de la actividad peroxidasa frente a la concentración de nanopartículas (expresados como absorbancia a 495nm).

La funcionalización de las nanopartículas de apomaghemita con los carbohidratos da origen a una nanoestructura biofuncional que exhibe dos características, la especificidad y el comportamiento magnético. Los resultados *in vivo* de MRI, vistos en el capítulo anterior, muestran que las muestras de apomaghemita son buenos candidatos como agentes de contraste y los carbohidratos inmovilizados conservan sus habilidades de reconocimiento, como lo demuestra la gran afinidad con sus correspondientes lectinas.

Bibliografía:

- 1) P. Arosio, S. Levi; *Free Radical Biol. Med.*, **2002**, 33, 457–463.
- 2) Granick S.; Hahn P. F.; *J. Biol. Chem.* **1944**, 155, 661-669.
- 3) Treffry A.; Harrison P. M.; *Biochem. J.* **1978**, 171, 313-320.
- 4) Michaelis L.; Coryell C. D.; Granick S.; *J. Biol. Chem.* **1943**, 28, 329-336.
- 5) Wade V. J.; Treffry A.; Laulhere J. P.; Bauminger E. R.; Cleton M. I.; Mann S.; Briat J. F.; Harrison P. M.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1993**, 1161, 91-96.
- 6) Rohrer J. S.; Islam Q. T.; Watt G. D.; Sayers D. E.; Theil E. C.; *Biochemistry* **1990**, 29, 259-264.
- 7) Bauminger E. R.; Cohen S. G.; Dickson D. P. E.; Levy A.; Ofer S.; Yariv J.; *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 623, 237-242.
- 8) Mann S.; Bannister J. V.; Williams R. J. P.; *J. Mol. Biol.* **1986**, 188, 225-232.
- 9) Treffry A.; Harrison P. M.; Cleton M. I.; Debruijn W. C.; Mann S.; *J. Inorg. Biochem.* **1987**, 31, 1-6.
- 10) Watt G. D.; Frankel R. B.; Jacobs D.; Huang H. Q.; *Biochemistry* **1992**, 31, 5672-5679.
- 11) Huang H. Q.; Watt R. K.; Frankel R. B.; Watt G. D.; *Biochemistry* **1993**, 32, 1681-1687.
- 12) Johnson J. L.; Cannon M.; Watt R. K.; Frankel R. B.; Watt G. D.; *Biochemistry* **1999**, 38, 6706-6713.
- 13) Jup Polanams, Alisha D. Ray and Richard K. Watt; *Inorg. Chem*, **2005**, 44, 3203-3209.
- 14) (a) Hermanson G. T.; *Academic Press: New York*, **1996**. (b) Choi J. S.; Jun Y. W.; Yeon S. I.; Kim H. C.; Shin J. S.; Cheon J.; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15982–15983.

- 15) Seidenfaden R.; Krauter A.; Schertzinger F.; Gerardy-Schahn R.; Hildebrandt H.; *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 5908–5918.
- 16) (a) Alivisatos A. P.; *Science*, **1996**, 271, 933–937. (b) Murray C. B.; Norris D. J.; Bawendi M. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 8706–8715.
- 17) (a) Ntziachristos V.; Yodh A. G.; Schnall M.; Chance B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 2767–2772. (b) Beyer T.; Townsend D. W.; Brun T.; Kinahan P. E.; Charron M.; Roddy R.; Jerin J.; Young J.; Byars L.; Nutt R.; *J. Nucl. Med.* **2000**, 41, 1369–1379.
- 18) S. S. Jurisson and J.D. Lyndon; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2205-2218.
- 19) S. Liu and D.S. Edwards; *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2235-2268.
- 20) S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson, and G. D. Watts. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 59, 15.
- 21) P. J. Blower, J. S. Lewis and J. Zweit; *Nucl. Med. Biol.*, **1996**, 23, 957.
- 22) H. Lis, N. Sharon; *Chem. Rev.* **1998**, 98, 637-674.
- 23) Derfus A. M., Chen A. A., Min D. H., Ruoslahti E., Bhatia S.N.; *Bioconjug. Chem.* **2007**, 18,1391–1396.
- 24) Licha K In: Krause W (ed) Contrast agents II. Topics in current chemistry, vol 222. Springer, Heidelberg, **2002**, pp 1–29.
- 25) Bailey R. E., Nie S. M.; *J Am Chem Soc.* **2003**, 125, 7100–7106.
- 26) Hines M. A., Scholes G.D.; *Adv Mater.* **2003**, 15, 1844–1849.
- 27) Kim S., Fisher B., Eisler H. J., Bawendi M. G.; *J Am Chem Soc.* **2003**, 125,11466–11467
- 28) Qu L. H., Peng X. G.; *J Am Chem Soc.* **2002**, 124, 2049–2055.
- 29) Cheon J.; Lee J. H.; *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 1630–1640.
- 30) (a) S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Duguet; *J. Mater. Chem.* **2004** 14, 2161–2175; (b) M. Di Marco, C. Sadun, M. Port, I. Guilbert, P. Couvreur, C. Dubernet; *Int.*

- J. Nanomed.* **2007**, *2*, 609-622; (c) C. Corot, P. Robert, J. M. Idee, M. Port; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1471-1504; (d) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, R. N. Muller; *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064-2110
- 31) (a) J. M. de la Fuente, S. Penadés; *Biochem. Biophys. Acta*, **2006**, *1760*, 636-651; (b) L. Lartigue, K. Oumzil, Y. Guari, J. Larionova, C. Guérin, J. L. Montero, V. Barragan-Montero, C. Sangregorio, A. Caneschi, C. Innocenti, T. Kalaivani, P. Arosio, A. Lascialfari; *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2992-2995; (c) C. Earhart, N. R. Jana, N. Erathodiyil, J. Y. Ying; *Langmuir*, **2008**, *24*, 6215-6219; (d) K. El-Boubbou, C. Gruden, X. Huang; *J. Amer. Chem. Soc.* **2008**, *129*, 13392-13393; (e) L. H. Liu, H. Dietsch, P. Schurtenberger, M. Yan; *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1349-1355; (f) C. H. Liang, C. C. Wang, Y. C. Lin, C. H. Chen, C. H. Wong, C. Y. Wu; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7750-7756.
- 32) (a) B.G. Davis; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579-601; (b) D.P. Gamblin, E.M. Scanlan, B.G. Davis; *Chem Rev.* **2009**, *109*, 131-163.
- 33) Belén Fernández, Natividad Gálvez, Purificación Sánchez, Julia Morales, Francisco Santoyo, Rafael Cuesta, José M. Domínguez-Vera; *Inorganica Chimica Acta.* **2007**, *360*, 3951-3954.
- 34) Taylor, M. E.; Benzouska, K.; Drickamer, K.; *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1719-172.

CAPÍTULO 5

PROCEDICIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Nanopartículas magnéticas encapsuladas en apoferritina.

Síntesis de Apoferritina-Gd

A una disolución de apoferritina (0.4ml, $1,36 \times 10^{-5} \text{M}$, Sigma Aldrich (49mg/ml), lot 055K7012) se le añadieron alícuotas de 0.1ml de una disolución de $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.16M) cada 30 minutos. La solución de nitrato de gadolinio 0.16M fue preparada en un tampón (AMPSO pH 8.4), y a esta concentración el pH era de 6.5 y no se observó precipitación. Después de completar las adiciones (7 alícuotas), la mezcla se agitó durante 30 min. La suspensión coloidal resultante fue incubada durante 24h a 4°C. En principio, el Gd(III) se puede unir bien a la superficie de la

apoferritina o bien a la cavidad interna o en ambos. Con el fin de eliminar el Gd(III) no localizado dentro de la cavidad interna (unido a la superficie externa o libre en solución), se añadió 0.039g de $\text{Na}_3\text{HEDTA}\cdot x\text{H}_2\text{O}$ y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución clara obtenida fue exhaustivamente dializada con agua bidestilada usando una membrana de diálisis con un poro de 100KDa de peso molecular para eliminar el complejo Gd (EDTA), el cual fue detectado por IR después de concentrar y liofilizar la solución del reservorio. La solución dializada fue pasada a través de una columna calibrada Sephadex G-25 y eluida con agua milli-Q, aislándose así las fracciones que contienen apoferritina con Gd (Apoferritina-Gd).

Síntesis de Apoferritina-CoNi

Se prepararon nanopartículas bimetálicas con una proporción teórica de átomos de Co/Ni de 75:25, 50:50 y 25:75 por adición de 1ml de una disolución de $\text{CoSO}_4/\text{NiSO}_4$ 0.1M a una disolución de apoferritina de 4mg/ml (apoferritina de bazo de caballo, 49mg/ml, Sigma Aldrich) y se incubó durante 24 horas obteniéndose una disolución clara y homogénea. El pH fue dinámicamente ajustado a 8 con NaOH 0.1M para incrementar la cantidad de M^{2+} por proteína, gracias al hecho bien conocido de la existencia de un gradiente de carga negativa desde la cara externa hacia el interior de la cavidad de la proteína. Previamente a la incubación todas las disoluciones fueron cuidadosamente desgasificadas. Posteriormente se cromatografiaron las disoluciones mediante una columna calibrada Sephadex G-25 (1.5cm-5.5cm). La adición del agente reductor NaBH_4 (0.1ml, 4mg/ml) a la mezcla de Apoferritina- Co^{2+} - Ni^{2+} produce una solución negra de Apoferritina- Co^0Ni^0 . A continuación la solución se dializa exhaustivamente con agua bidestilada y desgasificada y finalmente se liofiliza produciendo un polvo negro de nanopartículas de CoNi en el interior de la apoferritina.

Síntesis de Apoferritina-Pd

Se incubó una disolución de apoferritina (5mg/ml, Sigma-Aldrich) con 500 equivalentes de K_2PdCl_4 durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se adicionó $NaBH_4$ (20 equivalentes). La solución negra resultante fue exhaustivamente dializada con agua milli-Q a 4°C, y cromatografiada (columna Sephadex G-25) aislándose así las fracciones que contienen apoferritina. La reacción fue llevada a cabo en condiciones aeróbicas, es decir, en presencia de oxígeno por lo que a dicha muestra la denominamos Pd-oxígeno $Pd(O_2)$. La solución negra obtenida fue diluida en una solución de apoferritina (5mg/ml) recién preparada antes de ponerla a liofilizar. La misma reacción química fue llevada a cabo en una atmósfera inerte de argón por lo que denominamos a esta muestra Pd-argón $[Pd(Ar)]$. Se llevó a cabo un tratamiento por calor del polvo de las nanopartículas para las muestras de Pd (O_2) y Pd (Ar) bajo una atmósfera de N_2 a 500°C durante 2h en un tubo de cuarzo.

5.2. Nuevas nanopartículas como agentes de contraste para MRI.

Preparación de coloide de maghemita

La magnetita fue sintetizada siguiendo el método de Massart^[1] por coprecipitación de sales de Fe^{+2} y Fe^{+3} en estequiometría de 0.5. Concretamente se preparó una disolución de Fe^{+2} [sal de Mohr, $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$ amonium Iron(II) sulfate hexahydrate] 1.2M en 5ml de HCl 1M y otra disolución de Fe^{+3} [$Fe(NO_3)_3$] 2M en 5ml de HCl 1M y ambas se juntan para obtener una disolución mezcla de Fe^{+2}/Fe^{+3} . Por ajustes del pH (NaOH 3M, pH 12-13) y la fuerza iónica ($NaNO_3$) se puede controlar la talla de las nanopartículas de magnetita resultantes ($NaNO_3$ 3M para magnetita de 4nm y $NaNO_3$ 0.5M para magnetita de 6nm). Todas las soluciones preparadas fueron

cuidadosamente desgasificadas con argón. Dado que la disolución de magnetita que se obtiene es insoluble, se procede a su oxidación con HClO_4 1M y conseguimos así un coloide de nanopartículas de maghemita estables a pH 2.

Encapsulación de las nanopartículas de óxido de hierro magnéticas por la apoferritina

A una disolución de 2ml de apoferritina (5mg/ml, Sigma-Aldrich) se le bajó lentamente el pH 2 con HCl 0.1M, a este pH la proteína se encuentra disociada en sus subunidades. Después de 15 minutos en agitación la solución fue mezclada con 1ml de una solución diluida de nanopartículas de maghemita a pH 2 (50 μ l en 1ml) y se agitó durante 30 minutos. El pH de la solución resultante fue posteriormente ajustado hasta 8 con NaOH 0,1M para permitir que las subunidades se autoensamblen en las 24 subunidades de la proteína y encapsulen a las nanopartículas.

La solución marrón rojiza resultante dializada con agua milli-Q para eliminar las subunidades no ensambladas y finalmente cromatografiada en una columna Sephadex G-25 para aislar las fracciones que contienen la proteína y nanopartículas de maghemita en su interior, a las que denominamos apomaghemita.

5.3. Nanopartículas bifuncionales.

5.3.1. Dopado de Ferritina con metales

Dopado de ferritina con $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Se empleó un generador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Mallinckrodt) usando 0.9% de solución salina. Mediante el programa de cálculo Nucleolab V1.2 se han obtenido la

actividad específica: 367 mCi/ μg , el contenido en masa de $^{99\text{m}}\text{Tc}$: 0.072 μg (9%) y el contenido en masa de ^{99}Tc : 0.755 μg (91%). La concentración de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es de 0.121 μM en un volumen de 1ml, por lo que hay $1.21 \cdot 10^{-10}$ moles de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Se hacen reaccionar $1.73 \cdot 10^{-12}$ moles de apoferritina ($1.25 \cdot 10^{-4}$ M, Sigma-Aldrich) con los $1.21 \cdot 10^{-10}$ moles de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (relación 1:70) durante 2 horas con la intención de encapsular $^{99\text{m}}\text{Tc}$ en el interior de la proteína. A continuación se hicieron 3 adiciones de Fe^{+2} ($2.8 \cdot 10^{-9}$ moles de Fe^{+2} , relación 1 Apoferritina: 2000 Fe^{+2}) y se dejó 12 horas en incubación. Posteriormente se cromatografió la muestra con una columna Sephadex G-25 y se recogieron las fracciones que contenían la proteína con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ y Fe^{+2} en su interior.

Dichos experimentos fueron realizados en el instituto de Química Inorgánica de la Universidad de Zurich en colaboración con el Prof. Roger Alberto.

Dopado de ferritina con Cu^{2+}

Se prepara una disolución de apoferritina de 1mg/ml en un volumen de 50ml de tampón Imidazol 0.1M/NaCl 0.05M pH 7.4. Por otra parte se preparan una disolución de Fe^{2+} [sal de Mohr: $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$] 0.01M en HCl 0.001M, y una disolución de Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.001M en agua bidestilada. En primer lugar se adiciona el Fe^{2+} a la disolución de apoferritina con alícuotas de 200 μl cada 30 minutos hasta un total de 2000 átomos de Fe por apoferritina (500 μM , 11alícuotas). Se deja 1hora de incubación se dializa frente a Mops 0.1M/NaCl 0.1M pH 7.4. Se adicionan 200 μl de Cu^{2+} cada 30 minutos hasta obtener 1000 átomos de éste por proteína (300 μM , 6 alícuotas). Después de 2 horas de incubación se hace una cromatografía de exclusión por tamaño en columna Sephadex G-25 y se recogen las fracciones que contienen la proteína con los cationes en su interior.

5.2.2. Nanopartículas magnéticas fluorescentes.

Síntesis del bioconjugado Apomaghemita- Alexa Flúor 790nm (AF790):

Se prepara una solución de Apomaghemita de acuerdo con el procedimiento explicado anteriormente. La muestra de Apomaghemita purificada ($1.2 \cdot 10^{-8}$ moles) se hace reaccionar con el fluoróforo orgánico de tipo Alexa Flúor, concretamente el AF790 succinimidil éster, ($5.7 \cdot 10^{-8}$ moles, Invitrogen) con el objeto de tener una relación de AF790/Apomaghemita=5. Dicho AF790 tiene una $\lambda_{\text{excitación}}=732\text{nm}$ y una $\lambda_{\text{emisión}}=805\text{nm}$. La reacción se produce entre los grupos amina de la capa externa de la proteína y el grupo succinimidil éster del AF790. Se deja reaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 12 horas. A continuación se procede a purificar la muestra mediante diálisis exhaustiva frente a agua bidestilada y posterior cromatografía en columna Sephadex G-25 para eliminar el exceso de AF790 que no haya reaccionado.

Síntesis del bioconjugado Apomaghemita- Quantum dot 800nm:

El quantum dot, QD800 ($\lambda_{\text{excitación}}=240\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}}=800\text{nm}$, tamaño 15-20nm), ha sido adquirido en la casa comercial Invitrogen y está recubierto por un polímero orgánico que expone hacia el exterior grupos carboxilo que serán los que reaccionarán con el grupo amino de la apoferritina. Pero para ello los residuos carboxilos del quantum dot deben activarse con EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimidehydrochloride). 50 μl de la solución stock del quantum dot comercial (8 μM) se incubaron con 23 μl de una disolución stock de EDC (10 mg/ml en agua bidestilada) durante 30 min para su activación. Posteriormente se adiciona una solución de apomaghemita preparada de la forma que se ha expuesto anteriormente y se deja reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se lleva a cabo la purificación de la muestra mediante cromatografía

Sephacryl 300HR (5,5 cm x 1,5 cm de lecho, Sigma), con el fin de eliminar el exceso de producto que no haya reaccionado.

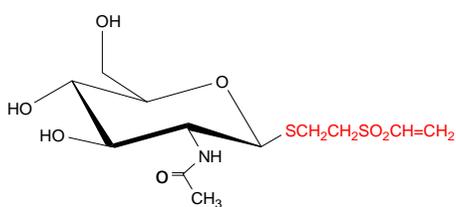
5.2.3. Funcionalización de nanopartículas con carbohidratos.

Glicosilación de la apomaghemita con N-Acetil glucosamina (NAG) o manosa- vinil sulfona.

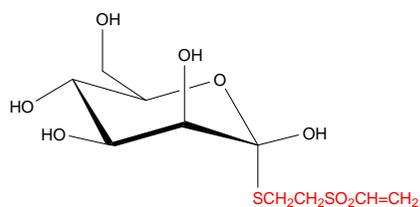
La muestra purificada (3ml) fue dividida en dos alícuotas de 1.5ml cada una (1.7×10^{-8} moles de proteína) e incubados con 1000 moles y 4000 moles de NAG, respectivamente. Después de 12 horas de incubación los monosacáridos vinil sulfona que no han reaccionado se eliminan por diálisis exhaustiva. Luego las muestras se cromatografian usando una columna Sephadex G-25 y se aislan las fracciones que contienen la proteína. El mismo procedimiento se lleva a cabo para la glicosilación de la apomaghemita con manosa.

Síntesis de 2-etenilsulfinil etil 1-tiol- α -D-manopiranosido: una disolución de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- α -D-manopiranososa^[2] (2.2g, 6.04mmol) en metanol anhidro (20ml) fue adicionada a metóxido sódico (360mg, 6.65mmol) y la reacción mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El material precipitado obtenido fue disuelto en H₂O y neutralizado con Amberlita IR-120H. La resina fue filtrada y la solución resultante empleada directamente sin más tratamiento. Se adicionó SiO₂ (5g) y divinilsulfona (3.54g, 30mmol) y la nueva reacción mezcla agitada a temperatura ambiente durante 30min. La evaporación del solvente dio un crudo que fue purificado por cromatografía en silica gel (CH₂Cl₂:metanol 3:1) para dar el compuesto del título (564mg, 30%) como un sirope.

Síntesis de 2-etenilsulfinil etil 2-acetamido-2-desoxi-1-tio-β-D-glucopiranosido(NAG): una solución de cloruro de 2-acetamido-3,4,6-tri-O-acetil-2-desoxi-α-D-glucopiranosil^[3] y tiourea (2.52g, 33.1mmol) en acetona anhidro (30ml) fue calentada bajo un reflujo durante 4 horas. Después de este tiempo, el volumen de la reacción mezcla fue reducido aproximadamente a la mitad por evaporación a vacío con un ligero calentamiento. Después de agitar durante 30 minutos, se adicionó HCl (5%, 16ml) y H₂O (50ml), secada (Na₂SO₄), filtrada y evaporada. El producto crudo obtenido fue O-acetilado por adición de metóxido sódico (360mg, 6.65mmol) en metanol (20ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución fue neutralizada por adición de Amberlita IR-120H. La resina fue filtrada y la solución resultante usada directamente sin ningún tipo más de tratamiento. Se adicionó SiO₂ (5g) y divinilsulfona (3.54g, 30ml) y la reacción mezclada por agitación durante 30 minutos. La evaporación del solvente dio un crudo que fue purificado por cromatografía en silica gel (CH₂Cl₂: metanol, 4:1) para dar el compuesto del título (930mg, 40%) como un sólido.



NAG-Vinil sulfona



Manosa-Vinil sulfona

Ensayo de afinidad ELISA: se evaluaron la afinidad de NAG con la lectina WGA (Wheat germ agglutinin peroxidasa conjugate) y la manosa con lectina Con A (concanavalin A) mediante el protocolo ELLA tipo ELISA.

Se hacen diluciones seriadas de la muestra conteniendo 20μl de proteína (3.3 μg/μl) en 200 μl de tampón carbonato 0.1M (pH 9.6) que se adicionan en los pocillos

de una placa ELISA y adsorbidos por incubación a 4°C toda la noche. Los pocillos se lavan con 300µl de PBST (3 x 200µl/3 minutos). La presencia de lectina es detectada por la actividad peroxidasa después de parar la reacción con 100µl de H₂SO₄ 2M mediante la incubación a 37°C durante 30 minutos con 200µl 2.2mM 1,2-fenilenediamina dihidroclorídico en 0.1M de tampón citrato pH 5 con 100µl de H₂SO₄ 2M. La cuantificación se hace por medidas de absorbancia a 495nm con un lector de absorbancia sunrise (Tecan).

Las síntesis de los compuestos 2-etenilsulfinil etil 1-tiol-α-D-manopiranosido y 2-etenilsulfinil etil 2-acetamido-2-desoxi-1-tio-β-D-glucopiranosidolas realizó el Dr. Mariano Ortega y el ensayo ELISA el Prof. D. Javier Jaramillo, ambos pertenecientes al grupo de Carbohidratos dirigido por el Profesor D. Francisco Santoyo del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Granada.

INSTRUMENTAL EMPLEADO

Diálisis

La diálisis es un método de purificación, cuyo fundamento se basa en el transporte pasivo de solutos a través de membranas semipermeables, concretamente es el paso de solutos desde una disolución de mayor concentración a otra de menor concentración.

La diálisis es el proceso de separar las moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión y tamaño a través de una membrana semipermeable.

Las membranas de diálisis utilizadas se compraron a Spectrum Laboratories y son del tipo Spectra/Pro dialysis; consisten en una membrana de éster de celulosa con un poro que va desde los 25KDa hasta los 100KDa. Este tipo de bolsas de diálisis son utilizadas para la separación de productos biológicos con alta pureza, como pueden ser proteínas, péptidos, anticuerpos, DNA, etc. También son ampliamente utilizadas para purificación porque eliminan moléculas contaminantes de bajo peso molecular, permiten la eliminación de sales y permiten cambios de soluciones tampones.

La solución impurificada que contiene varios tipos de moléculas se introduce en la bolsa semipermeable de diálisis y se coloca en un envase con una solución tampón o agua bidestilada (milli-Q). Las moléculas lo suficientemente pequeñas

como para pasar a través de los poros (a menudo agua, sales y otras moléculas pequeñas) tienden a moverse hacia adentro o hacia afuera de la bolsa de diálisis en la dirección de la concentración más baja. Aquellas moléculas que poseen un mayor peso molecular (a menudo proteínas, ADN, o polisacáridos) y que por tanto tienen dimensiones mayores al diámetro del poro son retenidas dentro de la bolsa de diálisis. Permitiéndonos así la purificación de la muestra sin pérdida alguna de producto.

Cromatografía por exclusión de tamaño

La cromatografía puede definirse como una técnica que permite la separación de una mezcla de moléculas diferentes presentes en una misma muestra basada en la velocidad de desplazamiento diferencial de los mismos que se establece al ser arrastrados por una fase móvil (líquida o gaseosa) a través de un lecho cromatográfico que contiene la fase estacionaria, la cual puede ser líquida o sólida. Las propiedades de los componentes de una mezcla determinan su movilidad entre sí y con respecto a la fase móvil. La base de la separación cromatográfica será, por tanto, la diferencia en la migración de los mismos.

En la cromatografía de exclusión por tamaño (llamada a veces columna de filtración en gel) la separación se lleva a cabo por diferencias en el tamaño molecular y la habilidad de las diferentes moléculas para penetrar en los poros de la fase estacionaria.

Los elementos básicos de una columna de cromatografía por exclusión de tamaño son la fase estacionaria y la fase móvil:

- La *fase estacionaria*, está formada por un sólido poroso soportado en el interior de una columna de plástico o vidrio. La matriz de la columna está formada por un polímero entrecruzado que puede ser de varios tipos: dextranos con enlaces

cruzados (sephadex), agarosa (sepharose, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Todos estos geles (fase estacionaria) se hallan constituidos por gránulos (partículas) de un material esponjoso hidratado, que contiene poros con un tamaño de diámetro determinado.

· La *fase móvil* se encuentra formada por la solución que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La solución que sale al final de la columna se reemplaza constantemente por nueva solución que se suministra por la parte superior de la columna.

La muestra que se va a separar se coloca en una capa sobre la parte superior de la columna y se permite que lentamente se introduzca en el interior de la matriz sólida mientras se añade nueva solución tampón por la parte superior de la columna. La solución heterogénea forma una banda dentro de la fase móvil que inicialmente corresponde a la anchura de la banda de muestra aplicada sobre la columna. Conforme los solutos a separar migran a través de la columna, su avance se encuentra retardado en diferente grado por las interacciones diferenciales que cada uno de ellos pueda ejercer con la fase estacionaria.

Cuando se hace pasar una mezcla de moléculas de distinto tamaño, a través de una columna de filtración en gel, las moléculas pequeñas penetran en los pequeños conductos que presentan las bolas de gel, donde la velocidad de flujo de solvente es menor. Sin embargo las moléculas grandes, incapaces de penetrar en los pequeños conductos de las bolas de gel se mueven entre ellas, donde la velocidad de flujo de solvente es superior. Como consecuencia, las moléculas de mayor peso molecular son eluidas antes que las de menor peso molecular, es decir, las moléculas eluyen en este tipo de cromatografía por orden decreciente de tamaño molecular.

La cromatografía de exclusión por tamaño se usa generalmente para las separaciones preparativas de macromoléculas de origen biológico, así como para la purificación de polímeros orgánicos sintéticos.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Es una técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico; aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migrarán hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.

Al poner una mezcla de moléculas y aplicar un campo eléctrico, éstas se moverán y deberán ir pasando por la malla del gel (una red tridimensional de fibras cruzadas), por lo que las pequeñas se moverán mejor, más rápidamente. Así, las más pequeñas avanzarán más y las más grandes quedarán cerca del lugar de partida.

La electroforesis nativa se hace en gel de poliacrilamida (PAGE) sin uso de ningún tipo de desnaturizante, para evitar el desensamblaje de la proteína en sus 24 subunidades. Se prepara un gel con dos fases siguiendo el protocolo de Lammeli, que comprende un gel concentrador (Stacking gel) en el que se cargan las muestras [4% de acrilamida 0.125 M, Tris 0.5 M pH 6.8, 0.1% TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), 0.05% de persulfato amónico] y un gel separador (Separating gel) [7,5% de acrilamida 0.375 M, Tris 1.5 M pH 8.8, 0.05% TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina), 0.05% de persulfato amónico]. La electroforesis se corre a 200V durante 1h 30 minutos con polaridad cátodo-ánodo convencional en una cubeta de electroforesis del tipo PROTEAN II xi Cell (BIORAD).

En cada pocillo se cargan 50 µl donde está la muestra diluida en un tampón de carga que contiene 1.0 ml de Tris 0.5 M a pH 6.8, 0.8 ml glicerol al 99%, 0.4 ml de azul de bromofenol 0.05% y 3.8 ml de agua bidestilada.

El gel se tiñe con Azul de Coomassie Brilliant Blue R250 que marca la capa proteica (0.1% del fijador en una mezcla agua/metanol/ácido acético glacial, 40% MeOH, 10% HOAc) durante 30 minutos-1 hora y posteriormente se destiñe con una

solución agua/metanol/ácido acético glacial (40% MeOH, 10% HOAc), se realizan varios cambios de la solución decolorante durante 2 h-3 h.

Espectroscopia Uv-visible

Las medidas de espectroscopia Uv-visible se llevan a cabo en un Espectrofotómetro Thermospectronic UV300. La proteína presenta una banda de absorción muy característica a 280nm, por lo que estas medidas nos permiten monitorizar la proteína en todo momento. Aunque esta no es la única banda de absorción que presenta la proteína en el espectro UV-visible, también posee una banda más ancha y menos definida a 400 nm.

Espectroscopía de absorción atómica (AAS)

Las medidas de absorción atómica se llevan a cabo en un espectrómetro de absorción atómica PERKIN ELMER mod.5100 con una cámara de grafito PERKIN ELMER mod.5100 ZL ZEEMAN pertenecientes al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras usadas para los estudios TEM se preparan depositando una gota de la muestra sobre una rejilla de Cu revestida con carbón y secada al aire y a temperatura ambiente. Sin embargo, para las nanopartículas bimetálicas CoNi y las nanopartículas de Pd(Ar) la rejilla se deja secar en una caja seca para evitar su

oxidación. Las micrografías electrónicas se toman en un Microscopio Electrónico de Transmisión (Philips CM-20HR) a 200 keV.

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)

Los rayos-X son muy útiles para caracterizar los sólidos y sus estructuras. En los fenómenos de difracción (interacción elástica) no hay transferencia de energía entre los átomos y la radiación sino un simple cambio de dirección de la radiación electromagnética incidente. Sin embargo, los rayos-X también son absorbidos por la materia (interacción inelástica) que producen consecuencias como transiciones electrónicas de los niveles internos de los átomos.

El material puede responder de diversas formas a la absorción de rayos-X lo que origina un conjunto de técnicas relacionadas pero que pueden dar información complementaria. (1) Se pueden analizar las energías de los electrones emitidos que constituye la técnica **XPS (X-ray Photo electron Spectroscopy)**; (2) Se pueden analizar la energía de los electrones secundarios emitidos (electrones Auger) lo que da lugar a la técnica **Auger**; (3) Se pueden analizar las energías de los rayos-X emitidos por la muestra que constituye la técnica **XRF (X-Ray Fluorescence)** técnica muy relacionada con **EPMA (Electron Probe Microanalysis)** dónde la fuente de excitación son electrones; (4) se puede analizar el espectro de energías absorbidas por la muestra lo que da lugar a las técnicas **EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure)** y **XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure)**. En la figura 1 se representan los diversos fenómenos que se pueden dar con las técnicas correspondientes, cuando se irradia la muestra con una fuente de rayos-X intensa.

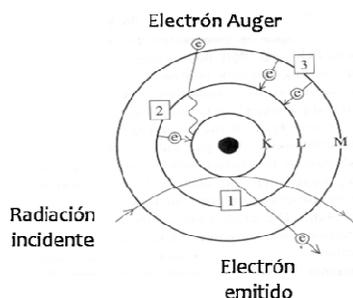


Figura 1. Interacción de los rayos X con un átomo.

En la etapa 1 la radiación incidente es de gran energía lo que posibilita la ionización de un electrón interno. Midiendo la energía cinética del electrón arrancado y la energía de la radiación incidente se puede medir la energía de ligadura (energía de enlace) que depende del átomo que se estudia. Además, un electrón de un nivel superior puede relajarse para ocupar el nivel vacío con la emisión de fotones de energía de los rayos-X, etapa 2. Midiendo la energía de esos fotones tenemos la técnica XRF que permite cuantificar la composición elemental de la muestra. Esos fotones que provienen de la relajación anterior pueden servir para ionizar electrones secundarios. Estos electrones son conocidos como electrones Auger y sus E_c no dependen de la energía de la radiación incidente, a diferencia de los electrones primarios. Los electrones de niveles superiores pueden relajarse para ocupar los niveles vacíos que dejan los electrones Auger, etapa 3. Por último, se puede cuantificar la radiación que se transmite a través de la muestra (la que no se absorbe) y sus variaciones (variaciones en la absorción) originan la técnica XAS.

En la figura 2 se muestra las regiones de un espectro XAS en el que se muestran los diferentes métodos usados en función del rango de energías del fotón (expresada en eV) de rayos X.

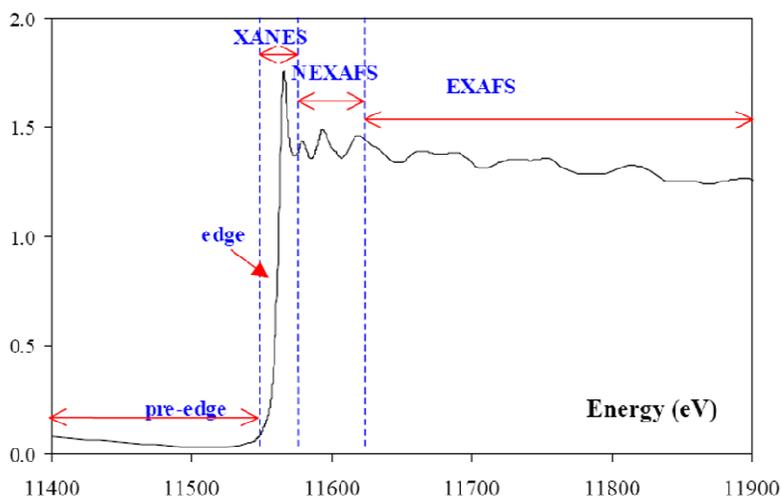


Figura 2. Regiones de un espectro de absorción de rayos X.

EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure): Esta técnica analiza las variaciones en los bordes de absorción de los diferentes elementos. Es una técnica con selectividad elemental y es local. No se necesita orden periódico a larga distancia por lo que se puede utilizar para obtener información estructural en sistemas amorfos o sistemas muy complejos. Desgraciadamente, las señales se superponen y si hay varios tipos de elementos la señal que se obtiene es la suma de todas. Experimentalmente, la señal de absorción se mide en transmisión analizando la relación entre la intensidad incidente y la transmitida mientras va cambiando las energías de las radiaciones que inciden sobre las muestras provenientes de un anillo sincrotrón.

Es un hecho experimental que para un elemento (o muestra dada) la absorción de los rayos-X disminuye cuando la energía de la radiación incidente aumenta. Sin embargo, esta disminución no es monótona sino que hay discontinuidades en el coeficiente de absorción. Estas discontinuidades se denominan bordes de absorción y hay de diferentes capas, p. ej., K, L, M ...

Esta técnica es menos precisa que los métodos difractométricos (errores mayores) sin embargo tiene una ventaja puesto que se puede utilizar para el estudio de gases, líquidos y sólidos amorfos. No se suele aplicar al estudio de compuestos cristalinos pero da muy buena información en vidrios.

XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure): es una técnica muy relacionada con el EXAFS (absorción) pero solo se analiza la zona de absorción justo después del borde y permite principalmente el estudio de los estados de oxidación de los diferentes elementos aunque no tiene gran utilidad para abarcar estudios estructurales. Es muy utilizado para la caracterización de los estados de oxidación de los metales de transición.

Los experimentos de espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) se realizaron en el equipo D04B-XAFS1 de la estación experimental Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brasil. Los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente (alrededor de 22°C) en la transmisión geométrica empleando láminas de metal para los propósitos de calibración. El tratamiento de los datos y el ajuste del modelo se realizaron con el programa ATHENA del paquete IFFEFIT^[4].

Espectroscopía de energía dispersiva de Rayos-X (EDX)

Se han realizado estudios de espectroscopia de energía dispersiva de rayos-X (EDS, EDX o EDXRF) que es una técnica analítica usada para el análisis elemental o la caracterización química de una muestra, ya que los rayos X emitidos son altamente específicos de los elementos que componen la muestra. El uso de un haz de electrones muy finamente focalizado consigue seleccionar un área muy pequeña para ser analizada y el bombardeo de electrones sobre la muestra genera rayos X que son analizados por el espectrómetro de energía dispersiva.

Las medidas de EDX de las muestras de Apoferritina-Gd y Apoferritina-Pd se han hecho en el centro de instrumentación de la Universidad de Granada.

Las medidas de EDX de la muestra de Apoferritina-CoNi se han realizado con un equipo JEOL 2011, que trabaja con una sonda de 0.5nm por lo que permite una alta resolución. Para la realización de la medida, la muestra se deposita en una rejilla de carbón y se le hace un barrido, de modo que se toma un espectro de EDX individual en cada punto.

Espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS)

En la espectroscopia de pérdida de energía de los electrones (EELS, Electron Energy Loss Spectroscopy) un material es expuesto a un haz de electrones con un conocido y estrecho rango de energía cinética. Algunos de estos electrones experimentarán una dispersión inelástica, lo que significa que pierden energía y tienen un camino escaso y desviado al azar. La cantidad de energía perdida puede ser medida por un espectrómetro e interpretada en términos de lo que causa la pérdida de energía.

Las pérdidas de energía se producen cuando los electrones del haz excitan tanto a los electrones de valencia del material, como a los electrones en las capas internas de los átomos de la red. Para que una de estas últimas excitaciones se produzca, es necesario que el haz cruce muy próximo al átomo excitado, dado que la energía de la excitación es característica del átomo.

Un espectro típico de pérdida de energía se puede analizar en tres regiones energéticas:

▪ *Región de pérdida cero (0 eV)*: principalmente contiene a los electrones que aún tienen la energía del haz original y tienen sólo interacción elástica. En especímenes

finos, la intensidad del haz de pérdida cero es alta. No ofrece información analítica del espécimen, sólo ofrece información sobre el espesor de la muestra, por lo que el haz de pérdida cero es a menudo omitido durante la recogida del espectro.

▪ *Región de baja pérdida (5-100 eV)*: aquí, ocurre la excitación de los plasmones y las transiciones inter-bandas. La generación de los plasmones es la interacción inelástica más frecuente de los electrones con la muestra, la intensidad en esta región es relativamente alta. La pérdida de energía de los plasmones es proporcional a la densidad electrónica de las capas externas. Por tanto puede ser utilizada para calcular las fases estructurales del compuesto.

▪ *Región de pérdida del núcleo (< 100 eV)*: ocurren las transiciones desde los estados del núcleo ocupados hacia los estados inocupados sobre el nivel de Fermi. Para la ionización de los átomos, una energía mínima específica, la energía de ionización crítica o ionización umbral, debe ser transferida desde los electrones incidentes a los electrones expulsados de las capas internas (K, L, M,...) lo cual lleva a la ionización umbral en el espectro a pérdidas de energía que son características para un elemento. De esta manera, EELS es complementaria a la espectroscopia de rayos X (EDX), y puede ser también utilizada para los análisis cuali- y cuantitativos de los elementos.

La espectrometría EELS asociada a la microscopía STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy) le aporta la ventaja de la alta resolución espacial.

En nuestro caso en concreto, las medidas se realizaron en un equipo JEOL2010F en colaboración con el grupo del Profesor José J. Calvino de la Universidad de Cádiz. Para las nanopartículas bimetalicas de CoNi se tomó una serie de 29 espectros de EELS con una sonda (haz de electrones) de 0.5nm de ancho y una corriente de 0.1-0.3nA que va escaneando a lo largo de la muestra. Simultáneamente también se recoge para cada punto dentro del área analizada la

intensidad de la señal dispersada de campo oscuro de alto ángulo (HAADF), cuya intensidad es proporcional a Z^2 , es decir, el número atómico, por eso se denominan imágenes de contraste en Z. Este pequeño tiempo de adquisición evita la deriva de la muestra lo que puede eventualmente limitar la resolución espacial de las medidas. Este método fue aplicado a 22 partículas y se obtuvo una alta reproducibilidad de EELS, indicando que las partículas son homogéneas y descartan un posible sistema en el que haya moléculas de apoferritina que contienen cobalto y otras níquel, independientemente.

Las muestras han sido preparadas por la deposición de una gota de la disolución a analizar en una rejilla de carbón y secada en una caja seca para evitar su oxidación.

Microscopía electrónica de alta resolución (HREM): es una técnica importante para la determinación estructural cuantitativa. Para la caracterización de las nanopartículas de óxido de hierro las imágenes HREM fueron tomadas usando un microscopio "field emission gun electron" (JEM2010-FEG) con una resolución espacial de 0,19nm en condiciones de desenfoque Scherzer.

Medidas de magnetismo

Las medidas de susceptibilidad magnética se han realizado en un magnetómetro tipo SQUID (Quantum Desing MPMS-XL-5). Este magnetómetro se utiliza para hacer medidas de susceptibilidad magnética (χ_M) en función de la temperatura y de magnetización (M) en función del campo aplicado (histéresis magnética) de muestras sobre un amplio rango de temperaturas (de 1.9 K a 400 K) y campos magnéticos (de 5 T a -5 T). Además, la gran sensibilidad del magnetómetro

SQUID permite determinar la susceptibilidad magnética con apenas unos miligramos de muestra.

Las muestras previamente necesitan ser liofilizadas para poder llevar a cabo estas medidas de magnetismo. El tratamiento consiste en congelar las muestras en Nitrógeno líquido para a continuación poder liofilizarlas en un liofilizador tipo CRYODOS-50. Las muestras se liofilizan durante 24 horas a una temperatura del condensador de -50°C y bajo un vacío de 7×10^{-2} mbar. Una vez liofilizadas, las muestras se molturan y se pesan, ya que las medidas obtenidas en el SQUID las referimos a una unidad de masa (emu/g).

En esta tesis se han llevado a cabo principalmente dos tipos de medidas magnéticas:

Curvas de magnetización a campo cero (ZFC) y a campo no nulo (FC)

Los datos obtenidos de las medidas de magnetización a campo cero (zero field-cooling) y campo no nulo (field-cooling) evalúan la dependencia de la susceptibilidad magnética de los materiales con la temperatura (figura 3). Esta medida se utiliza normalmente para determinar la llamada temperatura de bloqueo (T_B). Las medidas de magnetización ZFC-FC son llevadas a cabo de la siguiente manera:

Para la curva ZFC la muestra primero se enfría en ausencia de campo magnético externo desde temperatura ambiente hasta una temperatura baja normalmente 2 K. Entonces se aplica un campo magnético y la magnetización en función de la temperatura se mide durante el proceso de calentamiento hasta temperatura ambiente.

La curva FC se obtiene midiendo la magnetización cuando la muestra se enfría en el mismo campo magnético antes aplicado para la ZFC.

En las medidas ZFC los dipolos magnéticos de la muestra están ordenados al azar a temperatura ambiente y permanecen así después del enfriamiento. A baja temperatura los dipolos no tienen energía térmica suficiente para rotar pero cuando se incrementa la temperatura los dipolos magnéticos se orientan en dirección al campo resultando en un incremento del momento magnético. En las medidas FC los dipolos están alineados a temperatura ambiente y son enfriados en este estado. Posteriormente, cuando se hace subir la temperatura, ésta proporciona la energía para que los momentos magnéticos vuelvan a orientarse al azar dando como resultado una disminución del campo. La temperatura que corresponde al punto más alto del pico de la curva ZFC es la temperatura de bloqueo T_B y depende del volumen de la partícula, su anisotropía y su orientación con respecto al campo aplicado. Por debajo de ésta no hay energía térmica suficiente para que los dipolos magnéticos se orienten al azar y el material se comporta como ferromagnético o ferrimagnético. Por encima de ella sí hay suficiente energía térmica, los dipolos se orientan al azar comportándose el material como paramagnético o superparamagnético. Si esta temperatura coincide con la temperatura de separación de las curvas ZFC y FC significa que las partículas son muy homogéneas, pero si no coincide, nos indica que existe una distribución de barreras de energía que puede estar relacionado con tamaño de partícula, cristalinidad, etc. Si cuando nos desplazamos hacia temperaturas más bajas la curva FC no permanece horizontal, sino que sube nos indica que no existe mucha interacción entre las partículas.

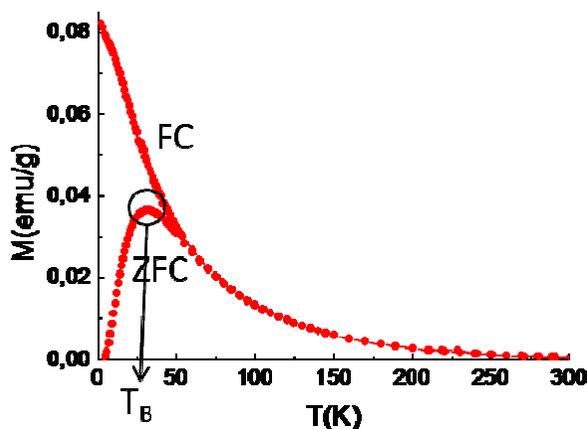


Figura 3. Ejemplo de una curva ZFC-FC.

En nuestro caso las medidas se realizaron en el rango de temperaturas comprendido entre 2-300 K y aplicando un campo constante de 50 G o 0.005 T.

Curva de Histéresis

Las curvas de magnetización indican la variación de la magnetización (también llamada imanación o imantación) cuando se aplica un campo magnético (figura 4). Se basan en métodos inductivos, concretamente en la medida de la tensión inducida en un sistema de bobinas detectoras cuando varía el flujo magnético que la atraviesa según la ley de Faraday.

Los parámetros magnéticos que podemos determinar a partir de estos ciclos son:

- La magnetización a saturación (M_s), que es la magnetización de un material cuando todos sus momentos magnéticos bipolares están alienados a lo largo del campo magnético aplicado.
- La magnetización remante (M_R), que es la parte de la inducción magnética que queda en el núcleo cuando el campo que realizó dicha inducción es nulo, es decir, la magnetización de la muestra a campo magnético cero después de que haya llegado a la M_s .

· La coercitividad magnética (H_c), que es la fuerza del campo magnético necesaria para eliminar la magnetización remanente del material.

La magnetización de saturación es una propiedad intrínseca que depende del tipo de material, mientras que la magnetización remanente, la coercitividad y la susceptibilidad magnética son propiedades extrínsecas, que dependen del campo y de la preparación de la muestra y varían enormemente con el tamaño y la forma de las partículas, la rugosidad superficial, porosidad, cristalinidad, presencia de impurezas, exceso de agua, etc.

Las curvas de magnetización están originadas a partir de barreras de energías locales que surgen como consecuencia de la anisotropía intrínseca de las partículas. Esta anisotropía determinará el mecanismo a través del cual tiene lugar la saturación y posterior inversión de la magnetización, y consecuentemente, los valores de los parámetros característicos de esta curva. Cada curva caracteriza perfectamente a cada tipo de material magnético y nos permite deducir su comportamiento.

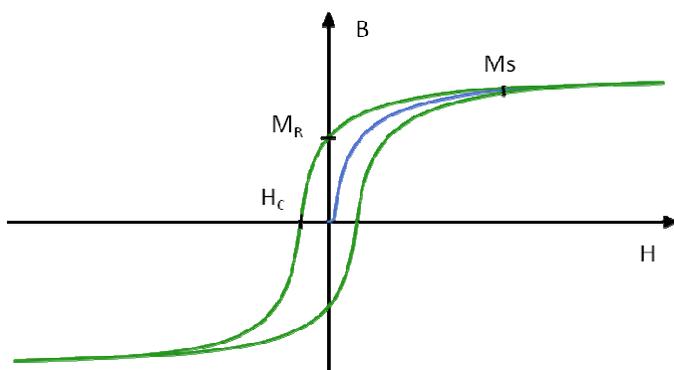


Figura 4. Curva de histéresis típica, dónde se indican H_c , H_s y M_R

En nuestro caso los ciclos de histéresis se obtienen a una temperatura constante de 2K en presencia de un campo magnético variante desde +5 T a -5 T.

Estas medidas se realizan en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Difracción de rayos X en polvo (XRD)

Las medidas de XRD de las nanopartículas de maghemita y de éstas encapsuladas por la apoferritina (apomaghemitas) se han realizado en el centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada en un difractor BRUKER D8 ADVANCE usando radiaciones de $\text{CuK}\alpha$ con unas medidas de 0.08° $2\theta\text{min}^{-1}$.

Las medidas de XRD de las nanopartículas de Pd se han realizado en un difractor BRUKER D8 ADVANCE (con radiación $\text{CuK}\alpha$), un detector sensitivo position Lynxeye, y un monocristal de cuarzo con rangos de medidas de $5^\circ < 2\theta < 85^\circ$ y 0.05° $2\theta \text{ min}^{-1}$). El análisis estructural y microestructural completo se llevó a cabo comparando distintos métodos de modelización: el modelo más convencional "Aproximación de los parámetros fundamentales" (FPA)^[5] y el método basado en la función Debye de dispersión total (DF)^[6]. El método FPA permitió la estimación de la anchura de los picos debida al instrumento (sobre 0.07° , por lo tanto no afecta al análisis microestructural) y de los tamaños medios de partícula por refinamientos de tipo Rietveld. Los tipos de estructuras (incluyendo los no cristalográficos), las distribuciones de tamaños y formas de las nanopartículas fueron determinadas por el método DF^[7]. Para ello, se emplearon modelos atomistas para Pd fcc y combinación múltiple icosaédrico y decaédrico, así como PdO tetragonal. Estas medidas se han realizado en el Instituto de Cristalografía del CNR en Bari, Italia, en colaboración con los doctores N. Masciocchi y A. Guagliardi.

Imagen por resonancia magnética nuclear (MRI)

La imagen de resonancia magnética (MRI) es una técnica de imagen usada principalmente en estudios médicos para obtener imágenes de alta calidad de los órganos internos del cuerpo humano. La técnica de MRI se basa en los principios básicos de la resonancia magnética nuclear (NMR), una técnica espectroscópica usada para obtener información química y física de las moléculas a nivel microscópico.

En la breve historia de dicha técnica hay que mencionar a Felix Bloch y Edward Purcell, quienes obtuvieron el Premio Nobel en 1952, por el descubrimiento del fenómeno de la resonancia magnética en 1946. Desde el año 1950 hasta el año 1970, la NMR se usó en el análisis molecular de propiedades tanto físicas como químicas.

En 1971 Raymond Damadian demostró que los tiempos de relajación en tejidos sanos y tumores eran diferentes, lo que motivó a los científicos a considerar la resonancia magnética para detección de tejidos tumorales^[8]. En 1973 Hounsfield introdujo la técnica de tomografía basada en rayos X (CT). En 1975 Richard Ernst propuso el tratamiento de la imagen obtenida por resonancia magnética mediante el uso de la transformada de Fourier^[9]. Esta técnica es la base de los principios usados en la MRI actual. En 1991, Richard Ernst obtuvo el Premio Nobel en química por dicho descubrimiento. Posteriormente se ha ido mejorando la técnica para disminuir los tiempos de adquisición en la imagen hasta conseguir la obtención de imágenes a tiempo real^[10].

La resonancia magnética (MRI) se encuentra, por tanto, entre las mejores metodologías no invasivas disponibles en la actualidad en la medicina clínica para evaluar la anatomía y la función de los tejidos^[11,12]. Sus principales ventajas son que permite la adquisición rápida de imágenes in vivo y, en condiciones específicas, es posible obtener la resolución de imágenes a nivel de la célula. Esta técnica se basa en

el balance entre el momento magnético extremadamente pequeño en un protón (^1H), y el altísimo número de protones presentes en los tejidos biológicos, lo que conduce a un efecto medible en la presencia de grandes campos magnéticos.

Los núcleos de hidrógeno (protones ^1H), llamados spines nucleares, tienen propiedades magnéticas. Se comportan como pequeños imanes giratorios, representados por vectores. La suma de todos los pequeños campos magnéticos de cada spin se llama magnetización neta o magnetización macroscópica. Normalmente, la dirección de estos vectores se distribuye al azar. Así, la suma de todos los spines da una magnetización neta nula. Dentro de un gran campo magnético externo (llamado B_0), los espines nucleares se alinean con el campo externo. Algunos de los espines se alinean con el campo (en paralelo) y otros se alinean en contra del campo (anti-paralelo). El vector magnético de los protones girando se pueden desglosar en dos componentes ortogonales: longitudinal o componente Z, y un componente transversal, situada en el plano XY. Dentro del campo magnético B_0 , hay más spines alineados con el campo (en paralelo - estado de baja energía) que spines alineados contra el campo (anti-paralelo - estado de alta energía). Debido a este ligero exceso de spines en paralelo, la magnetización neta (magnetización macroscópica) tiene un componente longitudinal (a lo largo del eje Z) alineados con B_0 .

La precesión corresponde a la rotación del componente transversal sobre el eje longitudinal (la precesión es el cambio de la dirección del eje alrededor del objeto que gira. El ejemplo típico es el movimiento que realiza una peonza, o trompo ...). Se define la ecuación de Larmor como el movimiento de precesión de los protones cuando son expuestos a un campo magnético externo B_0 :

$$\omega_0 = \gamma B_0$$

dónde γ es el radio giromagnético, que para los protones ^1H $\gamma = 2,67 \times 10^8 \text{ rad} / \text{s}^{-1} \text{ T}^{-1}$, por lo que en un campo $B_0 = 1 \text{ T}$ la frecuencia de precesión de Larmor corresponde a un campo de radio frecuencia con $\omega_0/2\pi = 42,57 \text{ MHz}$.

La MRI se basa en la capacidad de los núcleos de hidrógeno del agua de alinearse con un movimiento de precesión alrededor de un campo magnético estático aplicado B_0 . La frecuencia de precesión (frecuencia de Larmor) de los protones es proporcional a la intensidad de la fuerza del campo. La precesión de los núcleos de hidrógeno puede ser perturbado por pulsos de radiofrecuencia.

Un pulso de radiofrecuencia que coincide con la frecuencia de precesión afecta el equilibrio de spin: se produce un intercambio de energía y modifica la trayectoria del spin y los hace entrar en coherencia de fase a los protones (spines), por lo que decrece la magnetización longitudinal y aparece la magnetización transversal. El ángulo de inclinación depende de la intensidad, forma de onda y la duración de pulso de radiofrecuencia. El vector de la magnetización transversal está en continuo movimiento con una frecuencia de precesión y emite una corriente eléctrica que es la señal de MRI.

La relajación es el proceso físico dinámico en el que el sistema de spines vuelve al equilibrio (a su estado alineado original) lo que puede ser explotado para dar una imagen. Cuando se apaga el pulso de radiofrecuencia los protones dejan de estar en coherencia de fase y vuelven al estado de menor energía, es decir, decrece la magnetización transversal y se recupera la magnetización longitudinal.

Por tanto la relajación puede desglosarse en:

- Recuperación de la magnetización longitudinal, en consonancia con B_0 , siguiendo una curva exponencial caracterizada por constantes de tiempo T_1 .
- Descomposición de la magnetización transversal, debido a los spines fuera de fase, de acuerdo a una curva exponencial caracterizada por constantes de tiempo T_2 .

La relajación de ambas magnetizaciones T_1 y T_2 dependen del entorno químico y magnético en el que se encuentre el protón.

La magnetización longitudinal se debe a una diferencia en el número de spines en estado paralelo y en estado anti-paralelo. La relajación longitudinal T1 refleja una pérdida de energía, en forma de calor, desde el sistema de spines a la red que los rodea (relajación spin-red), como los spines pasan de un estado de alta energía a un estado de baja energía, la energía de radiofrecuencia se libera de nuevo en la red que la rodea. La relajación en el plano xy es relativamente rápida, y está impulsada por la pérdida de coherencia de fase de los protones en precesión debido a sus interacciones magnéticas entre sí y con otros momentos fluctuantes en el tejido.

La recuperación de la magnetización longitudinal sigue una curva exponencial. La tasa de recuperación se caracteriza por el tiempo tejido-específico constante T1. Después de tiempo T1, la magnetización longitudinal ha regresado al 63% de su valor final. Con una fuerza de 1,5 T del campo, los valores de T1 son alrededor de 200 a 3000 ms. Los valores de T1 son mayores, a mayor fuerza de campo.

La magnetización transversal se debe a los spines que están en coherencia de fase. La relajación transversal T2 resulta de spines fuera de fase. Como los spines se mueven juntos, sus campos magnéticos interactúan (interacción spin-spin), modificando ligeramente su tasa de precesión. Estas interacciones son temporales y aleatorias. Por lo tanto, la relajación spin-spin causa una pérdida acumulada en la fase que resulta en el descenso de la magnetización transversal.

La decadencia de la magnetización transversal está descrita por una curva exponencial, caracterizado por la constante de tiempo T2. Después de tiempo T2, la magnetización transversal ha perdido el 63% de su valor original. T2 es tejido-específico y siempre es inferior a T1. La relajación transversal es más rápida que la relajación longitudinal. Los valores de T2 no están relacionados con la intensidad de campo.

El contraste viene de las diferencias locales que existen en la cinética de relajación a lo largo de los planos longitudinal (tiempo de relajación spin-red T1) y transversal (tiempo de relajación spin-spin T2) del campo magnético principal aplicado a la muestra. En base a esto, el contraste endógeno depende de la naturaleza química y física de los tejidos y, a menudo surge de la variación local en la densidad de protones (la concentración de agua). Cada tipo de protón da una intensidad diferente (un contraste diferente). El tratamiento mediante un software apropiado de los diferentes contraste de los diferentes tipos de protones permite la construcción de un imagen de la zona biológica que sirva para un análisis morfológico y anatómico.

Aunque el contraste inherente de los tejidos puede ser manipulado en MRI de manera mucho más flexible que en otras técnicas de imagen, en muchos casos llevar a cabo un diagnóstico en base a las imágenes requiere el uso de agentes de contrastes. En general, la manipulación del contraste en resonancia magnética aplicando agentes de contraste es usada cuando no se puede cambiar el contraste inherente del tejido y el uso de estas sustancias exógenas o agentes de contraste que alteran la intensidad de la señal para acortar los tiempos de relajación de los núcleos de hidrógeno de los tejidos es esencial para mejorar la sensibilidad y la especificidad de MRI^[13]. Los agentes de contraste se pueden dividir en agentes positivos, porque acortan T1, lo que hace que a nivel local mejoren la señal (puntos brillantes) y como agentes negativos si acortan T2, ya que éstos reducen la señal total o parcialmente (puntos negros).

Durante los últimos 20 años, se ha desarrollado de manera significativa la química de los agentes de contraste para su uso en vivo. Han recibido particular atención los metaloquelatos paramagnéticos, principalmente derivados de gadolinio, que por lo general se comportan como agentes de contraste T1, ya que causan aumento del contraste positivo y proporcionan imágenes más brillantes en el sitio en el que se acumulan. Los protones de las moléculas de H₂O "próximas" al compuesto

paramagnético sienten un efecto de relajación de la magnetización longitudinal mayor que para los restantes protones del medio. El intercambio continuo de las moléculas de H₂O a la esfera de coordinación del Gd (esfera interna) y de sus proximidades (esfera externa) traslada el efecto paramagnético del agente de contraste y genera una señal diferenciada en la zona de influencia (zona donde se acumula el agente de contraste).

Por otra parte, los sistemas de partículas a base de óxido de hierro superparamagnético (SPIO o USPIO) han emergido como agentes de contraste T₂, ya que su principal (aunque no único) efecto es producto de la perturbación magnética que crea en su entorno cuando se aplica un campo magnético externo. Esta heterogeneidad magnética se traduce en un acortamiento de T₂ y por ende en un mayor contraste con respecto a la zona de no influencia. Mayor Magnetización, menor T₂ y más contraste.

La eficacia de un agente de contraste es comúnmente evaluada en términos de sus relaxitvidades r_1 y r_2 que se definen como las tasas a las que los núcleos excitados del disolvente (protones ¹H) se relajan para recuperar su estado de equilibrio inicial. Se puede calcular r_1 y r_2 mediante las siguientes ecuaciones:

$$1/T_1 = 1/T_{1_0} + r_1 C$$

$$1/T_2 = 1/T_{2_0} + r_2 C$$

La relaxitvidad r_1 está relacionado con el proceso de relajación spin-red (T₁), los núcleos excitados que emiten su energía al medio ambiente circundante. Y la relaxitvidad r_2 caracteriza al proceso de la relajación spin-spin (T₂), proceso a través del cual los núcleos excitados intercambian sus energías con un bajo consumo de energía del mismo. El contraste en RMN resulta de la diferencia entre los valores de r_1 y r_2 , y la eficacia de una agente de contraste se basa en la relación r_2/r_1 . Un mejor

agente de contraste para MRI es aquel que aumente r_2 y disminuya r_1 , lo que hace que aumente la capacidad de contraste del agente.

Todos los experimentos de MRI se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Pasquina Marzola de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona (Italia), en un equipo System Biospec Tomograph (Bruker, Karlsruhe, Germany) con un campo fijo de 4.7T y una barra magnética horizontal de 33cm de diámetro (Oxford Ltd, UK) y con una frecuencia de 200MHz. Las muestras de nanopartículas de apomaghemita con diferentes concentraciones de hierro fueron preparadas e insertadas en una bobina jaula de 7,2cm. Los valores del tiempo de relajación transversal T2 de cada muestra fueron medidos usando una secuencia estándar de SPIN-ECHO MULTI-ECHO con los siguientes parámetros: TR/TE= 2000/15ms, número de echo=8, FOV= 4x8 cm², tamaño de la matriz (MTX) = 256x128 y espesor de la capa =2mm.

Los experimentos *in vivo* fueron llevados a cabo para la caracterización de las muestras de apomaghemita como agentes de contraste y comparadas éstas con el Endorem® mediante el mapeo de un volumen sanguíneo cerebral (CBV) y del flujo sanguíneo cerebral (CBF). Se pueden hacer evaluaciones cuantitativas de CBF y CBV mediante el método "Bolus Tracking". El CBV regional puede ser medido usando una "blood pool" de los agentes de contraste, a la concentración en estado estacionario del agente de contraste en la sangre, mediante la adquisición de las imágenes T2* antes y después de la inyección del agente de contraste y usando la siguiente ecuación:

$$\bullet \text{ En } rCBV = k \cdot \ln (SI \text{ pre} / SI \text{ post})$$

donde k es una constante en función de parámetros instrumentales, SI pre y SI post son los valores de la intensidad de señal del cerebro antes y después de la inyección del agente del contraste

Los experimentos *in vivo* se han realizado en un total de 15 ratones Balb-c con un peso de 20g, exactamente se emplearon 5 animales para cada agente de contraste. Los agentes de contraste fueron administrados a través de la vena de la cola en una dosis de 23.5mg Fe/Kg.

Los ratones se anestesian de forma gaseosa (70% N₂ y 30% O₂ con un porcentaje inicial del 5% de isoflurano que actúa como anestésico), una vez que el ratón está anestesiado la dosis de isoflurano (Fe₃C-CHCl-OCHF₂) se disminuye a 0.5-1.5% y se mantiene así durante todo el experimento. Las imágenes se obtienen a través de una bobina superficial (figura 9) optimizada para la adquisición de datos a nivel del cerebro del ratón (bobina de jaula, 72 mm ID). Durante el experimento se monitoriza la respiración del ratón, que debe comprenderse entre 20-30 respiraciones/min.

Las imágenes de First-passage fueron adquiridas usando una secuencia Echo Planar Imaging (EPI) con los siguientes parámetros: tamaño de la matriz (MTX)= 128x128, FOV= 25x25mm², espesor de la capa=2mm, 4 EPI shots, TR/TE= 25/6.5 ms, NEX=4 (con un tiempo de resolución de 5 imágenes/s). Las imágenes fueron continuamente adquiridas durante 60s. Imágenes de estado estacionario fueron adquiridas antes y después de 2 minutos de la inyección del agente de contraste usando la secuencia gradiente Echo con los siguientes parámetros: TR/TE=130/6ms, ángulo=30°, tamaño de la matriz (MTX) =256x256, FOV=25x25mm² (correspondiendo a 0.098x0.098mm² en el plano de resolución), espesor de la capa =1mm, NEX=4. El tiempo de adquisición de cada imagen fue de 133s. Como referencia externa, se usó un estándar de Gd, una disolución salina de 1mM Gd-DTPA, para normalizar las posibles derivas del espectrómetro durante la adquisición de imágenes.

Relaxometría de campo ciclado RMN

La relaxometría de campo ciclado RMN^[14-16] es la técnica preferida para la obtención de la frecuencia (o campo magnético) dependiente de los tiempos de relajación (o equivalente de las tasas de relajación). Por lo tanto, también se refiere a la dispersión de la relajación magnética nuclear (MNRD). El término "Relaxometría" se utiliza normalmente en el contexto de las mediciones de tiempos de relajación spin-red en general. La relajación transversal y los efectos debidos a acoplamientos dipolares residuales también pueden ser empleados como fuente de información complementaria de utilidad. La relaxometría de campo ciclado RMN permite medir la dispersión de la relajación espín-red en un amplio intervalo de frecuencias de Larmor (típicamente en un rango que va desde unos pocos kHz hasta varios MHz).

El principio de un experimento típico de relaxometría de campo ciclado NMR se ilustra en la figura 5. La muestra está polarizada en un campo magnético con una densidad de flujo de B_p (campo de polarización) tan alto como sea técnicamente factible. El proceso de relajación se lleva a cabo en un intervalo de bajo campo variado con respecto a la longitud y densidad de flujo B_r . La señal que queda después de este intervalo de relajación se detecta en un campo de densidad de flujo fijo B_d nuevamente lo más alto posible. Es decir, las señales se adquieren con una radiofrecuencia (RF) ajustada a una frecuencia predeterminada, independientemente del campo de relajación elegido. Para la detección se registra el decaimiento de inducción libre después, ya sea de un simple pulso de RF de 90° o de un spin echo producido por una secuencia de dos o más pulsos. Luego, un prolongado retraso de reciclaje para la restauración del equilibrio térmico y la polarización sigue hasta que el siguiente ciclo comience.

Aunque el objetivo fundamental de la relaxometría con campo ciclado es obtener información de la densidad espectral de las fluctuaciones de las interacciones de espín en un rango de frecuencias tan alto como sea posible también

permite estudiar, en un intervalo extenso de temperaturas, la dinámica de sistemas acoplados tales como cristales líquidos, polímeros, biomoléculas, electrólitos sólidos, y en general sólidos con movimientos lentos. Esta técnica es una de las que más información proporcionan sobre los movimientos moleculares debido a la amplia gama de frecuencias que puede barrer con respecto a otras técnicas de RMN.

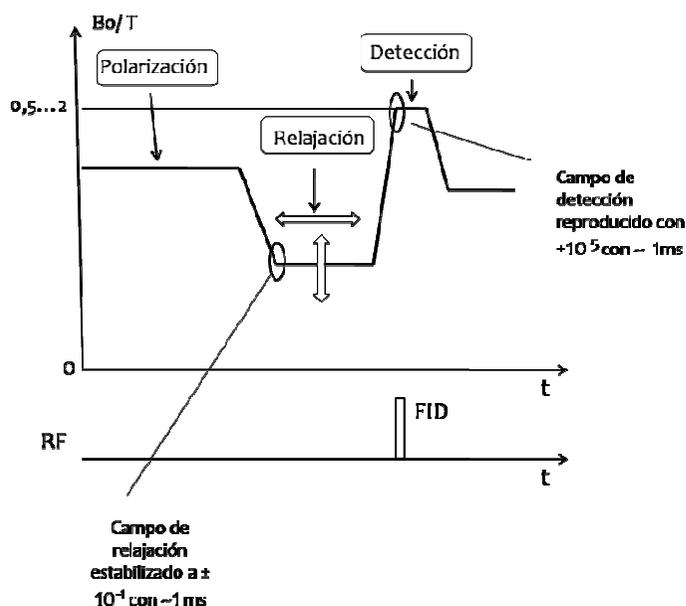


Figura 5. Representación esquemática de un ciclo típico de la B_0 campo magnético principal empleado con relaxometría de campo ciclado RMN.

Los datos NMR de la muestra Apoferritina-Gd fueron obtenidos por un relaxómetro Smartracer® Stelar (usando la técnica de campo de ciclado rápido) de $10 \text{ kHz} \leq \nu \leq 10 \text{ MHz}$, de un SpinMaster Stelar y un espectrómetro de Apolo-Tecmag de $\nu > 10 \text{ MHz}$. Se utilizaron radiofrecuencias de excitación estándar como CPMG (T2) y recuperación de saturación (T1). La eficiencia de un agente de contraste puede ser definida mediante la determinación, a diferentes frecuencias de NMR, de las relaxitvidades $r_{1,2}$ de los ^1H nucleares definido por^[17,18]: $r_i = [(1/T_i)_{\text{meas}} - (1/T_i)_{\text{dia}}] / c$, ($i=1$

longitudinal y $i=2$ transversal), donde $(1/T_i)_{\text{meas}}$ es la tasa de relajación nuclear de la muestra (en agua) con concentración $c=0.139$ mM (Gd(III) obtenido por ICP) del centro magnético y $(1/T_i)_{\text{dia}}$ es la tasa de relajación nuclear de los núcleos de ^1H del solvente diamagnético (en nuestro caso agua). El pH de la muestras usado en los experimentos de RMN fue 7.4-7.7.

Estas medidas de relaxometría fueron realizadas en el Istituto di Fisiologia Generale e Chimica Biologica "G.Esposito" de la Università degli studi di Milano (Italia), en colaboración con el Prof. D. Alessandro Lascialfari.

Imagen óptica (OI)

Es una técnica de imagen que usa como fuente de contraste la fluorescencia, bioluminiscencia, absorción o reflexión del agente de contraste. Es una técnica no invasiva que no genera fuertes preocupaciones de seguridad en el individuo, al igual que las demás modalidades de imagen médica^[19]. Por ello la imagen óptica representa un campo en rápida expansión, con aplicaciones directas en la farmacología, biología molecular y celular, y en el diagnóstico.

Mientras que la luz en el rango visible se utiliza rutinariamente para microscopía intravital, las imágenes de los tejidos más profundos (> 500 micras a cm) requiere el uso de luz cercana al infrarrojo, como la hemoglobina y el agua, los absorbentes principales de la luz visible e infrarrojo, respectivamente, tienen su nivel más bajo de coeficiente de absorción en la región NIR (650-900 nm)^[20]. Las ventajas de la imagen en la región NIR (700-1100 nm) son numerosas: la ausencia o la reducción significativa de la absorción del fondo, la fluorescencia y dispersión de la luz, junto con una alta sensibilidad, la disponibilidad de fuentes de bajo costo y la versatilidad de las diferentes investigaciones publicadas.

Las sondas y etiquetas fluorescentes son una importante herramienta en la imagen óptica. Una gran cantidad de fluoróforos que emiten cerca del infrarrojo (NIR) se han empleado para obtener las imágenes *in vivo*, entre los cuales podemos citar, Cy5.5, Cy7, Alexa Fluor... Los quantum dots han generado un gran interés en este campo frente a los fluoróforos orgánicos debido a su alta fotoestabilidad y gran eficiencia cuántica^[21].

Los experimentos de imagen óptica se han realizado en colaboración con el grupo del Dr. Federico Boschi de la Facultad de Medicina de la Universidad de Verona, en un equipo Vivo VisionSystems, IVIS[®] 200 Series (XenogenCorporation, Alameda USA), constituido por una cámara negra con sensor de profundidad y retro iluminación CCD 1 (2.7 x 2.7 cm, -90°C) mediante una lámpara 150W y 3250° Kelvin, con una resolución mínima de 20 μm (dimensión del píxel 13.5 μm , pixeles de la imagen 2048 x 2048), con una eficiencia cuántica superior al 85% en la región comprendida entre 500-700 nm, al movernos a la zona superior del espectro UV-Vis llegando al IR, 400-900 nm, la eficiencia cuántica se disminuye al 30%. El IVIS 200 puede trabajar en dos modalidades diferentes: fluorescencia y bioluminiscencia y está equipado con un conjunto de filtros de excitación: GFP (445-490 nm), DsRed (500-550 nm), Cy5.5 (615-665 nm), ICG background (665-695 nm) y ICG (710-760 nm), y un filtro de emisión ICG (810-875).

Las imágenes se adquirieron y analizaron con el software Living Image 2.6 y Living Image 3D (XenogenCorporation, Alameda USA).

Para llevar a cabo estos experimentos *in vivo* se suministraron (10 μl /1 g ratón de Apomag-QD800, 40 pM de una disolución de QD800). Se adquirió una imagen control inicial previa al suministro del agente de contraste y tras el suministro del agente se tomaron imágenes con el mismo protocolo que la serie control durante las 3h sucesivas al suministro del compuesto Apomag-QD800. El mismo procedimiento se lleva a cabo para el compuesto Apomag-AF790.

El protocolo seguido para la adquisición de las imágenes de Fluorescencia fue: tiempo de exposición = 1 segundo (tiempo que se está excitando la muestra); binning = 8 (parámetro que relaciona la sensibilidad con la precisión de la imagen); f/stop = 2 (apertura del objetivo, cromador); filtros de excitación = GFP, DsRed, Cy5.5, ICGbkg, ICG; filtros de emisión = ICG; FOV = 12.8 cm; altura del animal = 1.5 cm. Las fotografías se tomaron con un tiempo de exposición de 0.2 seg; binning = 4; f/stop = 8.

Bibliografía:

- 1) R. Massart; *IEE Trans. Magn.* **1981**, MAG-17, 1247-1248.
- 2) Matta L. L.; Girotra R. N.; Barlow J. J.; *Carbohydr. Res.* **1975**, 43, 101.
- 3) Horton D.; *Methods in Carbohydrate Chemistry*, **1972**, 6, 282.
- 4) Newville M. J.; *Synchrotron Radiat.* **2001**, 8, 322.
- 5) Cheary R. W. and Coelho A. A.; *J. Appl. Crystallogr.* **1992**, 25, 109
- 6) Debye P.; *Ann. Phys. Lpz.* **1915**, 46, 809
- 7) (a) Cervellino A., Giannini C. and Guagliardi A.; *J. Appl. Crystallogr.* **2003**, 36, 1148 (b) Cervellino A., Giannini C., Guagliardi A. and Zanchet D.; *Eur. Phys. J. B.* **2004**, 41, 485 (c) Giannini C., Cervellino A., Guagliardi A., Gozzo F., Zanchet D., Rocha T. and Ladisa M. Z.; *Kristallogr. S.* **2007**, 26, 105 (d) Cozzoli P. D. et al.; *NanoLett.* **2006**, 6, 1966
- 8) R.V. Damadian; *Science*, **1971**, 171, 1151.
- 9) A. Kumar, D. Welti, R. R. Ernst.; *J. Magn. Reson.* **1975**, 18, 69-83. *Naturwissenschaften*, **1975**, 62, 34.
- 10) B. Chapman, R. Turner, R. J. Ordidge, M. Doyle, M. Cawley, R. Coxon, P. Glover, P. Mansfield.; *Magn. Reson. Med.* **1987**, 5, 246-254.
- 11) R. Kimmich, Bull.; *Magn. Reson.* **1980**, 1, 195.
- 12) F. Noack; *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1986**, 18, 171.
- 13) S.H. Koenig, R.D. Brown III, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*
- 14) R. Kimmich, Bull.; *Magn. Reson.* **1980**, 1, 195.

- 15) F. Noack; Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. **1986**, 18, 171.
- 16) S.H. Koenig, R.D. Brown III, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.
- 17) *The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, ed. A. E. Merbach and E. Toth; Wiley, New York, **2001**.
- 18) S. Aime, M. Botta, M. Fasano, S. Geninatti Crich and E. Terreno; *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, 321, 185–186; (b) S. Aime, L. Frullano and S. G. Crish; *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2002**, 41, 1017.
- 19) Weissleder R., Mahmood U.; *Radiology*, **2001**, 219, 316-333.
- 20) Harry L. Osterman and Amy Schutz-Geschwender. *LI-COR Biosciences*, **2007**.
- 21) Olive D.M., Kovar J.L., Simpson M.A., Schutz-Geschwender A.; *Analytical Biochemistry*, **2007**, 367, 1-12.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1. Nanopartículas magnéticas encapsuladas en la ferritina:

Como una extensión de un método previamente reportado por nuestro grupo de investigación, es posible preparar nanopartículas magnéticas de sistemas más complejos: oxihidróxido de Gd(III), bimetálicas de metales ferromagnéticos Co_xNi_y y Pd^0 .

1.1. Las nanopartículas de óxido-hidróxido de Gd(III) presentan propiedades singulares y extraordinarias para ser potencialmente utilizadas como agentes de contraste en MRI: altos valores de r_1 y r_2 (muy por encima de los de fármacos en el mercado) y además su contraste positivo o negativo puede ser modulado por control del campo magnético externo. Sin embargo, ensayos *in vivo* ponen de manifiesto que su toxicidad, probablemente consecuencia de la liberación de Gd(III) al torrente sanguíneo, impide su utilización en la presente formulación.

1.2. Es posible utilizar la cavidad de la ferritina para preparar nanopartículas heterobimetálicas en las que se puede controlar la cantidad de cada uno de los metales. En particular, se han preparado nanopartículas de CoNi con diferente estequiometría, presentando todas ellas comportamiento superparamagnético con valores de la temperatura de bloqueo en el

rango 11-80K. Estas partículas se oxidan parcialmente sin la aparición de fenómenos de interacción de canje entre la capa de óxido antiferromagnético y el metal ferromagnético, lo que revierte en un descenso importante de su magnetización/g y por ende en sus aplicaciones biomédicas.

1.3. Se han preparado nanopartículas de Pd que muestran comportamiento ferromagnético a temperatura ambiente. Este es uno de los escasos ejemplos que existen en bibliografía de nanopartículas con magnetización espontánea a temperatura ambiente preparadas a partir de átomos de Pd, estrictamente diamagnéticos.

2. Apomaghemitas: nuevos agentes de contraste en MRI.

Haciendo uso del conocido proceso por el cual la apoferritina se disocia en sus 24 subunidades a pH ácido, para reautoasociarse a pH básico, se ha logrado encapsular nanopartículas preformadas de maghemita de 4 y 6 nm.

2.1. Del estudio *in vitro* de estos compuestos se obtuvieron valores de r_2 de 68.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ y 102.0 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para Apomag-4 y Apomag-6, respectivamente. Hay que señalar que el valor de r_2 para el fármaco ENDOREM® es de 94.8 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, lo que sugiere que ambas nanopartículas (especialmente las de 6nm) podrían generar contrastes de MRI explotables para el estudio anatómico-morfológico del tejido donde se acumulen.

2.2. El estudio de MRI *in vivo* pone de manifiesto que las nanopartículas Apomag-4 y Apomag-6 se acumulan preferencialmente en el hígado, generando un contraste sensiblemente mayor al provocado por

ENDOREM[®], un fármaco que precisamente se desarrolló para el estudio de patologías hepáticas.

- 2.3. El proceso de biodegradación de las nanopartículas Apomag-4 y Apomag-6 es extremadamente lento (más de 15 y 30 días, respectivamente) si lo comparamos con el sufrido por otras nanopartículas que están en el mercado: ENDOREM[®] (2 días) y RESOVIST[®] (6 días). Estos resultados ponen de manifiesto que Apomag-4 y Apomag-6 representan una nueva generación de nanopartículas superparamagnéticas con parámetros idóneos para su uso como agentes de contraste MRI de hígado de “largo plazo”, lo que permite la adquisición de imágenes MRI de forma prolongada en el tiempo con una primera y única inyección.

3. Nanopartículas bifuncionales.

Es posible manipular tanto el mineral nativo de la ferritina como su cubierta proteica para incorporar nuevas especies químicas que añadan una funcionalidad nueva: emisión gamma, fluorescencia o vectorización de la nanopartícula hacia un tejido adecuado

- 3.1. Es posible dopar el mineral nativo de la ferritina con cationes u oxoaniones metálicos radioactivos. Concretamente se han logrado preparar por una lado ferritinas que contienen entre 10-20 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ y por otro, ferritinas con alrededor de 30 átomos de Cu por partícula. Ambos sistemas sientan las bases del desarrollo de nuevos agentes de bioimagen por gammagrafía (SPECT).
- 3.2. Se han preparado dos tipos de nanoestructuras magneto-fluorescentes mediante funcionalización a nivel de la capa proteica de las nanopartículas de Apomaghemitas: bien con un fluoróforo clásico (Alexa Flúor 790) o bien con un Quantum dot (QD800). Los estudios de Imagen

Optica *in vivo* de estas dos nanoestructuras ponen de manifiesto que una fracción importante de las mismas se acumula en hígado, lo que abre la posibilidad de que ambas puedan ser utilizadas como agentes bimodales MRI/OI para patologías de hígado.

3.3. Las nanopartículas magnéticas de Apomaghemitas pueden ser funcionalizadas con una molécula que sirva de “targeting ligand” para dirigir la nanopartícula a un tejido específico. En este sentido, se ha demostrado la funcionalización de estas Apomaghemitas con dos carbohidratos (NGA y D-manosa). Estos carbohidratos son reconocidos de forma específica por diferentes lectinas presentes en diferentes tejidos biológicos, de tal forma que esta vía permite la preparación de una librería de nanopartículas magnéticas que puedan acumularse en diferentes tejidos, mediante elección adecuada del carbohidrato.

CONCLUSIONS

From the results obtained in this PhD thesis we can conclude:

1. Apoferritin-Encapsulated Magnetic Nanoparticles:

As an extension of a method previously reported by our research group, it is possible to prepare magnetic nanoparticles of more complex systems such as Gd oxyhydroxide, bimetallic CoxNiy and Pd nanoparticles.

1.1. The oxide-hydroxide nanoparticles of Gd (III) exhibit unique properties and could be potentially used as contrast agents in MRI: their longitudinal and transverse relaxivities are much higher than those of Gd-based MRI contrast agents. Moreover, by monitoring the frequency our sample changes drastically the r_2 / r_1 ratio thus giving the possibility to tune the response in terms of image contrast. However, in vivo tests show that their toxicity, probably due to the release of Gd (III) into the bloodstream, prevents their use in the present formulation.

1.2. We used the apoferritin protein, for the synthesis of monodisperse CoxNiy nanoparticles of variable composition. The CoxNiy series prepared in this way were structural and magnetically characterized, the resulting magnetic properties varying accordingly with composition with blocking temperatures varying in the range 11-80K. Upon oxidation CoxNiy decreased superparamagnetic blocking temperatures (T_B), coercivity (H_C) and no exchange bias shift (H_{EB}) is observed. Probably no proper core-shell structure formation, poor crystallinity and the

presence of Co_3O_4 instead of CoO oxide are the responsible for a weak ferromagnetic/antiferromagnetic (FM/AFM) interface coupling. The significant decrease in their magnetization /g prevented their use in biomedical applications.

1.3. We have prepared Pd nanoparticles that show ferromagnetic behavior at room temperature. This is one of the few examples in literature of nanoparticles showing spontaneous magnetization at room temperature based on Pd atoms, which are strictly diamagnetic.

2. Apomaghemites: new MRI contrast agents.

We have shown that the pH-driven assembly-disassembly process that occurs in the apoferritin protein is effective for the encapsulation of maghemite nanoparticles of different sizes: 4 and 6 nm.

2.1. In vitro studies of these compounds showed r_2 relaxivity values of 68.5 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 102.0 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for Apomag-4 and Apomag-6 and 94.8 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ for the commercial drug ENDOREM[®]. The r_2 values as well as the *in vivo* pre-contrast and post-contrast T_2^* - weighted images suggested that our systems could be used as perspective superparamagnetic contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI).

2.2. The *in vivo* biodistribution study shows that Apomag-4 and Apomag-6 nanoparticles, preferentially accumulate at the liver, resulting in a significantly higher contrast in MRI contrast as compared with ENDOREM[®], a drug that was developed for the study of liver pathologies.

2.3. The process of biodegradation of the Apomag-4 and Apomag-6 nanoparticles is extremely slow (more than 15 and 30 days, respectively) when compared to that suffered by other nanoparticles that are currently marketed: ENDOREM[®] (2 days) and RESOVIST[®] (6 days). These results show that Apomag-4 and

Apomag-6 represent a new generation of superparamagnetic nanoparticles with parameters suitable for their use as MRI contrast agents of "long term" in liver, which would allow the acquisition of MRI images for a long period of time with a single injection.

3. Bifunctional nanoparticles.

It is possible to manipulate both native ferritin core and its protein shell to incorporate new chemical species that add new functionalities: gamma emission, fluorescence or "active targeting" such as a targeting molecule for a desired receptor.

3.1. It is possible to dope the native mineral ferritin with radioactive oxoanions or cations. In particular we have prepared ferritins containing 10-20 ^{99m}Tc atoms and ferritins with 30 Cu atoms per particle. Both systems provides the basis for the development of new agents for bioimaging by scintigraphy (SPECT).

3.2. We have prepared two types of magneto-fluorescent nanostructures by functionalization of the Apomaghemites: we have used either classic fluorophore (Alexa Fluor 790) or Quantum dot (QD800). In vivo Optical Imaging studies of these two nanostructures point out that a substantial fraction of them accumulate at the liver, which opens the possibility to used them as MRI / OI bimodal probes for liver diseases.

3.3. Apomaghemites magnetic nanoparticles can be functionalized with a targeting ligand to drive the nanoparticles to a specific tissue. In this sense, we have demonstrated the functionalization of apomaghemites with two carbohydrates (NGA and D-mannose). The carbohydrate-functionalized Apomaghemite nanoparticles retained their recognition abilities, as demonstrated by the strong affinity with their corresponding lectins, present at different biological tissues. This functionalization

route opens up a the possibility for the preparation of a library of targeted magnetic nanoparticles.

ANEXOS

Se han derivado los siguientes artículos a partir del trabajo de esta tesis:

- Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles.

Natividad Gálvez; Fernández Belén; **Valero Elsa**; Sánchez Purificación; Cuesta Rafael and Domínguez-Vera José M.

Comptes Rendus Chimie. **2008**, 11, (10), 1207-1212.

- MRI relaxation properties of water-soluble apoferritin-encapsulated gadolinium oxide-hydroxide nanoparticles.

Purificación Sánchez; **Elsa Valero**; Natividad Gálvez; José M. Domínguez-Vera; Massimo Marinone; Giulio Poletti; Maurizio Cortic and Alessandro Lascialfari.

Dalton Trans., **2009**, 800–804.

- A Bioinspired Approach to the Synthesis of Bimetallic CoNi Nanoparticles.

Natividad Gálvez; **Elsa Valero**; Marcelo Ceolín; Susana Trasobares; Miguel López-Haro; José J. Calvino and José M. Domínguez-Vera.

Inorg. Chem. **2010**, 49, 1705–1711.

- Structural and magnetic characterization of Pd nanoparticles encapsulated in Apoferritin.

Natividad Gálvez; **Elsa Valero**; José M. Domínguez-Vera; Norberto Masciocchi; Antonietta Guagliardi; Miguel Clemente-León and Eugenio Coronado.

Nanotechnology, **2010**, 21(27), 274017.

- Magnetic Nanoparticles-Templated Assembly of Protein Subunits: A New Platform for Carbohydrate-Based MRI Nanoprobes.

Elsa Valero; Stefano Tambalo; Pasquina Marzola; Mariano Ortega-Muñoz; F. Javier López-Jaramillo; Francisco Santoyo-González; Juan de Dios López; Juan J. Delgado; José J. Calvino; Rafael Cuesta; José M. Domínguez-Vera and Natividad Gálvez.

J. Am. Chem. Soc. 2011, en prensa: [dx.doi.org/10.1021/ja110014p](https://doi.org/10.1021/ja110014p)

Full paper / Mémoire

Apoferritin as a nanoreactor for preparing metallic nanoparticles

Natividad Gálvez^{a,*}, Belen Fernandez^a, Elsa Valero^a, Purificación Sánchez^a,
Rafael Cuesta^b, José M. Domínguez-Vera^{a,*}

^a Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Avda Fuentenueva S.N., 18071 Granada, Spain

^b Departamento de Química Inorgánica y Orgánica, E.P.S. de Linares, Universidad de Jaen, 23700 Linares, Spain

Received 25 March 2008; accepted after revision 15 September 2008

Available online 29 October 2008

Abstract

Metal (Cu, Co, Ni and Ag) nanoparticles have been prepared within the apoferritin cavity using M^{II}-loaded apoferritin as a chemically and spatially confined environment for their construction. The protein shell prevents bulk aggregation of the metal particles, rendering them water soluble. Optical Ag and Cu nanoparticles showed characteristic surface plasmon resonance whereas magnetic Co and Ni particles confirmed the expected superparamagnetic behavior. *To cite this article: N. Gálvez et al., C. R. Chimie 11 (2008).*

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

On prépare des nanoparticules métalliques (Cu, Co, Ni and Ag) dans la cavité de l'apoferritine. Pour cela on utilise l'assemblé l'apoferritine chargée en ion M^{II} comme environnement chimique et spatial. La couche protéique empêche l'agrégation des nanoparticules et les rend solubles dans l'eau. Les propriétés optiques de nanoparticules d'argent et de cuivre montrent la bande de résonance de plasmon de surface caractéristique de ces métaux, tandis que les nanoparticules de cobalt et de nickel présentent le comportement superparamagnétique attendu. *Pour citer cet article : N. Gálvez et al., C. R. Chimie 11 (2008).*

© 2008 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Superparamagnetic behavior; Apoferritin; Apoferritin-encapsulated metallic nanoparticles

Mots-clés : Comportement superparamagnétique ; Apoferritine ; Nanoparticules métalliques dedans l'apoferritine

1. Introduction

In the last years, considerable research efforts have been focused on the preparation of water soluble magnetic nanoparticles for their use in biomedical

applications as contrast agents in Magnetic Resonance Imaging, drug delivery and hyperthermic treatment of tumors [1,2]. Numerous physical and chemical methods have been employed to produce magnetic nanoparticles [3] focusing on the tight control of particle size and shape. Because of the strong dependence of the magnetic properties on particle size and shape at the nanometer scale, methods yielding uniformly sized and shaped nanoparticles became

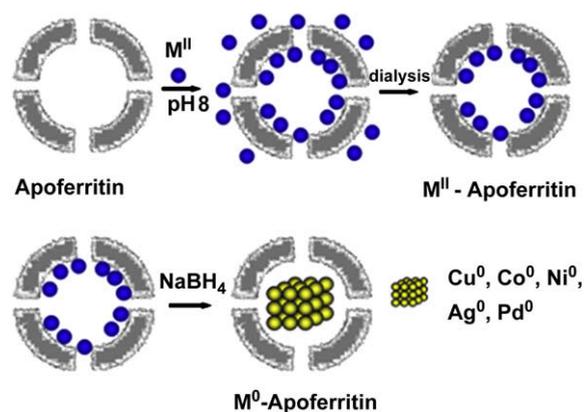
* Corresponding authors.

E-mail address: ngalvez@ugr.es (N. Gálvez).

extremely important. One possible route for obtaining non-aggregated water soluble metallic nanoparticles is the use of a preorganized molecular matrix as a chemical and spatial nanocage for their construction. A typical example of this type of molecule is the iron storage oligomeric protein apoferritin [4] considered as a model for other nanocavity-containing macromolecules such as virus capsids [5]. Apoferritin consists of a spherical protein shell composed of 24 subunits surrounding an aqueous cavity with a diameter of about 8 nm [6]. Channels are generated by the multi-subunit construction of the apoferritin shell. Eight hydrophilic channels of about 4 Å allow the passage of metal ions and molecules of sufficiently small size into the cavity of the protein [7].

The first approach to produce apoferritin-encapsulated metallic nanoparticles was the use of the apoferritin cavity for biomimetic oxidative hydrolysis reactions, producing apoferritins reconstituted with non-native inorganic compounds, usually in the form of oxides or oxyhydroxides [8]. A more recent approach is based on the high affinity of some metal ions for the apoferritin cavity [9] and on the capacity of these bonded metal ions to react with an appropriate reagent to produce a metallic particle, constrained to the size of the cavity [11]. Apoferritin has been reported to bind metal ions in its cavity at specific sites, with stoichiometric binding not higher than 60 atoms per apoferritin at pH 7.4 [9]. However, the number of metal ions strongly increases when working at higher pH. For example, when horse spleen apoferritin is treated with Cu(II), Co(II), Ni(II) or Ag(I) and the pH is dynamically adjusted to 8, the number of metal ions per apoferritin reaches values of about 300. Douglas and Ripoll [10] calculated the electrostatic potential in ferritin and found a negative potential gradient directed towards the cavity of the protein supporting the idea of positive ions encapsulation. These encapsulated metal(II)-apoferritins are susceptible of reacting with an appropriate reductant to give rise to the nucleation and growth of a new metal(0)-apoferritin nanoparticle [11]. This last method, therefore, has afforded a wide range of zero-valent metal nanoparticles. The advantage of our procedure lies in the fact that we succeeded in isolating the metal(II) ions-loaded apoferritin species (M^{II} -Apoferritin, see Scheme 1), which, in a second step, can act as nanoprecursor for the preparation of zero-valent metal apoferritin-encapsulated nanoparticles, avoiding any precipitation outside the apoferritin protein.

Recently, [12] we showed a thorough X-ray near edge structure (XANES) spectroscopy study of the intermediate species (Cu^{II} -Apoferritin) as well as the



Scheme 1. Schematic representation of the preparation of metallic nanoparticles.

final product Cu^0 -Apoferritin which demonstrated that we isolated an Cu-oxide/hydroxide apoferritin species that transformed completely to zero-valent metallic copper apoferritin after reduction with $NaBH_4$.

The aim of this article is to give an overview of the metal nanoparticles preparation method developed in our group.

2. Results and discussion

Apoferritin (Sigma–Aldrich) and M(I) or M(II) were incubated at pH 8 for 24 h. The apoferritin-containing fractions were isolated by G-25 Sephadex chromatography. The M(I) or M(II)-Apoferritin fractions were then monitored by UV–vis spectroscopy at 280 nm and metal determined by atomic absorption spectroscopy (see Section 3). Every collected fraction was added to a $NaBH_4$ solution and then, the apoferritin and metal concentration were measured again, the metal concentration remained the same before and after reduction. The M-associated apoferritin peak (fractions 4–7) is separated from free M^0 (fractions 10–12), which trails well behind (Fig. 1). The coelution of apoferritin and metal (Fig. 1A) indicates that metal clusters are attached to apoferritin. In addition, native apoferritin and M(I) or M(II)-Apoferritin were electrophoretically analyzed on Polyacrylamide gel (PAGE), under native (non-denaturing) conditions (Fig. 1B). The co-migration of the samples (native and M(I) or M(II)-Apoferritins) indicates, first that the protein remained intact after reaction with M(I) or M(II) and second, that M(I) or M(II) atoms are really bounded to the protein.

M(I)- or M(II)-apoferritin acts as a nanoreactor as the trapped M(I) or M(II) ions are able to react with

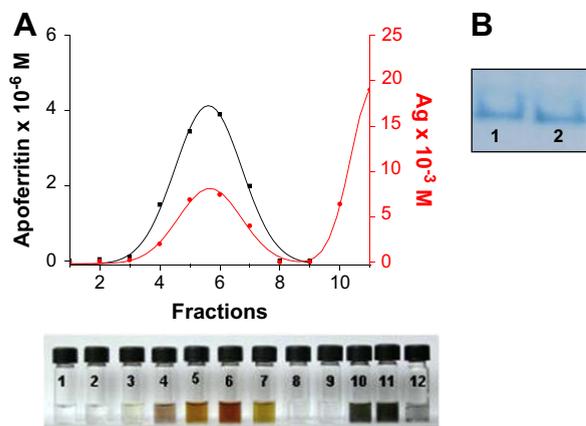


Fig. 1. A. As an example, elution profile of Ag-containing apoferritin. Protein was measured by UV–vis spectroscopy and Ag by atomic absorption. B. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) stained with Coomassie Blue. Lane 1 is native apoferritin, lane 2 is M(I)-apoferritin.

a chemical reagent, small enough to traverse the apoferritin channels, in this case NaBH_4 reductant, to yield a zero-valent metal nanoparticle.

In the case of copper nanoparticles, as a result of the chemical reduction the UV–vis spectrum of the solution dramatically changed, showing the typical absorption band of Cu, centred at 570 nm (Fig. 2A). The observed absorption spectra are similar to those reported for Cu nanoparticles and have been attributed to the plasmon excitation in Cu [13]. Moreover, the band centred at 570 nm appears flattened, which is typical for small clusters [14]. We performed time-dependent formation of Cu in aerobic conditions and its subsequent oxidation was monitored by UV–vis spectroscopy [11]. We observed a decrease in absorbance at 570 nm and a shift of the SPR position according to the fact that Cu nanoparticles are very

sensitive towards oxidation. The copper oxidation was faster in the absence of apoferritin.

For the Ag nanoparticles the position of the SPR can be tuned by changing particle size, shape, as well as the surrounding dielectric medium. In Fig. 2B, the UV–vis spectrum of the solution corresponding to the particles of 4 nm shows the presence of the SPR at 434 nm. This SPR value is characteristic of Ag particles surrounded with a high refractive index shell [15].

TEM shows the presence of discrete electron-dense spherical cores. The mean diameter was statistically measured to be 3.0 ± 0.5 nm for the case of copper, 4.0 ± 0.5 nm for Ag, 3.5 ± 0.5 nm for Ni and 3 ± 0.5 nm for Co nanoparticles by sampling approximately 100 particles. Energy dispersive spectroscopy confirmed the presence of the corresponding metals (Fig. 3). No metals were detected where there were no particles. TEM images of samples negatively stained with uranyl acetate (to visualize the protein shell) confirmed that the particles were actually produced within the apoferritin interior (Fig. 3). The presence of the apoferritin coat prevents irreversible aggregation of the particles and their precipitation.

The magnetic properties of evaporated samples of the Co and Ni nanoparticles were reported [16]. Both of them presented the expected superparamagnetic behavior with blocking temperatures of 70.2 K and 5.9 K, respectively. Clear evidence of the superparamagnetic behavior of the Co and Ni nanoparticles was given by the ac susceptibility measurements which showed an in-phase (χ') and out-of-phase (χ'') maxima that shifted towards higher temperatures at increasing frequencies. The superparamagnetic behavior was also confirmed by the field dependence of magnetisation. At temperatures above T_B no hysteresis was observed. In contrast, a clear hysteresis loop of magnetisation was observed below T_B with a coercive field of 39 mT

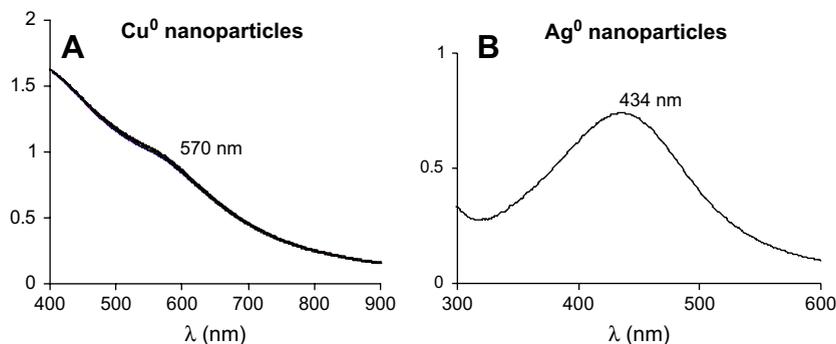


Fig. 2. A. UV–vis spectra of the formation of Cu nanoparticles, showing the flattened band at 570 nm. B. UV–vis spectra of the Ag particles. The SPR shifts to longer wavelength when the size increases from 1 to 4 nm.

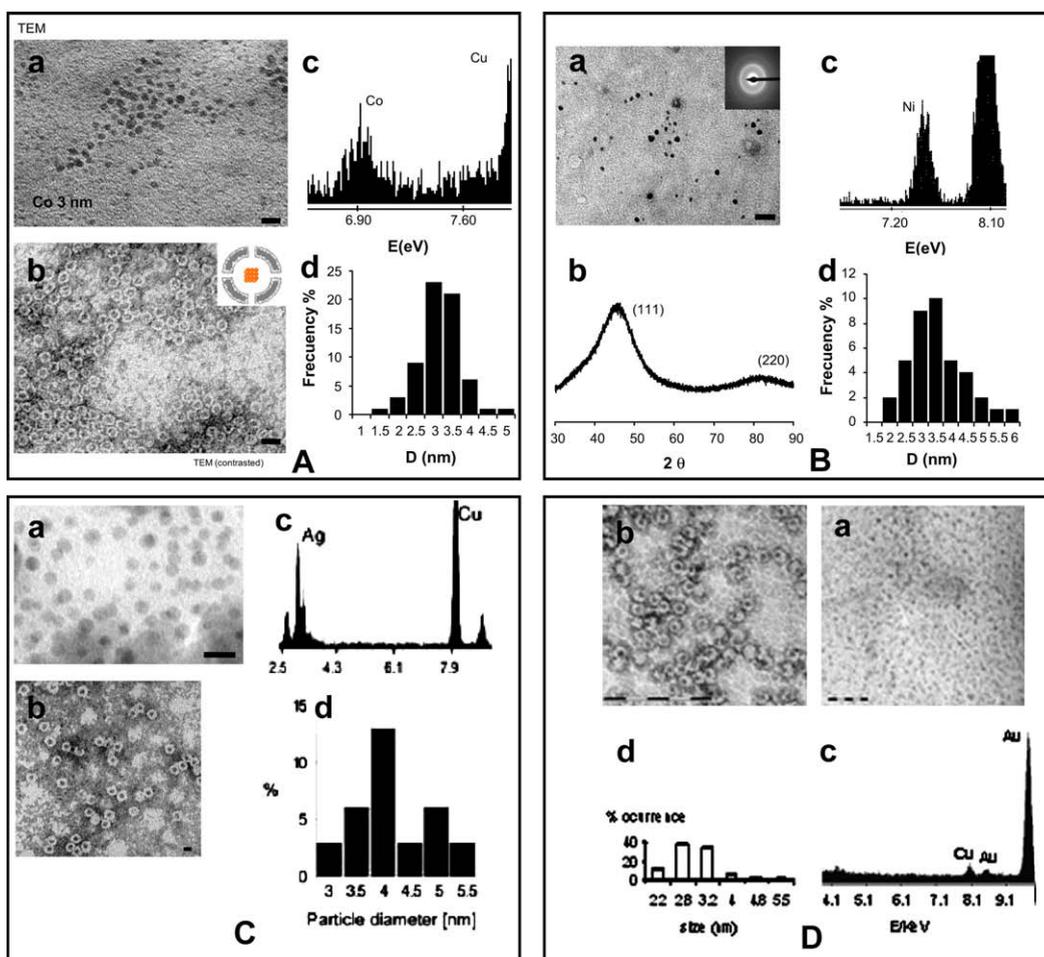


Fig. 3. A. (a) TEM image of Co nanoparticles; (b) negatively stained Co nanoparticles. Scale bars are 10 nm; (c) EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy) spectrum; (d) Size-distribution. B. (a) TEM image of Ni nanoparticles. Inset: electronic diffraction pattern of the Ni nanoparticles. Scale bar is 20 nm; (b) X-ray powder diffraction pattern; (c) EDS spectrum; (d) Size-distribution. C. (a) TEM image of Ag nanoparticles; (b) Ag nanoparticles negatively stained with uranyl acetate. Scale bars are 10 nm; (c) EDS spectrum; (d) Size-distribution. D. (a) TEM image of Cu nanoparticles Scale bar is 100 nm; (b) negatively stained Cu nanoparticles. Scale bar is 50 nm; (c) EDS spectrum; (d) Size-distribution.

for Ni and 125 mT for Co nanoparticles at 2 K. We have recently reported that Pd nanoparticles containing ca. 500 atoms (2.4 nm size) encapsulated within the apoferritin cavity show permanent magnetism up to room temperature [16].

Previous works, Watanabe et al. and our group [11,16] showed that different metal ions can be concentrated inside the cavity of the apoferritin molecule and that this apoferritin-loaded molecule can be chemically reduced with NaBH_4 to form size constrained metal nanoparticles. In a recent work [12] we performed small angle X-ray scattering (SAXS), X-ray near edge structure (XANES) and extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) experiments on the intermediate species (Cu^{II} -apoferritin) as well as the final product obtained after chemical reduction (Cu^0 -

apoferritin). The results obtained point out that the encapsulated- Cu^{II} metal ions are in fact a Cu-oxide/hydroxide apoferritin species and that it is completely transformed to a Cu zero-valent metal apoferritin after reduction with NaBH_4 .

The apoferritin-encapsulated- Cu^{II} oxide and/or hydroxide can act as a reactor because the trapped Cu^{II} ions are able to react with a chemical reagent, small enough to traverse the apoferritin channels, to build a new material. This assumption can be extrapolated to the Ni^{II} - and Co^{II} -apoferritin species.

In conclusion, chemical preparation of Cu, Co, Ni and Ag nanoparticles was carried out using previously M(I) or M(II)-apoferritin as a nanoreactor. Metal and metallic cores of homogeneous size were formed in the apoferritin cavity avoiding agglomeration and bulk

precipitation. The possibility of using the apoferritin cavity as a nanoreactor, opens up the possibility of obtaining a wide variety of metallic nanoparticles of different compositions and homogeneous size.

3. Experimental

Aliquots of 0.1 ml of a 0.1 M MSO_4 , ($\text{M} = \text{Cu}^{\text{II}}$, Co^{II} , Ni^{II} and 0.1 M $\text{Ag}(\text{NO}_3)$ in the case of Ag^{I}) solution were added to a previously chromatographed Sigma–Aldrich Horse spleen apoferritin (4×10^{-5} mmol, 4 ml) to give a theoretical loading of 2000 atoms per apoferritin. The pH was dynamically adjusted to 8 with 0.01 M NaOH. Solutions were then allowed to react at 4 °C for 24 h. The M(I) or M(II)-Apoferritin solutions were then purified by size exclusion chromatography (G-25 Sephadex). The apoferritin-containing fractions were then monitored by UV–vis spectroscopy at 280 nm ($\epsilon^{280} = 468,000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$) and metal determined by atomic absorption spectroscopy. Addition of NaBH_4 (4 mg ml^{-1}) to the solutions of M(I) or M(II)-Apoferritin, produced black solutions of M^0 -apoferritin for Cu, Co and Ni, and dark-orange for Ag^0 -nanoparticles. Metal determined by atomic absorption spectroscopy after the reduction yielded the same concentration values. The solutions were exhaustively dialyzed against milli-Q water at 4 °C for 12 h. The coelution of apoferritin and metallic ions (Fig. 1A) indicates that metal ions are attached to apoferritin. The purity and stability of the M(I) or M(II)-Apoferritin were assessed by native PAGE. Gels were stained for protein for 1/2 hour using 0.1% Coomassie Blue in fixative 40% MeOH/10% HOAc. Gel was destained by treatment with 40% MeOH/10% HOAc to remove the background during 3 h. The comigration of both (lanes 1 and 2, Fig. 1B) indicates first, that the protein remained intact after M(II) or M(I) loading and second, that the M ions are indeed bounded to the apoferritin.

The samples used for TEM study were prepared by diluting the resulting solutions with milli-Q water and then placing a drop onto a carbon-coated Au or Cu grid and drying it in air at room temperature. The average particle sizes and the standard deviations were estimated from TEM image analysis of 100 particles. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV. X-ray Energy Dispersive Spectroscopy (X-EDS) confirmed that the particles contained the corresponding metals (Fig. 3), which were not detected outside the particles. TEM images of samples negatively stained with 1% uranyl acetate (to visualize the protein shell) confirmed that the particles were actually produced within the apoferritin interior (Fig. 3).

Acknowledgements

Financial support from the Spanish MEC (project CTQ2006-02840) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-02525) are gratefully acknowledged. N.G. thanks the Spanish MEC for a research contract (Ramón y Cajal program).

References

- [1] R.C. O’Handley, *Modern Magnetic Materials*, Wiley-VCH, New York, 1999.
- [2] (a) P.S. Doyle, J. Bibette, A. Bancaud, J. Viovy, *Science* 295 (2002) 2237;
(b) H. Gu, P. Ho, K.W.T. Tsang, L. Wang, B. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 15702;
(c) D. Wang, J. He, N. Rosenzweig, Z. Rosenzweig, *Nano Lett.* 4 (2004) 409.
- [3] J.M. Perez, F.J. Simeone, Y. Saeki, L. Josephson, R. Weissleder, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 10192.
- [4] (a) E.X. Wu, H. Tang, K.K. Wong, J. Wang, *J. Magn. Reson. Imaging* 19 (2004) 50;
(b) S.H. Koenig, K.E. Kellar, *Acad. Radiol.* 3 (1996) 273;
(c) D.K. Kim, Y. Zhang, J. Kehr, T. Klasson, B. Bjelke, M. Muhammed, *J. Magn. Mater.* 225 (2001) 256.
- [5] (a) F. Bertorelle, C. Wilhelm, J. Roger, F. Gazeau, C. Manager, V. Cabuil, *Langmuir* 22 (2006) 5385;
P.N. Prasad, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 446 (2006) 1;
(b) D. Ma, J. Guan, F. Normandin, S. Denomme, G. Enright, T. Veres, B. Simard, *Chem. Mater.* 18 (2006) 1920.
- [6] (a) M. Mikhaylova, D.K. Kim, C.C. Berry, A. Zagorodni, M. Toprak, A.S.G. Curtis, M. Muhammed, *Chem. Mater.* 16 (2004) 2344;
(b) I. Koh, X. Wang, B. Varughese, L. Isaacs, S.H. Ehrman, D.S. English, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 1553;
(c) Y. Sahoo, A. Goodarzi, M.T. Swihart, T.Y. Ohulchansky, N. Kaur, E.P. Furlani, P.N. Prasad, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 3879;
(d) S. Santra, P. Zhang, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4988;
(e) X. Zhao, R. Dytioco, W. Tan, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 11474;
(f) X. Zhao, L.R. Hillard, S.J. Merchery, Y. Wang, R.P. Bagwe, S. Jin, W. Tan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 15027;
(g) S. Santra, K. Wang, R. Tapeç, W. Tan, *J. Biomed. Opt.* 6 (2001) 160;
(h) J. Guo, W. Yang, Y. Deng, C. Wang, S. Fu, *Small* 1 (2005) 737.
- [7] (a) C. Gilles, P. Bonville, K.K.W. Wong, S. Mann, *Eur. Phys. J. B* 17 (2000) 417;
(b) M. Clemente, E. Coronado, A. Soriano, E. Colacio, J.M. Dominguez-Vera, N. Galvez, R. Madueño, M.T. Martin, *Langmuir* 22 (2006) 6993;
(c) S.A. Makhlof, F.T. Parker, A.E. Berkowitz, *Phys. Rev. B* 55 (1997) R14717.
- [8] (a) Y. Li, W. Kim, D. Wang, H. Dai, *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process.* 74 (2002) 325;
(b) M. Allen, D. Willits, M. Young, T. Douglas, *Inorg. Chem.* 42 (2003) 6300;

- (c) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita, Y. Zhang, H. Yoshimura, *Biotechnol. Bioeng.* 84 (2003) 187;
(d) K.K.W. Wong, S. Mann, *Adv. Mater.* 8 (1996) 928.
- [9] S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson, G.D. Watt, *J. Inorg. Biochem.* 59 (1995) 15.
- [10] T. Douglas, D.R. Ripoll, *Protein Sci.* 7 (1998) 1083.
- [11] N. Galvez, P. Sánchez, J.M. Domínguez-Vera, *Dalton Trans.* (2005) 2492.
- [12] M. Ceolín, N. Gálvez, M.P. Sánchez, M.B. Fernández, J.M. Domínguez Vera, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2008) 795.
- [13] C. Salzemann, I. Lisiecki, A. Brioude, J. Urban, M. Pileni, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 13242.
- [14] U. Kreibig, M. Vollmer, *Optical Properties of Metal Clusters*, Springer-Verlag, Berlin, 1995.
- [15] A.S. Kumbhar, M.K. Kinnan, G. Chumanov, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 12444;
S. Hussain, R.K. Roy, A.K. Pal, *Mater. Chem. Phys.* 99 (2006) 375.
- [16] T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama, Y. Watanabe, *Angew. Chem. Int. Ed.* 43 (2004) 2527;
N. Galvez, P. Sanchez, J.M. Domínguez-Vera, A. Soriano-Portillo, M. Clemente-Leon, E. Coronado, *J. Mat. Chem.* 16 (2006) 2757;
J.M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, P. Sánchez, A.J. Mota, S. Trasobares, J.C. Hernández, J.J. Calvino, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2007) 4823.M. Clemente-Leon, E. Coronado, A. Soriano Portillo, N. Galvez, J.M. Domínguez-Vera, *J. Mater. Chem.* 17 (2007) 49.

MRI relaxation properties of water-soluble apoferritin-encapsulated gadolinium oxide-hydroxide nanoparticles†

Purificación Sánchez,^{*a} Elsa Valero,^a Natividad Gálvez,^a José M. Domínguez-Vera,^{*a} Massimo Marinone,^{b,d} Giulio Poletti,^{b,d} Maurizio Corti^{c,d} and Alessandro Lascialfari^{b,c,d}

Received 6th June 2008, Accepted 7th October 2008

First published as an Advance Article on the web 28th November 2008

DOI: 10.1039/b809645g

We have prepared water-soluble gadolinium oxide nanoparticles that show potential as MRI contrast agents. The particles were built into the apoferritin cavity and have an average size of 5 nm. After seven days a loss of 5% of Gd was detected compared with the as-prepared samples; after that the Gd remained constant and stabilized inside the apoferritin, indicating that the apoferritin capsid acts as a Gd store, avoiding metal delivery and consequent toxicity. The NMR longitudinal and transverse relaxivities resulted about 10 and 70 times higher than the ones of clinically approved paramagnetic Gd-chelates, thus indicating the possible route for synthesizing a novel class of MRI contrast agents.

1. Introduction

Magnetic nanoparticles are attracting attention because of their potential application in the biomedical field,¹ especially as contrast agents for magnetic resonance imaging (MRI), since their relaxivities are much higher than those of “classic” Gd(III) complexes. Genuine examples of this type of particle are SPIO (superparamagnetic iron oxide) and USPIO (ultra-small superparamagnetic iron oxide).^{2,3} Thus, numerous iron oxide nanoparticles (generally magnetite-maghemite based) have been prepared by different methods, usually by the one-step alkaline coprecipitation of Fe(II) and Fe(III) in aqueous solution in presence of a hydrophilic coating molecule.^{2,3}

Gd(III) nanoparticles represent a different approach to the development of novel MRI agents, and some examples have been reported, especially of water-soluble particles,^{3,4} essential for biomedical applications. The protein apoferritin was used to prepare the Gd(III) nanoparticles described in this paper, following the method indicated few years ago by Aime and co-workers (see ref. 4). Apoferritin, the main iron store in living organisms, is a spherical protein shell composed of 24 subunits with a central cavity in which up to 4500 iron atoms can be incorporated as a mixture of iron oxides, giving rise to ferritin.⁵ The access of metal ions and water molecules to the inner cavity occurs through hydrophilic channels of 4–5 Å in diameter, formed at subunit intersections. The 8 nm-sized empty cavity of apoferritin has been used as a chemically and spatially confined environment for building biomimetic (metal oxide or oxyhydroxide)⁶ or non-biomimetic (zero-valent metal,^{6,7} Prussian-blue complexes,⁸ etc.) nanoparticles. The protein shell prevents bulk aggregation of the

metal particles, rendering them water soluble. Apoferritin has been reported to bind metal ions in its cavity at specific sites at pH 7.4⁹ but the number of metal ions markedly increases when the apoferritin cavity is used for mineralization reactions at a more basic pH, producing metal oxide or oxyhydroxides.^{10,11} A strategy to actively concentrate gadolinium within the apoferritin cavity was here developed in order to achieve a high loading of apoferritin (see Scheme 1).

The nuclear relaxivities of the sample studied in the present paper, constituted by a core of Gd ions coated by apoferritin, have been revealed to be much higher than those of paramagnetic commercial compounds, thus indicating a possible route for a new class of biocompatible MRI contrast agents.

2. Synthesis and characterization

Aliquots of 0.1 mL of a solution of Gd(NO₃)₃·6H₂O (0.16 M) was added to an apoferritin solution (0.4 mL, 1.36 × 10⁻⁵ M) every 30 min. The 0.16 M nitrate gadolinium solution was prepared in buffer (AMPSO pH = 8.4); at this concentration the pH is 6.5 and no precipitation was observed. After the addition was completed (7 aliquots), the mixture was stirred for 30 min. The resulting colloidal suspension was incubated for one day at 4 °C.

In principle, Gd(III) can be bound either to the external apoferritin surface or within the cavity or both. In order to remove Gd(III) not localized in the internal cavity (bound to external surface or free in solution), 0.039 g of Na₃HEDTA·xH₂O was added and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. A clear solution was obtained, which was exhaustively dialyzed against milli-Q water using a Spectrapor 100 kD molecular weight cut-off to remove the Gd(EDTA) complex, which was detected by IR after concentration and lyophilization of the reservoir solution. The dialyzed solution was then passed through a calibrated G-25 Sephadex column (1.5 cm × 5.5 cm) and eluted with milli-Q water. The apoferritin-containing fractions (Gd-apoferritin) were isolated and the apoferritin and Gd concentrations measured by the absorbance value at 280 nm in the UV-Vis spectrum ($\epsilon^{280} = 468\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) and ICP, respectively. From the Gd/apoferritin

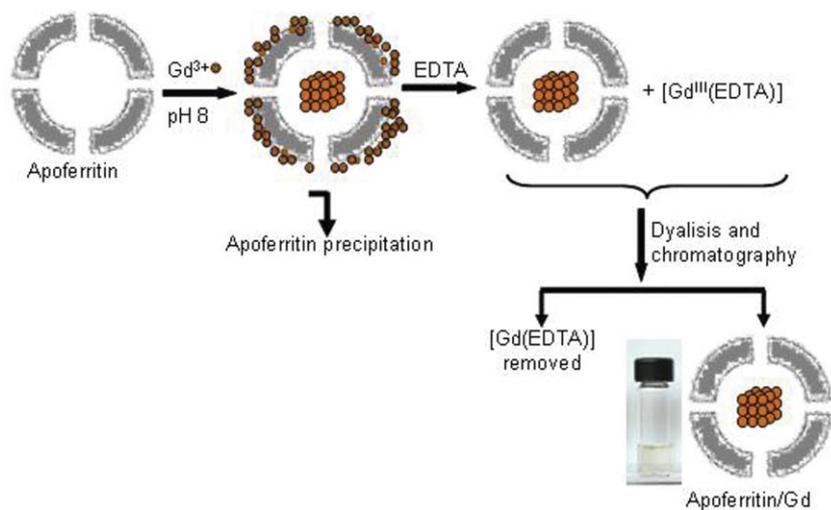
^aDepartamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071, Spain

^bIstituto di Fisiologia Generale e Chimica Biologica “G. Esposito”, Università degli studi di Milano, Via Trentacoste 2, I-20134, Milano, Italy

^cDipartimento di Fisica “A.Volta”, Università degli studi di Pavia, Via Bassi 6, I-27100, Pavia, Italy

^dS3-CNR-INFN, Via Campi 213, I-41100, Modena, Italy

† Electronic supplementary information (ESI) available: X-Ray diffraction pattern of the investigated sample. See DOI: 10.1039/b809645g



Scheme 1 Pictorial drawing of the preparation of our investigated sample.

concentration ratio, the number of 1700 Gd per apoferritin was obtained.

Native apoferritin and Gd(III)-apoferritin were electrophoretically analyzed on polyacrylamide gel (PAGE), under native (non-denaturing) conditions (Fig. 1). The comigration of both (lanes 1 and 2) indicates first that the protein remained intact after Gd(III) loading and second, that the Gd(III) ions were indeed bound to the apoferritin. The Gd-apoferritin solution was also treated with a large excess of EDTA and stirred at room temperature for 1 h. The resulting solution was then dialyzed and no Gd was detected by ICP in the reservoir. These results collectively indicate that Gd is located within the apoferritin cavity, where EDTA, due to its large size, cannot penetrate through the apoferritin channels.

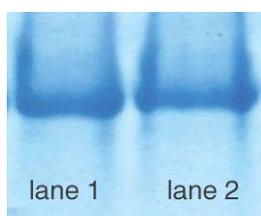


Fig. 1 Native polyacrylamide gel stained electrophoresis (Coomassie Brilliant Blue R250). Lane 1 is native horse spleen apoferritin and lane 2 Gd-apoferritin.

The Gd oxide/hydroxide-apoferritin nanoparticles were studied by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a Philips CM-20HR analytical electron microscope operating at 200 keV. The samples used for TEM study were prepared by diluting the solution of Gd-apoferritin with Milli-Q water and then placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in air at room temperature. A representative TEM image is shown in Fig. 2 (a). Discrete electron-dense cores, which are generally spherical in shape, are clearly observed. The mean diameter was statistically measured to be 5.0 ± 0.7 nm (standard deviation) by sampling 50 particles, indicating the homogeneous size of the particles (Fig. 2a inset). The size of the metal particles is smaller than that of the apoferritin

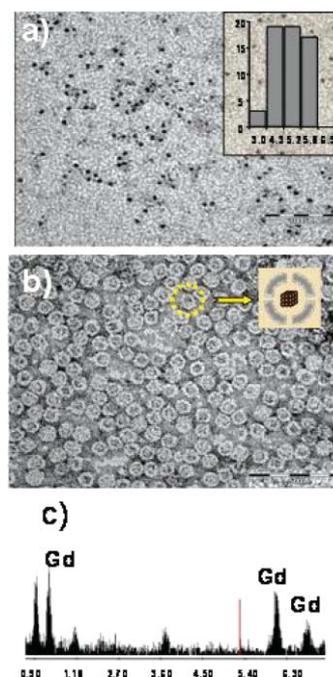


Fig. 2 (a) A representative TEM image of Gd-apoferritin particles. Scale bar is 100 nm. Inset: size histogram. (b) A negatively stained (uranyl acetate) TEM image, showing the electron-transparent protein shell. (c) EDX spectrum showing signals corresponding to the presence of Gd.

cavity (~8 nm). Likewise, no evidence of a bulk precipitation was observed.

Energy dispersive spectroscopy confirmed that the particles contained Gd (Fig. 2c), which was not detected outside the particles. Staining of the protein with uranyl acetate showed that the apoferritin shells were intact and confirmed that the metallic particles were produced within the apoferritin interior (Fig. 2b). No electronic diffraction could be obtained due to the amorphous nature of the encapsulated material. Previous studies reported that metal ions as Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} or Cu^{2+} , incubated with apoferritin at basic pH lead to

apoferritin-encapsulated nanoparticles of a mixture of amorphous metal-oxide/hydroxide.^{6,10,11} This result could be extrapolated to the Gd-apoferritin sample, assuming that the encapsulated material is a Gd(III) oxide/hydroxide structure. This assumption is according with the XRD variation of the particles with temperature.

The XRD diffractograms (ESI†) showed that the synthesized samples were amorphous until 400 °C, after which increasing peak intensities were observed with rising calcination temperatures, indicating greater crystallite growth. A crystalline phase corresponding to Gd₂O₃ was observed. The crystal structure was determined from the observed *d* values. This analysis shows that the calcined sample has a *fcc* structure with *a* = 5.36 Å. The observed 2θ and *d* values and the calculated *hkl* planes are: 2θ = 28.8°, *d* = 3.097 Å, (111); 2θ = 33.1°, *d* = 2.704 Å, (200); 2θ = 47.8°, *d* = 1.901 Å, (220); 2θ = 56.5°, *d* = 1.627 Å, (311), according to reported data for Gd₂O₃.¹²

1 mL of a Gd-apoferritin solution was dialyzed against a buffered solution (TRIS pH 7.4, 0.1M NaCl) and the concentrations in the dialysis bag and reservoir were measured by ICP every 24 h. After 7 days, a loss of only 5% of Gd was detected, indicating that Gd(III) is effectively stabilized by apoferritin and that only negligible Gd(III) delivery from the encapsulated Gd oxide-hydroxide nanoparticle to the external solution occurs.

3. NMR relaxometry

As preliminary magnetic characterizing measurements, we performed zero-field cooled–field cooled (ZFC-FC) magnetization curves at field *H* = 5 mT reported in Fig. 3. The data were collected by means of a Quantum Design MPMS system, operating with the standard extraction technique. As can be easily seen no opening between ZFC and FC curves is observed thus demonstrating that the system is fully paramagnetic in the whole temperature range 2 ≤ *T* ≤ 300 K. The reciprocal susceptibility above 30 K for Gd oxide/hydroxide-apoferritin nanoparticles can be fit well by a Curie-Weiss law in accordance with $\chi = C/(T - \theta)$, where θ is the paramagnetic Curie temperature with a value of −11.0 K which is typical for paramagnetic Gd₂O₃ ($\theta = -13$ K).¹³

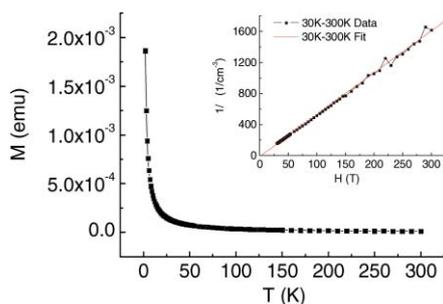


Fig. 3 ZFC-FC magnetization of Gd-apoferritin measured at an applied field of 5 mT. Inset: Curie-Weiss fit to inverse susceptibility in the 30–300 K temperature range.

We tested the efficiency in contrasting the MRI images of the Gd-apoferritin sample. This efficiency can be determined by determining at different NMR frequencies the nuclear ¹H relaxivities *r*_{*i*} (*i* = 1 longitudinal and *i* = 2 transverse) defined by:^{3,4} $r_i = [(1/T_i)_{\text{meas}} - (1/T_i)_{\text{dia}}]/c$, where $(1/T_i)_{\text{meas}}$ is the nuclear

relaxation rate of the sample (in water) with concentration *c* = 0.139 mM (Gd(III) obtained by ICP) of magnetic center and $(1/T_i)_{\text{dia}}$ is the nuclear relaxation rate of the ¹H nuclei of the diamagnetic host solution (in our case water). The pH of the sample used in NMR experiments was 7.4–7.7. The longitudinal and transverse relaxivities indicate the increase of, respectively, the nuclear spin–lattice and spin–spin relaxation rates due to the presence of 1 mmol L^{−1} of magnetic center. We measured the ¹H NMR longitudinal and transverse nuclear relaxation times *T*₁ and *T*₂ of the solvent (water) and of Gd-apoferritin, in the frequency range 10 KHz ≤ *ν* ≤ 65 MHz and 15 MHz ≤ *ν* ≤ 65 MHz, respectively, at room temperature. The NMR data were collected by means of a Smartracer® Stellar relaxometer (using the Fast-Field-Cycling technique¹⁴) for 10 kHz ≤ *ν* ≤ 10 MHz, of a Stellar Spinmaster and an Apollo-Tecmag spectrometer for *ν* > 10 MHz. Standard radio frequency excitation sequences CPMG-like (*T*₂) and saturation-recovery (*T*₁) were used. Using the measured *T*₁ and *T*₂ values, we calculated the longitudinal and transverse relaxivities. Fig. 4(a) and 4(b) report the so-called NMR-dispersion profiles of Gd-apoferritin, *i.e.* *r*₁(*ν*) and *r*₂(*ν*), compared with same data^{2–4} on commercial Omniscan® and Gd-DTPA®. In the whole frequency range, the longitudinal relaxivity *r*₁ of Gd-apoferritin is about a factor 10–25 higher than the ones of commercial compounds and *r*₂ stays approximately 70 times higher. As further test, the relaxivities *r*₁ and *r*₂ have been followed as a function of time over 1.5 months, at two typical frequencies. As can be seen from the inset of Fig. 4 for *r*₂ (*r*₁ not reported, shows the same behaviour), they displayed no change with time, within the experimental error.

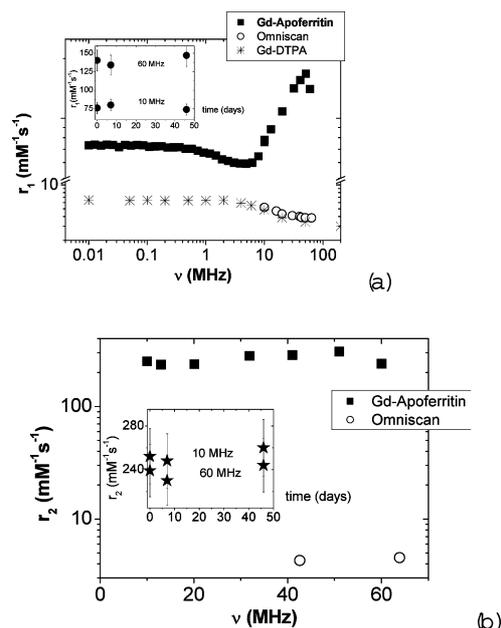


Fig. 4 Longitudinal *r*₁ (a) and transverse *r*₂ (b) relaxivities of Gd-apoferritin, measured as a function of frequency. The data of the commercial compounds Omniscan and Gd-DTPA are also reported. In the insets, *r*₁ and *r*₂ measured as a function of time at 10 and 60 MHz are shown.

It can be thus concluded that at typical clinical frequencies corresponding to the mostly used 1.5 T total body Imager (*ν* ~ 64 MHz) and to the low field 0.2 T (*ν* ~ 8 MHz) and ~0.5 T

($\nu \sim 20$ MHz) Imagers, Gd-apoferritin has r_1 and r_2 relaxivities much higher than commercial Gd-chelates. We should note also that similar relaxivities (see *e.g.* Aime *et al.*, Sitharaman *et al.*, Hartman *et al.*, ref. 4) were obtained using Gd-loaded CAs. Particularly, Aime *et al.* encapsulated GdHPDO3A (or similar compounds) in the apoferritin while Sitharaman *et al.* and Hartman *et al.* used carbon nanotubes to host Gd nanoparticles. In the last case, to reach the final MRI application, severe tests regarding the possible carbon nanotubes toxicity have to be performed.

As is well known, the difference between positive MRI contrast agents (CAs) and negative ones, is in the effect on the image of tissues they reach, being brilliant spots in the first case and dark (or no signal) regions in the second. A parameter that roughly distinguishes the two cases is the r_2/r_1 ratio. This ratio is generally <2 for paramagnetic Gd-chelates that are positive CA (being the $1/T_1$ increasing effect the dominating one), and is greater than 2 for superparamagnetic negative CA (where the $1/T_2$ increase prevails in the image contrast).¹⁵ In Fig. 5 we report the r_2/r_1 ratio as a function of frequency for Gd-apoferritin. Interestingly, by increasing the frequency our sample changes from values $r_2/r_1 < 2$ to $r_2/r_1 > 2$ at around 30 MHz. This behaviour opens the possibility of a “tunable” class of CA, once the applied magnetic field strength is varied.

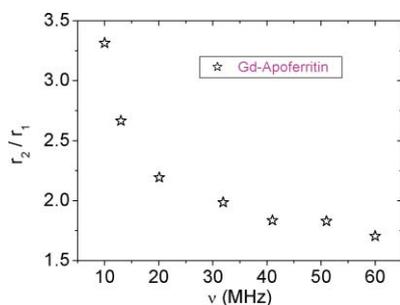


Fig. 5 Relaxivities ratio r_2/r_1 as a function of frequency in our sample.

Regarding the possible physical origin of the high relaxivities of our sample, we recall that the nuclear relaxivity is increased through the action of several microscopic processes characterized by different correlation times.^{3–5} (the rotational molecular correlation time τ_R , the water exchange time τ_m , the diffusion time τ_D and the electronic relaxation times T_{1e} and T_{2e} of the magnetic center), for our sample we can only observe that the presence of a peak in $r_1(\nu)$ data at $\nu \sim 50$ MHz suggests that the molecule is slowly reorienting, in agreement with heuristically predicted/experimental data reported in literature for samples with dimensions similar to Gd-apoferritin.⁴ On the other hand, as remarked by Aime *et al.*,⁴ in the case of Gd-loaded apoferritin the inner water molecules can freely exchange with the bulk water through the apoferritin channels, thus possibly giving the main physical mechanism which increases the nuclear relaxation rates. This is similar to the case of Gd-based samples with a bound protein, where due to the absence of inner-sphere contributions the relaxation enhancement can be ascribed to exchangeable protons on the surface of the protein near the binding site(s) of the paramagnetic complex.⁴ Finally, we would like to remark that a detailed study of the mechanisms leading to the observed nuclear

relaxation in our sample is under way, but it is out of the aim of the present paper.

Conclusions

We have reported the preparation of a water-soluble apoferritin-encapsulated gadolinium oxide that loses a negligible amount of Gd(III). These particles may offer significant advantages over first-generation MRI agents (mononuclear Gd(III)-complexes) for meeting the requirements of clinical magnetic resonance imaging diagnosis. Their longitudinal and transverse relaxivities are much higher than those of classic Gd(III)-complexes (10–25 and 70 times, respectively). Moreover, by changing the frequency our sample changes drastically the r_2/r_1 ratio thus giving the possibility to tune the response in terms of image contrast. The external apoferritin shell also affords the opportunity of covalently grafting organic molecules for incorporating new functionality or for increasing the plasma half-life. Work along this line and first “*in vivo*” MRI tests are in progress.

Acknowledgements

M. Mariani is acknowledged for help in experimental measurements. We are grateful to the MEC (project CTQ2006-02840) and Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM2007-02525) for financial support. N. G. thanks the MEC for a research contract (Ramón y Cajal program). The work was carried out also within the framework of the national project PRIN 2005-prot. No. 2005039758, the European project NoE MAGMANET (NMP3-CT-2005 515767), and using the funds FIRST-2006 and FIRST-2007 of the University of Milano.

References

- (a) S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset and E. Duguet, *J. Mater. Chem.*, 2004, **14**, 2161; (b) F. Sonvico, C. Dubernet, P. Colombo and P. Couvreur, *Curr. Pharm. Des.*, 2005, **11**, 2091; (c) P. Caravan, J. J. Elison, T. J. McMurphy and R. B. Lauffer, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2293.
- S. Laurent, L. Vander Elst, A. Roch and R. N. Müller, in *NMR-MRI, μ SR and Mossbauer Spectroscopies in Molecular Magnets*, ed. P. Carretta and A. Lascialfari, Springer-Verlag, Italia, 2007, p. 71.
- The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging*, ed. A. E. Merbach and E. Toth, Wiley, New York, 2001.
- (a) S. Aime, M. Botta, M. Fasano, S. Geninatti Crich and E. Terreno, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **321**, 185–186; (b) S. Aime, L. Frullano and S. G. Crish, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 1017; (c) J.-L. Bridot, A.-C. Faure, S. Laurent, C. Rivière, C. Billotey, B. Hiba, M. Janier, V. Jossereand, J.-L. Coll, L. V. Elst, R. Muller, S. Roux, P. Perriat and O. Tillement, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **129**, 5076–5084; (d) C. H. Reynolds, N. Annan, K. Beshah, J. H. Huber, S. H. Shaber, R. E. Lenkinski and J. A. Wortman, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 8940–8945; (e) M. Engström, A. Klasson, H. Pedersen, C. Vahlberg, P.-O. Käll and K. Uvdal, *Magn. Reson. Mater. Phys.*, 2006, **19**, 180–186; (f) F. Evanics, R. Diamente, F. C. J. M. Van Veggel, G. J. Stanisz and R. S. Prosser, *Chem. Mater.*, 2006, **18**, 2499–2505; (g) S. Aime, C. Cabella, S. Colombaro, S. G. Crich, E. Gianolio and F. Maggioni, *J. Magn. Res. Imaging*, 2002, **16**, 394–406; (h) S. G. Crich, B. Bussolati, L. Tei, C. Grange, G. Esposito, E. Lanzardo, G. Camussi and S. Aime, *Cancer Res.*, 2006, **66**(18), 9196–9201; (i) B. Sitharaman, K. R. Kissell, K. B. Hartman, L. A. Tran, A. Baikalov, I. Rusakova, Y. Sun, H. A. Khan, S. J. Ludtke, W. Chiu, S. Laus, È. Tóth, L. Helm, A. E. Merbach and L. J. Wilson, *Chem. Com.*, 2005, 3915–3917; (j) K. B. Hartman, S. Laus, R. D. Bolskar, R. Muthupillai, L. Helm, E. Toth, A. E. Merbach and L. J. Wilson, *Nano Lett.*, 2008, **8**, 415–419; (k) S. Rakesh and K. Soonjo, *J. Exper. Nanosc.*, 2007, **2**(1–2), 115–126; (l) M. Norek, I. C. Neves and J. A. Peters, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**(15), 6190–6196; (m) O. Vasalaty,

-
- P. Zhao, S. Zhang, S. Aime and D. Sherry, *Contrast med. Mol. Imaging*, 2006, **1**, 10–14.
- 5 (a) N. D. Chasteen and P. M. Harrison, *J. Struct. Biol.*, 1999, **126**, 182–194; (b) P. M. Harrison and P. Arosio, *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, **1275**, 161–203; (c) X. Liu and E. C. Theil, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 167–175.
- 6 M. Uchida, M. T. Klem, M. Allen, P. Suci, M. Flenniken, E. Gillitzer, Z. Varpness, L. O. Liepold, M. Young and T. Douglas, *Adv. Mater.*, 2007, **19**, 1025–1042.
- 7 (a) T. Ueno, M. Suzuki, T. Goto, T. Matsumoto, K. Nagayama and Y. Watanabe, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004, **43**, 2527; (b) J. M. Domínguez-Vera, N. Gálvez, P. Sánchez, A. J. Mota, S. Trasobares, J. C. Hernández and J. J. Calvino, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2007, 4823–4826.
- 8 J. M. Domínguez-Vera and E. Colacio, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 6983.
- 9 S. Pead, E. Durrant, B. Webb, C. Larsen, D. Heaton, J. Johnson and G. D. Watt, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **59**, 15.
- 10 M. Ceolin, N. Gálvez, P. Sánchez, B. Fernández and J. M. Domínguez-Vera, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2008, 795–801.
- 11 N. Gálvez, P. Sánchez and J. M. Domínguez-Vera, *Dalton Trans.*, 2005, 2492; N. Gálvez, P. Sánchez, J. M. Domínguez-Vera, A. Soriano-Portillo, M. Clemente-León and E. Coronado, *J. Mater. Chem.*, 2006, **16**, 2757.
- 12 F. Söderlind, H. Pedersen, R. M. Pectoral Jr., P.-O. Käll and K. Uvdal, *J. of Col. Interf. Sci.*, 2005, **288**, 140–148; T. Tsuzuki, E. Pirault and P. G. McCormick, *Nanostr. Mat.*, 1999, **11**, 125–131.
- 13 C. D. Graham, *J. Appl. Phys.*, 1965, **36**, 1135.
- 14 G. Ferrante and S. Sykora, *Adv. Inorg. Chemistry*, 2005, **57**, 405.
- 15 E. Taboada, E. Rodriguez, A. Roig, J. Oro, A. Roch and R. N. Muller, *Langmuir*, 2007, **23**, 4583.

A Bioinspired Approach to the Synthesis of Bimetallic CoNi Nanoparticles

Natividad Gálvez,^{*,†} Elsa Valero,[†] Marcelo Ceolin,[‡] Susana Trasobares,[§] Miguel López-Haro,[§] José J. Calvino,[§] and José M. Domínguez-Vera[†]

[†]*Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain,*

[‡]*Instituto de Físico-Química Teórica y Aplicada, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, and*

[§]*Departamento Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica y Química Inorgánica, Universidad de Cádiz, Campus Río San Pedro, 11510 Cádiz, Spain*

Received October 27, 2009

Bimetallic CoNi nanoparticles have been prepared within the apoferritin cavity. The protein shell controls size, prevents aggregation, and makes nanoparticles water-soluble. The CoNi series prepared in this way were structurally and magnetically characterized, the resulting magnetic properties varying accordingly with composition (Co₇₅/Ni₂₅, Co₅₀/Ni₅₀, Co₂₅/Ni₇₅). Co and Ni metals were associated in each nanoparticle, as demonstrated by high-angle annular dark field scanning electron microscopy and electron energy loss spectroscopy (EELS). After intentional oxidation, the CoNi nanoparticles were characterized by EELS, X-ray absorption near edge structure (XANES), and SQUID measurements to evaluate the importance of the oxidation on magnetic properties.

Introduction

Metallic nanoparticles remain the focus of numerous studies because of their size-dependent electronic, optical, catalytic, and magnetic properties. Specifically, magnetic properties can be used in a variety of applications ranging from magnetic data storage to probes and vectors for biomedical sciences.¹

The ability to manufacture and control the structure and composition of metallic nanoparticles will allow the design of materials with desirable properties. In particular, alloy-based magnetic nanoparticles constitute an extremely appealing class of materials, since their magnetic properties can be tuned by combining size effects and alloy composition.² The challenge of being able to fabricate materials with well-defined, controllable properties on the nanometer scale has generated interest in the preparation of bimetallic and trimetallic nanoparticles.^{2,3} The synthesis of bimetallic nanoparticles or clusters is far from easy, because of the difficulty of controlling both particle stoichiometry and surface state.⁴ Bimetallic ferromagnetic CoNi nanoparticles are of particular interest for their potential to overcome the superparamagnetic limit for ultra-high-density magnetic recording and to enhance contrast in magnetic resonance imaging.² To our

knowledge, apart from a sonochemical method reported by Gedanken et al. in 1998,⁵ only four main examples can be found in the literature exploring chemical routes for the synthesis of CoNi nanoparticles with varying compositions: (1) a sol–gel route for the preparation of CoNi nanoclusters hosted in silica gel,⁶ (2) an alginate-mediated growth of CoNi nanoparticles,⁷ (3) a cobalt–nickel reduction in liquid polyol,⁸ and (4) a “guest–host” strategy using layered double hydroxides as a host.⁹

Because magnetic properties are strongly size- and shape-dependent in the nanometer regime, methods that yield nanoparticles of uniform size and shape are extremely important. One possible route for obtaining nonaggregated size- and shape-controlled metallic nanoparticles is the use of a preorganized molecular matrix as a chemical and spatial nanocage for their construction. Typical examples of this type of molecule are apoferritin and small ferritin cages.¹⁰

(5) Shafi, K. V. P.; Gedanken, A.; Prozorov, R. *J. Mater. Chem.* **1998**, *8*, 769.

(6) Mattei, G.; de Julián Fernández, C.; Mazzoldi, P.; Sada, C.; De, G.; Battaglin, G.; Sangregorio, C.; Gatteschi, D. *Chem. Mater.* **2002**, *14*, 3440.

(7) Brayner, R.; Vaulay, M.-J.; Fiévet, F.; Coradin, T. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 1190.

(8) Ung, D.; Soumare, Y.; Chakroune, N.; Viau, G.; Vaulay, M.-J.; Richard, V.; Fiévet, F. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 2084.

(9) Tarasov, K. A.; Isupov, V. P.; Bokhonov, B. B.; Gaponov, Y. A.; Tolochko, B. P.; Yulikov, M. M.; Yudanov, V. F.; Davidson, A.; Beaunier, P.; Marceau, E.; Che, M. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *107*, 202.

(10) (a) Mann, S. *Biomimetic Materials Chemistry*; Wiley: New York, 1996. (b) Douglas, T.; Strable, E.; Willits, D.; Aitouchen, A.; Libera, M.; Young, M. *Adv. Mater.* **2002**, *14*, 415. (c) Douglas, T.; Stark, V. T. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1828. (d) Wong, K. K. W.; Douglas, T.; Gider, S.; Awschalom, D. D.; Mann, S. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 279.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: ngalvez@ugr.es.

(1) (a) Jun, Y.; Choi, J.; Cheon, J. *Chem. Commun.* **2007**, 1203. (b) Jun, Y.; Seo, J.; Cheon, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 179.

(2) Fernando, R.; Jellinek, J.; Johnston, R. L. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 845 and references therein.

(3) Wen, M.; Liu, Q.; Wang, Y.; Zhu, Y.; Wu, Q. *Colloids Surf., A* **2008**, *318*, 238.

(4) Zitoun, D.; Respaud, M.; Fromen, M. C.; Casanove, M. J.; Lecante, P.; Amiens, C.; Chaudret, B. *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 037203.

Apoferitin consists of a spherical protein shell composed of 24 subunits surrounding an aqueous cavity with a diameter of about 8 nm.¹¹ The high stoichiometry binding of some metal ions to the inner cavity wall of apoferitin¹² and the capacity of these bonded metal ions to be reduced by the appropriate chemical reagent give rise to the nucleation of zero-valent metallic nanoparticles.¹³ In this way, several metallic nanoparticles have been prepared using ferritin protein as a template biomolecule.¹⁴

Our group has previously reported the use of the apoferitin cavity to prepare magnetic Co, Ni, and Pd nanoparticles as well as Cu and Ag nanoparticles with optical properties.¹⁵

We report here a simple bioinspired procedure, using the apoferitin protein, for the synthesis of monodisperse Co_xNi_y nanoparticles of variable composition. Detailed compositional and magnetic characterization of these bimetallic CoNi nanoparticles is presented.

Experimental Section

Bimetallic nanoparticles with theoretical final atomic ratios of 75:25, 50:50, and 25:75 Co/Ni were prepared by adding 1 mL of a 0.1 M solution of mixed $\text{CoSO}_4/\text{NiSO}_4$ salts to a 4 mg/mL apoferitin (horse spleen apoferitin, 49 mg/mL, Sigma Aldrich) solution and incubating the sample for 24 h. The resulting solutions were clear and homogeneous. The pH was dynamically adjusted to 8 with 0.1 M NaOH to increase the amount of M^{2+} per protein cage, thanks to the well-known fact of the existence of an out-in negative charge gradient from the external shell to the cavity.¹⁶ All solutions were carefully degassed previous to incubation.

The solutions were passed through a calibrated G-25 Sephadex column (1.5 cm \times 5.5 cm; Scheme 1). The apoferitin-containing fractions were isolated ($\text{Co}^{2+}\text{Ni}^{2+}$ -apoferitin), and metals and protein contents were then determined by atomic absorption spectroscopy and by absorbance at 280 nm ($\epsilon = 468\,000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$), respectively. The addition of NaBH_4 (0.1 mL, 4 mg/mL) to the mixture of $\text{Co}^{2+}\text{Ni}^{2+}$ -apoferitin produced black solutions of Co^0Ni^0 -apoferitin. The solutions were dialyzed against milli-Q water and finally lyophilized to yield black powders of CoNi nanoparticles.

Samples used for transmission electron microscopy (TEM) study were prepared by placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in a glovebox. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV. High-angle annular dark field scanning electron microscopy (HAADF-STEM) and electron energy-loss spectra (EELS) were recorded on a JEOL2010F working at 200 KeV. The spectrum line (SL) mode, which consists of acquiring a series of EELS spectra while a 0.5 nm beam with a current of 0.1–0.3 nA is scanned along the sample, was used. The HAADF signal was also simultaneously collected at each point within the scanned area. This approach

Scheme 1. Preparation of Apoferitin Encapsulated Bimetallic CoNi Nanoparticles

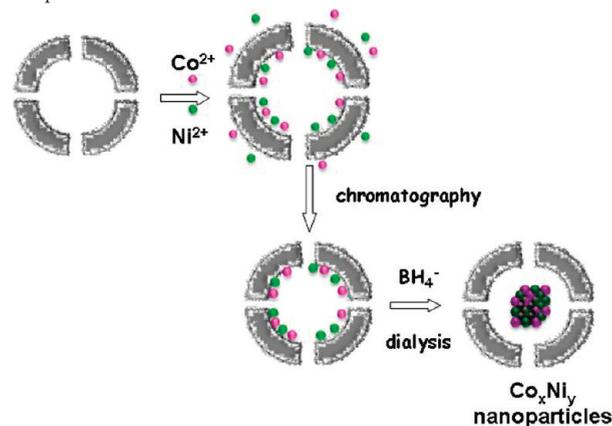


Table 1. Initial Co/Ni Molar Ratio Introduced during the Synthesis and Final Co/Ni Atomic Ratio Obtained by Atomic Absorption Spectroscopy

	initial Co/Ni	final Co/Ni
$\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$	0.33	0.46
$\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$	1	0.95
$\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$	3	3.3
* Co_{100}		
* Ni_{100}	0	0

allows correlating nanoanalytical and structural information of the region under study.

X-ray absorption spectroscopy experiments were performed at the D04B-XAFS1 experimental stations of the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Campinas, Brazil. Nickel and cobalt K-edge experiments were performed at room temperature (ca. 22 °C) in transmission geometry using metal foils for calibration purposes. Data reduction and model fitting were performed using the program ATHENA from the IFFEFIT package.¹⁷

Magnetization measurements were performed on lyophilized samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. The temperature was varied between 2 and 300 K, according to a classical zero-field-cooled/field-cooled (ZFC/FC) procedure in the presence of a weak applied magnetic field (5 mT), and the hysteresis loops were obtained at 2 and 300 K in a magnetic field varying from +5 T to -5 T. Also, hysteresis loops after the field-cooling procedure ($H = 5\text{ T}$) were obtained at 2 K.

Results and Discussion

A series of bimetallic nanoparticles with different Co/Ni ratios ($\text{Co}_{75}/\text{Ni}_{25}$, $\text{Co}_{50}/\text{Ni}_{50}$, $\text{Co}_{25}/\text{Ni}_{75}$) were prepared using the apoferitin protein as a nanoreactor where growth is spatially limited by the protein cavity size. In this way, apoferitin was incubated with different Co/Ni proportions (75:25, 50:50 and 25:75) at pH 8 for 24 h. The protein-containing fractions were isolated by size exclusion chromatography and reduced by the addition of excess NaBH_4 (Scheme 1). The so-obtained black homogeneous solutions were dialyzed to eliminate unreacted products. The three CoNi metallic apoferitin samples were characterized by UV-vis spectroscopy, size exclusion chromatography (SEC), TEM, HAADF-STEM, EELS, X-ray absorption near edge structure (XANES), and SQUID techniques.

(11) (a) Harrison, P. M.; Arosio, P. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1275*, 161. (b) Proulx-Curry, P. M.; Chaspeen, N. D. *Coord. Chem. Rev.* **1995**, *144*, 347.

(12) Pead, S.; Durrant, E.; Webb, B.; Larsen, C.; Heaton, D.; Johnson, J.; Watt, G. D. *J. Inorg. Biochem.* **1995**, *59*, 15.

(13) Ueno, T.; Suzuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527.

(14) Uchida, M.; Klem, M. T.; Allen, M.; Suci, P.; Flenniken, M.; Gillitzer, E.; Varpness, Z.; Liepold, L. O.; Young, M.; Douglas, T. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025 and references therein.

(15) (a) Gálvez, N.; Sánchez, P.; Domínguez-Vera, J. M. *Dalton Trans.* **2005**, 2492. (b) Clemente-León, M.; Coronado, E.; Soriano-Portillo, A.; Gálvez, N.; Domínguez-Vera, J. M. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 49. (c) Domínguez-Vera, J. M.; Gálvez, N.; Sánchez, P.; Mota, A. J.; Trasobares, S.; Hernández, J. C.; Calvino, J. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4823.

(16) Douglas, T.; Ripoll, D. R. *Protein Sci.* **1998**, *7*, 1083.

(17) Newville, M. J. *Synchrotron Radiat.* **2001**, *8*, 322.

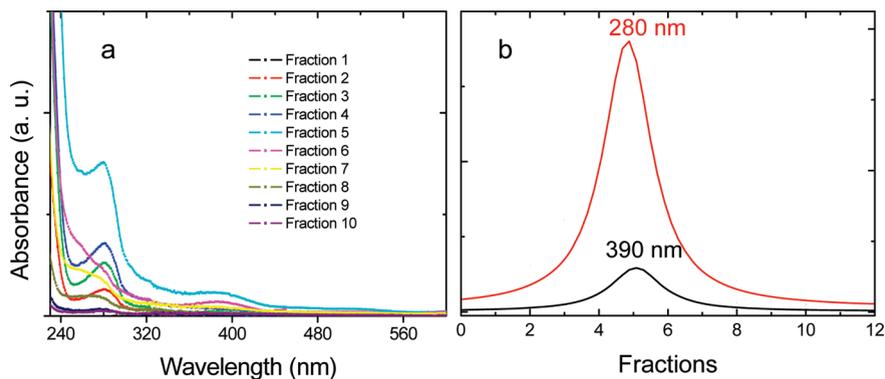


Figure 1. (a) UV-vis spectroscopy of the eluted fractions for the $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$ sample. (b) Size exclusion chromatography coelution profile for the same sample monitored at 280 (red) and 390 nm (black).

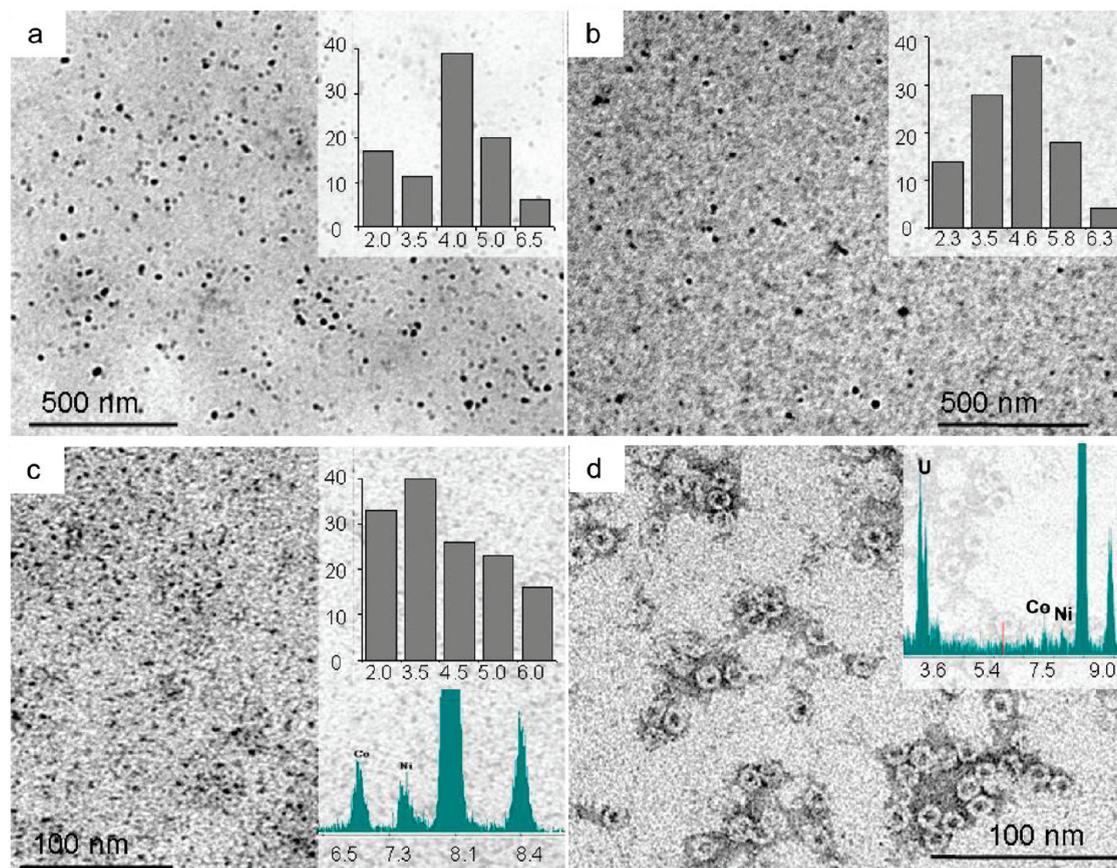


Figure 2. TEM micrographs of (a) $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$, (b) $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$, and (c) $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$ showing spherical nanoparticles and (d) $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$ stained with uranyl acetate. Inset: Particle size histograms and EDX spectra.

The eluted fractions obtained by SEC were analyzed by UV-vis spectroscopy. As an example, the evolution of the optical spectra of the $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$ sample is shown in Figure 1a. The band at 280 nm corresponds with the protein and the band at 390 nm with the metallic core. The spectrum of empty apoferritin did not show absorption at 390 nm. The band at 390 nm is a qualitative indication that metallic reduction took place. The coelution of protein and metal (Figure 1b) indicates that both the protein and metallic core are intimately associated after reduction.¹⁸ The chemical composition

of bimetallic nanoparticles was quantified by atomic absorption spectroscopy and by EDX spectroscopy. The final Co/Ni ratios in the nanoparticles are close to those present in the initial mixture (Table 1). Therefore, one can infer from these data that the final amount of encapsulated cations is directly related to the Co/Ni ratio introduced in the starting solution.

The TEM micrographs of the three samples $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$, $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$, and $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$ are shown in Figure 2. Measuring 50 nanoparticles from each sample showed no significant difference in particle size among the different samples. The metallic cores are generally spherical in shape. The mean diameter was statistically measured to be 4 ± 2.1 , 4.5 ± 1.6 ,

(18) Klem, M. T.; Willits, D.; Solis, D. J.; Belcher, A. M.; Young, M.; Douglas, T. *Adv. Funct. Mater.* **2005**, *15*, 1489.

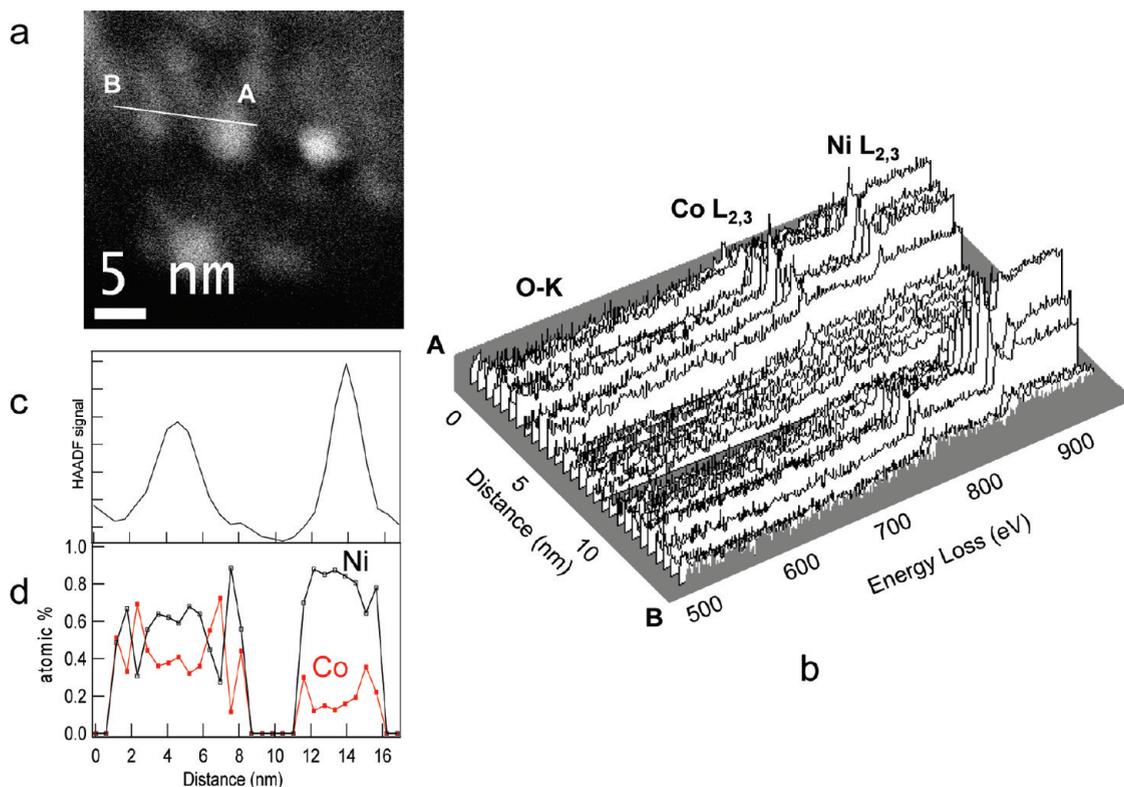


Figure 3. (a) STEM-HAADF image showing the two $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$ nanoparticles where the spectrum line analysis was performed. (b) 3D illustration of a set of 30 EEL spectra taken along the A–B line at the energy loss region of Co/L_{2,3}, Ni/L_{2,3}, and O/K edges (due to the small size of analyzed particles, we cannot rule out, completely, the presence of small amounts of the corresponding oxides). (c) HAADF signal intensity variation acquired simultaneously with the spectrum line shown in b. (d) Co and Ni chemical composition variation along both particles. In red line, the Co atomic ratio and, in black, the Ni atomic ratio.

and 3.9 ± 1.6 nm for $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$, $\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$, and $\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$, respectively. EDX confirmed the presence of Co and Ni (Figure 2c and d, inset), which were not detected outside the particles. When negatively stained with uranyl acetate, protein cages remained intact and metallic cores were surrounded by a protein shell (Figure 2d). The presence of the apoferritin shell prevents irreversible aggregation of metallic nanoparticles and makes them water-soluble. It should be noted that the preparation of CoNi nanoparticles in apoferritin-free media resulted in bulk precipitation of a black solid. No electron diffraction pattern was obtained, suggesting an amorphous material. The X-ray diffractogram of powder samples confirmed an amorphous material (data not shown).

When studying bimetallic systems, the first question to ask is if the two metals are really combined in every nanoparticle. EDX measurements show the presence of Co and Ni but did not give information about how these metals were distributed inside each nanoparticle. To answer this question, we used EEL spectroscopy. We analyzed a series of nanoparticles using the so-called SL technique. Figure 3 illustrates the results obtained when a 0.5 nm probe is scanned across two individual nanoparticles of the $\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$ sample (Figure 3a). The 3D illustration of the acquired spectra, in the 500–950 eV energy range, taken along the A–B line shows the Co–L_{2,3} and Ni–L_{2,3} edges signal (780 and 853 eV, respectively) variation as we go across the two nanoparticles. Note how Co and Ni metals are associated in both nanoparticles and the O–K signal is not observed in the spectra (Figure 3b). The intensity line profile (Figure 3c) shows the HAADF

variation along the particles, a signal that can be related to the projected sample mass. EELS spectra were quantified using standard methods,¹⁹ and the Co (red line) and Ni (black line) chemical composition along both particles was determined (Figure 3d). EELS results clearly showed the presence of both metals, which are intimately associated in these nanoparticles.

Magnetic properties were characterized by SQUID measurements (Figure 4). ZFC/FC magnetization curves were performed as a function of the temperature (2–300 K) at a field of $H = 50$ Oe (Figure 4a). We observed maxima in the ZFC curves for all CoNi samples. The obtained blocking temperatures (T_B) vary from 11 to 70 K, as the Co content increases, and delimit the ferromagnetic–superparamagnetic transition. Above the blocking temperature, the ZFC and FC curves superimpose perfectly, so we can rule out the presence of much aggregation in all of these samples. It is worthy to note that CoNi–apoferritin T_B values range between 6 and 70, which are the T_B values previously reported for pure Ni– and Co–apoferritin nanoparticles, respectively.²⁰ The presence of only one clearly defined peak in the ZFC curve is a further argument in favor of the formation of bimetallic CoNi NPs, with almost homogeneous chemical and physical properties.²¹

(19) Egerton, R. F. *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*, 2nd ed.; Plenum Press: New York, 1996.

(20) Gálvez, N.; Sánchez, P.; Domínguez-Vera, J. M.; Soriano-Portillo, A.; Clemente-León, M.; Coronado, E. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2757.

(21) Poddar, P.; Srinath, S.; Gass, J.; Prasad, B. L. V.; Srikanth, H. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 14060.

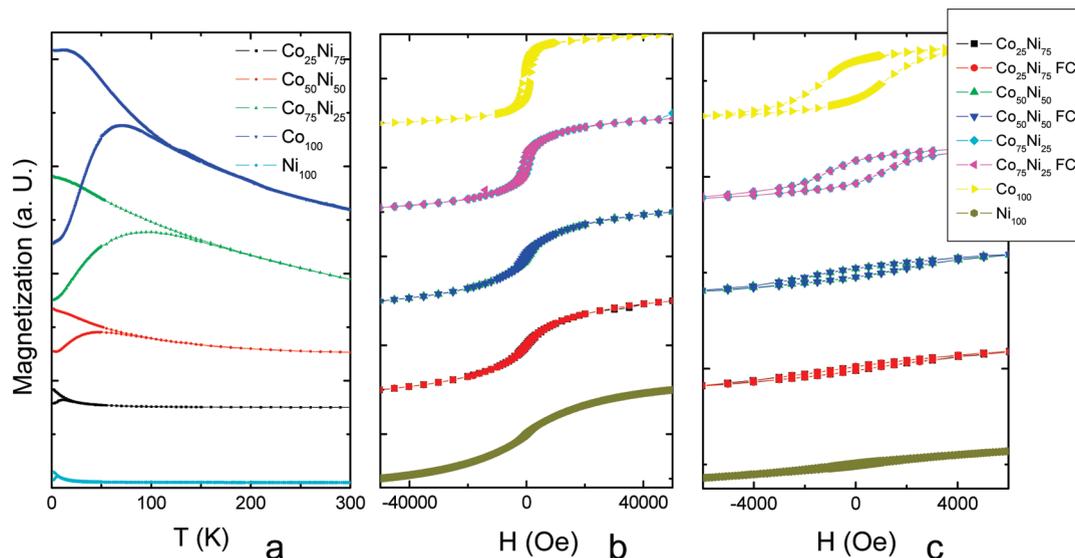


Figure 4. (a) Field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) curves for CoNi samples at 50 Oe. (b) Hysteresis loops recorded at 2 K and hysteresis loops recorded at 2 K in a field cooled at 5 T. (c) Zoom of the M–H curves showing H_C and the absences of exchange-bias shift.

Table 2. Magnetic Properties: Remanence Magnetization (M_R/M_S), Coercive Field (H_C) and Blocking Temperature (T_B) of the CoNi Series^a

	M_R/M_S (2 K)	H_C (Oe)	T_B (K)	initial Co/Ni	final Co/Ni
Co ₂₅ Ni ₇₅	0.0364	500	11	0.33	0.46
Co ₅₀ Ni ₅₀	0.07826	1000	40	1	0.95
Co ₇₅ Ni ₂₅	0.21905	1100	80	3	3.3
^b Co ₁₀₀	0.39888	1250	70		
^b Ni ₁₀₀	0.0264	390	6	0	0

^a Initial Co/Ni molar ratio introduced during the synthesis and final Co/Ni atomic ratio obtained by atomic absorption spectroscopy.
^b Previously reported data, ref 20.

Figure 4b shows the hysteresis loops recorded at 2 K, that is, below the blocking temperature. The CoNi particles show ferromagnetic behavior at this temperature. The magnetization curves measured versus applied fields reflect the particle anisotropy. A remanence of the saturation ($M_R/M_S < 0.5$) is found for all of the samples (Table 2). This value is characteristic of an assembly of randomly oriented single-domain uniaxial particles. The coercivity increases in the range between 500 and 1100 Oe when the cobalt content increases. In any case, H_C values range between the 390 Oe for pure Ni nanoparticles and 1200 Oe for pure Co nanoparticles.²⁰ Hysteresis curves recorded in the field-cooled regime (5 T) did not show a shift of the loops, evidencing the lack of exchange bias coupling (H_{EB}). Magnetization recorded at 300 K did not show coercive fields or remanence magnetization, characteristics of a superparamagnetic behavior (data not shown). In Table 2 are summarized the main magnetic properties of CoNi–apoferritin nanoparticles compared with pure Ni and Co–apoferritin phases. H_C and T_B values are in good agreement with previous published data for similar CoNi compositions and sizes.^{6,7}

An interesting issue in the CoNi system upon oxidation is the possibility of forming core–shell structures (Co/CoO, Ni/NiO, Co/NiO, or Ni/CoO) exhibiting exchange bias coupling, an effect in which the antiferromagnetic shells (CoO or NiO) enhance the effective magnetic anisotropy of the cores (Co or Ni). So, we performed a structural and

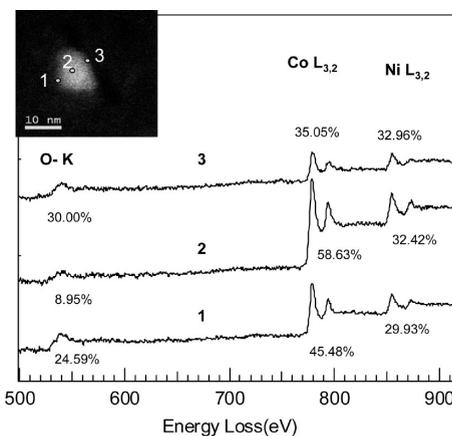


Figure 5. EEL spectra at the energy loss region of O–K, Co–L_{2,3}, and Ni–L_{2,3} edges, extracted from the spectrum line acquired at the Co₇₅Ni₂₅ sample (inset: STEM-HAADF image).

magnetic characterization of the same CoNi samples after intentional oxidation in an air atmosphere.

Figure 5 shows the results extracted from a SL-EELS analysis, 50 spectra with an energy dispersion of 0.5 eV and an acquisition time of 2 s per spectrum were acquired when a 0.5 nm probe was scanned across individual nanoparticles (see inset figure). O–K, Co–L_{2,3}, and Ni–L_{2,3} signals are present all along the nanoparticle. Note how in spectra 1 and 3 (Figure 5), which correspond to surface locations, the O peak is more intense than in spectra 2, corresponding to the nanoparticle core, meaning that oxygen is located, mainly, at the surface. The O, Co, and Ni quantification was carried out analyzing the O–K, Co–L_{2,3}, and Ni–L_{2,3} signals. A power law model for the background subtraction and a Hartree–Slater model for the cross-section were applied.¹⁹

We focused on the change observed in EELS after the oxidation process. Briefly, the results suggested that we had oxidation of CoNi nanoparticles, at least partially, and that the oxidation was mainly localized at the surface of the nanoparticles. Therefore, we used the high sensitivity of the X-ray near-edge structure (XANES) spectroscopic technique

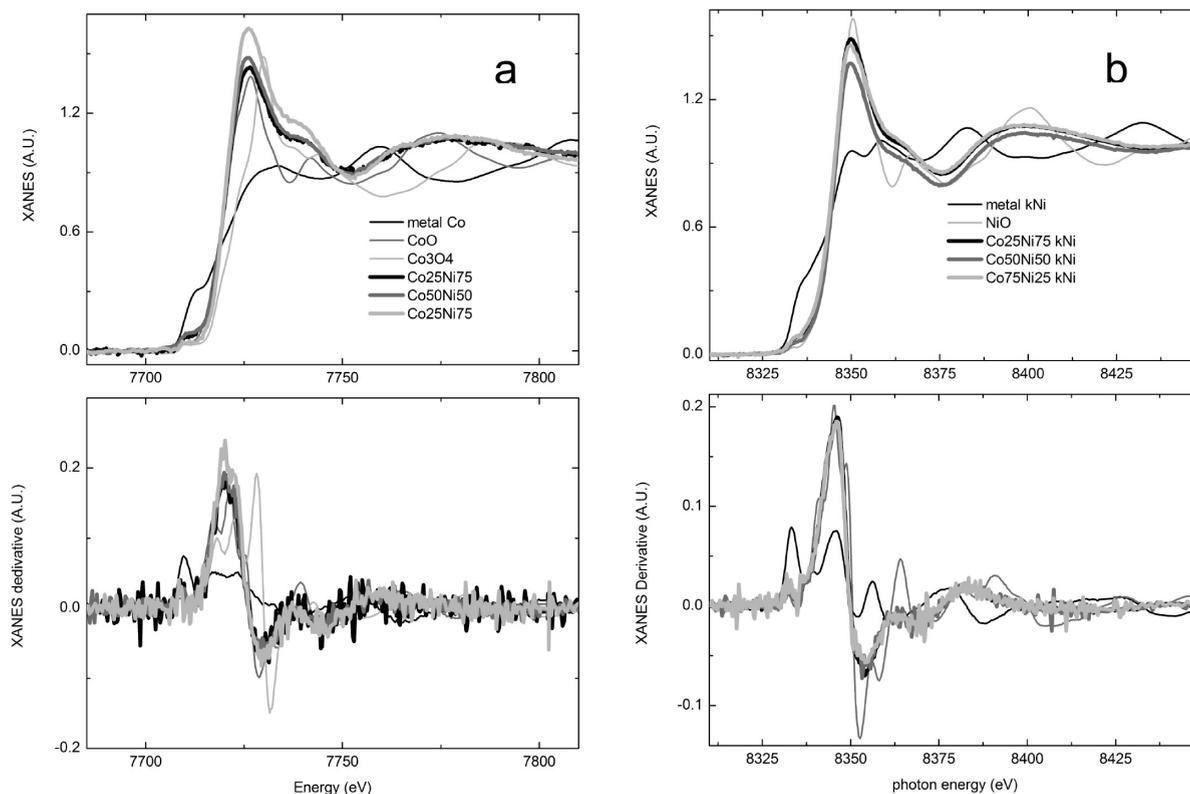


Figure 6. XANES spectra (upper panel) and their first derivatives (lower panel) of the CoNi series at the Co–K edge (a) and at the Ni–K edge (b).

Table 3. Proportion of Co, Co_3O_4 , $\text{Co}(\text{OH})_2$, Ni, and NiO in the CoNi Series Extracted from XANES Experiments

	% $\text{Co}(\text{OH})_2$	% Co	% Co_3O_4	% Ni	% NiO
$\text{Co}_{25}\text{Ni}_{75}$	38 ± 1	13 ± 1	49 ± 1	23 ± 1	77 ± 1
$\text{Co}_{50}\text{Ni}_{50}$	41 ± 1	10 ± 1	49 ± 1	23 ± 1	77 ± 1
$\text{Co}_{75}\text{Ni}_{25}$	37 ± 1	26 ± 1	37 ± 1	28 ± 2	72 ± 2

to gain information about the oxidation state and chemical nature of the CoNi–apoferritin species. XANES results are shown in Figure 6a, cobalt K-edge, and 6b, nickel K-edge, together with the corresponding reference spectra, Co, Co_3O_4 , $\text{Co}(\text{OH})_2$, Ni, and NiO, for comparison. Solid thick lines correspond to the spectra obtained for the CoNi samples, and solid thin lines correspond to the reference spectra (Figure S1, in the Supporting Information, show the corresponding EXAFS spectra). Both the overall shape and structure of the spectra and their derivatives clearly indicate that the CoNi species consist of a mixture of oxides and metallic nanoparticles. Detailed least-squares fits of the XANES data (not shown) indicate that Co is present as Co, Co_3O_4 , and $\text{Co}(\text{OH})_2$ and Ni as Ni and NiO, being the oxides the main phases (Table 3).

The blocking temperature (T_B ; Figure 7a) for oxidized samples varies from <2 to 60 K as the Co content increases. The lower T_B values of oxidized samples with respect to pure bimetallic ones are in agreement with oxide formation.^{21,7}

The hysteresis curves (Figure 7b) show coercivity values for oxidized samples varying between 80 and 500 Oe when the cobalt content increases. In Table 4 are collected the H_C , T_B , and M_R values for oxidized samples. The lower values obtained for H_C , as well as the slightly higher values obtained for M_S (saturation magnetization), as compared

with nonoxidized samples, are coherent with an oxidation of the metal phase. The higher M_S values are, probably, due to an increase of paramagnetic species.^{22,23} Magnetization curves recorded in the field cooled regime (5 T) did not show exchange bias coupling (Figure 7c). The exchange bias coupling occurs in core–shell structures when a ferromagnet (FM core) shares an interface with an antiferromagnet (AFM shell) having a larger magnetic anisotropy, and the AFM pins the orientation of the moment in the FM layer (through exchange interaction), which results in an enhanced coercivity and an asymmetric shift of the hysteresis loop (H_{EB}). This effect depends on the quality of the FM/AFM interface coupling, which is closely related to the crystallinity of the core–shell and the nanoparticle shape. In our samples, despite the presence of Ni and Co oxides, observed by XANES, and that EELS suggested an increase of oxygen in particle surface locations, no evidence of an exchange bias shift was found. Probably, no proper core–shell structure formation and poor crystallinity are responsible for a weak FM/AFM interface coupling. The amorphous structure combined with a lack of thickness renders the AFM shells unable to support the interfacial pinning strength necessary for an exchange shift.^{25,26} Finally, the fact that Co_3O_4 oxide is

(22) Verelst, M.; Ould Ely, T.; Amiens, C.; Snoeck, E.; Lecante, P.; Mosset, A.; Respaud, M.; Broto, J. M.; Chaudret, B. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 2702.

(23) Chen, J. P.; Sorensen, C. M.; Klabunde, K. J.; Hadjipanayis, G. C. *Phys. Rev. B* **1995**, *51*, 11527.

(24) Zhou, Y. Z.; Chen, J. S.; Tay, B. K.; Hu, J. F.; Chow, G. M.; Liu, T.; Yang, P. *Appl. Phys. Lett.* **2007**, *90*, 043111.

(25) Nogués, J.; Skumryev, V.; Sort, J.; Stoyanov, S.; Givord, D. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 157203.

(26) Tracy, J. B.; Weiss, D. N.; Dinega, D. P.; Bavwendi, M. G. *Phys. Rev. B* **2005**, *72*, 064404.

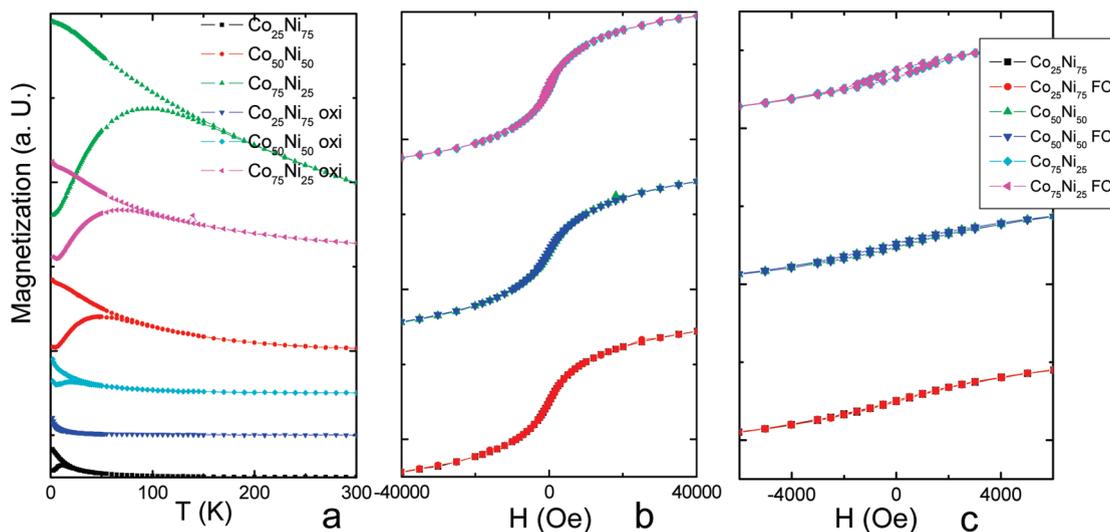


Figure 7. (a) Field-cooled (FC) and zero-field-cooled (ZFC) curves for oxidized CoNi samples at 50 Oe. (b) Hysteresis loops recorded at 2 K and hysteresis loops recorded at 2 K in a field cooled at 5 T. (c) Zoom of the M–H curves showing H_C and the absence of exchange-bias shift.

Table 4. Magnetic Properties: Remanence Magnetization (M_R/M_S), Coercive Field (H_C), and Blocking Temperature (T_B) of Oxidized Samples

oxidized	M_R/M_S (2 K)	H_C (Oe)	T_B (K)
Co ₂₅ Ni ₇₅	0.00848	80	No
Co ₅₀ Ni ₅₀	0.022	270	20
Co ₇₅ Ni ₂₅	0.05	500	90

less effective than CoO oxide in producing exchange bias coupling²⁷ could be claimed as another contributing factor, keeping in mind that the factors determining the strength of the exchange bias interaction remain incomplete.

Conclusions

In this work, the preparation of CoNi nanoparticles of different compositions encapsulated within the apoferritin cavity have been reported. We have shown the convenience of using apoferritin protein as a confined medium where bimetallic nanoparticles can be synthesized under mild chemical conditions. Only a few examples in the literature can be found related to the chemical preparation of bimetallic CoNi nanoparticles, highlighting the importance of finding new synthetic routes. In this sense, biomimetic methods that occur in water are easier and “friendlier” than nonhydrolytic

synthetic methods and therefore offer an interesting approach to metallic nanoparticle synthesis. The three CoNi series showed important H_C and T_B values, varying with composition. These are crucial magnetic properties if one thinks in terms of biomedical applications. Upon oxidation, the CoNi series have decreased superparamagnetic blocking temperatures (T_B) and coercivity (H_C), and no exchange bias shift (H_{EB}) is observed. Probably, a lack of proper core–shell structure formation, poor crystallinity, and the presence of Co₃O₄ instead of CoO oxide are the factors responsible for a weak FM/AFM interface coupling. But still, coercive and T_B values remain of significant importance proving the use of apoferritin protein as a good template for the synthesis of metallic or oxide nanoparticles.

Acknowledgment. We are grateful to the MEC (project CTQ2006-02840), Junta de Andalucía (Proyecto Excelencia FQM-02525), and EU I3 Project ESTEEM (contract no. 026019 RII3) for financial support. N.G. and S.T. thank the MEC for a research contract (Ramón y Cajal program).

Supporting Information Available: (Figure S1) k₂-weighted EXAFS spectra (panel A, nickel K-edge; panel B, cobalt K-edge) and Fourier transform of the spectra in panels A and B (panel C, nickel K-edge; panel D, cobalt K-edge). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(27) Srikala, D.; Singh, V. N.; Banerjee, A.; Mehta, B. R.; Patnaik, S. J. *Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 13882.

Structural and magnetic characterization of Pd nanoparticles encapsulated in apoferritin

This article has been downloaded from IOPscience. Please scroll down to see the full text article.

2010 Nanotechnology 21 274017

(<http://iopscience.iop.org/0957-4484/21/27/274017>)

View [the table of contents for this issue](#), or go to the [journal homepage](#) for more

Download details:

IP Address: 150.214.197.92

The article was downloaded on 18/03/2011 at 09:35

Please note that [terms and conditions apply](#).

Structural and magnetic characterization of Pd nanoparticles encapsulated in apoferritin

Natividad Gálvez¹, Elsa Valero¹, José M Domínguez-Vera¹,
Norberto Masciocchi², Antonietta Guagliardi³,
Miguel Clemente-León^{4,5} and Eugenio Coronado⁴

¹ Departamento Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071, Granada, Spain

² Dipartimento di Scienze Chimiche e Ambientali and CNISM, Università dell'Insubria, via Valleggio 11, 22100 Como, Italy

³ Istituto di Cristallografia del CNR, via Amendola 122/O, 70126 Bari, Italy

⁴ ICMol Instituto de Ciencia Molecular, Universidad de Valencia, calle catedrático José Beltrán 2, 46980, Paterna, Spain

⁵ Fundació General de la Universitat de València, Spain

E-mail: ngalvez@ugr.es and eugenio.coronado@uv.es

Received 26 January 2010, in final form 28 March 2010

Published 22 June 2010

Online at stacks.iop.org/Nano/21/274017

Abstract

Pd nanoparticles exhibiting permanent magnetism at room temperature have been prepared within the apoferritin cavity. Pd nanoparticles in air and under an inert atmosphere were synthesized to study the influence of the aerobic and anaerobic conditions in the final magnetic properties. The surface of nanoparticles as well as the type of crystalline phase could determine the magnetic properties. X-ray powder diffraction, including Debye-function analysis, transmission electronic microscopy, and magnetization measurements have been used for characterizing the nanoparticles.

 Online supplementary data available from stacks.iop.org/Nano/21/274017/mmedia

Metallic nanoparticles (NPs) remain the focus of numerous studies because of their size-dependent electronic, optical, catalytic, and magnetic properties. With the decrease in size of NPs two additional effects come into play: (1) a quantum confinement of the electrons, when the size of a NP decreases to values comparable to the wavelength of an electron at the Fermi level and (2) an increase in the fraction of surface atoms relative to the total number of atoms in a NP. Whereas quantum confinement leads to readjustment of electronic states, the surface atoms with reduced symmetry, unquenched bonds, and exposure to the outside world play a crucial role in the energy minimization and, consequently, in the stabilization of the system [1]. These two factors are, among others, invoked as being responsible for the emergence of permanent magnetism in Pd NPs and thin films [2, 3].

The onset of ferromagnetism in usually non-magnetic materials like Pd and late 4d transition metals is attracting great attention from both theoretical and experimental points

of view. Pd is a very particular case as it lies close to a ferromagnetic instability. Bulk Pd only shows enhanced Pauli paramagnetism, but not ferromagnetism because its high density of states at the Fermi level is not large enough to fulfil the Stoner criterion for ferromagnetism [4]. In order to observe ferromagnetism the density of states at the Fermi level has to be increased. In the last decade Pd nanostructures (ultrathin films or NPs) have been reported to show ferromagnetism [5].

In 1997, Taniyama *et al* found experimental evidence for a magnetic moment in gas-evaporated Pd NPs with average radius below 7 nm [6]. A more complete study was carried out by these authors in 2003 in which surface ferromagnetism was experimentally observed and attributed to the (100) facets of the particle [7]. The Curie temperature of these NPs was higher than 400 K. Hernando *et al* found hysteresis loops at room temperature for alkylammonium protected [8] and thiol capped [9] Pd NPs in the size range between 1.2 and 2.4 nm. The origin of this magnetic behaviour was

explained on the basis of two different mechanisms: (i) when the NP is a pure metallic Pd cluster without covalent Pd–S bonds at the surface or without an oxide passivation layer, ferromagnetism occurs, which can be attributed to the increase in the density of states near the Fermi level; (ii) when a depletion shell structure is formed, with Pd–S or Pd–O chemical bonds at the surface, a highly anisotropic permanent magnetism in the sample appears as a result of the increase of the 4d density of holes at the Pd site [10]. In a recent paper it has been suggested that magnetization increases with decreasing particle size, indicating the important role played by the surface Pd atoms [11]. In previous works we have observed room temperature ferromagnetism in subnanometric Pd nanoparticles having an oxide passivation layer as well as in nanometric Pd NPs encapsulated within the apoferritin cavity [12]. In this last case the magnetic behaviour of Pd NPs containing about 500 atoms (2.4 nm) suggested a coexistence of blocked ferromagnetic entities with superparamagnetic particles and paramagnetic atoms. According to these properties we proposed that the Pd NPs were surrounded by a small Pd oxide shell. We proposed that the origin of the permanent magnetism comes primarily from the surface Pd atoms located at the surface next to the PdO shell. Taking into account the novelty and controversial nature of Pd NPs' magnetic behaviour reported so far, we have used this method to prepare water-soluble Pd NPs controlling the oxidation at the surface of the Pd core. The structural and magnetic results obtained in these systems are reported in this work.

1. Experimental details

Apoferritin (Sigma-Aldrich, 5 mg ml⁻¹) was incubated with 500 equivalents of K₂PdCl₄ for 1 h at room temperature and then NaBH₄ (20 equivalents) was added. The resulting black solution was exhaustively dialyzed against water at 4 °C, chromatographed (Sephadex G-25), and the apoferritin-containing fractions were isolated. The reaction was carried out in air, herein called the Pd(O₂) sample. The black solution thus obtained was diluted in a freshly prepared solution of apoferritin (5 mg ml⁻¹) previous to being submitted to lyophilization. The same chemical reaction was carried out under inert gas flow and the resulting Pd–argon sample will be named herein Pd(Ar). The samples used for the transmission electron microscopy (TEM) study were prepared by diluting the dialyzed solutions of Pd–apoferritin with milli-Q water and then placing a drop onto a carbon-coated Cu grid and drying it in a glove box. The average particle sizes and the standard deviations were estimated from TEM image analysis of 100 particles. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR analytical electron microscope operating at 200 keV. Heat treatment of the NP powders was carried out for both samples, Pd(O₂) and Pd(Ar), under N₂ atmosphere at 500 °C for 2 h in a quartz tube. Magnetic susceptibility measurements were performed on evaporated samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor. The as-prepared and annealed samples were characterized by x-ray powder diffraction (XRD). Experimental data were collected using

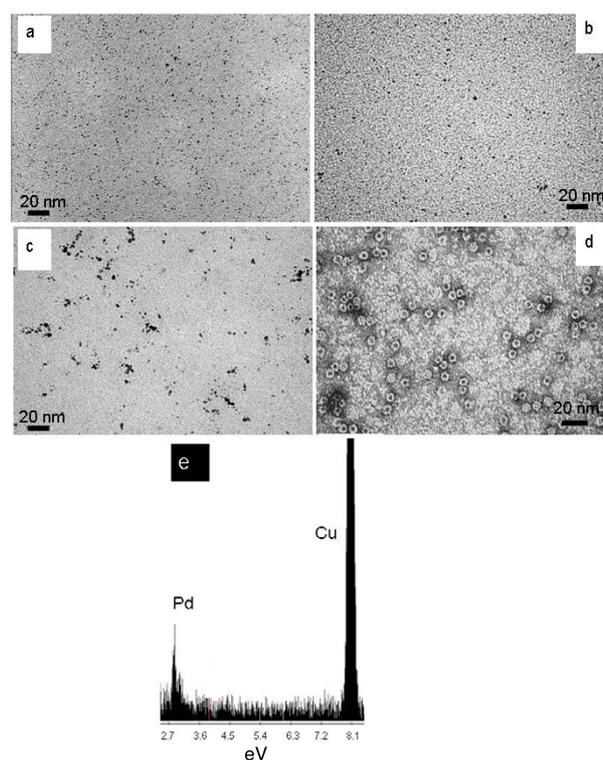


Figure 1. TEM images of: (a) Pd NPs prepared under air atmosphere; (b) Pd NPs prepared under Ar atmosphere; (c) sample (a) heated at 500 °C; (d) sample (a) negatively stained with uranyl acetate; (e) EDS spectrum from sample (a), similar spectra were obtained for the other three samples (data not shown for clarity).

a Bruker D8 ADVANCE diffractometer (in Bragg–Brentano θ : θ geometry) with Ni-filtered Cu K α radiation, a Lynxeye position sensitive detector, and a quartz monocrystal as zero-background plate, with scan range $5^\circ < 2\theta < 85^\circ$ and scan rate $0.05^\circ 2\theta \text{ min}^{-1}$.

2. Results and discussion

Apoferritin acts as a nanoreactor for the preparation of metallic NPs [13]. In order to gain an insight into the role of synthesis conditions in the magnetic properties, we have prepared two kinds of apoferritin–Pd NPs: (1) Pd NPs prepared in an oxygen atmosphere, Pd(O₂), and submitted to dilution in empty apoferritin solution to improve insulation of NPs and (2) Pd NPs prepared in argon atmosphere, Pd(Ar). The 500 °C heated counterpart samples, Pd(O₂/500) and Pd(Ar/500), are also structurally characterized and magnetically studied. Typical TEM images for these samples are shown in figure 1.

Discrete electron-dense cores, which are spherical in shape, are clearly observed. The mean diameter was statistically measured to be $2.4 \pm 0.19 \text{ nm}$ for the Pd(O₂) (figure 1(a)) sample and $2.5 \pm 0.19 \text{ nm}$ (figure 1(b)) for the Pd(Ar) sample; the latter are only slightly higher than the average value determined by diffraction methods (*vide infra*); this small discrepancy may, however, be explained by the intrinsic resolution of the instrument used (not high resolution TEM (HRTEM)) and by the known fact that XRD measures

Table 1. Summary of the results from XRD analysis. Values in italics were obtained from the DF method, while those in parentheses were derived by the FPA approach on crystalline fcc Pd and tetragonal PdO models. (Note: These approximate values have been derived using the convolutive FPA (implemented in TOPAS) assuming isotropic, monodisperse, fcc Pd clusters. However, the occurrence of icosahedral and decahedral nanoparticles generates a physically implausible atomic Debye–Waller factor for the Pd(Ar) sample and an underestimation of the average particle size in Pd(Ar/500). Analogously, the bimodal size distribution of fcc Pd nanoclusters in Pd(O₂/500) affects the estimated average particle size in the FPA approach.)

Material	Pd average dimensions (nm)	Pd structure type (rel. %)	PdO average dimensions (nm)	PdO/Pd ratio
Pd(Ar)	<i>Icosahedra, 1.7</i> <i>Decahedra, 1.6</i> (1.7)	<i>Icosahedra, 88%</i> <i>Decahedra, 12%</i>	—	0
Pd(Ar/500)	<i>Icosahedra, 3.0</i> <i>Decahedra, 3.3</i> <i>fcc, 4.3</i> (2.6)	<i>Icosahedra, 37%</i> <i>Decahedra, 23%</i> <i>fcc, 40%</i>	—	0
Pd(O ₂)	(Amorphous)	—	—	—
Pd(O ₂ /500)	<i>Icosahedra, 2.7</i> <i>fcc, 4.6</i> <i>fcc, 12.1</i> (5.7)	<i>Icosahedra, 6%</i> <i>fcc, 46%</i> <i>fcc, 12%</i>	2.7 (5.0)	0.54:1 (0.47:1)

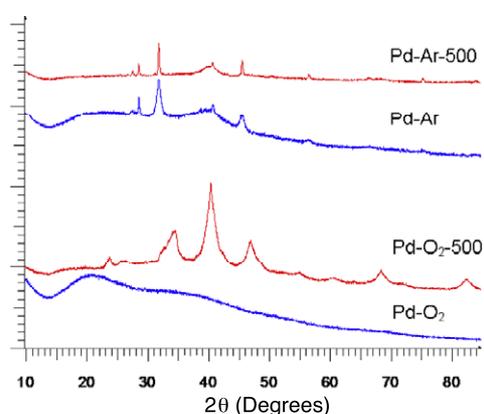


Figure 2. Plot of the raw XRD data of the nanocrystalline samples. (This figure is in colour only in the electronic version)

coherent domains, necessarily smaller than, or equal in size to, individual grains. In the case of samples Pd(O₂/500) (figure 1(c)) and Pd(Ar/500) (not shown) the NPs form aggregates of different sizes.

TEM images of the Pd(O₂) sample negatively stained with uranyl acetate (to visualize the protein shell) confirmed that the particles were actually produced within the apoferritin interior (figure 1(d)). Energy dispersive spectroscopy (EDS) confirmed that all samples contained Pd (figure 1(e)). The presence of the apoferritin coat prevents irreversible aggregation of the metal particles and their subsequent precipitation.

The XRD patterns of the as-synthesized Pd(O₂) and Pd(Ar) NPs are shown in figure 2. They appear quite different: while the diffraction trace of the material prepared in air is almost featureless (indicating that the metal, or metal-oxide, NPs are essentially amorphous), the broad peak centred around $2\theta = 40^\circ$ suggests the presence, in Pd(Ar), of very small Pd nanocrystals. As expected, a set of broad low-angle peaks ($2\theta = 11^\circ$ and 20°) attributable to the apoferritin shell is also noticeable, but, due to their angular location, they have been eliminated from the structural analysis later reported.

Upon heating, at 500 °C, both samples show sintering, or coalescence, of Pd NPs, although to a different extent (see

table 1); in addition, a partial oxidation to PdO (tetragonal phase) [14] is observed upon treatment in air only.

However, it should be mentioned here that a couple of weak and broad peaks, falling near 24° – 26° 2θ are observed in the Pd(O₂/500) sample, still lacking a structural or analytical identification. These contaminants might be attributed to complex, still unknown, PdX_n phases, X being N and O (from air), or even C (from decomposition of apoferritin), or a mixture thereof.

The complete structural and microstructural analysis was performed by matching two different modelling approaches: the more conventional fundamental parameters approach (FPA [15]) and the total-scattering Debye-function-based method (DF [16]⁶). FPA allowed the estimation of the instrumental peak broadening (about 0.07°, thus not affecting the microstructural analysis) and of average particle sizes in Rietveld-like refinements. Structure types, (including non-crystallographic ones), size distributions and shapes of the NPs were determined by the DF approach [17]. To do this, atomistic shell cluster models for Pd (fcc, and multiple twinned icosahedra and decahedra), as well as tetragonal PdO were employed⁷. Table 1 contains the most relevant structural features derived from the combined analyses. An example of the fitting results obtained by this approach is shown, for the Pd(Ar) sample, in figure 3. A similar procedure was applied to the Pd(Ar/500) sample and to the Pd(O₂/500) material (fits not shown here), but could not be applied to the Pd(O₂) one, as it showed a featureless XRD trace.

Briefly, when the Pd NPs are prepared under inert atmosphere at room temperature (Pd(Ar) sample), icosahedral and a small fraction of decahedral structures are detected (about 1.7 nm in diameter), while heating at 500 °C promotes the formation of fcc (cuboctahedral) clusters (Pd(Ar/500) sample). Amorphous Pd, obtained in air at room temperature (the Pd(O₂) sample), transforms upon heating into a mixture

⁶ The Debye formula computes the powder diffraction pattern from the set of interatomic distances of all given clusters. Therefore, also non-crystallographic structure types can be handled.

⁷ A few contaminant peaks (nanocrystalline NaCl and KCl) were also included in our modelling to fit the whole experimental pattern.

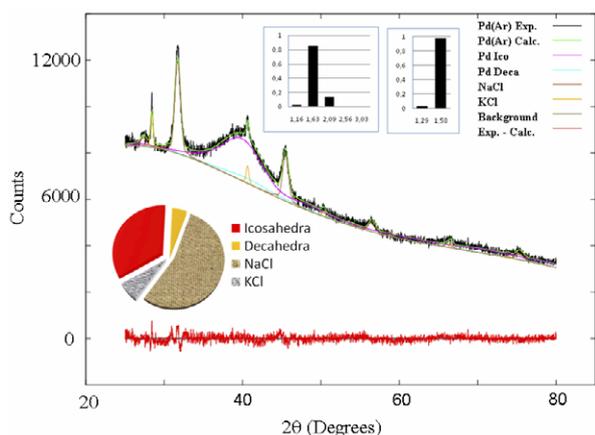


Figure 3. Debye-function modelling of the XRD pattern of the native sample Pd(Ar), showing the presence of icosahedral NPs and a small fraction of decahedra. Their size distributions are shown in the insets. Sizes are given as particle diameters (nm) for icosahedra (left) and decahedra (right); in both cases, nearly monodisperse distributions can be observed.

of PdO and (mainly) fcc Pd, the latter showing a bimodal size distribution with quite different average diameters (see table 1) leading to hyper-Lorentzian peak shapes [18]. A similar effect was also observed for catalytically active Pt nanocrystals [19]. Interestingly, coexistence of the four structural types (including amorphous material) has been observed for Pd clusters prepared by colloidal methods [20].

Magnetic measurements have been carried out using a Quantum Design SQUID magnetometer. The diamagnetism from the holder was corrected by measuring the empty holder at the same conditions (magnetic field and temperature) used for the measurement of the Pd NPs. After removing this contribution, the obtained magnetization values arise directly from the Pd. Figure 4 shows the magnetization (M) versus field (H) curves at different temperatures for the four different samples. The large coercivity (H_c) and saturation magnetization (M_s) values measured are evidence of permanent magnetism in all the cases. As we have previously reported [12], a clear ferromagnetic behaviour is observed.

For the samples synthesized at room temperature hysteresis loops are observed in the range of 2–300 K. The coercivity values are of the same order: 70 Oe and 100 Oe at 2 K and 70 Oe and 90 Oe at 300 K for Pd(O₂) and Pd(Ar), respectively (table 2) [10–13]. The magnetization versus H curves above 100 K show a sharp increase at low fields and a tendency to saturation at high fields. In this range these curves do not appreciably change with temperature (SI available at stacks.iop.org/Nano/21/274017/mmedia). At low temperatures (below 100 K) the magnetization of the Pd(O₂) sample is far from saturation and the curves show a significant temperature dependence, while that of Pd(Ar) shows a clear tendency to saturation (figures 4(b) and (c)).

The M_s values and coercive fields for the Pd(Ar) sample, between 50 and 300 K, are close to those observed for other Pd NPs of similar size reported in the literature (see table 2 [10–12, 21]). For instance, 2.4 nm tetraalkylammonium protected Pd NPs prepared by Hernando *et al* [10] present

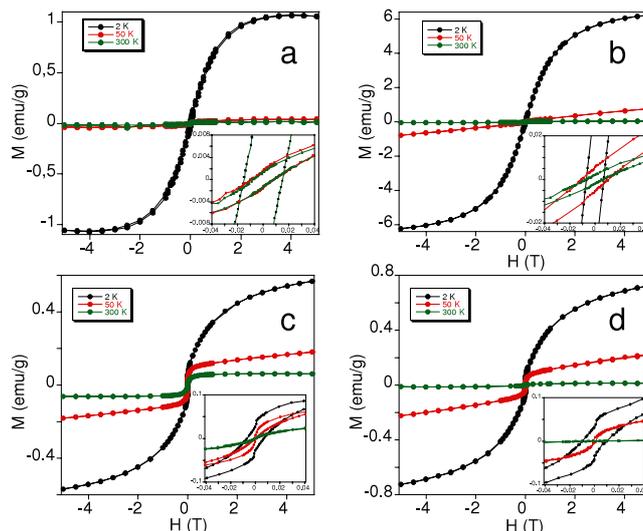


Figure 4. Magnetization (M) versus field (H) of (a) Pd(Ar), (b) Pd(O₂), (c) Pd(Ar/500), (d) Pd(O₂/500) at different temperatures: $T = 2$ K black line, $T = 50$ K red line, and $T = 300$ K green line. Insets show an enlargement of the low-field regions.

Table 2. Saturation magnetization (M_s) and coercivity (H_c) of Pd NPs prepared at room temperature and 500 °C at 2 and 300 K.

	Pd(Ar)	Pd(O ₂)	Pd(Ar/500)	Pd(O ₂ /500)
M_s (emu g ⁻¹) 2 K	1.1	6.2	0.6	0.7
H_c (Oe) at 2 K	100	70	70	100
M_s (emu g ⁻¹) 300 K	0.02	0.03	0.06	0.02
H_c (Oe) at 300 K	90	70	0	0

M_s values around 0.04 emu g⁻¹ at room temperature which are close to those obtained in our samples. XRD data of the Pd(Ar) sample (see below) indicate that the Pd core is composed of multiple twinned icosahedra and decahedra. The Pd(Ar) samples are poorly crystalline and have icosahedral and decahedral structures. These structures with reduced symmetry could be at the origin of the permanent magnetism observed. It has been predicted theoretically that icosahedral structure instead of the typical bulk fcc symmetry could be at the origin of the ferromagnetism in Pd NPs [8]. Under noncubic local field symmetry the d atomic level does not split into two, e_g and t_{2g} , sublevels giving rise to a drastic narrowing of the 4d band, sufficient for the Stoner criterion to hold. XRD data of the Pd(Ar) sample seem to confirm this point.

The strong increase of M_s at 2 K in this Pd(Ar) sample is not consistent with the magnetic behaviour of Pd NPs reported in the literature in which a depletion PdO shell is not present. A possible explanation for this low-temperature behaviour is the coexistence of blocked ferromagnetic entities, responsible for the permanent magnetism at higher temperatures, with presumably superparamagnetic and paramagnetic contributions, responsible for the increase of M_s at lower temperatures. This minor contribution may arise from Pd NPs having lower blocking temperatures and from the presence of residual paramagnetic centres (paramagnetic impurities, some Pd moments coming from the core of the NP). The lower crystallinity of these samples compared to other Pd

NPs described in the literature, their polydispersity, or the coexistence of different Pd structure types could be responsible for this effect.

The magnetic behaviour of the sample prepared under air Pd(O₂) at room temperature cannot be correlated with the XRD data as it is amorphous. It is possible to study the effect of the presence of air on the magnetic properties during the synthesis. The main difference with respect to the Pd(Ar) sample is observed in the low-temperature magnetization measurements. M_s at 2 K of both samples increase two orders of magnitude with respect to the measurements at room temperature but this increase is more important for the Pd(O₂) samples which presents a M_s six times higher than that of Pd(Ar). Furthermore, magnetization of Pd(O₂) at 2 and 50 K does not saturate at 5 T while that of Pd(Ar) shows a clearer tendency to saturation. These differences indicate that the paramagnetic and superparamagnetic contributions are more important in the sample prepared under air and this could be attributed to the partial oxidation of the Pd NPs prepared under air. When a depletion shell structure is promoted, the atoms depleting the NP (S or O) are able to increase the 4d density of holes at the Pd site and to localize a magnetic moment, leading to a permanent magnetism in the sample [10]. This phenomenon is observed only at low temperatures when the depletion shell is formed by PdO. Anyway, the lack of crystallinity of Pd(O₂) samples does not allow us to prove this hypothesis.

For the heated samples, either under an air or Ar atmosphere, the magnetic behaviour is different as compared with the non-heated ones. In both cases, a hysteresis loop of magnetization is observed with a coercive field of 70 and 100 Oe at 2 K for Pd(O₂/500) and Pd(Ar/500), which vanishes at 100 and 200 K respectively (see supporting information available at stacks.iop.org/Nano/21/274017/mmedia), suggesting that the blocking temperature of these samples is below room temperature. XRD and TEM data showed that heating at 500 °C causes a sintering process of the NPs that increases their size. This could be the explanation of the decrease of the blocking temperature. Hyeon *et al* have reported, recently, trioctylphosphine–Pd NPs varying from 2 to 10 nm [11], where ferromagnetism grows stronger with reducing particle size, indicating the important role played by the surface Pd atoms. These authors also prepared Pd aggregates of 100 nm displaying unsaturated magnetization and negligible coercivity. In our case, the heated treatment did not produce NPs or aggregates large enough to result in the loss of permanent magnetism, but in a decrease of the blocking temperature. Indeed the maximum size of these aggregates observed by TEM is 20 nm for Pd(Ar/500) and 50 nm for Pd(O₂/500). The lower blocking temperature of the Pd(O₂/500) sample could be related to their larger size compared with the Pd(Ar/500) sample.

On the other hand, for the samples synthesized under argon atmosphere, the M_s value of Pd(Ar/500) NPs at 300 K (0.06 emu g⁻¹) is higher than that of the Pd(Ar) NPs (0.02 emu g⁻¹). Keeping in mind that the Pd(Ar/500) NPs' sizes are higher than Pd(Ar) ones, this increase of M_s with the nanoparticle size contrasts with that observed in

the literature [11]. We have to take into account, however, that the composition of the NPs changes after the heating process. Therefore, the increase of M_s could be related to the structural changes undergone after calcination (presence of fcc clusters, enhanced crystallinity). This effect is not observed in the Pd(O₂/500) sample that presents a more marked size increase after heating. Furthermore, the presence of air also induces higher M_s at low temperatures and a lower tendency to saturation, as observed in the samples prepared at room temperature. This effect can be related to the presence of a depletion shell of PdO which is detected by XRD.

3. Conclusions

We have prepared Pd NPs in air and argon atmospheres, encapsulated within the apoferritin cavity, that show permanent magnetism up to room temperature. The magnetic behaviour of these NPs has been correlated with the XRD analysis. An important point to remark in all these samples is the large coercivity and saturated magnetization values comparable with the reported ones so far, which provide an additional support for the permanent magnetism of these Pd NPs. For samples prepared under Ar atmosphere, the presence of icosahedral and decahedral Pd phases could be responsible for the magnetic properties. This is in agreement with theoretical calculations that predict an increase of the density of states near the Fermi level under noncubic local field symmetry sufficient for the Stoner criterion to hold. For the Pd NPs synthesized under air atmosphere, the magnetic properties at low temperatures could be dominated by the surface Pd atoms located next to the PdO shell, which induce the permanent magnetism observed. The Pd–apoferritin system constitutes one of the few examples reported in the literature presenting such interesting magnetic behaviour for Pd NPs.

Acknowledgments

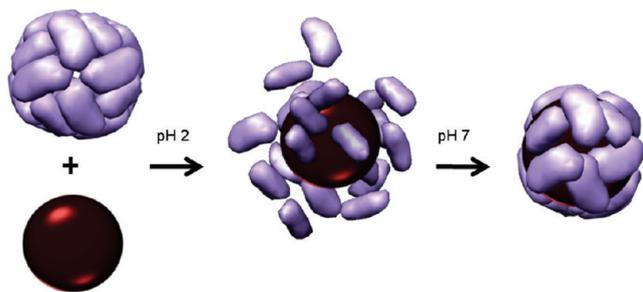
NG thanks the MEC for a research contract (Ramón y Cajal programme). Financial support from the European Union (MolSpinQIP and SPINMOL ERC Advanced Grant), the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Projects Consolider-Ingenio in Molecular Nanoscience, CSD2007-00010, CTQ2008-06720, and CTQ2006-02840), the Fondazione CARIPO (Project 2009-2446) and the Junta de Andalucía (Project FQM-02525) and the Generalitat Valenciana (Project PROMETEO/2008/128) are gratefully acknowledged. Núria Clos from the Universitat de Barcelona is gratefully acknowledged for assistance in the magnetic measurements.

References

- [1] Gambardella P 2002 *Nature* **416** 301
- [2] Zeng H, Li J, Liu J P, Wang Z L and Sun S 2002 *Nature* **420** 395
- [3] Chen H, Bremer N E and Callaway J 1989 *Phys. Rev. B* **40** 1443 and references therein
- [4] Takano N, Kai T, Shiiki K and Terasaki F 1996 *Solid State Commun.* **97** 153

- [5] Zhu M J, Bylander D M and Kleinman L 1990 *Phys. Rev. B* **42** 2874
Eriksson O, Alberts R C and Boring A M 1991 *Phys. Rev. Lett.* **66** 1350
Blügel S 1992 *Europhys. Lett.* **18** 257
- [6] Taniyama T, Ohta E and Sato T 1997 *Europhys. Lett.* **38** 195
- [7] Shinohara T, Sato T and Taniyam T 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 197201
- [8] Sampedro B, Crespo P, Hernando A, Litrán R, Sánchez-López J C, López-Cartes C, Fernández A, Ramírez J, González-Calbet J and Vallet M 2003 *Phys. Rev. Lett.* **91** 23203
- [9] Hernando A, Sampedro B, Litrán R, Rojas T C, Sánchez-López J C and Fernández A 2006 *Nanotechnology* **16** 1449
- [10] Litrán R, Sampedro B, Rojas T C, Multigner M, Sánchez-López J C, Crespo P, López-Cartes C, García M A, Hernando A and Fernández A 2006 *Phys. Rev. B* **73** 054404
- [11] Angappane S, Park J, Jang Y, Hyeon T and Park J G 2008 *J. Phys.: Condens. Matter* **20** 295209
- [12] Clemente-León M, Coronado E, Soriano-Portillo A, Gálvez N and Domínguez-Vera J M 2007 *J. Mater. Chem.* **17** 49
Coronado E, Ribera A, García-Martínez J, Linares N and Liz-Marzán L M 2008 *J. Mater. Chem.* **18** 5682
- [13] Uchida M, Klem M T, Allen M, Suci P, Flenniken M, Gillitzer E, Varpness Z, Liepold L O, Young M and Douglas T 2007 *Adv. Mater.* **19** 1025 and references therein
- Ueno T, Suzuki M, Goto T, Matsumoto T, Nagayama K and Watanabe Y 2004 *Angew. Chem. Int. Edn* **43** 2527
- Galvez N, Sanchez P and Domínguez-Vera J M 2005 *Dalton Trans.* 2492
- Gálvez N, Sánchez P, Domínguez-Vera J M, Soriano-Portillo A, Clemente-León M and Coronado E 2006 *J. Mater. Chem.* **16** 2757
- [14] X-Ray Powder Diffraction File JCPDS-ICDD (Joint Committee on Powder Diffraction Standards International Centre for Diffraction Data) 46-1043 for Pd fcc and 46-1211 for PdO
- [15] Cheary R W and Coelho A A 1992 *J. Appl. Crystallogr.* **25** 109
- [16] Debye P 1915 *Ann. Phys. Lpz.* **46** 809
- [17] Cervellino A, Giannini C and Guagliardi A 2003 *J. Appl. Crystallogr.* **36** 1148
- Cervellino A, Giannini C, Guagliardi A and Zanchet D 2004 *Eur. Phys. J. B* **41** 485
- Giannini C, Cervellino A, Guagliardi A, Gozzo F, Zanchet D, Rocha T and Ladisa M 2007 *Z. Kristallogr. S* **26** 105
- Cozzoli P D et al 2006 *Nano Lett.* **6** 1966
- [18] Young R A and Sakthivel A 1988 *J. Appl. Crystallogr.* **21** 416
- [19] Hyde T 2008 *Platinum Met. Rev.* **52** 128
- [20] Yacamán M J, Marín-Almazo M and Ascencio J A 2001 *J. Mol. Catal. A* **173** 61
- [21] Jeon Y T and Lee G H 2008 *J. Appl. Phys.* **103** 094313

Scheme 1. Schematic Encapsulation of Maghemite Nanoparticles Thanks to the pH-Driven Disassembly–Assembly Process Exhibited in Apoferritin



66 may be recognized by carbohydrate-binding proteins such as
 67 antibodies, enzymes, or lectins; the latter bind to mono- and
 68 oligosaccharides with high specificity.⁹ Numerous examples of
 69 magnetic nanoparticles coated with polysaccharides or biocompatible
 70 polymers (dextran, albumin, etc.) have also been
 71 announced.³ However, there are only a few examples of nano-
 72 particles functionalized with biologically significant oligosaccharides,
 73 where the saccharides truly confer a new biological
 74 functionality to the inorganic nanoparticle and not a simple
 75 stabilizing role.¹⁰

76 In this Article, we describe a new synthetic method for
 77 obtaining carbohydrate-functionalized magnetic nanoparticles
 78 based on the pH-driven disassembly/assembly of horse spleen
 79 apoferritin. To our knowledge, this is the first example of both a
 80 templated self-assembly of apoferritin around maghemite nano-
 81 particles and its conversion into a glycosylated specimen.

RESULTS AND DISCUSSION

83 In a first step, magnetite nanoparticles were prepared by co-
 84 precipitation of iron salts in water. As compared to non-polar
 85 organometallic routes,¹¹ aqueous syntheses are more reproduc-
 86 ible, cheaper, and non-toxic, and the as-prepared samples have
 87 high aqueous stability and biological compatibility. Besides,
 88 magnetite nanoparticles obtained in organic solvents are usually
 89 stabilized by hydrophobic non-degradable surfactants and have
 90 the problem of replacing these surfactants by hydrophilic ones.
 91 The aqueous coprecipitation method allows one to tune the size
 92 of magnetite nanoparticles by controlling the pH and ionic
 93 strength of the synthetic medium, as was previously reported.¹²
 94 We synthesized magnetite nanoparticles of 4 and 6 nm on
 95 average size. Oxidation of magnetite in acidic conditions resulted
 96 in a colloid of maghemite (γ -Fe₂O₃) nanoparticles, which are
 97 chemically stable at pH 2.¹³

98 In a second step, the acidic colloid of maghemite nanoparticles
 99 was incubated with disassembled apoferritin at pH 2, and then
 100 the protein was reassembled by increasing the pH at 7, entrap-
 101 ping the nanoparticles inside the cavity (Scheme 1). At pH 2, the
 102 apoferritin is dissociated into its 24 polypeptide subunits, and the
 103 increase of the pH up to pH 7 produces the reassembly of
 104 subunits. We obtained water-soluble, size-controlled magnetic
 105 bionanoparticles thanks to this synthetic approach. In a control
 106 experiment, without protein, precipitation of maghemite nano-
 107 particles occurs.

108 The presence of magnetic iron oxide nanoparticles serves as a
 109 template for the protein to self-assemble. The 4 nm sample will
 110 be named herein APOMAG-4 and the 6 nm sample APOMAG-6.

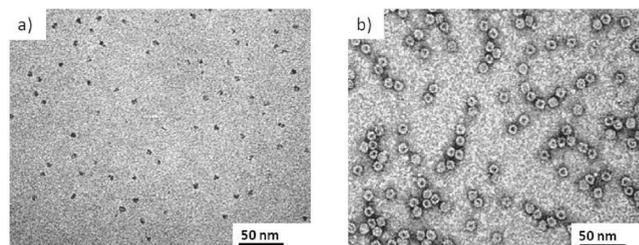


Figure 1. (a) TEM image of APOMAG-4; and (b) uranyl negative stained of (a). Similar images were obtained for the APOMAG-6 sample (data not shown).

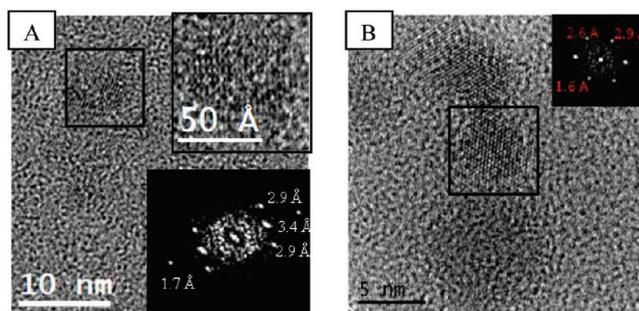


Figure 2. (A) HREM image of APOMAG-4. The black square shows a nanoparticle. Inset: DDP of the selected particle. (B) Same as (A) for the APOMAG-6 sample.

As an advantage over previous reported works for the in situ
 synthesis of magnetite inside the apoferritin, we used a stable
 colloid of pre-formed maghemite nanoparticles that does not
 evolve chemically and prevents the eventual precipitation of
 material outside the protein.¹⁴

The purification of the system was carried out by size exclusion
 chromatography (Supporting Information S11). The fractions
 containing protein and magnetic nanoparticles were isolated and
 studied by transmission electron microscopy (TEM), high angle
 annular dark field scanning electron microscopy (HAADF-
 STEM), electron energy loss spectroscopy (EELS), X-ray dif-
 fraction (XRD), SQUID technique, relaxivity measurements,
 and MRI in vivo experiments.

TEM images of magnetic colloids mainly showed irregular
 spherical nanoparticles (SI2). As expected, maghemite nano-
 particles are found more isolated when encapsulated by apo-
 ferritin, as observed in Figure 1a. The protein shell was visualized
 by negative staining with uranyl acetate, confirming that the nano-
 particles were actually encapsulated within the apoferritin shell
 (Figure 1b). Numerical analysis of the images showed a 75% of
 successful encapsulation. Negative staining of the samples at pH 2
 revealed the dissociated state (i.e., non-assembly) of the protein
 (data not shown).

The average particle size and standard deviation were esti-
 mated from the HAADF-STEM images (Supporting Informa-
 tion S14). The mean particle sizes were 4.2 ± 0.2 and $6.5 \pm$
 0.2 nm for the APOMAG-4 and APOMAG-6, respectively.

Figure 2 shows high-resolution electron microscopy (HREM)
 images for both Apomaghemite samples. The digital diffraction
 pattern (DDP) of one particle clearly shows eight spots that
 correspond to four families of equivalent crystallographic planes.
 An in-depth analysis of the DDP using the Z-Axis software¹⁵

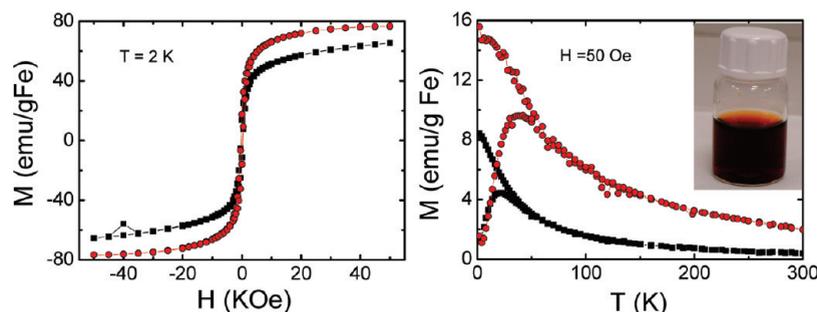


Figure 3. (a) Hysteresis loops of APOMAG-4 (■) and APOMAG-6 (red ●) samples at $T = 2$ K; and (b) zero field cooled-field cooled curves registered at a field (H) of 50 Oe. Inset: APOMAG-4 sample.

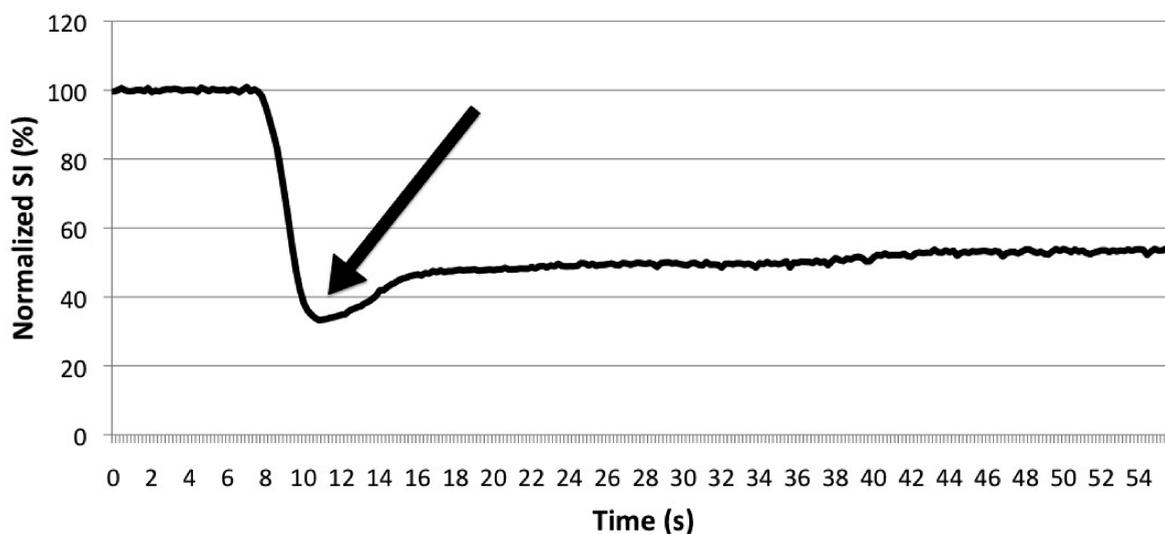


Figure 4. Representative first passage curve obtained using APOMAG-6. The arrow indicates the time point of maximum signal drop.

indicated that the calculated d -spacing and angles can only be interpreted considering the following structures: magnetite or maghemite. Besides, dynamic diffraction pattern and image simulation of the different possible phases in the adequate orientation suggested that the most suitable phases were magnetite and maghemite. Some electron energy loss spectra (EELS) for both Apomaghemite samples are included in Supporting Information SI4, showing that apart from maghemite we cannot exclude the presence of a small quantity of magnetite.

X-ray diffraction (XRD) measurements of the magnetic colloids also showed typical XRD patterns for maghemite and/or magnetite spinel oxides (Supporting Information SI3).¹² On the basis of the calculations with the Debye–Scherrer’s formula, the mean grain sizes of maghemites were 3.8 and 6.5 nm for APOMAG-4 and APOMAG-6, respectively, consistent with HAADF-STEM measurements.

Before using the Apomaghemite nanopatform for biological tests, we examined their magnetic properties by the SQUID technique (Figure 3).¹⁶ Zero field cooled-field cooled (ZFC-FC) magnetization curves were performed as a function of temperature (2–300 K) at a field of $H = 50$ Oe (Figure 3b). The obtained blocking temperatures (T_B) were 20 and 35 K for APOMAG-4 and APOMAG-6, respectively. Above T_B , ZFC and FC curves superimpose perfectly, so we can rule out the presence of much aggregation. It is relevant to note that the obtained T_B values were comparable to that of γ - Fe_2O_3 nanoparticles of the same size.^{16,17}

Table 1. Maximum Signal Drop (Average \pm Standard Deviation) in First Passage Curves for APOMAG-4, APOMAG-6, and Endorem^a

normalized SI (%)	
APOMAG-4	70.5 \pm 9.8
APOMAG-6	76.5 \pm 7.2
Endorem	73.6 \pm 4.1

^a Values of SI are normalized as described in the text.

Figure 3a shows the hysteresis loops recorded at 2 K, that is, below the blocking temperature. The particles showed ferrimagnetic behavior at this temperature. The magnetization (M) curves measured versus applied fields (H) reflect the particle anisotropy. The coercivity (H_c) was 336 Oe for APOMAG-4 and 340 Oe for APOMAG-6, and the mass magnetization (M_S) was 64 and 76 emu/g Fe for APOMAG-4 and APOMAG-6, respectively, in agreement with values reported previously for the same size and nanomaterial.¹⁷ Magnetization recorded at 300 K did not show coercive field or remanence magnetization, characteristics of a superparamagnetic regime.

MRI is one of the most powerful noninvasive techniques for the diagnosis of many diseases in human soft tissues. We tested the efficiency in contrasting MRI images of the Apomaghemite samples. In MRI, the contrast enhancement effects are directly related to the relaxivity value of the nanoparticles. Measurements

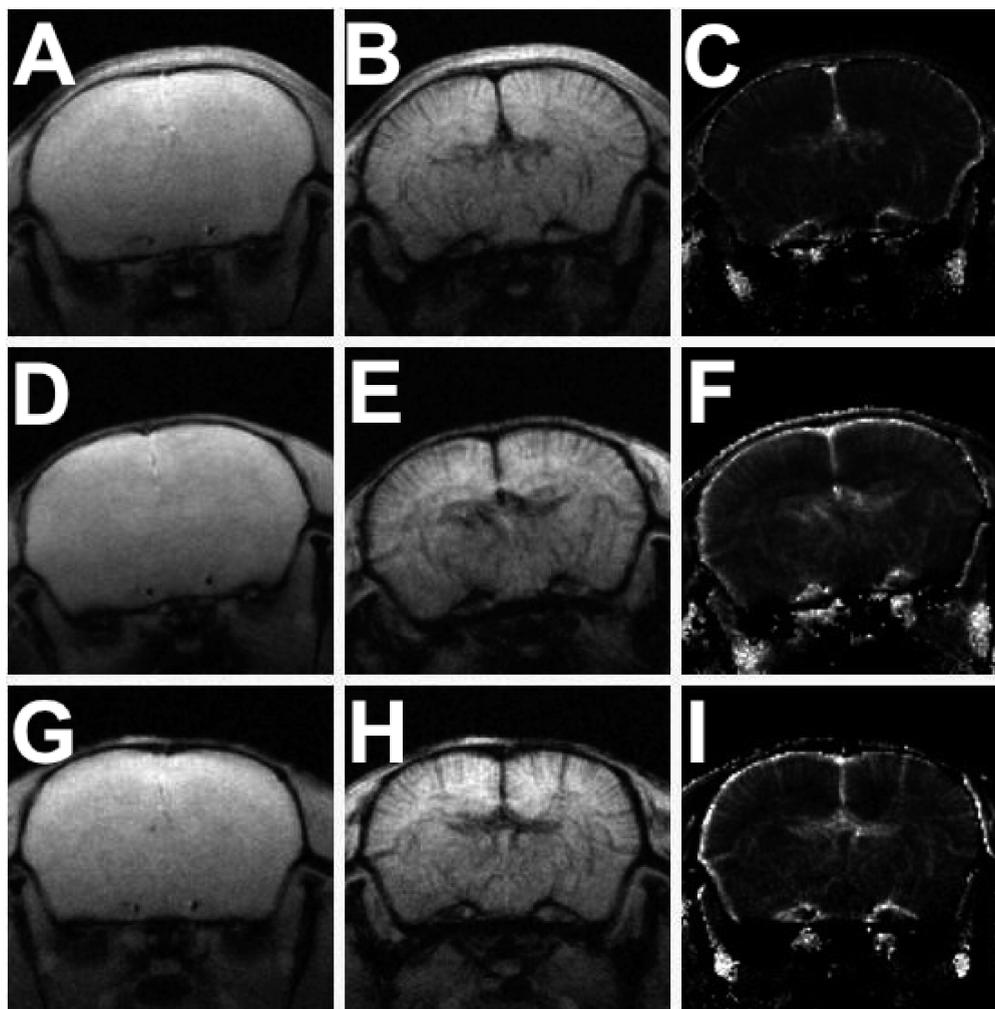


Figure 5. Representative mouse brain images acquired before and 120 s after administration of contrast agents and corresponding rCBV maps. Upper line: Precontrast (A), postcontrast (B), and rCBV map (C) obtained with APOMAG-4. Middle line: Precontrast (D), postcontrast (E), and rCBV map (F) obtained with APOMAG-6. Lower line: Precontrast (G), postcontrast (H), and rCBV map (I) obtained with Endorem.

of the transverse relaxation time (T_2) were acquired at a field of 4.7 T. The relaxivity coefficient (r_2) values, which are obtained as the slope of the plot of $1/T_2$ versus the molarity concentration of magnetic centers expressed in millimolar, were 68.5 and 102.0 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$ for the Apomaghemite samples of 4 and 6 nm, respectively. These r_2 values are comparable to those previously reported for the commercial contrast agent Endorem (94.8 $\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$).¹⁸ Figure 4 shows a representative first-passage curve obtained by plotting the signal intensity (SI) of the brain versus image acquisition time for APOMAG-6. Data have been normalized using the following relationship:

$$\text{normalized SI}\% = 100 \cdot (\text{SI}(t) - \text{SI}(0)) / \text{SI}(0)$$

where $\text{SI}(0)$ represents the average signal intensity before injection, and $\text{SI}(t)$ is the signal intensity at time t . Quantitative comparison between the efficiency of Apomaghemite samples and Endorem was obtained by measuring the maximum signal drop. Results, reported in Table 1, show that Apomaghemite samples of both 4 and 6 nm size can induce signal drops similar to contrast agent Endorem.

To validate the efficiency of our samples in contrasting MRI images, we collected representative pre-contrast and post-

contrast T_2^* -weighted images acquired 120 s after injection of Apomaghemite samples and the CA Endorem, at the steady-state concentration of contrast agent in blood. Regional cerebral blood volume maps (rCBV) calculated as described in the Experimental Section are also shown. Similarly to Endorem, post-contrast images and rCBV maps obtained with Apomaghemite samples depicted very well the space arrangement of cerebral vessels. Images and maps reported in Figure 5 clearly indicate that acquiring steady-state rCBV maps using Apomaghemite samples would be comparable to Endorem.

The blood half-lives of APOMAG-4 and APOMAG-6 were estimated in anaesthetized animals by fitting the time dependence of the signal intensity in T2w images of brain with a single exponential decay according to ref 18b. Blood half-times of about 2 and 3 h were obtained for APOMAG-4 and APOMAG-6, respectively.

From the above discussion, it can be concluded that our systems can be considered as promising negative contrast agents for magnetic resonance imaging.

For the functionalization of water-soluble magnetic nanoparticles with monosaccharides ligands, we used APOMAG-4 as the starting material. The high monodispersity, the ease of apoferritin shell modification, and its high magnetic moment make this bioconjugate an ideal probe for adding new functionalities. In

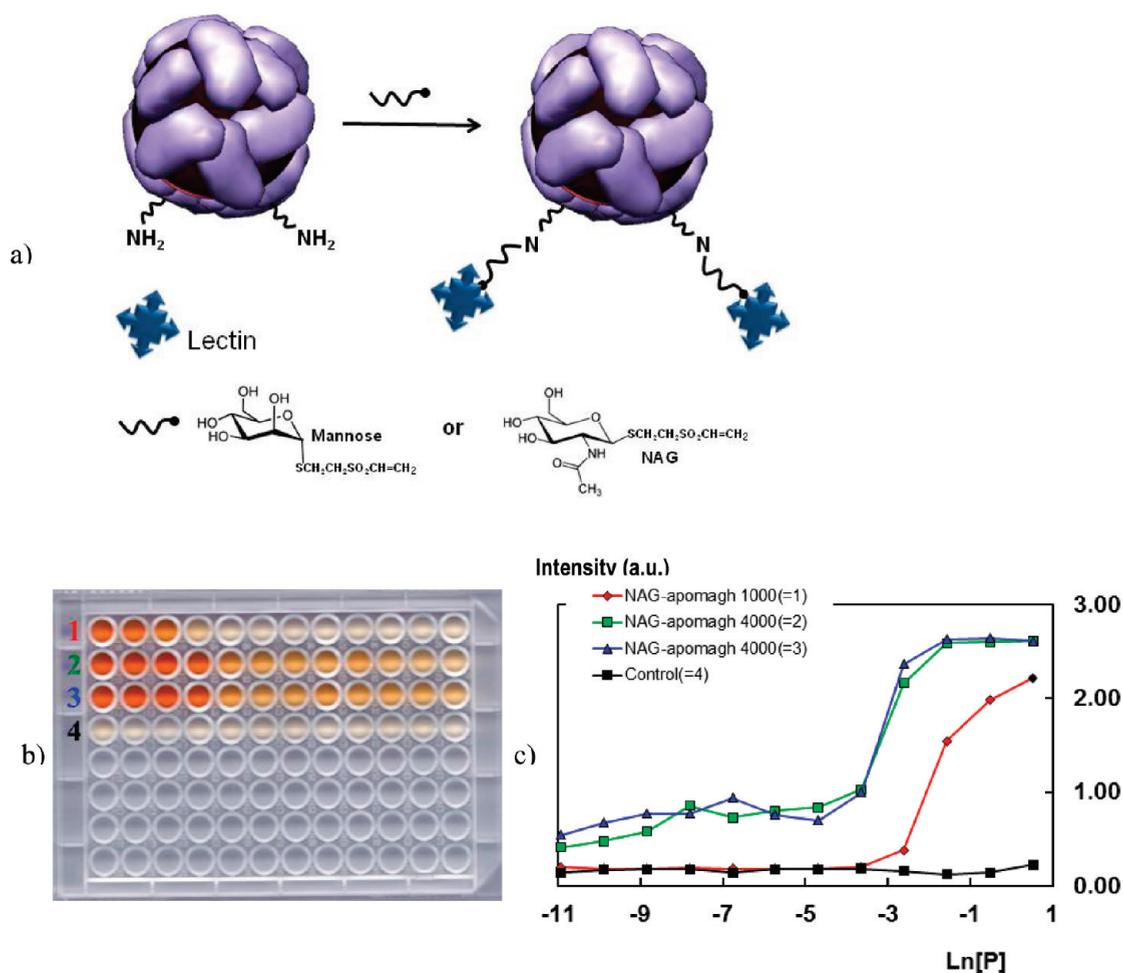


Figure 6. (a) Glycosylation of Apomaghemite nanoparticles by reaction of *N*-acetyl-*D*-glucosamine or *D*-mannose vinyl sulfone derivatives with the amine group naturally present in the Apomaghemite nanoparticles to make them recognizable by lectins. (b) Image of the ELISA plate after incubation of decreasing concentrations of the glycosylated Apomaghemite nanoparticles (left to right) with the horseradish peroxidase-lectin bioconjugate. From top to bottom, rows 1 and 2, Apomaghemite glycosylated with 1000 and 4000 mol of vinyl sulfone *N*-acetyl-*D*-glucosamine; row 3, duplicate of row 2 (control of reproducibility of the assay); row 4, non-glycosylated Apomaghemite nanoparticles (control of non-specific interaction Apomaghemite-lectin). (c) Quantification of the plate. Plot of the peroxidase activity of the peroxidase-lectin bioconjugate retained in the well by interaction with the nanoparticles versus concentration of nanoparticles (expressed as neperian logarithm).

228 fact, we have recently demonstrated that ferritin can be con-
 229 jugated with different dyes or quantum dots, as a new type of
 230 dual-functional fluorescent-magnetic probe.¹⁹ The functionalization
 231 with carbohydrates is an appealing option due to the potential
 232 of carbohydrate-protein interactions to target protein receptors
 233 at sites of localization. In particular, the presence of receptors for
 234 *N*-acetyl-*D*-glucosamine in hepatocytes and *D*-mannose receptors
 235 in liver, spleen, and alveolar macrophages encouraged us to
 236 functionalize the Apomaghemite nanoparticles with these two
 237 monosaccharides. However, the glycosylation of the protein is far
 238 from trivial.²⁰ In this context, we have demonstrated the versa-
 239 tility of the vinyl sulfone function as a general derivatization
 240 strategy for bioconjugation that leads to the reaction with the
 241 amine groups naturally present in biomolecules in mild condi-
 242 tions (i.e., room temperature and pH above 8).²¹ Thus, the
 243 glycosylation of the Apomaghemite was addressed by reaction with
 244 vinyl sulfone derivatized *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *D*-mannose
 F6 245 (Figure 6a).

246 The synthesis of vinyl sulfone monosaccharides was carried
 247 out in two steps from the corresponding per-*O*-acetyl-1-thio-

248 monosaccharides: The first was de-*O*-acetylation with sodium
 249 methoxide followed by treatment with divinyl sulfone
 250 (Supporting Information S15). The recognition of the glycosylated
 251 Apomaghemite by endogenous lectins is a primary goal for
 252 its biomedical applications. The interactions between the glyco-
 253 sylated Apomaghemite and plant lectins were evaluated by
 254 enzyme-linked lectin assay (ELLA). Nanoparticles were fixed
 255 on an ELISA plate, and the presence of the carbohydrate moiety
 256 was revealed by incubation with horseradish peroxidase-lectins
 257 conjugates. The lectins of choice were wheat germ agglutinin
 258 (WGA) and concanavalin A (ConA) that interact with *N*-acetyl-
 259 *D*-glucosamine and *D*-mannose, respectively. As depicted in
 260 Figure 6b, glycosylation turns Apomaghemite particles into
 261 glycoproteins recognizable by plant lectins that specifically bind
 262 *N*-acetyl-*D*-glucosamine or *D*-mannose. As expected, non-glyco-
 263 sylated Apomaghemite (Figure 6b, row 4) is not recognized by
 264 the plant lectins. A closer analysis revealed that the two assayed
 265 concentrations of vinyl sulfone monosaccharide yielded different
 266 intensity, suggesting a different degree of glycosylation (Figure 6c).
 267 This fact is relevant because protein-carbohydrate interactions

are weak and multivalence plays a role. Thus, in the mannose receptor, like other carbohydrate-binding proteins, several individual lectin domains with weak affinity for single sugars are clustered to achieve high affinity binding to oligosaccharides.²²

CONCLUSIONS

We have demonstrated that the pH-driven assembly–disassembly process that occurs in apoferritin is effective for the encapsulation of maghemite nanoparticles of 4 and 6 nm. The nanoparticles prepared in this way have been functionalized with two types of monosaccharides: *N*-acetyl-*D*-glucosamine and *D*-mannose vinyl sulfone derivatives. To our knowledge, this is the first example of both a templated self-assembly of apoferritin around maghemite nanoparticles and its conversion into a glycosylated specimen.

HREM, HAADF, EELS, XRD, and SQUID techniques were used to characterize the spinel phase nanocrystalline maghemite. The presence of the protein shell was revealed by negative staining, confirming the effective encapsulation of maghemite nanoparticles within the apoferritin protein shell.

The SQUID measurements confirmed the superparamagnetic behavior, required for *in vivo* applications, above 20 and 35 K for the 4 and 6 nm Apomaghemite samples, respectively.

MRI measurements suggested that Apomaghemite samples are promising contrast agents. Besides, Apomaghemites present added functionalities as compared to Endorem: the ease of encapsulation synthesis and the possibility of multiple functionalization thanks to the amine groups located at the external protein shell. Finally, the carbohydrate-functionalized Apomaghemite nanoparticles retained their recognition abilities, as demonstrated by the strong affinity with their corresponding carbohydrate-binding lectins.

EXPERIMENTAL SECTION

Preparation of Maghemite Colloid. Magnetite was synthesized according to Massart's method¹³ by coprecipitation of Fe²⁺ and Fe³⁺ salts in stoichiometry of 0.5. By adjusting both pH (12 and 11 for 4 and 6 nm, respectively) and ionic strength (2 and 1 M NaNO₃ for 4 and 6 nm, respectively), the size of the resulting magnetite nanoparticles can be controlled.¹² All solutions were carefully deaerated with argon. After oxidation, a colloid of maghemite nanoparticles stable at pH 2 was obtained.

Encapsulation of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles in Apoferritin. The pH of a 2 mL solution of Apoferritin (5 mg/mL) was slowly lowered to pH 2 with 0.1 M HCl. After being stirred for 15 min, the solution was mixed with 1 mL of a diluted nanoparticles solution of pH 2 (50 μ L to 1 mL) and stirred for 30'. The pH of the resulting solution was then adjusted to 7 with 0.1 M NaOH to allow the proper subunit assembly into the 24-mer protein and then the encapsulation of nanoparticles.

The resulting clear reddish dark solution was purified to remove unfolded subunits or large nanoparticles aggregates by centrifugation (10 000 rpm, 1 h), then chromatographed on a Sephadex G-25 column to isolate the protein-containing fractions.

Glycosylation of Apomaghemite with NAG or Mannose. The purified sample (3 mL) was divided in two aliquots of 1.5 mL each (1.7 \times 10⁻⁸ mol) and incubated with 1000 and 4000 mol of *N*-acetyl-*D*-glucosamine (NAG), respectively. After 12 h of incubation, the unreacted vinyl sulfone monosaccharide was removed by exhaustive dialysis. Next, samples were chromatographed using a Sephadex G-25 column, and the protein containing fractions were isolated. The same

procedure was followed for the glycosylation of Apomaghemite with mannose.

Affinity ELISA Assay. The affinities of NAG toward WGA lectin (wheat germ agglutinin peroxidase conjugate) and mannose toward Con A (concanavalin A) lectin were evaluated by ELISA-type protocol ELLA.

Serial dilutions of the sample containing 20 μ L of protein (3.3 μ g/ μ L) in 200 μ L of 0.1 M carbonate buffer (pH 9.6) were added to the wells of an ELISA plate and adsorbed by incubation at 4 °C overnight. Wells were washed with 300 μ L of PBST (3 \times 3 min) and then incubated with 200 μ L of horseradish peroxidase–lectin bioconjugate (0.2 μ g/ μ L in PBST) at 37 °C for 1 h. After being washed with PBST (3 \times 200 μ L/3 min), the presence of lectin was detected by the peroxidase activity after stopping with 100 μ L of 2 M H₂SO₄ the incubation at 37 °C for 30 min with 200 μ L of 2.2 mM 1,2-phenylenediamine dihydrochloride in 0.1 M citrate buffer pH 5 with 100 μ L of 2 M H₂SO₄. Quantification was carried out by measurement of the absorbance at 495 nm with a sunrise absorbance reader (Tecan).

Transmission Electron Microscopy. Electron micrographs were taken with a Philips CM-20 HR electron microscope operating at 200 keV. High-resolution electron microscopy (HREM) images were recorded using a 200 kV field emission gun electron microscope (JEM2010-FEG) with a spatial resolution of 0.19 nm at Scherzer defocus conditions. High-angle annular dark field scanning transmission microscopy (HAADF-STEM) was performed using an electron probe with a diameter of 0.5 nm at a diffraction camera length of 12 cm. EEL spectra were obtained with an energy dispersion of 0.3 eV by channel. The average particle sizes and the standard deviations were estimated from HAADF images analysis of 100 particles for both samples.

Magnetic measurements were performed on lyophilized samples using a magnetometer (Quantum Design MPMS-XL-5) equipped with a SQUID sensor.

X-ray Diffraction (XRD). Experimental data were collected using a Bruker D8 ADVANCE diffractometer with Cu K α radiation.

MRI measurements were performed with a 4.7T Biospec Tomograph System (Bruker, Karlsruhe, Germany) operating at 200 MHz and equipped with a 33 cm bore magnet (Oxford Ltd., UK). Samples containing Apomaghemite nanoparticles at different iron concentrations were prepared and inserted in a 7.2 cm i.d. birdcage coil. The values of the transversal relaxation time *T*₂ of each sample were measured by using the standard SPIN-ECHO MULTI-ECHO sequence with the following parameters: TR/TE = 2000/15 ms, 8 echoes, FOV = 4 \times 8 cm², MTX = 256 \times 128, slice thickness = 2 mm.

In vivo experiments were performed to characterize the performances of Apomaghemite samples as contrast agents for mapping of cerebral blood volume (CBV) and cerebral blood flow (CBF) and were compared to Endorem. Quantitative evaluations of CBF and CBV can be performed by the bolus tracking method. Regional CBV (rCBV) can be also measured using blood pool contrast agents, at the steady-state concentration of contrast agent in blood, by acquiring *T*₂^{*} images before and after contrast agent injection and using the following relationship:

$$rCBV = k \cdot \ln(SI \text{ pre}/SI \text{ post})$$

where *k* is a constant depending on instrumental parameters, and SI pre and SI post are the values of the signal intensity of brain before and after contrast agent injection.

In the *in vivo* experiments, a total of 15 Balb-c mice weighing about 20 g, five animals for each contrast agent, were used. Contrast agents were administered through the tail vein at the dosage of 23.5 mg Fe/kg.

First-passage images were acquired using an EPI sequence with the following parameters: MTX = 128 \times 128, FOV = 25 \times 25 mm², slice thickness = 2 mm, 4 EPI shots, TR/TE = 25/6.5 ms, NEX = 4 (time resolution of 5 images/s). Images were continuously recorded for 60 s. Steady-state images were acquired before and 2 min after injection of the contrast agent using a Gradient Echo sequence with the following

parameters: TR/TE = 130/6 ms, flip angle = 30°, MTX = 256 × 256, FOV = 25 × 25 mm² (corresponding to 0.098 × 0.098 mm² in-plane resolution), slice thickness = 1 mm, NEX = 4. The acquisition time for a single image was 133 s. A phantom containing 1 mM Gd-DTPA in saline was inserted in the field of view and used to normalize possible spectrometer drifts during the acquisition.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. A detailed description of purification (SI1) and structural characterization (SI2, SI3, and SI4) of Apomaghemites samples, as well as detailed synthesis and characterization of the vinyl sulfone derivatized carbohydrates. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

josema@ugr.es; ngalvez@ugr.es

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the MEC (project CTQ2009-09344), Junta de Andalucía project (FQM-02525), and EU I3 Project ESTEEM (contract no. 026019 RII3) for financial support.

REFERENCES

- (1) (a) Cheon, J.; Lee, J. H. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1630–1640. (b) Dobson, J. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 139–143. (c) Jun, Y. W.; Seo, J. W.; Cheon, J. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 179–189. (d) Campbell, R. B. *Nanomedicine* **2007**, *2*, 649–652.
- (2) (a) Kettering, M.; Winter, J.; Zeisberger, M.; Streck, S. B.; Oehring, H.; Bergemann, C.; Alexiou, C.; Hergt, R.; Halbhauer, K. J.; Kaiser, W. A.; Hilger, I. *Nanotechnology* **2007**, *18*, 175101–175110. (b) Hergt, R.; Hiergeist, R.; Zeisberger, M.; Glockl, G.; Weitschies, W.; Ramirez, L. P.; Hilger, I.; Kaiser, W. A. *J. Magn. Magn. Mater.* **2004**, *280*, 358–368. (c) Weissleder, R.; Moore, A.; Mahmood, U.; Borhade, E.; Benveniste, H.; Chiocca, E. A.; Basilion, J. P. *Nat. Med.* **2000**, *6*, 351–354.
- (3) (a) Mornet, S.; Vasseur, S.; Grasset, F.; Duguet, E. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2161–2175. (b) Di Marco, M.; Sadun, C.; Port, M.; Guilbert, I.; Couvreur, P.; Dubernet, C. *Int. J. Nanomed.* **2007**, *2*, 609–622. (c) Corot, C.; Robert, P.; Idee, J. M.; Port, M. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1471–1504. (d) Laurent, S.; Forge, D.; Port, M.; Roch, A.; Robic, C.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2064–2110.
- (4) (a) Gálvez, N.; Sánchez, P.; Domínguez-Vera, J. M. *Dalton Trans.* **2005**, 2492–2495. (b) Clemente-León, M.; Coronado, E.; Soriano-Portillo, A.; Gálvez, N.; Domínguez-Vera, J. M. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 49–51. (c) Domínguez-Vera, J. M.; Gálvez, N.; Sánchez, P.; Mota, A. J.; Trasobares, S.; Hernández, J. C.; Calvino, J. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 4823–4826. (d) Ueno, T.; Suzuki, M.; Goto, T.; Matsumoto, T.; Nagayama, K.; Watanabe, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2527–2530. (e) Uchida, M.; Klem, M. T.; Allen, M.; Flenniken, M. L.; Gillitzer, E.; Varpness, Z.; Suci, P.; Young, M. J.; Douglas, T. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1025–1042. (f) Gálvez, N.; Fernández, B.; Sánchez, P.; Cuesta, R.; Ceolín, M.; Clemente-León, M.; Trasobares, S.; López-Haro, M.; Calvino, J. J.; Stéphan, O.; Domínguez-Vera, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8062–8068.
- (5) (a) Chen, C.; Daniel, M. C.; Quinkert, Z. T.; De, M.; Stein, B.; Bowman, V. D.; Chipman, P. R.; Rotello, V. M.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 611–615. (b) Huang, X.; Bronstein, L. M.; Retrum, J.; DuFort, C.; Tsvetkova, I.; Aniagyeyi, S.; Stein, B.; Stucky, G.; McKenna, B.; Remmes, N.; Baxter, D.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano*

- Let.* **2007**, *7*, 2407–2416. (c) Dixit, S. K.; Goicochea, N. L.; Daniel, M. C.; Murali, A.; Bronstein, L.; De, M.; Stein, B.; Rotello, V. M.; Kao, C. C.; Dragnea, B. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1993–1999.
- (6) (a) Webb, B.; Frame, J.; Zhao, Z.; Lee, M. L.; Watt, G. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *309*, 178–183. (b) Aime, S.; Frullano, L.; Geninatti Crich, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1017–1019. (c) Simsek, E.; Kilic, M. A. *J. Magn. Magn. Mater.* **2005**, *293*, 509–513. (d) Colacio, E.; Domínguez-Vera, J. M. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 6983–6985.
- (7) Swift, J.; Butts, C. A.; Cheung-Lau, J.; Yerubandi, V.; Dmochowski, I. *J. Langmuir* **2009**, *25*, S219–S225.
- (8) (a) Zhang, H.; Ma, Y.; Sun, X. L. *Med. Res. Rev.* **2010**, *30*, 270–289. (b) Seeberger, P. H.; Werz, D. B. *Nature* **2007**, *446*, 1046–1051. (c) Park, S.; Lee, M. R.; Shin, I. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1579–1591.
- (9) Lis, H.; Sharon, N. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637–674.
- (10) (a) de la Fuente, J. M.; Penadés, S. *Biochem. Biophys. Acta* **2006**, *1760*, 636–651. (b) Lartigue, L.; Oumzil, K.; Guari, Y.; Larionova, J.; Guérin, C.; Montero, J. L.; Barragan-Montero, V.; Sangregorio, C.; Caneschi, A.; Innocenti, C.; Kalaivani, T.; Arosio, P.; Lascialfari, A. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2992–2995. (c) Earhart, C.; Jana, N. R.; Erathodiyil, N.; Ying, J. Y. *Langmuir* **2008**, *24*, 6215–6219. (d) El-Boubbou, K.; Gruden, C.; Huang, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *129*, 13392–13393. (e) Liu, L. H.; Dietsch, H.; Schurtenberger, P.; Yan, M. *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1349–1355. (f) Liang, C. H.; Wang, C. C.; Lin, Y. C.; Chen, C. H.; Wong, C. H.; Wu, C. Y. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7750–7756.
- (11) Lu, A. H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (12) Vayssières, L.; Chanéac, C.; Tronc, E.; Jolivet, J. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205*, 205–212.
- (13) Massart, R. *IEEE Trans. Magn.* **1981**, 1247–1248.
- (14) (a) Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. *Science* **1993**, *261*, 1286–1292. (b) Wong, K. K. W.; Douglas, T.; Gider, S.; Awschalom, D. D.; Mann, S. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 279–285. (c) Meldrum, F. C.; Heywood, B. R.; Mann, S. *Science* **1992**, *257*, 522–523.
- (15) http://www2.uca.es/dept/cmat_qinor/catalisis/tem-uca-ser-ver.htm.
- (16) Tronc, E.; Fiorani, D.; Nogués, M.; Testa, A. M.; Lucari, F.; D'Orazio, F.; Grenèche, J. M.; Wernsdorfer, W.; Galvez, N.; Chanéac, C.; Maily, D.; Jolivet, J. P. *J. Magn. Magn. Mater.* **2003**, *262*, 6–14.
- (17) (a) Hyeon, T.; Lee, S. S.; Park, J.; Chung, Y.; Na, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12798–12801. (b) Jun, Y.; Huh, Y. M.; Choi, J. S.; Lee, J. H.; Song, H. T.; Kim, S. J.; Yoon, S.; Kim, K. S.; Shin, J. S.; Suh, J. S.; Cheon, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5732–5733.
- (18) (a) Masotti, A.; Pitta, A.; Ortaggi, G.; Corti, M.; Innocenti, C.; Lascialfari, A.; Marinone, M.; Marzola, P.; Daducci, A.; Sbarbati, A.; Miccotti, E.; Orsini, F.; Poletti, G.; Sangregorio, C. *Magn. Reson. Mater. Phys.* **2009**, *22*, 77–87. (b) Schwarz, A. J.; Reese, T.; Gozzi, A.; Bifone, A. *Magn. Reson. Imaging* **2003**, *21*, 191–200.
- (19) (a) Fernandez, B.; Galvez, N.; Sanchez, P.; Morales, J.; Santoyo, F.; Cuesta, R.; Domínguez-Vera, J. M. *Inorg. Chim. Acta* **2007**, *360*, 3951–3954. (b) Fernández, B.; Gálvez, N.; Cuesta, R.; Hungria, A. B.; Calvino, J. J.; Domínguez-Vera, J. M. *Adv. Funct. Mater.* **2008**, *18*, 3931–3935.
- (20) (a) Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 579–601. (b) Gamblin, D. P.; Scanlan, E. M.; Davis, B. G. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 131–163.
- (21) (a) Lopez-Jaramillo, F. J.; Perez-Banderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Acta Crystallogr., Sect. F* **2005**, *61*, 435–438. (b) Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, J.; Ortega-Muñoz, M.; Megia-Fernandez, A.; Perez-Balderas, F.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 667–678.
- (22) Taylor, M. E.; Benzouška, K.; Drickamer, K. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 1719–172.