

## Portada Externa de Tesis

Autor: M. en C. Jesús Roberto Vargas Ortiz

Valoración de efectos toxicológicos de  
diferentes propiedades de nanopartículas  
magnéticas en el sistema vascular mediante  
análisis de componentes principales

2024



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería



Nombre de la tesis:

Valoración de efectos toxicológicos de diferentes propiedades  
de nanopartículas magnéticas en el sistema vascular mediante  
análisis de componentes principales

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

**DOCTOR EN INGENIERÍA**

La presente obra está bajo la licencia:  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

### Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

### Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



**SinDerivadas** — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

### Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería

VALORACIÓN DE EFECTOS TOXICOLÓGICOS DE DIFERENTES  
PROPIEDADES DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN EL SISTEMA  
VASCULAR MEDIANTE ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:  
DOCTOR EN INGENIERÍA

**Presenta:**

M.C. Jesús Roberto Vargas Ortiz

**Dirigido por:**

Dra. Karen Esquivel Escalante

**Codirigido por:**

Dra. María del Carmen González Castillo

Dra. Karen Esquivel Escalante  
Presidente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. María del Carmen González Castillo  
Secretario

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. Rodrigo Rafael Velázquez Castillo  
Vocal

\_\_\_\_\_  
Firma

Dr. José Antonio Cervantes Chávez  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Dra. Iliana E. Medina Ramírez  
Suplente

\_\_\_\_\_  
Firma

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Diciembre 2024  
México

## RESUMEN

Las nanopartículas magnéticas (MNPs) se han estudiado por su potencial para combatir y tratar diferentes patologías, como el cáncer, la trombosis, la aterosclerosis, entre otras, debido a sus propiedades fisicoquímicas: morfología, tamaño, cristalinidad, carga superficial y magnetismo. Sin embargo, el impacto de las MNPs en el sistema vascular aún no se comprende por completo y se han planteado preocupaciones con respecto a su posible toxicidad y efectos con el corazón y los vasos sanguíneos, objetivos principales en la interacción de las MNP, en aplicaciones como la imagenología y la teranóstica, al ser inyectadas directamente en el torrente sanguíneo. Con este fin, se utilizó la técnica de corazón aislado y perfundido de rata o modelo de Langendorff y la técnica de anillos aislados de aorta (segmentos de alrededor de 3 a 5 mm de tejido se tensan entre ganchos para registrar cambios en el tono vascular bajo condiciones isométricas), para disminuir el uso de animales vivos y determinar los efectos potenciales de las MNPs en estos tejidos. A partir de estos análisis, es posible determinar indirectamente la interacción mediante el óxido nítrico (NO), un mediador importante del control del tono de los vasos sanguíneos y su señalización mediante la contracción y relajación en respuesta a estos nanomateriales.

Las MNPs fueron sintetizadas por dos rutas diferentes, coprecipitación y reducción química, para obtener materiales magnéticos distintas morfologías (amorfa y barras o hilos), cristalinidad (sin y con crecimiento preferencial), tamaño (promedio de partícula y radio hidrodinámico) carga superficial y recubrimiento de silicio mediante el método de Stöber para observar, estudiar y analizar los efectos vasculares inducidos por estas nanopartículas en función de su morfología y condiciones de síntesis.

Los resultados mostraron que tanto el tamaño, la carga superficial y el recubrimiento tuvieron gran contribución a los efectos contráctiles ya que es posible que provean disponibilidad de los iones solubles  $Fe^{2+}$  a la superficie de las MNP obtenidas lo que pudo desencadenar los efecto contráctiles tanto en corazón como en aorta a concentraciones relativamente bajas (1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), con una consecuencia incremental sostenida desde las concentraciones más pequeñas que

elevan un 200% la presión dentro del corazón con respecto a la presión basal y la tensión en la aorta se eleva un 62% con respecto al control contráctil de acuerdo con lo encontrado en este trabajo. Estos efectos se observaron en ambos independientemente de la morfología, puesto que las MNPs recubiertas con silicio de 800 nm tuvieron un efecto contráctil reducido de alrededor del 60% a diferencia de las MNPs sin recubrir. Esto puede indicar una probable interacción reversible  $\text{NO} + \text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+} - \text{NO}$  entre los iones solubles  $\text{Fe}^{2+}$  con las vías de señalización del óxido nítrico (NO) que disminuyen en un 60% al ser recubiertas las MNPs. La interacción de las MNP con el tejido vascular parece ser determinado por el tamaño, carga y disponibilidad de lixiviación de iones solubles en el medio (en este caso agua), los cuales interactúan en vías de señalización importante del funcionamiento de contracción y relajación del músculo liso. Como trabajo futuro será necesario obtener el valor de la lixiviación de cada material y la vía de activación del NO (neuronal, inducible y endotelial) para determinar cuantitativamente la interacción de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  con el NO y su posible estimulación en la regulación de transcripción génica.

**Palabras clave:** Contractilidad; Magnetita; Miocárdica; Óxido Nítrico; Tono Vascular Coronario

**ABSTRACT**

Magnetic nanoparticles (MNPs) have been studied for their potential to combat and treat different pathologies, such as cancer, thrombosis, atherosclerosis, among others, due to their physicochemical properties: morphology, size, crystallinity, surface charge and magnetism. However, the impact of MNPs on the vascular system is not yet fully understood and concerns have been raised regarding their possible toxicity and effects on the heart and blood vessels, main targets in the interaction of MNPs, in applications such as imaging and theranostics, when injected directly into the bloodstream. To this end, the isolated and perfused rat heart technique or Langendorff model and the isolated aorta ring technique (segments of around 3 to 5 mm of tissue are stretched between hooks to record changes in vascular tone under isometric conditions) were used to reduce the use of live animals and determine the potential effects of MNPs on these tissues. From these analyses, it is possible to indirectly determine the interaction through nitric oxide (NO), an important mediator of the control of blood vessel tone and signaling through contraction and relaxation in response to these nanomaterials. The MNPs were synthesized by two different routes, coprecipitation and chemical reduction, to obtain magnetic materials with different morphologies (amorphous and rods or wires), crystallinity (without and with preferential growth), size (average particle and hydrodynamic radius), surface charge and silicon coating using the Stöber method to observe, study and analyze the vascular effects induced by these nanoparticles based on their morphology and synthesis conditions. Results showed that size, surface charge and coating had a major contribution to the contractile effects since they may have provided availability of soluble  $\text{Fe}^{2+}$  ions to the surface of the obtained MNPs which could trigger the contractile effects both in heart and aorta at relatively low concentrations (1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), with a sustained incremental consequence from the lowest concentrations that raised the pressure inside the heart by 200% with respect to the basal pressure and the tension in the aorta rose by 62% with respect to the contractile control according to what was found in this work. These effects were observed in both independently of the morphology, since the MNPs coated with 800 nm silicon had a reduced contractile effect of around 60%

unlike the uncoated MNPs. This may indicate a probable reversible interaction  $\text{NO} + \text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{2+} - \text{NO}$  between soluble  $\text{Fe}^{2+}$  ions and nitric oxide (NO) signaling pathways that decrease by 60% when MNPs are coated. The interaction of MNPs with vascular tissue seems to be determined by the size, charge and availability of soluble ion leaching in the medium (in this case water), which interact in important signaling pathways for the contraction and relaxation function of smooth muscle. As future work, it will be necessary to obtain the leaching value of each material and the NO activation pathway (neuronal, inducible and endothelial) to quantitatively determine the interaction of  $\text{Fe}^{2+}$  ions with NO and its possible stimulation in the regulation of gene transcription.

**Keywords:** Coronary Vascular Tone; Magnetite; Myocardial Contractility; Nitric Oxide; Silicon

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) y la División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ingeniería (DIPFI), por formarme como doctorante a lo largo del programa doctoral.

A la Universidad Autónoma de San Luís Potosí (UASLP) y la Facultad de Ciencias Químicas, por recibirme y brindarme los medios e infraestructura para realizar los experimentos biológicos cruciales para la realización del proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme el apoyo económico para la obtención del grado.

A mis padres José Roberto Vargas Ortiz y María Gabriela Ortiz Yáñez y mi hermana que siempre estuvieron conmigo apoyándome y alentándome en todos los altibajos a lo largo de este viaje. Los amo mucho. Este trabajo es para y por ustedes.

A mis sinodales, que sin sus comentarios y apoyo a este trabajo no hubiera alcanzado a ser el escrito completo que es hoy.

En especial agradecer a mis amigos quienes estuvieron presentes desde la licenciatura alentándome día a día a terminar el proyecto. Sin ellos, este documento no existiría.



*“Life is brilliant. Beautiful. It enchants us, to the point of obsession.  
Some are true to their purpose, but they are shells, flesh, and mind.*

*.[...]*

*What is it that drives you?”*

- **Aldia, Scholar of the first sin**

## ÍNDICE

|   |     |
|---|-----|
| Resumen.....  | I   |
| Abstract.....   | III |
| Agradecimientos.....  | V   |
| Índice.....   | 1   |
| Índice de Figuras.....  | 5   |
| Índice de Tablas.....   | 11  |
| Glosario.....   | 12  |
| Capítulo I.....   | 15  |
| I.    Introducción.....   | 16  |
| I.1.1.    Nanopartículas magnéticas $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> y Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....                     | 19  |
| Capítulo II.....  | 21  |
| II.    Justificación.....   | 22  |
| Capítulo III.....   | 23  |
| III.    Descripción del Problema.....   | 24  |
| Capítulo IV.....  | 25  |
| IV.    Fundamentación Teórica.....  | 26  |
| IV.1.    Nanopartículas Magnéticas: Óxidos de Hierro ( $\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )..... | 26  |
| IV.2.    Recubrimientos.....  | 28  |
| IV.2.1.    Silicio.....   | 29  |
| IV.2.2.    Superparamagnetismo.....   | 29  |
| IV.2.3.    Morfología y cristalinidad.....  | 31  |
| IV.3.    Sistema vascular.....  | 34  |
| IV.3.1.    Vasos Coronarios.....  | 35  |

|   |    |
|---|----|
| IV.3.2. Modelos de tejido aislado <i>ex vivo</i> .....  | 38 |
| IV.3.2.1 Corazón de roedor aislado y perfundido o técnica de Langendorff<br>39  |    |
| IV.3.2.2 Anillos aislados de aorta.....   | 40 |
| IV.3.3. Contracción y relajación: activadores y sustancias vasoactivas .....  | 40 |
| IV.4. Lixiviación de Fe <sup>2+</sup> .....   | 44 |
| IV.5. Modelos estadísticos .....  | 47 |
| Capitulo V.....   | 50 |
| V. Hipótesis y Objetivos .....  | 51 |
| Hipótesis .....   | 51 |
| Objetivo General.....   | 51 |
| Objetivos Específicos.....  | 51 |
| Capitulo VI.....  | 52 |
| VI. Metodología .....   | 53 |
| VI.1. Síntesis de los Materiales.....   | 53 |
| VI.1.1. Síntesis de nanopartículas de Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup> <sub>2</sub> O <sub>4</sub> en forma de hilos<br>mediante reducción química (RQ): ..... | 53 |
| VI.1.2. Síntesis de nanopartículas de Fe <sup>2+</sup> Fe <sup>3+</sup> <sub>2</sub> O <sub>4</sub> amorfas coprecipitación<br>química (CQ): .....              | 54 |
| VI.1.3. Recubrimiento de las nanopartículas con silicio.....  | 55 |
| VI.2. Caracterización Físicoquímica.....  | 55 |
| VI.3. Abordajes Biológicos .....  | 56 |
| VI.3.1. Unidades Experimentales .....   | 56 |
| VI.3.2. Preparación del corazón aislado y perfundido de rata o técnica de<br>Langendorff.....   | 56 |
| VI.3.3. Preparación anillos aislados de aorta de rata .....   | 57 |

|                    |   |     |
|--------------------|---|-----|
| VI.3.4.            | Tratamientos.....   | 58  |
| VI.3.5.            | Determinación de Óxido Nítrico (NO) .....                                     | 59  |
| Capítulo VII.....  |   | 61  |
| VII.               | Resultados y Discusión.....   | 62  |
| VII.1.             | Caracterización Físicoquímica de las nanopartículas .....                     | 62  |
| VII.1.1.           | Morfología, tamaño y composición (SEM, TEM, PZ).....                          | 62  |
| VII.1.2.           | Carga y radio hidrodinámico (PZ) .....  | 67  |
| VII.1.3.           | Sensibilidad magnética ( <i>M<sub>s</sub></i> ).....                          | 75  |
| VII.1.4.           | Cristalinidad .....   | 76  |
| VII.2.             | Pruebas Biológicas .....  | 83  |
| VII.2.1.           | Evaluación de las MNP en corazón aislado y perfundido de rata<br>84           |     |
| VII.2.2.           | Evaluación de las MNP en segmentos de anillos aislados de aorta<br>de rata 96 |     |
| VII.3.             | Modelo estadístico de análisis de componentes principales (PCA)               | 105 |
| Capítulo VIII..... |   | 110 |
|                    | Conclusiones .....  | 111 |
|                    | Perspectivas a futuro .....   | 112 |
|                    | Referencias Bibliográficas.....   | 113 |
| Capítulo IX.....   |   | 126 |
| VIII.              | Apéndices .....   | 127 |
| A.1.               | Solución fisiológica para la preparación del Langendorff .....                | 127 |
| A.2.               | Solución fisiológica para la preparación de los anillos aislados .....        | 128 |
| A.3.               | Técnica de perfusión de corazón de Langendorff.....                           | 129 |
| A.4.               | Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Transmisión (TEM).....             | 130 |
| A.5.               | Potencial Zeta.....   | 133 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| A.6.  | Susceptibilidad Magnética .....                    | 134 |
| A.7.  | Difracción de Rayos X (XRD) .....                  | 136 |
| A.7.1 | Método de Scherrer.....                            | 137 |
| A.7.2 | Método de Williamson-Hall.....                     | 137 |
| A.7.3 | Análisis Rietveld .....                            | 138 |
| A.8.  | Código de análisis PCA. Software R y Rstudio ..... | 140 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.-</b> Línea de tiempo de los medios de contraste.....  | 18 |
| <b>Figura 2.-</b> Diferentes aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en distintos sectores de la industria y medicina [38]. .....  | 20 |
| <b>Figura 3.-</b> a) Estructura de la subcelda de la Magnetita, octaedros ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y tetraedros ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y sus radios atómicos. Imagen creada con el software VESTA. ....  | 26 |
| <b>Figura 4.-</b> Planos cristalinos a) (1 1 1) y b) (1 0 0) en la celda unidad de la magnetita. Imagen creada con el software VESTA.....  | 27 |
| <b>Figura 5.-</b> Representación del recubrimiento de silicio mediante el método de Stöber.....  | 29 |
| <b>Figura 6.-</b> Representación esquemática de la interacción de intercambio. El requisito de que la función de onda del electrón sea antisimétrica tiende a separar electrones con el mismo espín, lo que reduce su energía de Coulomb [84]. .....   | 31 |
| <b>Figura 7.-</b> Distintos niveles de ordenamiento atómico. a) Sin ordenamiento (átomos de helio). b) Ordenamiento de corto alcance (moléculas de agua). c) Ordenamiento de corto alcance (silicio amorfo en vidrio). d) Ordenamiento de largo alcance (celda de óxido de calcio) [88]. ..... | 32 |
| <b>Figura 8.-</b> Vista anterior de la sección frontal del corazón con corte transversal mostrando anatomía interna [98].....  | 35 |
| <b>Figura 9.-</b> Esquema de las ramificaciones del sistema coronario vascular. Imagen libre. ....   | 36 |
| <b>Figura 10.-</b> Comparación de tamaño entre un eritrocito ( $7.5 \mu\text{m}$ o $7500 \text{ nm}$ ) y una nanopartícula ( $75 \text{ nm}$ ) [110]. .....  | 37 |
| <b>Figura 11.-</b> Vías de señalización de la contracción del musculo liso por agonistas y despolarización [126]. .....  | 42 |
| <b>Figura 12.-</b> Vía de acción del efecto de la acetilcolina dentro del musculo liso. [98]. .....  | 43 |
| <b>Figura 13.-</b> Vías de señalización del efecto de la fenilefrina (Phe) en el músculo cardiaco y su efecto contráctil. [98]. .....  | 44 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 14.-</b> Descripción general de las interacciones del óxido nítrico y el hierro con las reacciones biológicamente más relevantes en las que podría intervenir [133], [140].  | 46 |
| <b>Figura 15.-</b> El uso de animales en los análisis toxicológicos puede ser mitigado utilizando modelos predictivos. Imagen propia.  | 47 |
| <b>Figura 16.-</b> Representación gráfica de la proyección de componentes principales [150].   | 49 |
| <b>Figura 17.-</b> Diagrama representativo de las diferentes MNP sintetizadas.   | 53 |
| <b>Figura 18.-</b> Síntesis de nano hilos magnéticas mediante reducción química.   | 54 |
| <b>Figura 19.-</b> Síntesis de nanopartículas amorfas mediante coprecipitación química.  | 54 |
| <b>Figura 20.-</b> Método Stöber para recubrimiento de nanopartículas de silicio.  | 55 |
| <b>Figura 21.-</b> Esquema del equipo Langendorff de corazón de roedor.  | 57 |
| <b>Figura 22.-</b> Esquema del equipo de anillos aislados de aorta.  | 57 |
| <b>Figura 23.-</b> Representación gráfica del registro obtenido del equipo Langendorff.  | 58 |
| <b>Figura 24.-</b> Reacción de Griess.   | 59 |
| <b>Figura 25.-</b> Representación gráfica del método de Griess para determinación indirecta de óxido nítrico.  | 60 |
| <b>Figura 26.-</b> Micrografías SEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante coprecipitación química (CQ) a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (amorfas) y reducción química (RQ) a (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. | 64 |
| <b>Figura 27.-</b> Micrografías TEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante coprecipitación química (CQ) a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (amorfas) y sus respectivos tamaños (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C.  | 65 |
| <b>Figura 28.-</b> Micrografías TEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante reducción química (RQ) a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (hilos) y sus respectivos tamaños (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C.          | 66 |
| <b>Figura 29.-</b> Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de las partículas amorfas CQ.  | 69 |

**Figura 30.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de las partículas amorfas recubiertas SiMNP CQ. .... 70

**Figura 31.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de los hilos magnéticos RQ..... 73

**Figura 32.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de los hilos magnéticos recubiertos SiMNP RQ..... 74

**Figura 33.-** Curvas de magnetización de histéresis magnética de las partículas amorfas CQ (A) e hilos magnéticos RQ (B)..... 76

**Figura 34.-** Estructura de la magnetita propuesta de crecimiento en la síntesis de reducción y coprecipitación química. Se observa una línea de hierro en el plano (1 1 1) donde pueden estar creciendo las partículas amorfas. Se marca el plano (4 4 0) como el plano..... 76

**Figura 35.-** Difractogramas de las partículas amorfas CQ (A) sin recubrir y (B) recubiertas de silicio..... 78

**Figura 36.-** Difractogramas de los hilos magnéticos RQ (A) sin recubrir y (B) recubiertas de silicio..... 79

**Figura 37.-** Refinamientos Rietveld de las partículas amorfas CQ a (A) 120°C, (B) 160°C y (C) 200°C..... 82

**Figura 38.-** Registros representativos de los controles aplicados (sustancias vasoactivas). Fenilefrina (Phe) como control contráctil y acetilcolina (ACh) como control relajante..... 84

**Figura 39.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de MNP amorfas CQ sin recubrir a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata. .... 87

**Figura 40.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para las MNP amorfas a las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C



y (F) 200 °C. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 88

**Figura 41.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de MNP amorfas CQ recubiertas a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata. .... 89

**Figura 42.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para las MNP amorfas recubiertas a las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 90

**Figura 43.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de los hilos magnéticos RQ sin recubrir a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata. .... 92

**Figura 44.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para los hilos magnéticos a las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 93

**Figura 45.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de los hilos magnéticos RQ recubiertos a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata. .... 94

**Figura 46.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para los hilos magnéticos recubiertos a las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 95

**Figura 47.-** Registro representativo que muestra los efectos inducidos por las sustancias vasoactivas fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) utilizadas como controles de contracción y relajación vascular respectivamente en el fisiógrafo de tejidos aislados. .... 96

**Figura 48.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de las nanoestructuras amorfas A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C sin recubrimiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01..... 97

**Figura 49.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de las nanoestructuras amorfas A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C con recubrimiento de silicio. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 99

**Figura 50.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de los hilos magnéticos A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C sin recubrimiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 100

**Figura 51.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de los hilos magnéticos A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C con recubrimiento. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01..... 101

**Figura 52.-** Valores de óxido nítrico del sistema de anillos aislados de aorta los para los hilos magnéticos recubiertos a las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 200 °C. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de una vía contra el control; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01. .... 102

**Figura 53.-** Posibles efectos de las estructuras amorfas CQ A) sin recubrir y C) recubiertas, así como los hilos magnéticos RQ B) sin recubrir B) y D) recubiertas en el tejido vascular..... 104

**Figura 54.-** Diagrama de PCA de distribución de individuos (materiales magnéticos) y su similitud entre ellos. .... 106

**Figura 55.-** Diagrama de PCA de contribución de variables (materiales) y su similitud entre ellos..... 107

**Figura 56.-** Diagrama completo PCA de distribución de individuos (materiales) y sus variables..... 108

**Figura A 1.-** Diferentes longitudes de onda permiten observar diferentes propiedades en los materiales. Microscopio óptico, microscopio de barrido y de transmisión [200]. ..... 130

**Figura A 2.-** Señales generadas cuando un haz de electrones de alta energía interactúa con una muestra delgada, la dirección no es necesariamente la dirección que toman las radiaciones dispersas. La mayoría de estas señales se pueden detectar en diferentes tipos de TEM..... 131

**Figura A 3.-** Posible distribución de cargas entre dos fases mostrando sólo la distribución del exceso de carga. .... 133

Figura A 4.- Diagrama del funcionamiento del magnetómetro. .... 134

**Figura A 5.-** Representación de la difracción de los rayos X dentro de una estructura cristalina. .... 136

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla 1.-</b> Ensayos toxicológicos de nanopartículas magnéticas. ....  | 17  |
| <b>Tabla 2.-</b> Tamaños obtenidos mediante DLS en potencial Z de las MNP, amorfas e hilos. ....                                       | 71  |
| <b>Tabla 3.-</b> Valores de tamaño de cristalito y tensión obtenidos de los difractogramas de CQ y RQ mediante Williamson - Hall. .... | 80  |
| <b>Tabla 4.-</b> Porcentajes de las diferentes fases obtenidas de los refinamientos Rietveld de las partículas amorfas CQ. ....        | 81  |
| <b>Tabla 5.-</b> Valores obtenidos de las propiedades y efectos provocados por las MNP. ....   | 105 |
| <br>   |     |
| <b>Tabla A 1.-</b> Solución Madre de la solución fisiológica de Krebs. Esta solución se almacena a 4°C. ....                           | 127 |
| <b>Tabla A 2.-</b> Solución Krebs. Esta solución es preparada en el MOMENTO del experimento y NO puede ser almacenada. ....            | 127 |
| <b>Tabla A 3.-</b> Solución fisiológica para anillos aórticos. Esta solución se almacena a 4°C. ....                                   | 128 |

**$\mu\text{gdL}^{-1}$** *Microgramos por decilitro* **$\mu\text{m}$** *Micrómetro* **$\mu\text{M}$** *Micromolar***AC***Adenilil ciclasa***ACh***Acetilcolina* **$\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$** *Ampere metro cuadrado sobre kilogramo, unidad de magnetización dependiente de la masa***AMCSD***Base de datos mineralogistas de estructuras cristalinas estadounidenses***ANP***Péptido natriurético atrial***ATP***Adenosín trifosfato***CaM***Calmodulina***cGMP***Guanosín monofosfato cíclico***CPI-17***Inhibidor de proteína fosfatasa 1 potenciado por C-quinasa***GLOSARIO****DAG***Diacilglicerol***EDS***Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X***g***Gramos***GC***Ciclasa guanina***GPCR***Receptores acoplados a la proteína G***Gq***Proteína G tipo q***Gs***Proteína G tipo s***GTP***Guanosín trifosfato***IP***Intraperitoneal* **$\text{IP}_3$** *Inositol trifosfato* **$\text{IP}_3\text{R}$** *Receptor de inositol trifosfato***kHz***Kilo Hertz, unidad de medida de frecuencia***LoVo**

*Línea celular obtenida a partir de metástasis para pruebas de cultivo*

**mgkg<sup>-1</sup>**

*Miligramo por kilogramo*

**mgmL<sup>-1</sup>**

*Miligramo por mililitro*

**MLC**

*Miosina de cadena ligera*

**MLCK**

*Kinasa de miosina de cadena ligera*

**MLCP**

*Fosfatasa de miosina de cadena ligera*

**mLmin<sup>-1</sup>**

*Mililitro por minuto*

**mmHg**

*Milímetros de mercurio*

**MNP**

*Nanopartículas magnéticas*

**M<sub>s</sub>**

*Saturación magnética*

**mV**

*Milivolts*

**N<sub>2</sub>**

*Nitrógeno diatómico*

**nm**

*Nanómetros*

**NO**

*Óxido Nítrico*

**Nore**

*Norepinefrina*

**PDE3**

*Fosfodiesterasa cAMP-dependiente tipo 3*

**PIP<sub>2</sub>**

*Fosfatidilinositol difosfato*

**PKC**

*Proteína kinasa C*

**PKG**

*Proteína kinasa dependiente de cGMP*

**PLC**

*Fosfolipasa C*

**PP**

*Presión de perfusión*

**ppm**

*Partes por millón*

**ROCK**

*Kinasa Rho*

**SEM**

*Microscopia electrónica de barrido*

**TEM**

*Microscopía electrónica de transmisión*

**XRD**

*Difracción de rayos X*

**β<sub>1</sub>, β<sub>2</sub>**

*Receptores adrenérgicos beta*

**mT**

*Militesla*

**CQ**

*Partículas amorfas*

**RQ**

*Hilos magnéticos*

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN



## I. Introducción

Como cualquier tipo de material, los materiales nanoestructurados se deben someter ante métodos de ensayo para evaluar su toxicidad y el impacto que tendrán sobre la salud, independientemente de si serán utilizados para el sector médico o no. La legislación REACH (registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias químicas) en la Unión Europea se encarga de regular a los agentes químicos [1] cuenta con un apartado que establece que un material nanoestructurado compuesto por menos del 50%, se clasifica como un material en bulto, sin tomar en cuenta su diseminación al medio u organismos biológicos.

Entre estos ensayos destacan las pruebas *in vivo*, *in vitro* [2] y las pruebas *ex vivo*, donde un órgano diana (corazón, pulmones, riñón, hígado) se mantiene en un sistema controlado fuera del cuerpo para observar sus interacciones con un principio activo en tiempo real [3]–[5]. A diferencia de los otros métodos, las pruebas *ex vivo* presentan ventajas importantes, la obtención de resultados en tiempo real, el reducido costo a largo plazo y la menor cantidad de animales vivos utilizados, por mencionar algunas [6].

El hierro, considerado como metal pesado, es un material con efectos adversos en bulto, presentados en concentraciones alrededor de  $350 \mu\text{gdL}^{-1}$  [7]. Es ampliamente conocido que los nanomateriales poseen propiedades diferentes a sus contrapartes a escala macroscópica, y se han llevado a cabo estudios para determinar la toxicidad que presentaran en diversos órganos del cuerpo con materiales diferentes [8]. se puede presentar la lixiviación de distintas especies iónicas, en estado ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) el cual es insoluble o en estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), el cual puede interferir directamente con agentes endógenos relacionados a agentes organometálicos biológicos como el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y óxido nítrico (nitratos,  $\text{NO}_2$ , nitritos,  $\text{NO}_3$ ) un importante mediador en el músculo cardiaco [9] que presentan hierro en su estructura (hemoglobina,  $\text{Fe}^{2+}$ ). El NO es un radical libre sintetizado por la NO-sintasa endotelial (eNOS), sintasas neuronales (nNOS) e inducibles (iNOS) [10] cuyas funciones, al menos en los vasos sanguíneos, son imitadas por la clase de fármacos nitrovasodilatadores, incluidos el trinitrato de glicerilo y el nitroprusiato de sodio, que actúan como una fuente exógena de NO. Por lo tanto, se puede considerar al NO endógeno como el "nitrovasodilatador endógeno" del cuerpo [11]. Los nanomateriales se encuentran en los primeros pasos para determinar su impacto sobre tejidos biológicos. Sin embargo, estudios sobre un mismo material en distintos tejidos dentro del cuerpo han presentado resultados contradictorios y controversiales dependiendo del tipo de tejido al que fueron sometidos estos materiales (**Tabla 1**) [12], por lo que su regulación debe ser especializada y señalada

de forma correcta para evitar así un efecto mayor en la sociedad y el medio ambiente.

**Tabla 1.-** Ensayos toxicológicos de nanopartículas magnéticas.

| Tejido Estudiado                         | Método                 | Efecto reportado  | Referencia |
|--|------------------------|---|------------|
| Fibroblasto (hTERT humano)               | Tintura BrdU           | Muerte celular.   | [13]–[15]  |
| Células de pulmón (A549)                 | Tintura TB, ROS, Comet | Lesiones oxidantes DNA (Comet).<br>Bajo – no toxicidad (TB, ROS). | [16]       |
| Células hígado (BAL3A rata)              | MTT, LDH               | No tóxico hasta 100µgmL <sup>-1</sup> .<br>Fuga de LDH.           | [16]       |
| Células madre mesenquimales (MSC humano) | Comet                  | No hubo efecto significativo.                                     | [17]       |
| Células de riñón (Cos-7 mono)            | MTT, MTS               | Reducida viabilidad celular.                                      | [17], [18] |
| Macrófago (humano)                       | MTS, BrdU              | Reducida viabilidad celular después de 7 días (20%)               | [19]       |
| Células nerviosas (humano)               | MTS, LDH               | Producción elevada de MTS   | [20], [21] |
| Células endoteliales (BAECs)             | Tintura PI, Redox      | Internalización celular, viabilidad celular 80 ± 3%               | [20], [21] |
| Cáncer (múltiples)                       | MTT                    | Alta viabilidad celular >90%                                      | [20], [21] |
| Musculo liso (A10 rata)                  | Redox                  | Sin toxicidad   | [22]       |

Debido a la importancia de la rapidez, eficacia y precisión en la detección temprana y confiable de ciertas enfermedades dentro del cuerpo humano, la imaginología juega un papel crucial dentro del diagnóstico, para lo cual se han utilizado diversos agentes de contraste para poder visualizar con mejor resolución al diferenciar mejor entre tejido sano y anormal lo que ocurre dentro del cuerpo humano, tales como gadolinio, manganeso y bario [23]–[27].

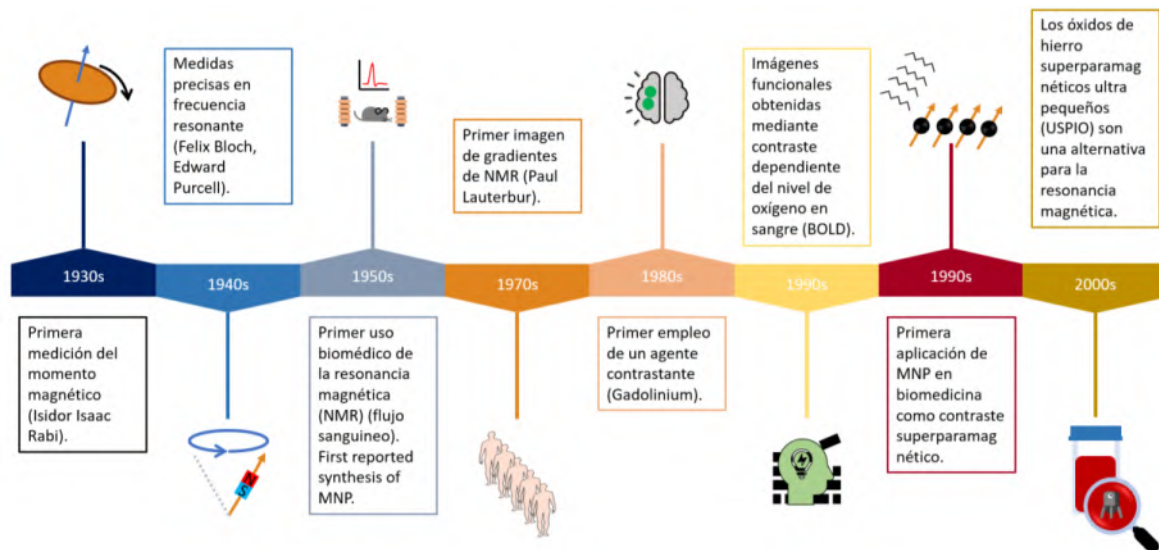


Figura 1.- Línea de tiempo de los medios de contraste.

Sin embargo, estos agentes son utilizados en promedio una tercera parte de los análisis dado su riesgo de presentar efectos adversos severos en pacientes pediátricos [28]. Los agentes de contraste para resonancia magnética nuclear (RMN) se clasifican según sus características específicas:

- Composición química (incluida la presencia o ausencia de átomos metálicos)
- Vía de administración (oral o intravenosa)
- Propiedades magnéticas
- Efecto sobre la imagen de resonancia magnética
- Biodistribución (líquido extracelular y acumulación de sangre)
- Aplicaciones de formación de imágenes (agentes específicos de órgano/objetivo)

La mayoría de estos agentes son complejos de iones paramagnéticos o partículas de magnetita superparamagnética y contienen elementos lantánidos como gadolinio ( $Gd^{3+}$ ) o manganeso de metal de transición ( $Mn^{2+}$ ) [29]. Estos elementos acortan el tiempo de relajación T1 o T2, lo que provoca un aumento de la intensidad de la señal en las imágenes ponderadas en T1 o una intensidad de señal reducida en las imágenes ponderadas en T2 [30]. La relajación T1 es el proceso por el cual la

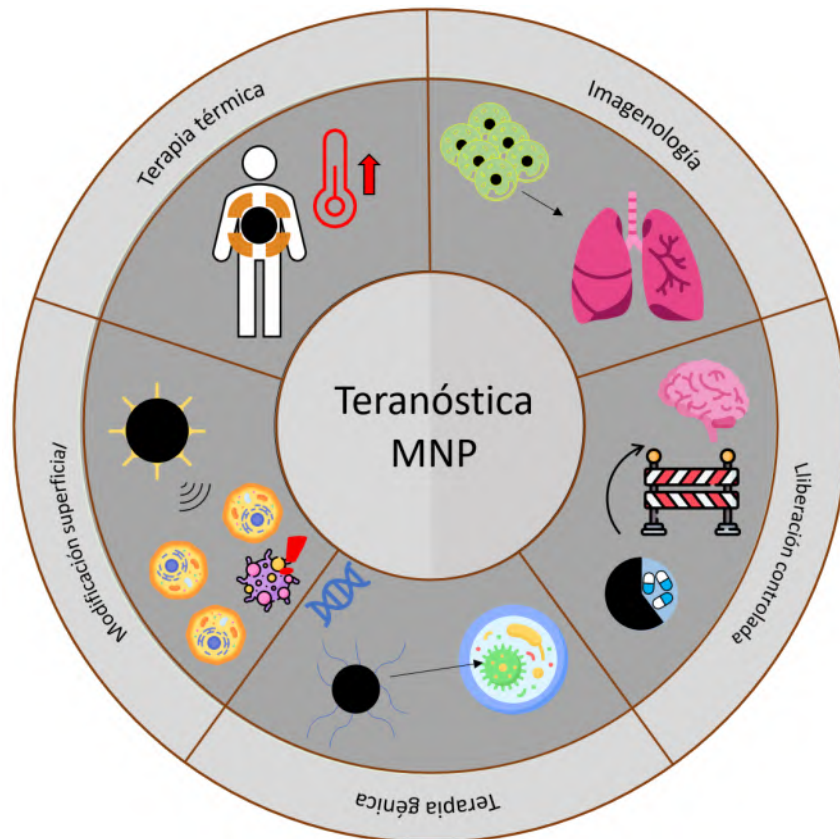
magnetización neta ( $M$ ) crece/regresa a su valor máximo inicial ( $M_0$ ) paralelo al campo magnético externo ( $B_0$ ). La relajación T1 se conoce también como relajación longitudinal, térmica o relajación de red de espín. La relajación T2 por otro lado, es el proceso por el cual los componentes transversales de la magnetización ( $M_{xy}$ ) decaen o se desfasan [31].

La mayoría de los agentes de contraste paramagnéticos son agentes positivos, los cuales acortan el tiempo de relajación T1, por lo que las partes realzadas aparecen brillantes en las imágenes ponderadas en T1. El disprosio, los agentes superparamagnéticos y los agentes ferromagnéticos son agentes de contraste negativos [27], [32], mientras que las partes realzadas aparecen más oscuras en las imágenes ponderadas en T2 [30]. Los agentes de contraste de MRI que incorporan agentes quelantes reducen el almacenamiento en el cuerpo humano, mejoran la excreción y reducen la toxicidad [33]; aunque requieran ser utilizados de forma casi inmediata debido a sus bajas vidas de anaquel [34].

#### I.1.1. Nanopartículas magnéticas $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Las nanopartículas compuestas por óxido de hierro magnéticas, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita) y  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemita) con química superficial modificada se consideran materiales prometedores para la hipertermia del fluido magnético (MFH) debido a su estabilidad química y propiedades magnéticas innatas [35].

Actualmente, muchos productos cotidianos que contienen nanopartículas magnéticas (baterías, revestimientos, material textil aséptico, cosméticos) se encuentran circulando el mercado [36], [37], mejorando las propiedades de estos productos. Si bien los nanomateriales pueden ofrecer oportunidades técnicas y comerciales (**Figura 2**), también pueden presentar riesgos sanitarios y ambientales.



**Figura 2.-** Diferentes aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en distintos sectores de la industria y medicina [38].

Dadas las propiedades magnéticas de estas nanopartículas y su eminente contacto con seres humanos, se requiere un análisis oportuno, al igual que cualquier otra sustancia en el mercado, para asegurarse de que sus usos se evalúen de forma adecuada y que los riesgos se controlen apropiadamente, tal es el objetivo de esta propuesta mediante análisis de tejido vascular en modelos fisiológicos *ex vivo*, que permiten la evaluación del funcionamiento particular de un tejido u órgano en presencia de NP.

# CAPÍTULO II

## Justificación

## II. Justificación

Los ensayos *ex vivo* de órganos y segmentos de tejido para evaluar los efectos de sustancias químicas son una herramienta que ha resultado útil para poder observarlos sin intervención directa sobre determinados sistemas y parámetros específicos en tiempo real [39] y dada la aplicación de las nanopartículas compuestas de magnetita abarca diversos ámbitos de la industria [40], [41] pueden llegar a entrar en contacto con el ser humano, hasta llegar al sistema vascular, por lo que se necesita un entendimiento profundo de la relación de los efectos que diferentes propiedades de los nanomateriales tendrán sobre el sistema vascular, para así evitar futuras contingencias sanitarias.

# CAPÍTULO III

## Descripción del problema



### III. Descripción del Problema

La magnitud de los efectos adversos de las MNPs han presentado en distintos ensayos para diferentes estructuras biológicas dadas sus propiedades únicas (morfología, tamaño, composición, cristalinidad, carga) [43], pueden generar efectos adversos en los usuarios o bien no tener el efecto deseado [44]. A partir de los ensayos en tejido cardiovascular, se esperan obtener indicadores de seguridad mediante la evaluación y creación de apartados específicos en órganos definidos para estas estructuras y así determinar magnitud y tipo de daño relacionando los efectos de las MNP en función de sus propiedades físicas y químicas.

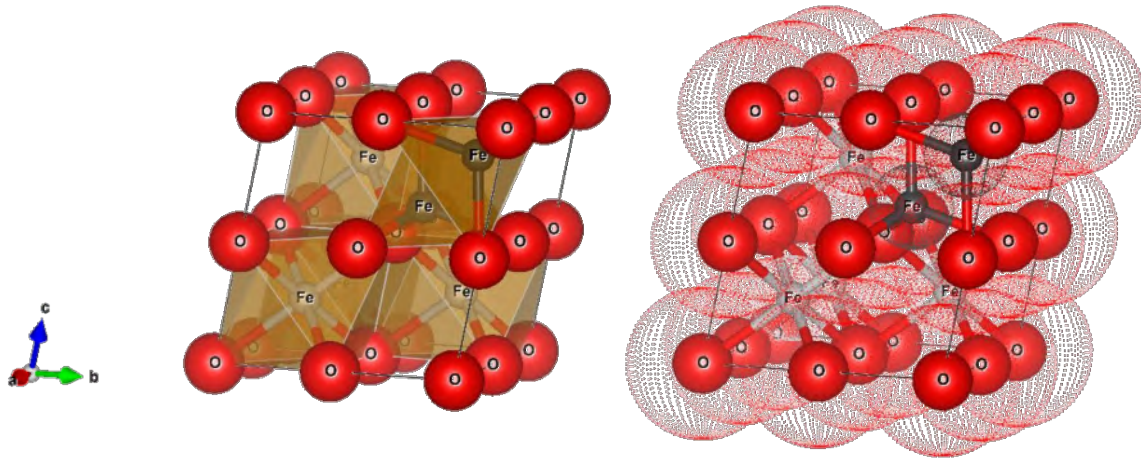
# CAPÍTULO IV

**Fundamentación teórica**

## IV. Fundamentación Teórica

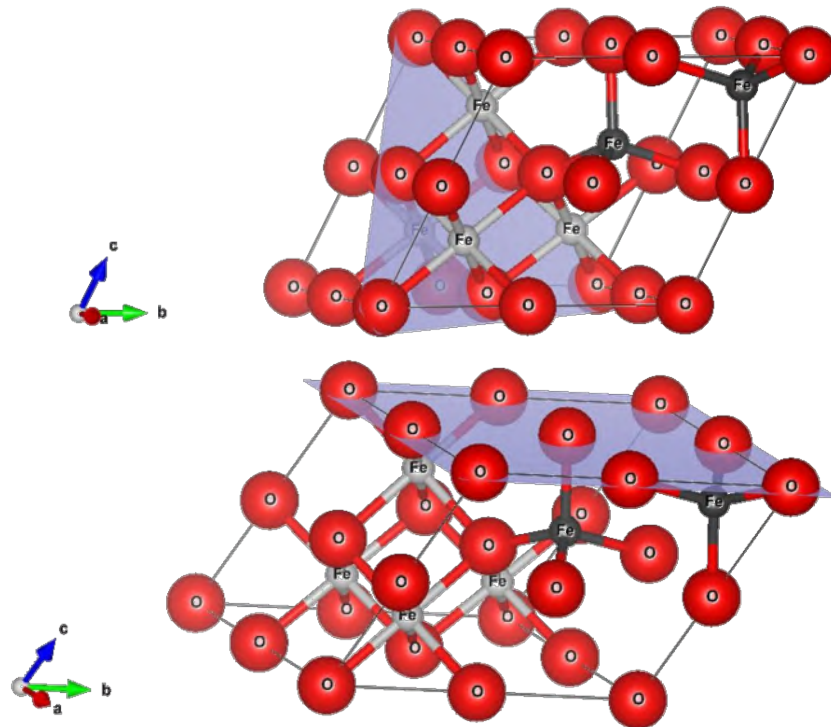
### IV.1. Nanopartículas Magnéticas: Óxidos de Hierro ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

El óxido ferroso-diférrico ( $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ ), o magnetita, llamado también erróneamente óxido de hierro, posee dos iones de Hierro,  $\text{Fe}^{2+}$ , soluble en agua y altamente tóxico [45], [46] y  $\text{Fe}^{3+}$ , insoluble en agua y sin forma de ser biodegradado u acumulado [47] que se encuentran acomodados con un grupo espacial en  $Fd3m$  dispuestos en un cristal con estructura “espinela” o magnetita ( $\text{AB}_2\text{X}_4$ ) posicionados con un arreglo FCC (Cubica Centrada en las Caras) de los oxígenos, con los iones hierro carga dos y tres formando tetraedros y octaedros, respectivamente, ocupando los sitios intersticiales (**Figura 3**) [48].



**Figura 3.-** a) Estructura de la subcelda de la Magnetita, octaedros ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y tetraedros ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y sus radios atómicos. Imagen creada con el software VESTA.

Esta estructura cristalina le permite a la magnetita crecer favoreciendo distintos planos cristalinos, entre los cuales destacan los planos (1 1 1) y (0 0 1) (**Figura 4**), donde se han reportado energías de adsorción de agua (específicamente el grupo hidroxilo) en la superficie de estos cristales, con mayor intensidad den los planos (1 1 1) [49].



**Figura 4.-** Planos cristalinos a) (1 1 1) y b) (1 0 0) en la celda unidad de la magnetita. Imagen creada con el software VESTA.

Este arreglo cristalino le confiere sus propiedades únicas paramagnéticas, es decir, no solo responde ante la influencia de un campo magnético, sino que es capaz de producir su propio campo magnético, de entre  $40 - 60 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$  [50]. Estas propiedades están fuertemente ligadas con el dominio magnético que le da la estructura cristalina, morfología y tamaño de partícula [51], un efecto puramente cuántico, se ve afectado dentro de la nanoescala, conocido como superparamagnetismo.

A causa a estas propiedades, la magnetita ha sido el objetivo de los investigadores dadas sus numerosas aplicaciones en ámbitos tan numerosos desde la medicina como en diagnóstico [52]–[54], agente acarreador [52], [55], [56], principio activo [57], [58], biomarcador [40], [59], [60] hasta el sector de sonoquímica ambiental como soporte para materiales con actividad fotocatalítica [61], [62] para mejorar su uso continuo al recuperarlo una vez usado, por lo que la magnetita estará en contacto con el ambiente y, por ende, con el ser humano en forma de desechos o

medicamentos. Sin embargo, el hierro en bulto presenta una reacción adversa al introducirse al cuerpo humano ( $350 \mu\text{gdL}^{-1}$ , 0.35 ppm) [7], por lo que las nanopartículas de magnetita normalmente se recubren con otro material que aumente su biotolerancia, como el silicio [63].

## IV.2. Recubrimientos

Al igual que sus contrapartes macroscópicas, los materiales de hierro son propensos a oxidarse y corroerse, por lo que las nanopartículas de óxidos de hierro no pueden usarse como material central para producir tratamientos o agentes farmacológicos *per se* sin la adición de recubrimientos con nuevas propiedades funcionales [55], [64], biocompatibles [65], inertes o específicos [25], [66]. Debido a su magnetismo, las MNP tienen una inestabilidad innata cuando se almacenan durante largos períodos [67]–[69], aglomerándose, lo que conduce a una pérdida de dispersabilidad gracias a la agregación y formación de partículas grandes para reducir la energía superficial generando una pérdida en sus propiedades (superparamagnetismo). Las nanopartículas de hierro no recubiertas se oxidan fácilmente cuando se exponen al aire o ambientes ricos en oxígeno debido a su alta actividad química y su estructura de espinela inestable, especialmente las nanopartículas de magnetita y maghemita, alcanzando una vida útil máxima de aproximadamente 8 a 12 meses [70], [71]. Como resultado, la estabilización química de nanopartículas simples de óxido de hierro para evitar daños durante o después de su posterior exposición y/o aplicación se convierte en un factor esencial a considerar porque la mayoría de los organismos y aplicaciones biológicas requieren la administración de soluciones acuosas [72], [73]. La elección del material de recubrimiento depende de la aplicación prevista de las nanopartículas magnéticas y de las propiedades deseadas, como la biocompatibilidad, la estabilidad y la funcionalidad; además, el recubrimiento de la superficie a menudo implica una facilidad para la funcionalización posterior con ligandos o biomoléculas y así conseguir capacidades de detección o focalización específicas [74]. Por lo que existen diversos materiales que pueden ser utilizados para recubrir y mejorar las

nanopartículas magnéticas, como el silicio, cubiertas de carbono, metálicas y poliméricas [75].

#### IV.2.1. Silicio

Debido a su estabilidad química, diversidad en las alteraciones de la superficie y pérdida mínima del magnetismo, la sílice ( $\text{SiO}_2$ ) se ha considerado como uno de los mejores materiales para proteger las MNP, unir diferentes ligandos biológicos a la superficie del óxido de hierro [76] y estabilizar las nanopartículas en la solución. El recubrimiento de sílice es el material preferido al aplicar capas a MNP debido a su mayor biocompatibilidad, capacidad para unirse con conectores orgánicos y una metodología de síntesis simple en general [77], [78].

Las diferentes metodologías para recubrir MNP y nanopartículas se basan en las propiedades deseadas, el espesor, el porcentaje de sílice y la posterior funcionalización [79]. La metodología Stöber es la más sencilla y utilizada debido a su fácil aplicación. Requiere de un precursor sol-gel, el cual se hidroliza y condensa para obtener láminas de  $\text{SiO}_2$  (Figura 5) que recubrirán el material deseado [80].

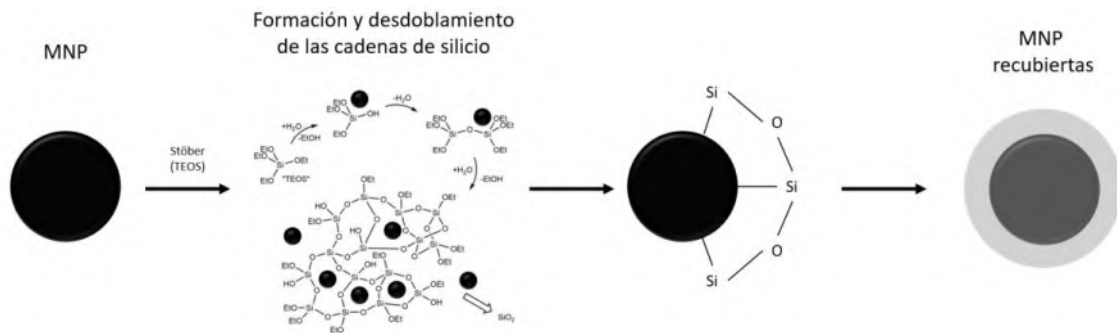


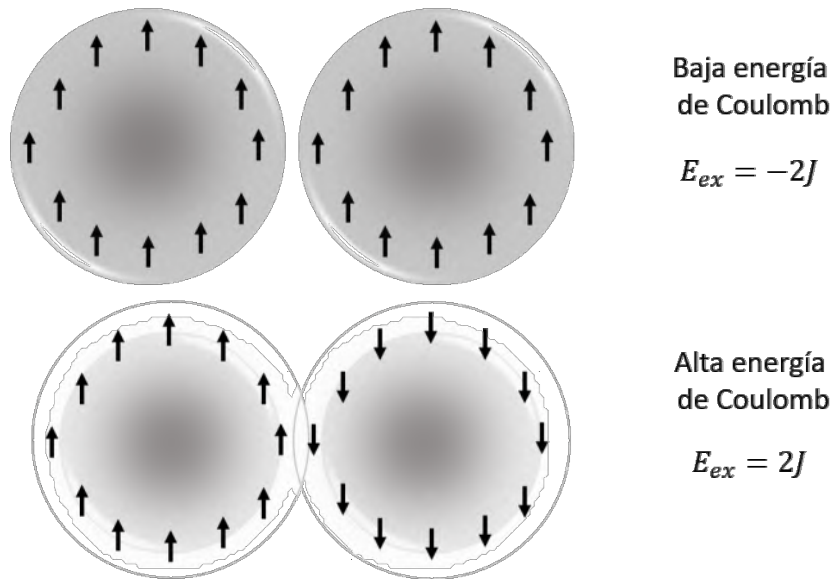
Figura 5.- Representación del recubrimiento de silicio mediante el método de Stöber.

#### IV.2.2. Superparamagnetismo

El momento magnético (magnetización) total de un material en bulto se compone de los momentos magnéticos de sus electrones individuales, que aparte de las contribuciones orbitales, el momento magnético de cada electrón está determinado principalmente por su espín [81]. La formación de un estado fundamental ordenado

magnéticamente de largo alcance en un material es impulsada por la llamada interacción de intercambio. Esta interacción de tipo Coulomb dependiente del espín es esencialmente una consecuencia del comportamiento colectivo de un sistema fermiónico y, como tal, un fenómeno puramente mecánico-cuántico [82], el cual requiere un tratamiento adecuado de la estructura electrónica. En otras palabras, el magnetismo en un sólido es explicado en el campo de la mecánica cuántica.

Es esto por lo que existe un interés muy grande en el magnetismo a nivel de la nanoescala, dado que el magnetismo es un proceso mecánico-cuántico (propiedades presentes regidas por la longitud de Planck,  $10^{-35}$  m) y los materiales nanométricos se encuentran a  $10^{-9}$  m poseen una proporción átomos-superficie significativa, cuyos estados electrónicos se modifican en relación con las capas interiores (efecto de apantallamiento), de esta forma, en una partícula de 10 nm, el 10% de los átomos están en la capa superficial y esta proporción aumenta al 50% en una partícula de 2 nm. En una partícula metálica, la separación de energía de los estados cuánticos de los electrones de conducción se vuelve significativa en relación con otros parámetros de energía como las energías térmica y de Zeeman [83]. Esto significa que a medida que el tamaño de la materia se reduce a 100 nm o menos, sus propiedades electrónicas, magnéticas, ópticas y químicas comienzan a evolucionar con el tamaño, empezando esta evolución de manera paulatina cerca del límite superior (100 nm) de la región a nanoescala, pero en tamaños pequeños pueden ocurrir cambios significativos en el comportamiento con la eliminación o adición de un solo átomo, como lo es el caso del superparamagnetismo donde la energía de intercambio por átomo es varios órdenes de magnitud más fuerte que la interacción dipolar magnética directa entre átomos (**Figura 6**)[84].



**Figura 6.-** Representación esquemática de la interacción de intercambio. El requisito de que la función de onda del electrón sea antisimétrica tiende a separar electrones con el mismo espín, lo que reduce su energía de Coulomb [84].

Los imanes que existen en la naturaleza poseen un campo magnético permanente, los cuales no son comunes ya que se crean al encontrarse en un campo magnético lo suficientemente intenso para lograr saturarlo ( $M = M_s$ ); sin embargo, la magnetización en diferentes partes del imán no apunta en la misma dirección (dominios magnéticos) [85].

Es por esta razón que el control del arreglo de los cristales en los nanomateriales de óxidos metálicos es de suma importancia, dado que las propiedades magnéticas de estos materiales dependen en gran medida de la forma del cristal [86].

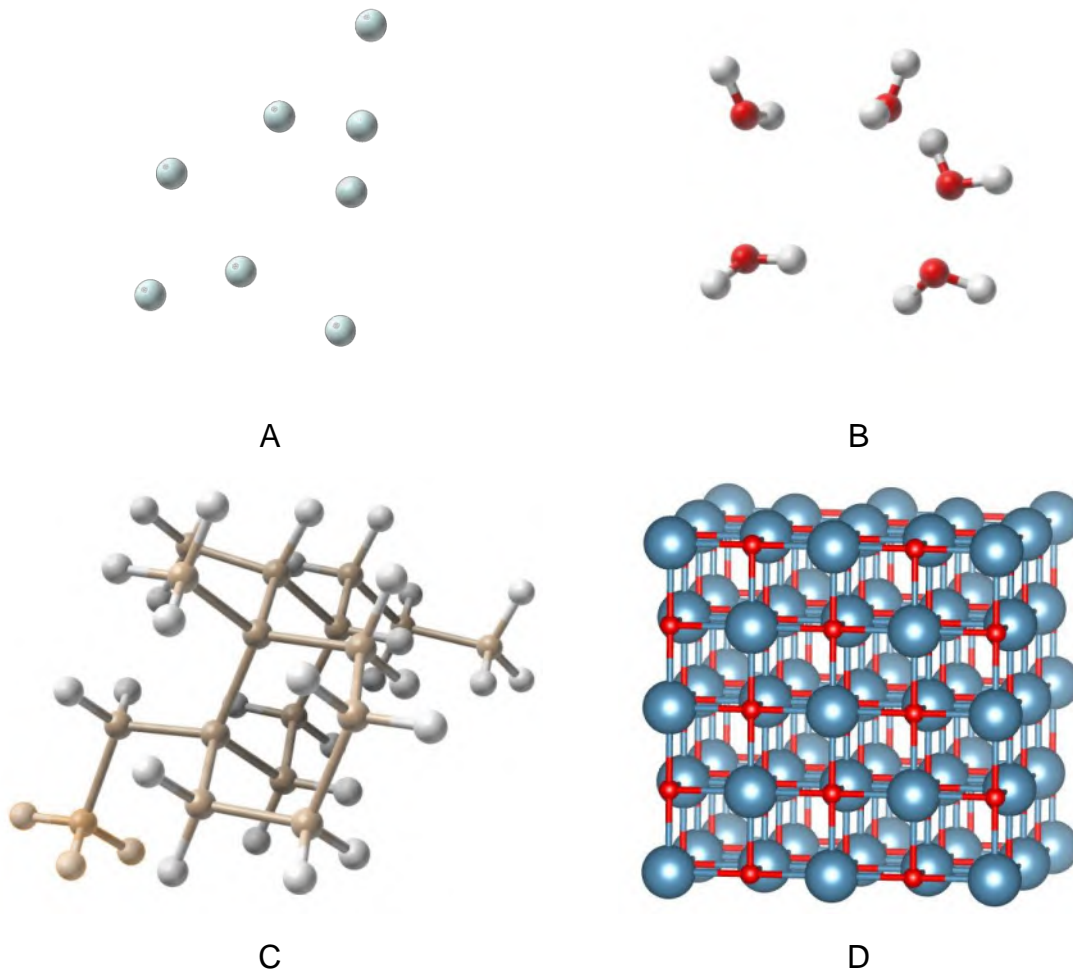
### IV.2.3. Morfología y cristalinidad

La forma macroscópica que presentan los cristales en la naturaleza es una proyección del ordenamiento atómico interno que reflejan los arreglos cristalinos [87].

En los distintos estados de la materia se pueden encontrar tres clases de arreglos atómicos o iónicos (**Figura 7**).



- Sin orden. - Los gases monoatómicos, los gases nobles y el plasma los átomos o iones no están dispuestos de manera ordenada y llenan todo el espacio que los contiene.
- Orden de corto alcance. - Un material cuyo arreglo espacial de los átomos sólo se extiende a sus vecinos inmediatos, tiene un orden de corto alcance. El agua tiene este tipo de ordenamiento debido a las interacciones covalentes que existen entre los átomos de hidrogeno y oxigeno formando un ángulo de  $104.5^\circ$ .
- Orden de largo alcance. - La mayoría de los metales, aleaciones, semiconductores, cerámicos y algunos polímeros presentan una estructura cristalina que abarca escalas de longitud mayores a 100nm, formando un patrón regular y repetitivo como una red en tres dimensiones. A estos materiales se les conoce como materiales cristalinos [88].



**Figura 7.-** Distintos niveles de ordenamiento atómico. a) Sin ordenamiento (átomos de helio). b) Ordenamiento de corto alcance (moléculas de agua). c) Ordenamiento de corto alcance (silicio amorfo en vidrio). d) Ordenamiento de largo alcance (celda de óxido de calcio) [88].

El ordenamiento atómico en los sólidos cristalinos puede ser descrito al representar a los átomos en los puntos de intersección en una red tridimensional, que se conoce como red espacial. Esta red puede describirse como un ordenamiento tridimensional infinito de puntos. Cada punto en la red tiene un entorno idéntico; en un cristal ideal, la agrupación de puntos de la red alrededor de uno cualquiera es idéntica a la agrupación en torno a otro punto dentro de la red espacial. A este grupo de puntos dispuestos de una forma determinada entre sí se conoce como motivo o base. La estructura del cristal puede ser definida como la colección de redes espaciales y bases [89].

La creación de estructuras con una morfología, tamaño, orientación o características específicas requiere una gran cantidad de energía que debe proporcionarse al sistema para promover el acomodo cristalino deseado, utilizando condiciones de temperatura y presión extremadamente altas, como se observa en la naturaleza [90]. Sin embargo, el uso de fuentes de energía como la calcinación pueden promover la formación de óxidos al estar rodeados de un ambiente rico en oxígeno [91]. Una alternativa que ha resultado ser viable en los últimos años para la regulación de estructuras nanométricas es la sonoquímica [92]. La radiación con ultrasonido de líquidos provoca reacciones químicas de alta energía, a menudo con la emisión de luz [93]. El efecto que origina la sonoquímica y la sonoluminiscencia se debe a la formación, crecimiento y colapso de burbujas en líquidos irradiados con sonido de alta energía es conocido como cavitación acústica. El colapso de las burbujas provocado por la cavitación produce un intenso calentamiento local (hot-spots) y altas presiones, con una vida útil muy corta, que pueden crear puntos calientes de temperaturas aproximadas de 5.000 K, presiones de 1.000 atm y tasas de calentamiento y enfriamiento superiores a  $10^{10} \text{ Ks}^{-1}$ . Es por esta razón que la cavitación puede crear condiciones físicas y químicas extraordinarias en líquidos que de otro modo serían inertes [94] sin fomentar la creación de óxidos. Las condiciones que producen choques de ondas ultrasónicas provocados por el colapso de las burbujas crean ambientes de síntesis, que han demostrado ser útiles para reacciones que requieren estructuras poco comunes como las espinelas de

hierro, formando estructuras definidas bajo el ambiente reductor de ciertas sustancias básicas [61] o estructuras definidas mediante otro tipo de ambientes controlados [92], [95], [96].

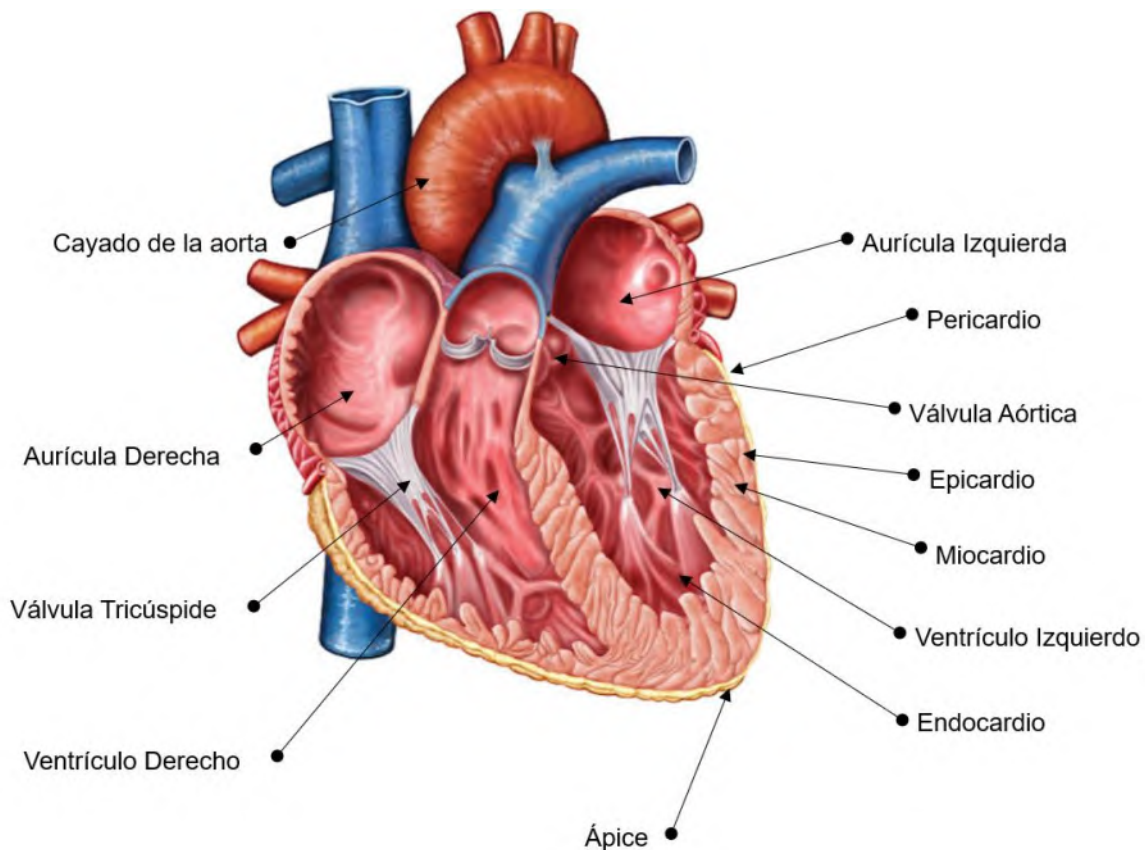
### IV.3. Sistema vascular

Dado que dentro del organismo diversas células cumplen funciones específicas y se encuentran ancladas en un tejido, órgano o sistema, formados por millones de células, por lo que existe un sistema de vasos sanguíneos que permiten el intercambio de nutrientes y desechar productos metabólicos (dióxido de carbono, creatina, urea, etc.) que pueden llegar a tener efectos adversos en el organismo y sus sistemas [97]. El corazón funciona como una bomba para circular la sangre a través del cuerpo y es el principal órgano del sistema hidráulico vascular de transporte desarrollado por organismos multicelulares [99].

La sangre y varios fluidos intersticiales son las dos vías hidráulicas que utilizan estos organismos multicelulares para el desecho y oxigenación de los tejidos. Sin embargo, el principal método de transporte es a través de la sangre, definida como un tejido conectivo formado de una matriz extracelular líquida que contiene en suspensión células completas (glóbulos rojos, blancos y plaquetas) junto con granulomas [98]. La sangre realiza múltiples funciones, como el transporte de nutrientes (eritrocitos) y desechos, la regulación de la acidez del organismo (manteniéndolo entre pH 7.35 y 7.45), la temperatura (36.5 °C), la barrera de eventos físicos mediante coágulos (plaquetas) y la defensa de agentes patógenos (leucocitos) [42].

El corazón está formado por cuatro cámaras principales separadas por válvulas: dos aurículas, ocupando el mayor espacio localizadas en la parte superior y dos ventrículos, localizados en la parte inferior, terminando en la punta del ápice (**Figura 8**). Cada vez el corazón realiza una contracción (sístole), las aurículas hacen fluir un volumen de sangre hacia un ventrículo o hacia las arterias. Esto crea cambios de presión dentro del corazón que ocasiona que las válvulas se abran y cierren entre cada contracción (sístole) y relajación (diástole). Cada una de las cuatro válvulas que separan las cámaras del corazón garantizan el flujo de sangre en una sola

dirección al abrirse y cerrarse para evitar su retorno [98]. El corazón recibe un oxígeno y nutrientes de la sangre que entra en vasos sanguíneos que irrigan el corazón por dentro llamados vasos coronarios, ubicados entre una membrana que protege el corazón (pericardio) y una capa de endotelio que rodea un segmento de tejido conectivo (endocardio), de tamaños aproximados menores de 262  $\mu\text{m}$  [100].



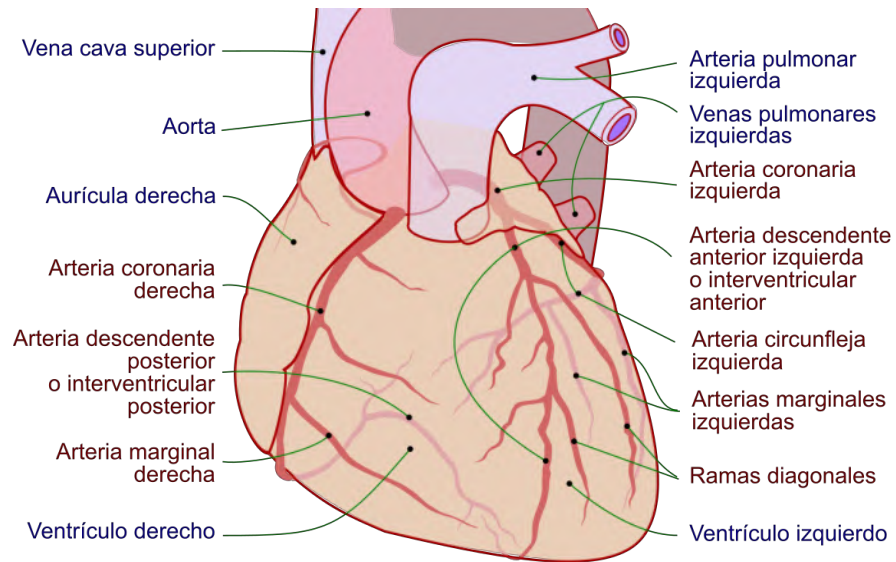
*Figura 8.- Corte transversal mostrando anatomía interna del plano anterior-frontal del corazón [98].*

### IV.3.1. Vasos Coronarios

El sistema coronario contiene tres componentes principales: arterias coronarias, vasos coronarios y drenaje venoso [98].

Las arterias coronarias principales derecha e izquierda salen de la aorta ascendente justo por encima de la válvula aórtica y la ramificación subsiguiente alimenta el tejido miocárdico de las cuatro cámaras del corazón (**Figura 9**) [101]. Estas arterias se ramifican en arteriolas, las que a su vez se ramifican en una gran cantidad de

capilares, que representan un grado extraordinario de ramificación en vasos muy delgados, lo que asegura que casi todos los miocitos se encuentren a poca distancia de al menos uno de estos capilares y es a través de la difusión por la que los nutrientes y los productos finales metabólicos se muevan entre los vasos capilares y el entorno de los miocitos a través del líquido intersticial [102].

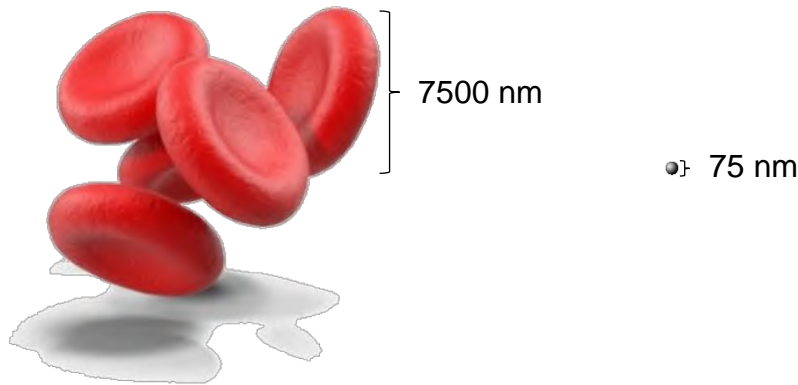


*Figura 9.- Esquema de las ramificaciones del sistema coronario vascular. Imagen libre.*

Las nanopartículas y los materiales nanoestructurados, definidos como aquellos que presentan en dimensiones entre 1 y 100 nm [103], poseen propiedades particulares debido a su reducido tamaño, gran área superficial, arreglo cristalino, composición, reactividad, entre otras, distintas de sus contrapartes en la macro escala [43]. Estas propiedades pueden tener distintos efectos contraproducentes:

- La estructura de estos materiales influye en gran medida en las propiedades finales que presenten, debido a los diferentes planos cristalinos que se encuentren expuestos en la superficie de las partículas, se exteriorizan diferentes átomos de la estructura, por lo que materiales con misma composición pero diferente acomodo resulta en respuestas diferentes la interacción con el medio [104], [105].
- El tamaño es un factor muy importante al diseñar estructuras que interaccionarán en algún punto con el cuerpo humano [106], dado que las células oscilan en un rango muy amplio de tamaños, desde la célula más pequeña de alrededor de 5  $\mu\text{m}$  (gránulos del cerebelo) [107] hasta los 0.1

mm (ovulo) [108] organizadas de diferente forma en los diferentes sistemas, responsables de mantener la homeostasis dentro del cuerpo [98], [109]. Sin importar el tamaño de la célula, estas son tres órdenes de magnitud más grandes que las de una nanopartícula (**Figura 10**).



**Figura 10.-** Comparación de tamaño entre un eritrocito (7.5  $\mu\text{m}$  o 7500 nm) y una nanopartícula (75 nm) [110].

- Los materiales nanoestructurados tienden, por su naturaleza inestable [111], a formar aglomerados o estructuras de mayor tamaño para reducir su energía: sin embargo, esto ha sido tema de debate debido a que las partículas pueden tener efectos negativos al aumentar su tamaño al impedir el acceso de oxigenación o al aumentar su tamaño reducir su número de átomos en la superficie y así reducir los efectos dañinos [2], [112].

Dadas estas propiedades, las nanopartículas no pueden ser catalogadas únicamente por su composición y atribuir las ventajas y desventajas de sus contrapartes macro, las cuales forman suspensiones inestables en medios ricos en iones (medios biológicos) debido a su tendencia a formar agregados de mayor tamaño [113], [114]. Simulaciones se han realizado para darse una idea de lo que sucedería si una partícula con un potencial positivo de NP atravesara el potencial de membrana de una célula bajo condiciones específicas [115]. Esto sin embargo no contesta las preguntas de aglomeración, morfología o tamaño, factores que deben ser importantes cuando se interactúa con organismos complejos como son los órganos [104]. Por el otro lado, existen estudios que hablan sobre la agregación como la principal razón de producir los efectos adversos en el organismo [111], ya que las nanopartículas al aglomerarse pueden llegar a alcanzar una concentración mínima para que su composición produzca efectos no deseados o bloquear estructuras estrechas importantes [100].

### **IV.3.2. Modelos de tejido aislado *ex vivo***

El funcionamiento específico de un tejido u órgano en presencia de NP se puede evaluar utilizando modelos fisiológicos *ex vivo* de tejidos y órganos aislados; por ejemplo, conductos relacionados con el sistema cardiovascular (aorta, arteriolas, etc.), sistema respiratorio (tráquea, bronquios) y el sistema digestivo (intestino delgado o grueso); así como el estudio de órganos como el corazón, riñón, pulmón, hígado, así como las rutas bioquímicas involucradas entre estos [116].

Para el estudio de moléculas del sistema endógeno tal como las hormonas, neurotransmisores y otros mediadores ya sea en condiciones normales como fisiopatológicas, como las asociadas a trastornos cardiovasculares, respiratorios y digestivos, entre otros, los modelos fisiológicos se han utilizado desde su implementación en 1883 como una herramienta de gran utilidad [117].

En la actualidad, se pueden medir varios parámetros fisiológicos utilizando una amplia variedad de modelos experimentales, pero algunos de estos modelos pueden ser costosos, requieren tiempos de preparación extensos y son complicados de manipular, lo que arroja resultados que en ocasiones no son confiables con información específica y en escenarios aislados para ayudar a explicar sus efectos en grandes sistemas [118]. El uso de los sistemas fisiológicos, particularmente los de órganos y tejidos aislados, permite determinar de manera confiable, rápida y económica los indicadores bioquímicos vinculados a los efectos causados para un tejido en particular, así como información sobre una amplia gama de parámetros fisiológicos en tiempo real [5].

Con los transductores adecuados, se pueden realizar mediciones isotónicas o isométricas. El transductor isométrico es un transductor que contiene un segmento de material conductor que puede medir la presión, la carga o ambos gracias al efecto piezorresistivo, una propiedad de algunos materiales para cambiar su resistencia eléctrica al ser sometidos a esfuerzos físicos específicos [119]. La medición isométrica, que mantiene la longitud del tejido constante, es un método popular para evaluar la contractilidad. Por el otro lado, en la medición isotónica, el cambio de fuerzas hace que la longitud del tejido se reduzca. El uso principal del sistema de anillo aislado es obtener variaciones de la tensión en pequeñas secciones de tejido y anillos mediante transductores isométricos [120].

Los hallazgos de este tipo de modelos experimentales permiten establecer o dilucidar los mecanismos que provocan estos NM en diferentes estructuras biológicas, así como la reorientación de futuras investigaciones en el estudio y conocimiento de sus efectos adversos, potenciales aplicaciones biomédicas, o bien en el establecimiento de parámetros de bioseguridad.

#### IV.3.2.1 Corazón de roedor aislado y perfundido o técnica de Langendorff

Oskar Langendorff creó el modelo de corazón perfundido, una técnica experimental, a finales del siglo XIX, en la que se coloca un catéter en la aorta de un corazón extirpado para permitir la perfusión cardíaca retrógrada a través de la arteria coronaria [121]. Desde el desarrollo de la técnica Langendorff en 1895 [122] se han desarrollado técnicas de tejido u órganos aislados para ver más de cerca su funcionamiento y respuesta a diferentes principios activos y sustancias [123], conocidos como modelos *ex vivo*. Estos modelos aislados se han utilizado durante mucho tiempo como una herramienta muy útil para el estudio de moléculas endógenas como hormonas, neurotransmisores y otros mediadores, en condiciones normales como fisiopatológicas, por ejemplo, trastornos cardiovasculares, respiratorios, digestivos, entre otros [123].

Al perfundir el corazón a través de los vasos coronarios mediante una cánula introducida en la aorta ascendente (cánula aórtica) permite mantener la actividad del tejido del miocardio en un entorno externo y con parámetros controlados (flujo constante, asistencia eléctrica mediante impulsos, temperatura constante y burbujeo de carbógeno a la solución fisiológica con nutrientes necesarios) para el correcto funcionamiento del corazón. La cánula aórtica permite que una solución fisiológica (conocida como solución de Krebs) ingrese al corazón retrógrado. Es importante tener en cuenta que la solución de Krebs esta solución perfunde al corazón aislado de una forma retrógrada con respecto a cómo funciona el corazón en condiciones fisiológicas normales (por medio de la aorta) para asegurar la irrigación de todos los vasos coronarios [3].

En contraste con el flujo cardíaco *in vivo*, la perfusión retrógrada ocurre cuando la válvula aórtica se cierra por una presión hidrostática **constante** o una bomba que mantiene un **flujo constante**. Los ostios coronarios (izquierda y derecha) llenan de solución de perfusión la vasculatura de la arteria coronaria cuando la cánula se encuentra introducida en la aorta. La presión resultante se conoce como presión de perfusión (PP), que se puede interpretar como el tono vascular (presión) de los vasos coronarios.



#### **IV.3.2.2 Anillos aislados de aorta**

Uno de los métodos tradicionales para investigar la fisiología y farmacología de tejidos con forma cilíndrica y presencia de peristalsis como lo son los vasos sanguíneos, vías respiratorias (tráquea) y los intestinos es el sistema de anillo aislado [124]. Dependiendo del transductor utilizado, se pueden realizar mediciones isométricas o isotónicas. La medición isométrica, que mantiene la longitud del tejido constante, es un método popular para evaluar la fuerza de contracción del músculo liso de conductos biológicos como los vasos sanguíneos. Sin embargo, la medición isotónica es adecuada para estudiar el acortamiento de las velocidades porque la longitud del tejido disminuye como resultado del cambio de fuerzas. El sistema de anillo aislado, que está conectado a transductores isométricos, se utiliza principalmente para controlar la tensión en anillos y pequeñas secciones de tejido [120]. El transductor isométrico es un transductor de galga extensométrica o un segmento de material conductor, que permite medir la presión, la carga o ambos, en función del efecto piezorresistivo, que es una propiedad que ciertos materiales tienen para cambiar su resistencia eléctrica cuando se someten a ciertos esfuerzos. A los anillos se colocan dos ganchos de metal a través de la luz y se sumergen en cámaras de doble pared que contienen una solución fisiológica mantenida a 37 °C. Uno de los ganchos está conectado al transductor isométrico, de modo que cuando el anillo aumenta su fuerza en respuesta a un agente, el transductor se tensa y el conductor se alarga y reduce su área de sección transversal, aumentando su resistencia eléctrica; Por otro lado, cuando se relaja, el conductor reduce su longitud, disminuyendo su resistencia [125].

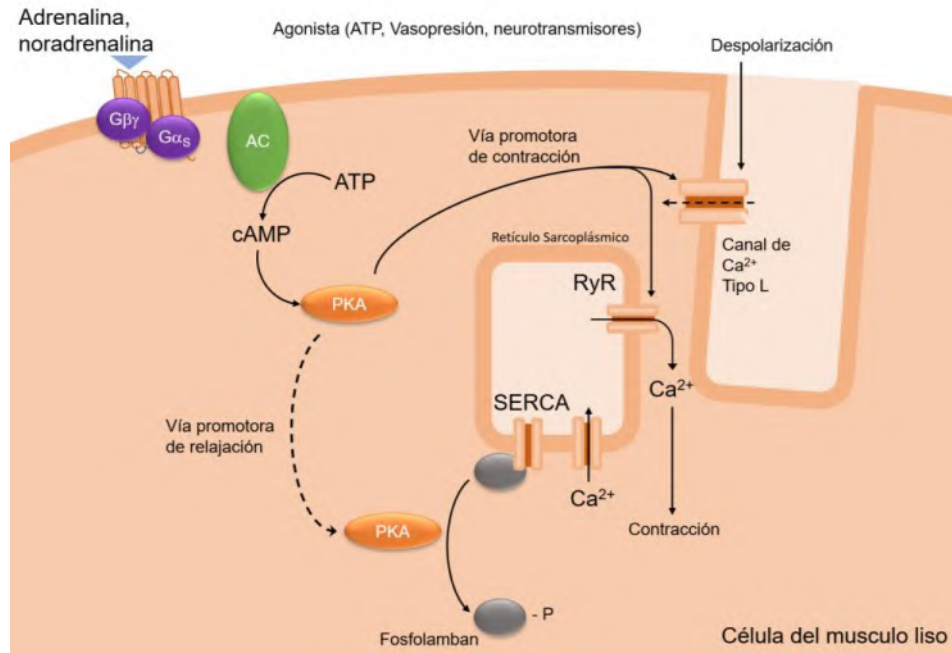
#### **IV.3.3. Contracción y relajación: activadores y sustancias vasoactivas**

El músculo se puede dividir en dos categorías amplias: músculo liso, que comprende músculos vasculares, respiratorios, uterinos y gastrointestinales; y músculo estriado, que incluye músculos esqueléticos y cardíacos. La actina y la miosina son las dos proteínas principales que forman el sistema contráctil en todos los tipos de músculos [126].

El calcio que interactúa con la célula (interna o externamente), juega un papel crucial al intervenir en la acción de la contracción del músculo liso en el sistema vascular. Por lo tanto, es necesario un aumento en la concentración de calcio citosólico para la contracción de todas las células musculares. El calcio tiene una concentración citosólica en reposo de alrededor de 100 nM y un valor extracelular de 2 a 4 mM; además, se mantiene en las células a una concentración de aproximadamente 0,4 mM en las membranas sarcoplásmica (SR, en músculo esquelético y cardíaco) y retículo endoplásmico (ER, en músculo liso) [127].

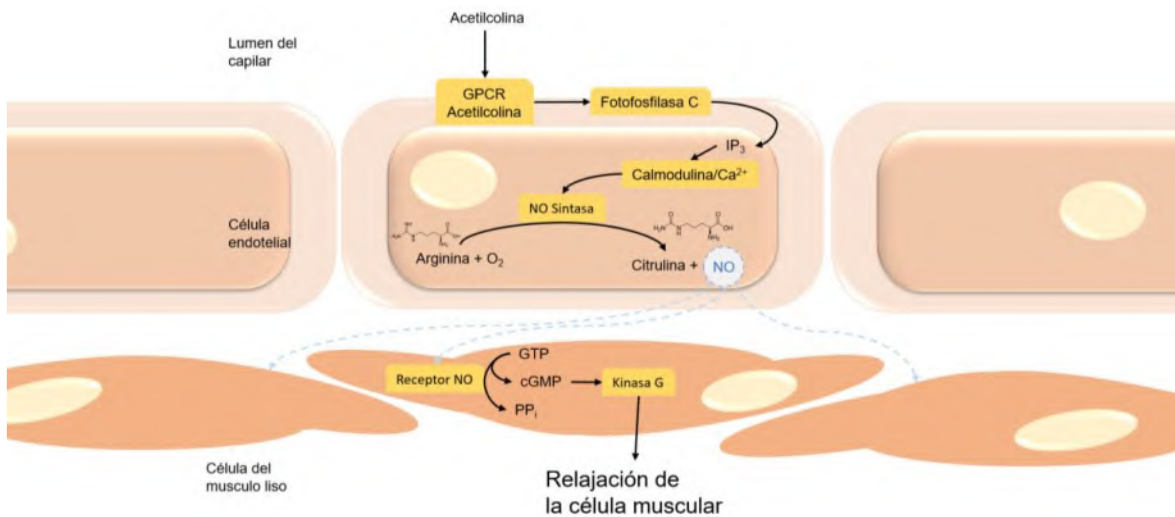
En el músculo estriado, limita la cantidad de actina disponible, mientras que, en el músculo liso, limita la disponibilidad de miosina de cadena ligera (MLC) (**Figura 11**). La contracción de los músculos lisos requiere una entrada de calcio. Hay dos formas principales en que las células del músculo liso aumentan los niveles de calcio. El calcio ingresa primero a la célula a través de canales tipo L que se encuentran en las caveolas de la membrana tras la despolarización, la estimulación hormonal o la acción de neurotransmisores. Luego, el calcio introducido por despolarización estimula la liberación de calcio extra desde el retículo sarcoplásmico (SR) a través de receptores de rianodina e IP3 [124].

Debido a que la carga en la membrana celular se mantiene con un potencial negativo, las células utilizan los canales de calcio tipo L (potencial positivo) para realizar la contracción en el músculo liso. Esto alterna la activación de estos canales, asegurando que el potencial se mantenga intercalándolos en todo momento [128]. Además, los factores de circulación (citocinas) y los factores difusibles (óxido nítrico, NO) en el torrente sanguíneo funcionan como mediadores en receptores de la membrana plasmática para limitar los niveles de calcio, lo que resulta en relajación a bajas concentraciones y citotóxicos cuando se excede la concentración de estos [126], [129].



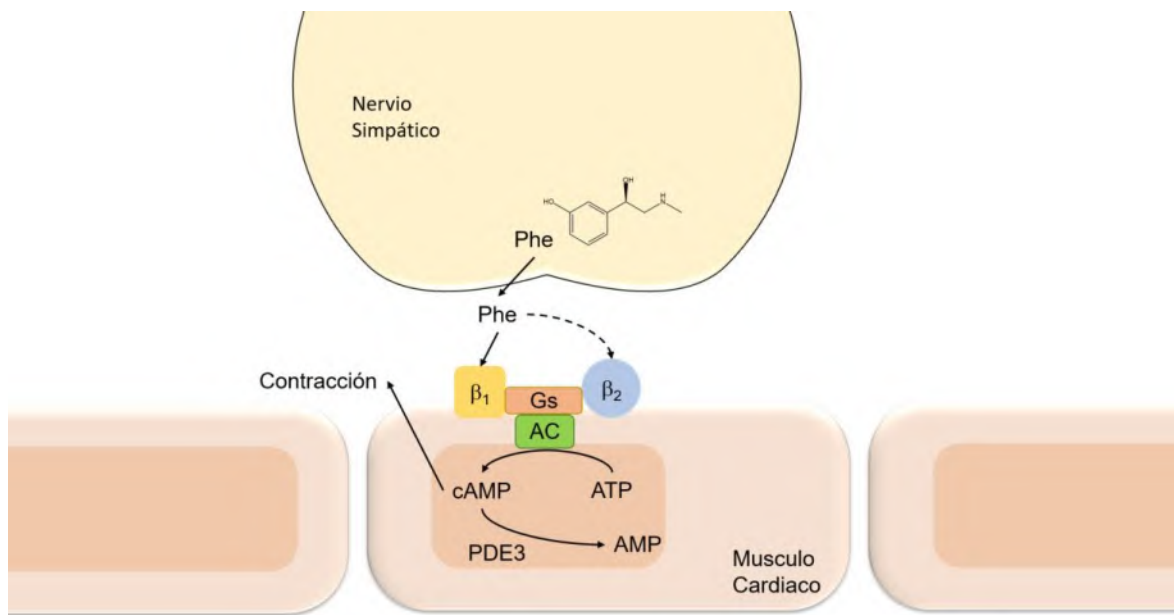
*Figura 11.- Vías de señalización de la contracción del músculo liso por agonistas y despolarización [126].*

Un grupo de sustancias conocidas como vasoactivas son las encargadas activar receptores para regular la liberación de calcio, uno de los elementos con mayor importancia al regular las vías que permiten la contracción y relajación dentro del músculo liso, dentro de las células musculares [130]. La activación de los receptores muscarínicos media la acetilcolina, que es una de las principales sustancias [131]. La liberación del calcio contenido en las células (**Figura 12**) se inicia como resultado de esta activación de los receptores, aumentando la disponibilidad interna de este y, como resultado, la apertura de los canales de potasio activados por calcio [128]. La despolarización de la membrana celular provoca un aumento en el potencial y la contracción en las células del músculo liso [132]. Es importante conocer las propiedades e interacciones de materiales que contienen iones  $\text{Fe}^{2+}$ , como la magnetita, porque la hemoglobina puede inhibirlo, elevar la presión arterial sistémica y reducir los vasopresores y las necesidades de ventilación, así como jugar un papel significativo en la regulación del NO [133].



*Figura 12.- Vía de acción de la acetilcolina en el músculo liso. [98].*

La contracción vascular en cambio, se produce mediante la activación de los receptores adrenérgicos correspondientes a la norepinefrina, un agente contráctil sintético similar a la noradrenalina, inician la contracción muscular [134]. Una variedad de proteínas en la membrana del músculo liso, conocidas como receptores adrenérgicos, reconocen esta sustancia cuando se libera a las células del sistema nervioso. Estos receptores desencadenan múltiples señales generadas por la proteína G agilizando la enzima adenilil ciclasa que convierte el ATP en AMP, lo que provoca la sístole (contracción) del músculo cardiaco por la fosforilación de la miosina de cadena ligera (**Figura 11** y **Figura 13**) y despolarizar así los canales de voltaje-dependientes calcio [135]. De igual forma, estos efectos también se producen cuando las células tienen altas dosis de potasio, lo que provoca la despolarización de los canales de calcio tipo L y la contracción del músculo liso. [136].



**Figura 13.-** Vías de señalización del efecto de la fenilefrina (Phe) en el músculo cardíaco y su efecto contráctil. [98].

La contracción y relajación del músculo liso presente en los vasos coronarios están reguladas por estos factores neurales, hormonales y locales en constante combinación, permitiendo que los vasos ajusten el flujo sanguíneo de forma dinámica, dependiendo de las necesidades metabólicas y componentes externos del corazón, fundamentales para mantener el flujo sanguíneo coronario y satisfacer las demandas del sistema, que puede ser modificado o interrumpido por factores externos como los metales pesados.

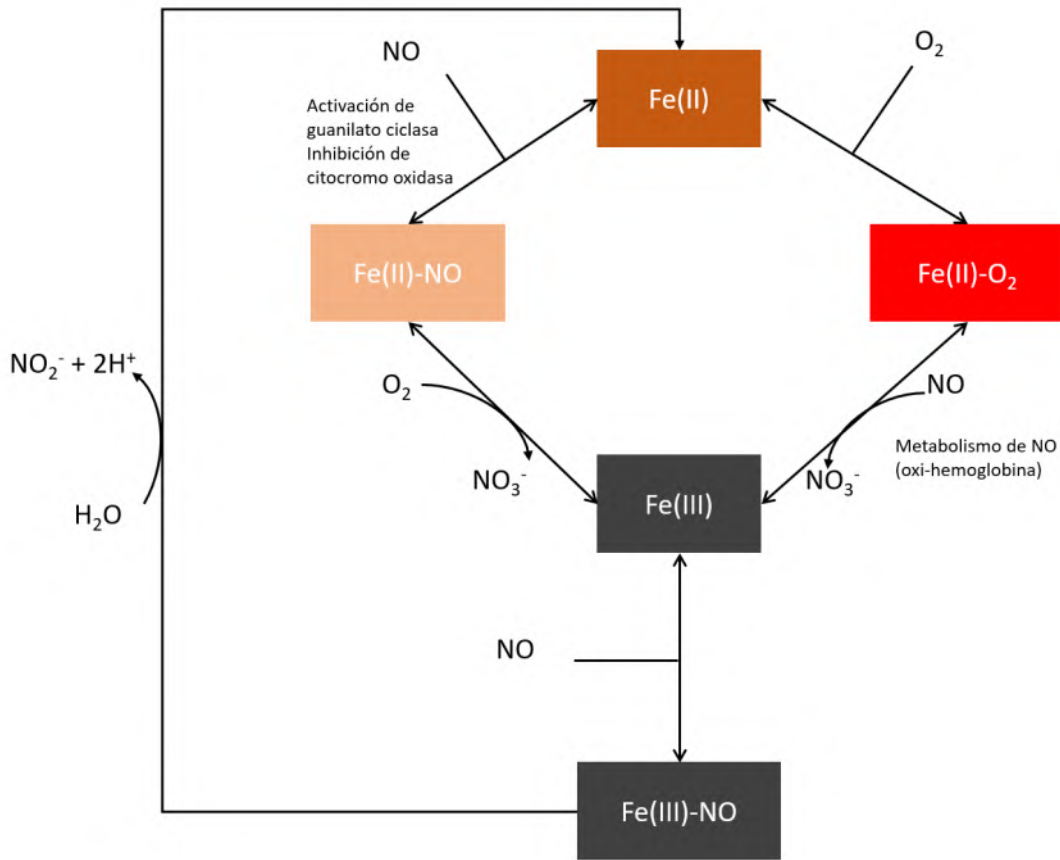
#### IV.4. Lixiviación de $Fe^{2+}$

Los organismos vivos requieren hierro para llevar a cabo procesos esenciales para la vida [137]. La wustita ( $FeO$ ), una estructura de hierro que se forma fácilmente al entrar en contacto con el oxígeno cambiando la valencia del hierro a iones  $Fe^{2+}$ , los cuales son solubles en agua, es de fácil absorción por los organismos [138] a diferencia de la magnetita ( $Fe_3O_4$ ), la cual tiene en su estructura iones  $Fe^{3+}$  insolubles en agua tanto como iones  $Fe^{2+}$ . Los seres vivos, a lo largo de la evolución y el tiempo, han adquirido una variedad de métodos para utilizar el hierro para una

aplicación biológica, como la hemoglobina. Ciertos microorganismos, las levaduras por ejemplo, utilizan mecanismos para transformar los iones de hierro férrico insoluble ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en formas de hierro ferroso soluble ( $\text{Fe}^{2+}$ ) [47]. Los humanos y otros organismos superiores tienen contrapartes análogas para estos mecanismos que se pueden encontrar en estos organismos unicelulares. El cuerpo absorbe el hierro mediante la transferrina, transformándolo en ferritina que se almacena en el hígado y corazón; una vez absorbido, el cuerpo no tiene otra forma fisiológica de desechar el hierro almacenado en exceso más que la producción de hemoglobina tras la pérdida de sangre [139].

La lixiviación de hierro es un fenómeno en el que los materiales que lo contienen liberan iones en un medio circundante a través de reacciones químicas [46]. Este proceso suele implicar la disolución del hierro en un entorno líquido. Un ejemplo común de lixiviación es la corrosión del hierro o el acero cuando se exponen al oxígeno y la humedad, lo que da como resultado la formación de óxido de hierro.

El hierro ferroso puede unirse reversiblemente por NO (**Figura 14**) [133], [140]. Es posible comparar la unión del NO con la del CO y el  $\text{O}_2$  dadas sus propiedades paramagnéticas similares por la presencia de oxígeno; su tamaño, carga (neutral) e hidrofobicidad son similares, lo que indica un acceso similar a las reservas de hierro celular, ya sea que estas últimas sean de bajo peso molecular o estén unidas a proteínas. Es probable que el  $\text{O}_2$  (y en menor medida el CO) esté presente en concentraciones más altas que el NO en la mayoría de las situaciones *in vivo* y, como resultado, teóricamente podría competir por los sitios de unión del NO en el hierro ferroso.



**Figura 14.-** Descripción general de las interacciones del óxido nítrico y el hierro con las reacciones biológicamente más relevantes en las que podría intervenir [133], [140].

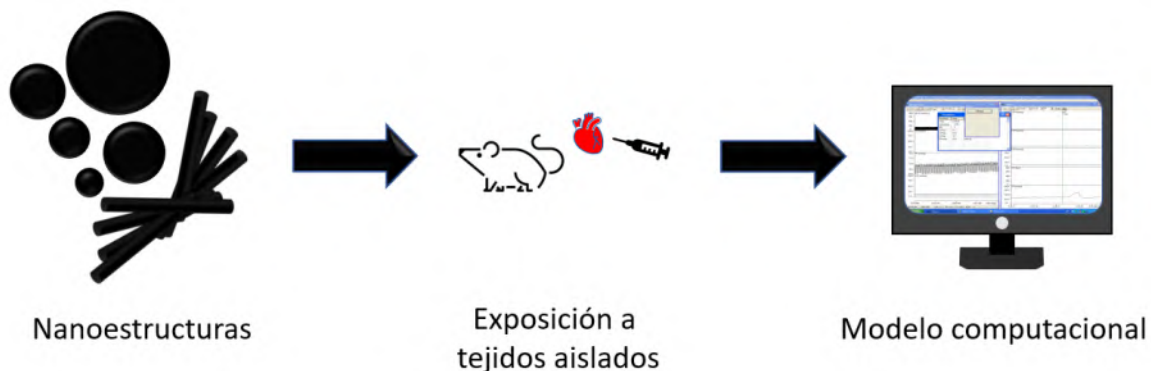
Además, a diferencia del CO, la unión reversible simple no suele ser la única interacción observada, ya que una vez unidos, las características paramagnéticas del NO y el O<sub>2</sub> añaden electrones desapareados al sistema. El hierro ferroso puede unirse de manera reversible al CO, NO y O<sub>2</sub>. La unión de oxígeno no es persistente porque el metabolismo del oxígeno del hierro ferroso en la mayoría de las proteínas es más rápido que los iones en solución, siendo la excepción las proteínas transportadoras de oxígeno, como la hemoglobina y la mioglobina, que forman uniones persistentes de O<sub>2</sub> con tasas de concentración cuantificables.

Sin embargo, no está claro si estas respuestas ocurren *in vivo* y, de ser así, qué importancia tienen, ya que no existe dentro de la célula un mecanismo de lixiviación localizado, como una nanopartícula [140]. Dada la composición química ambigua

de las reservas de hierro de bajo peso molecular en las células, es difícil realizar investigaciones pertinentes.

#### IV.5. Modelos estadísticos

El uso de animales de experimentación para la evaluación del impacto que de distintas sustancias y materiales de uso cotidiano (pesticidas, cosméticos, principios activos, etc.) pueden ocasionar sobre el cuerpo, es un requisito en la mayoría de los procesos de aprobación para ser liberados al mercado [141]. Sin embargo, los numerosos datos que arrojan los diferentes ensayos biológicos pueden ser difíciles de interpretar por el número de características y variables a analizar (**Figura 15**), que con el desarrollo e implementación de la computación ha sido posible relacionar cuestiones tanto biológicas, como físicas, químicas, etc. [142]. Desde entonces, los análisis en computadora han sido de gran ayuda para determinar, junto con los análisis prácticos, diversos aspectos de los efectos sobre tejido vivo, como los pulmones [143], células cancerígenas [144] y escáneres MRI [145].



*Figura 15.- El uso de animales en los análisis toxicológicos puede ser mitigado utilizando modelos predictivos. Imagen propia.*

Cuando el número de características (o variables observadas),  $p$ , es igual o mayor que el número de observaciones (o puntos de datos),  $n$ , se dice que los datos son de alta dimensión [146]. Un número cada vez mayor de áreas de la ciencia se ocupan de datos de alta dimensión debido al desarrollo de nuevas herramientas automatizadas de recopilación de datos. Un número creciente de conjuntos de datos



tienen muchas características; algunos tienen tantas características como filas en el conjunto de datos, por lo que visualizar conjuntos de datos con muchas funciones puede resultar un desafío. Trazar la variable de respuesta frente a cada uno de los pocos factores explicativos disponibles al examinar conjuntos de datos de baja dimensión puede ayudar a determinar cuáles de ellos son predictores de respuesta significativos [147].

Los datos con muchas dimensiones pueden simplificarse mediante el uso del análisis de componentes principales (PCA), al proyectar cada muestra sobre el primer componente principal, podemos reducir la dimensionalidad de nuestros perfiles de expresión bidimensionales a una dimensión. En esta representación unidimensional de los datos, las muestras todavía están separadas según el estado de las variables a evaluar. El patrón normalizado se denomina frecuentemente gen propio. La proyección de los datos sobre un componente principal puede entenderse como un patrón de expresión similar a un gen entre muestras. Por lo tanto, PCA encuentra un patrón similar a un gen correspondiente con la misma variación en los datos que el componente similar a una muestra para cada componente similar a una muestra [148], [149]. Esto se logra condensando los datos en menos dimensiones que sirven como resúmenes de sus características. Los datos de alta dimensión se encuentran con frecuencia en biología y son el resultado de la medición de varias características, como la expresión de numerosos genes, para cada muestra [149]. Al probar cada característica para conectarla con un resultado, este tipo de datos ofrece una serie de dificultades que PCA mitiga, incluido el costo de procesamiento y una mayor tasa de error debido a la corrección de múltiples pruebas. PCA es una técnica de aprendizaje que identifica patrones sin tener en cuenta los orígenes de las muestras en varios grupos de tratamiento o variaciones fenotípicas.

PCA obtiene una mínima cantidad de componentes principales (CP) para proyectar datos geoméricamente en dimensiones menores para revelar la mejor manera de resumir los datos. Para reducir la distancia total entre los datos y su proyección en el CP, se selecciona el CP inicial. La proyección se representa con puntos en dos dimensiones proyectados en líneas de una dimensión a lo largo de un camino

perpendicular a la línea (círculo sólido) (**Figura 16a**). La varianza de los puntos proyectados,  $\sigma^2$ , se optimiza cuando disminuye esta distancia a la trayectoria de cada recta sobre los puntos. Como ejemplo,  $\sigma^2$  para los puntos pronosticados puede ser alto para  $u$  o bajo para  $v$ . (**Figura 16b**). La correlación ( $r^2$ ) se maximiza como resultado del procedimiento de selección de CP. PC1 es la línea  $u$  desde **Figura 16a** y maximiza la proyección de  $\sigma^2$ . Siempre perpendicular a PC1 es el segundo PC, denominado PC2 (**Figura 16c**).

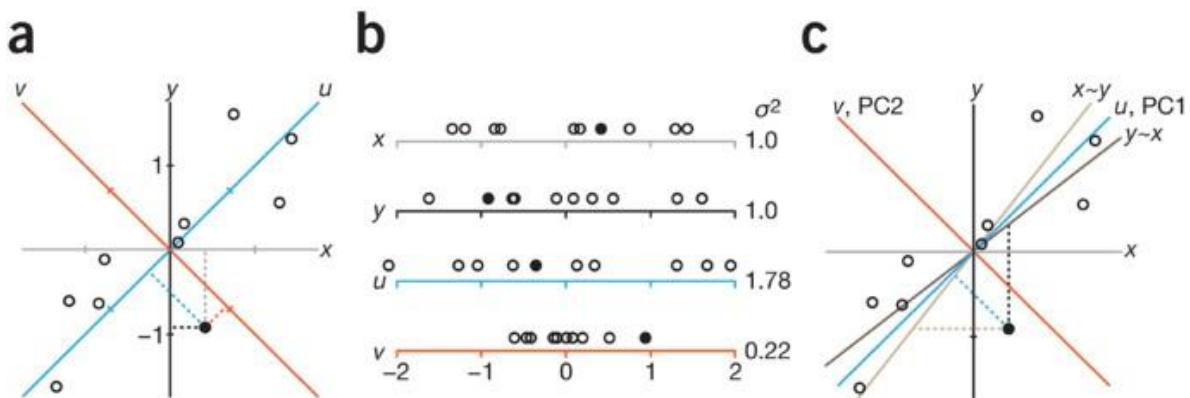


Figura 16.- Representación gráfica de la proyección de componentes principales [150].

# **CAPITULO V**

## **Hipótesis y objetivos**

## V. Hipótesis y Objetivos

### Hipótesis

La alimentación del modelo estadístico con los valores de las diferentes variables (daño en tejido, aumento de óxido nítrico y presión de perfusión), que caracterizan los efectos adversos a nivel histológico y fisiológico observables en tejido vascular expuesto a las MNP permitirá obtener parámetros de seguridad mediante la relación de la propiedad y el efecto a partir de la técnica de perfusión retrograda de corazón de roedor Langendorff y el sistema de anillos aislados de aorta.

### Objetivo General

Relacionar los efectos fisiológicos adversos que se generan en el tejido vascular expuesto a las MNP con sus diferentes propiedades mediante la técnica de perfusión de corazón de Langendorff y fisiógrafo de tejidos aislados de anillos aórticos.

### Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar los diferentes materiales  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$  y  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$  bajo diferentes condiciones de temperatura ( $120^\circ\text{C}$ ,  $160^\circ\text{C}$  y  $200^\circ\text{C}$ ) para la obtención de morfologías y calidad cristalina.
- 2) Caracterizar fisicoquímicamente mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de electrónica de transmisión (TEM), potencial Zeta  $\zeta$ , sensibilidad magnética a 500mT y 1000mT y difracción de rayos X (XRD) de los diferentes materiales  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$  y  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .
- 3) Evaluar los tejidos vasculares, midiendo cambios en la tensión (g) como índice del tono vascular, expuestos a concentraciones (0.001, 0.01, 0.1 y  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) de los diferentes materiales  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$  y  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .
- 4) Elaborar un modelo estadístico en el software R con los valores obtenidos de tono vascular para obtener la contribución de los efectos de los diferentes materiales  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$  y  $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ .

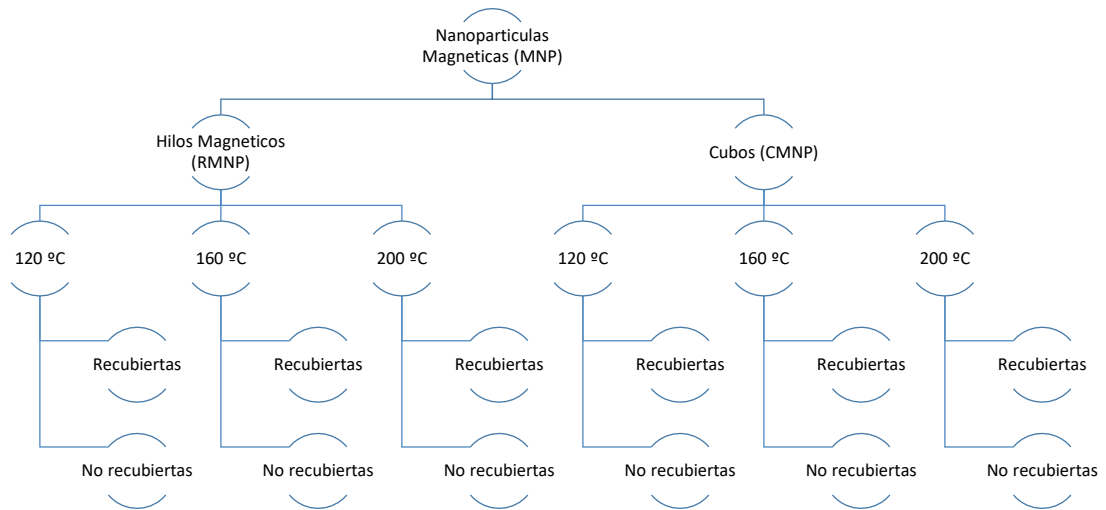
# CAPITULO VI

## Metodología

## VI. Metodología

### VI.1. Síntesis de los Materiales

Se eligieron dos diferentes morfologías (amorfos e hilos), sometidas a tres diferentes tratamientos térmicos de 4 horas (120, 160 y 200 °C) y posteriormente se recubrieron de silicio mediante el método de Stöber, quedando la relación de materiales como se presenta en la **Figura 17**



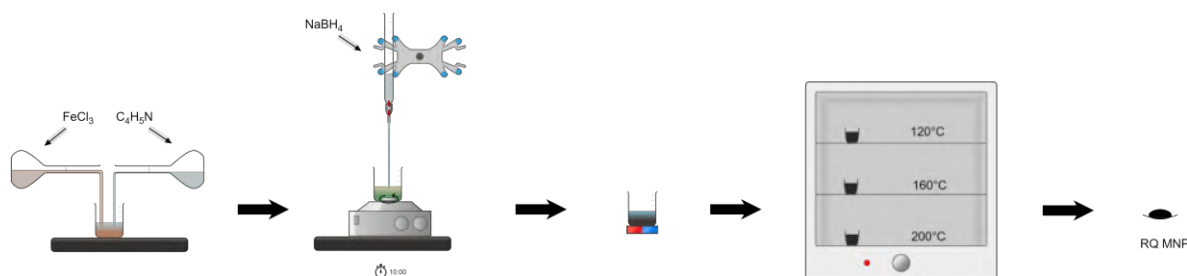
*Figura 17.- Diagrama representativo de las diferentes MNP sintetizadas.*

#### VI.1.1. Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$ en forma de hilos mediante reducción química (RQ):

Se elaboraron las soluciones de 0,27 g de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) y 0,55 g de pirrol ( $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$ ) en 20 mL de agua desionizada por separado y mezclados posteriormente para formar la solución A. La solución cambia de color de amarillo a naranja.

Por separado, se prepara 0,75 g de  $\text{NaBH}_4$  en 10 mL de agua desionizada (solución B). Seguido de la adición de la solución "B" en "A" con agitación magnética vigorosa [151].

Una vez completada la combinación de ambas soluciones, se procedió a los diferentes tratamientos térmicos (120, 160 y 200 °C) por 4 horas (**Figura 18**).

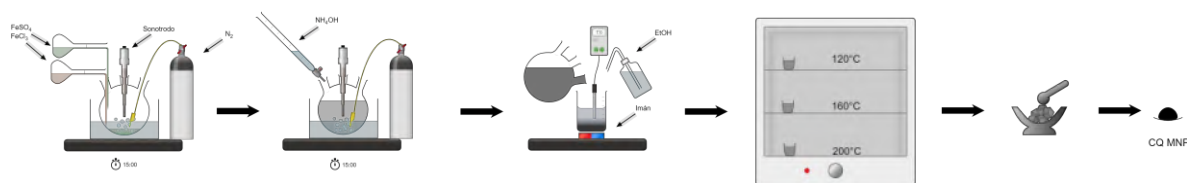


**Figura 18.-** Síntesis de nano hilos magnéticas mediante reducción química.

### VI.1.2. Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\text{2O4}$ amorfas coprecipitación química (CQ):

Se prepararon soluciones precursoras de cloruro férrico y sulfato ferroso por separado en una relación 1:1.75 Fe. Posteriormente, se mezclaron en un baño ultrasónico BRANSON 1510 con condiciones operativas de 47 kHz durante 15 minutos en presencia de una atmósfera inerte ( $\text{N}_2$ ). Después de este tiempo, se agregaron 10 ml de una solución de hidróxido de amoníaco 30% v/v a la mezcla con goteo controlado durante otros 15 minutos en las mismas condiciones sonoquímicas descritas anteriormente. Después de la etapa sonoquímica, se llevó a cabo la neutralización mediante lavados con etanol [61].

Una vez completada la neutralización, se procedió a los diferentes tratamientos térmicos (120, 160 y 200 °C) (**Figura 19**).



**Figura 19.-** Síntesis de nanopartículas amorfas mediante coprecipitación química.

### VI.1.3. Recubrimiento de las nanopartículas con silicio

Una vez obtenidas las nanopartículas se recubrieron mediante el método de Stöber:

Se preparó una solución de etanol, agua y las MNP, asistida por sonicación en un baño BRANSON 1510 ultrasónico con condiciones de 47 kHz durante 15 minutos.

Se adicionó a la mezcla de MNP una solución de SiO<sub>2</sub> de TEOS suspendido en etanol al 2% wt con asistencia de sonicación por 15 minutos. Después se lavó con agua desionizada y secó en horno de convección por 12 horas a 50°C (Figura 20) [152].

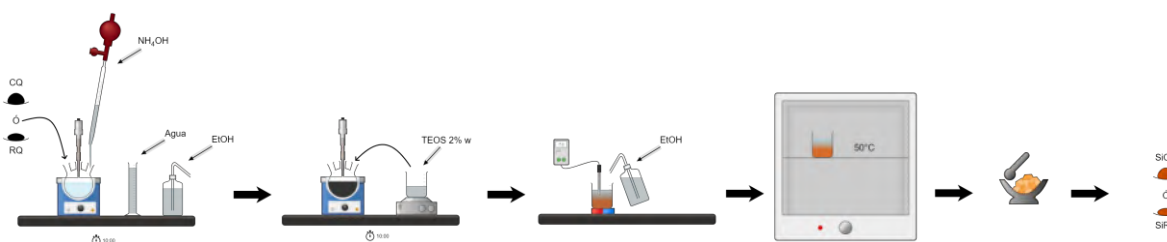


Figura 20.- Método Stöber para recubrimiento de nanopartículas de silicio.

### VI.2. Caracterización Físicoquímica

Se utilizó un microscopio JOEL JEM 2000FX para realizar la microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de transmisión (TEM) para determinar la morfología de las MNP. ZETASIZER ULTRA MADLS se utilizó para determinar la estabilidad de la partícula utilizando el potencial de Zeta (PZ). Un medidor de susceptibilidad magnética BARTINGTON MS2 y un medidor de susceptibilidad magnética MICROMAG 2900 se utilizaron para obtener la susceptibilidad magnética. Se utilizó un difractómetro BRÜKER D8 ADVANCE con condiciones de radiación de CuK<sub>α</sub> con longitud de onda  $\lambda = 0.15405$  nm en el rango de  $2\theta$  de 10-100° para la difracción de rayos X (XRD) en polvo fino.



### **VI.3. Abordajes Biológicos**

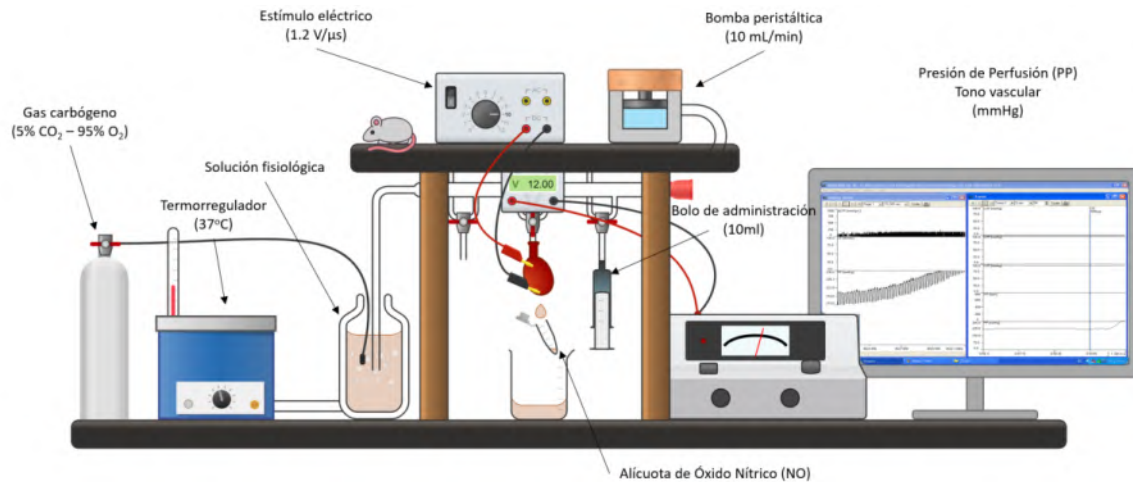
#### **VI.3.1. Unidades Experimentales**

Se alojaron dos ratas macho cepa Wistar en cada jaula bajo un ritmo circadiano de 12 horas de luz -12 horas de oscuridad, comida y agua suministradas *at libitum* manteniendo el peso de las ratas entre 250-300 g.

Al alcanzar el peso adecuado, se sacrificaron por resección del corazón al administrar pentobarbital sódico (50 mgkg<sup>-1</sup>, intraperitoneal) para alcanzar la sedación profunda como lo especifica la normatividad mexicana NOM-062-ZOO-1999 conforme a lo establecido en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud [153] y el conocimiento y aprobación del consejo de posgrado y bioética de la Universidad Autónoma de Querétaro (Núm. Registro: 004-2019 CEAIFI-196-2018-TP); así como el comité de ética de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (CONBIOTETICA-24-CEI-20190726). La disposición del corazón y la aorta para ser evaluados a través de la prueba de corazón aislado y perfundido de roedor (técnica de Langendorff) y anillos aislados.

#### **VI.3.2. Técnica de Langendorff (Corazón perfundido de roedor)**

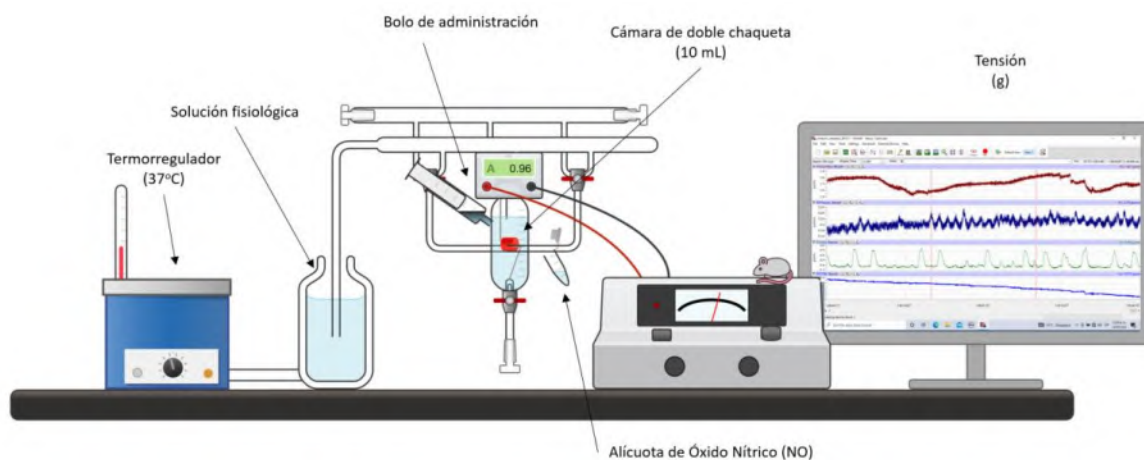
La perfusión de corazón de roedor *ex vivo*, observada en la **Figura 21** se realizó con una velocidad de flujo constante a 10 mLmin<sup>-1</sup> [123], [154]. El corazón fue extripado y transferido con ayuda de la solución fisiológica o de Krebs a 4°C preparada conforme al **Anexo A.1** para ser canalizado de manera retrograda (en la aorta) al equipo Langendorff donde se lavó con solución de Krebs calentada previamente a 37°C en flujo y burbujeo constante de Carbógeno (5% de dióxido de carbono y 95% de oxígeno). Se obtuvo en la PP en tiempo real a medida que el corazón se perfundía con la ayuda del transductor isométrico del equipo en la cánula aórtica como medida del índice de tono vascular de los vasos coronarios. Dos electrodos posicionados en la aurícula derecha y la punta del ápice se mantuvo la frecuencia a 4.5 latidos por segundo. El software ISOHEART Harvard Apparatus (Holliston, MA, EE. UU.) fue utilizado para la captura y posterior análisis de los datos.



**Figura 21.-** Esquema del equipo Langendorff de corazón de roedor.

### VI.3.3. Preparación anillos aislados de aorta de rata

Se seccionaron transversalmente segmentos de 3 a 4 mm de aorta, los cuales se colocaron en una caja de Petri con solución fisiológica con la siguiente composición (mM): NaCl 118, KCl 2.68, KCl 4.7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.8, dextrosa 10.01 y HEPES 20 (**Anexo A.2**) ajustados a un pH 7.4. Los anillos individuales se montaron en cámaras con solución fisiológica a  $37^\circ\text{C}$  acoplados a transductores de fuerza Grass (**Figura 22**). Posterior al acoplamiento de los anillos de íleon y después de un periodo de estabilización de 1 hora, se procedió a realizar la administración de los tratamientos.

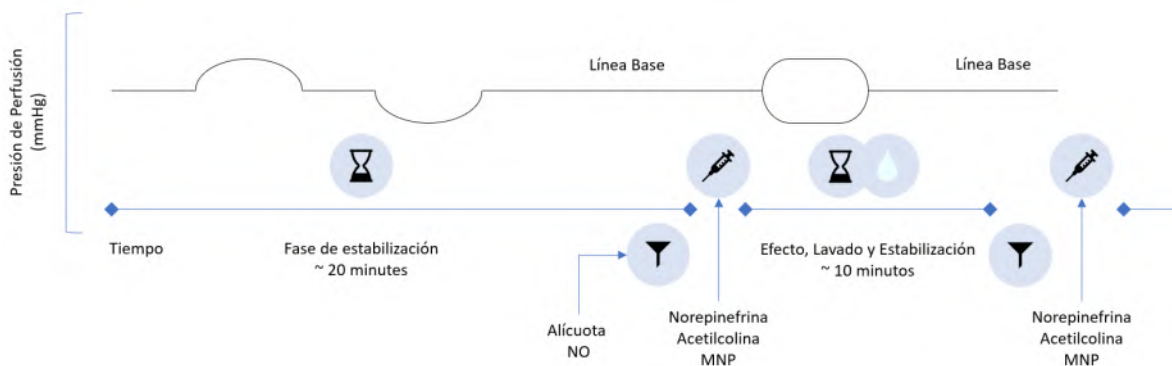


**Figura 22.-** Esquema del equipo de anillos aislados de aorta.

### VI.3.4. Tratamientos

#### Corazón aislado y perfundido de roedor o técnica de Langendorff

Previo a la administración de las concentraciones crecientes de MNP sometidas a análisis (1, 10, 100, 1000 mgmL<sup>-1</sup>), el corazón se estabilizó por 20 min. Después del tiempo de estabilización, se perfundieron Fenilefrina (Phe) y Acetilcolina (ACh) ambas en concentración 10µM al inicio y final de cada prueba para fungir como controles de los efectos contráctil y vasodilatador, respectivamente (**Anexo A.3**) [155] para asegurar el correcto funcionamiento del corazón. Se analizaron las concentraciones (1, 10, 100, 1000 mgmL<sup>-1</sup>) administradas en una jeringa en el flujo (bolo) a 10ml en un intervalo de un minuto, para seguir con el flujo de la bomba peristáltica. El efecto de las MNP se interpretó en tiempo real por los valores obtenidos del transductor isométrico en forma del PP (mmHg) como relación del tono vascular (**Figura 23**).



**Figura 23.-** Representación de los ciclos y eventos del registro obtenido del equipo Langendorff.

#### Anillos aislados de aorta

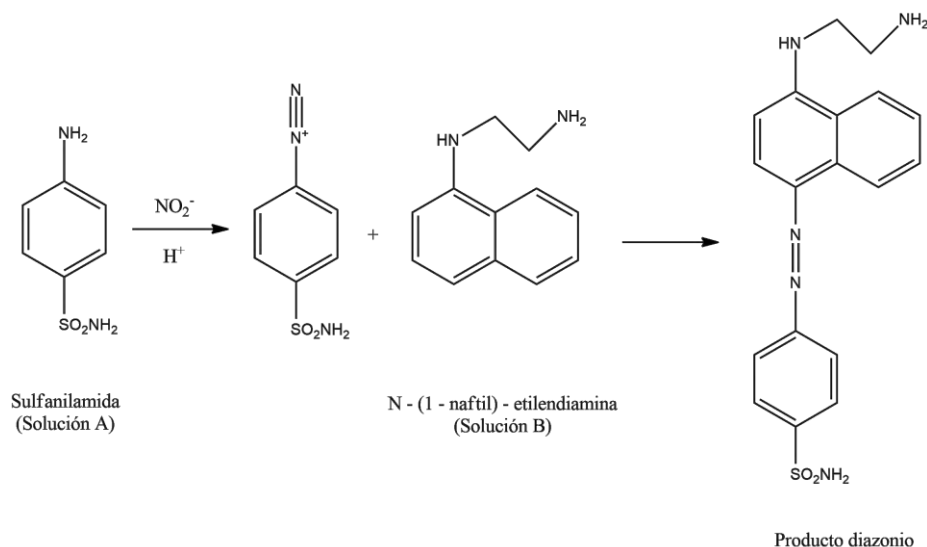
Se administraron los tratamientos de acuerdo con el protocolo de corazones aislados, siguiendo las mismas concentraciones para poder equipararlo como un bolo de administración en torrente sanguíneo 1, 10, 100 y 1000 µgmL<sup>-1</sup>.

Se administraron, como primer acercamiento, una concentración de 2 µM de Phe para verificar la viabilidad y funcionalidad del tejido, una vez alcanzada la

contracción óptima se expone la aorta en presencia de concentraciones crecientes y acumulativas de MNPs 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , de cada uno se administraron 10  $\mu\text{l}$  de una solución stock para el volumen final de 10 ml de solución fisiológica contenida en la cámara. Cada concentración promovía un efecto en el tejido, el cual se dejaba estabilizar de 10 a 15 minutos; una vez concluido el tiempo de efecto, se continuaba con la siguiente administración creciente. Al final, se administraron 2  $\mu\text{M}$  de ACh, se dejaba producir la máxima relajación, y se tomaba la última alícuota de NO.

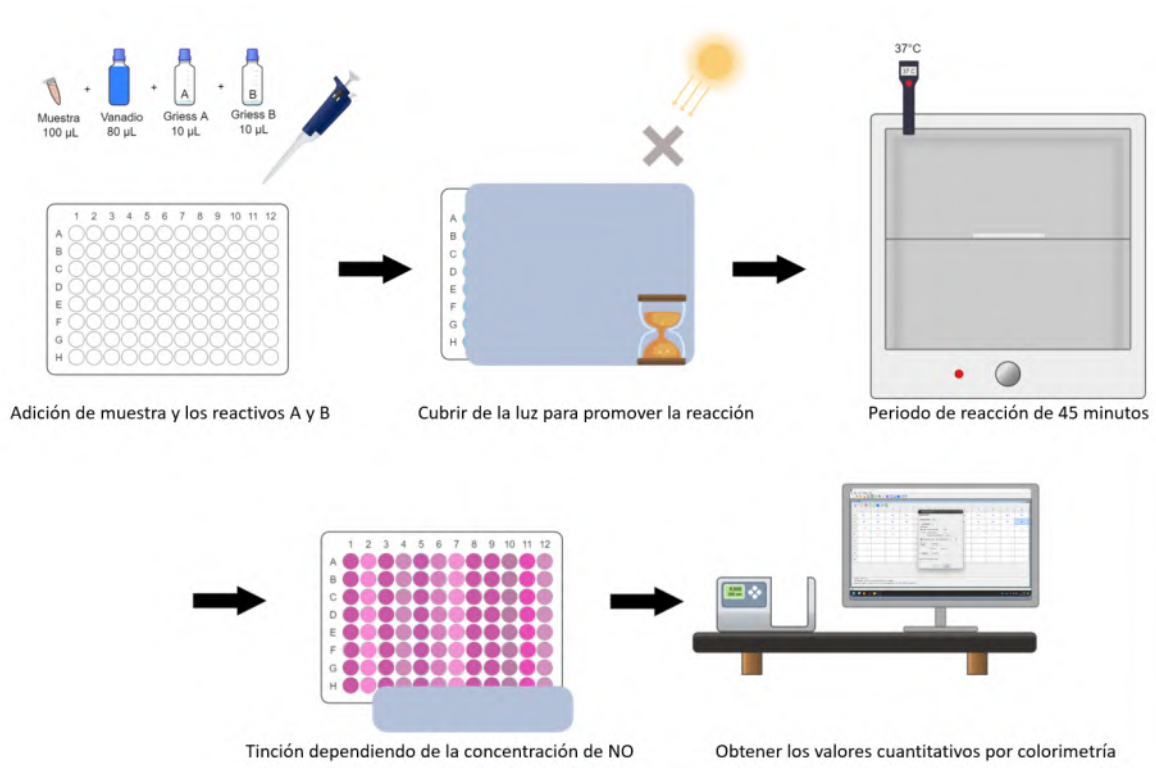
### VI.3.5. Cuantificación de Óxido Nítrico (NO)

La cuantificación indirecta de óxido nítrico (NO) se obtuvo mediante la formación de cuerpos nítricos (nitratos ( $\text{NO}_3$ ), nitritos ( $\text{NO}_2$ ) al interactuar con un cromóforo (producto diazonio) obtenido de la diazotación de sulfanilamida de los cuerpos nítricos (nitrito ácido) y el acoplamiento de N-[1-naftil]etilendiamina (aminas bicíclicas) [156], conocido comúnmente como método de Griess (**Figura 24**).



**Figura 24.-** Reacción de Griess.

Una vez concluida la reacción en ausencia de luz, se obtuvo la concentración mediante colorimetría en el espectrómetro marca iMark BIO RAD Microplate Reader a  $\lambda = 595\text{nm}$  y  $\lambda = 665\text{nm}$  (**Figura 25**) [157].



**Figura 25.-** Representación gráfica del método de Griess para determinación indirecta de óxido nítrico.

# **CAPITULO VII**

## **Resultados**

## VII. Resultados y Discusión

### VII.1. Caracterización Físicoquímica de las nanopartículas

Para realizar una correcta relación entre el efecto de las MNP y el tejido vascular se tomaron en cuenta seis criterios importantes de las nanopartículas obtenidos de las diferentes caracterizaciones físicoquímicas: tamaño, composición, carga, radio hidrodinámico, sensibilidad magnética y cristalinidad. Mientras que para determinar los efectos de las MNP en el tejido se tomaron las variables biológicas de concentración de óxido nítrico, tensión y presión de perfusión para posteriormente ser analizados en PCA y discernir la importancia que llevan estas propiedades de las nanopartículas con los efectos presentados en los tejidos del sistema vascular.

#### VII.1.1. Morfología, tamaño y composición (SEM, TEM, PZ)

Para obtener la morfología y composición de las MNP se realizaron los análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM).

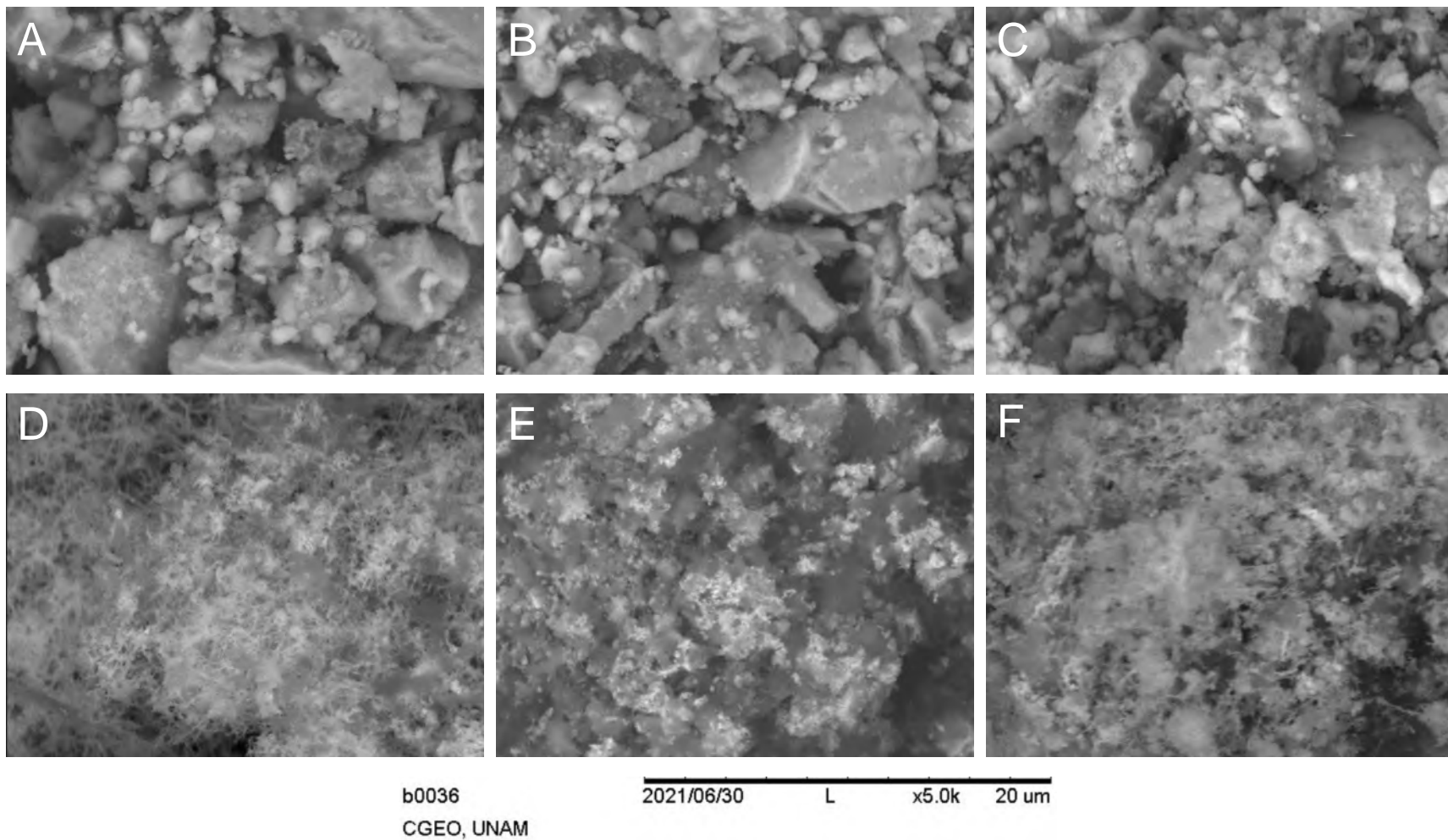
La **Figura 26** muestra las micrografías obtenidas del SEM de las partículas amorfas obtenidas mediante coprecipitación (CQMNP) y los hilos sintetizados mediante reducción química (RQMNP). Se puede observar el comportamiento característico de las MNP. Debido a sus propiedades magnéticas, las MNP forman grandes grupos y aglomeraciones, exhibiendo una dispersión deficiente. Si bien es posible ver nanopartículas dentro de estos grupos, no se afirma que las MNP tienen una forma definida, ya que la coprecipitación química requiere condiciones especializadas como el uso de surfactantes o el empleo de puntos calientes para obtener una morfología definida [158]. Aunque el tamaño de los agregados llega a medir 130 nm aproximadamente, se pueden apreciar pequeñas partículas formando estos agregados (**Figura 26A, 26B y 26C**) de alrededor de 20 nm. Las muestras RQMNP muestran una morfología parecida a una red de hilos de magnetita en aglomerados de hasta 5  $\mu\text{m}$  de largo (**Figura 26D, 26E y 26F**).

Las micrografías SEM se realizaron mediante electrones retrodispersados (BSE), llamado análisis de contraste Z (**Anexo 0**), los cuales son electrones que se reflejan después de las interacciones elásticas entre el haz y la muestra. Por el contrario,

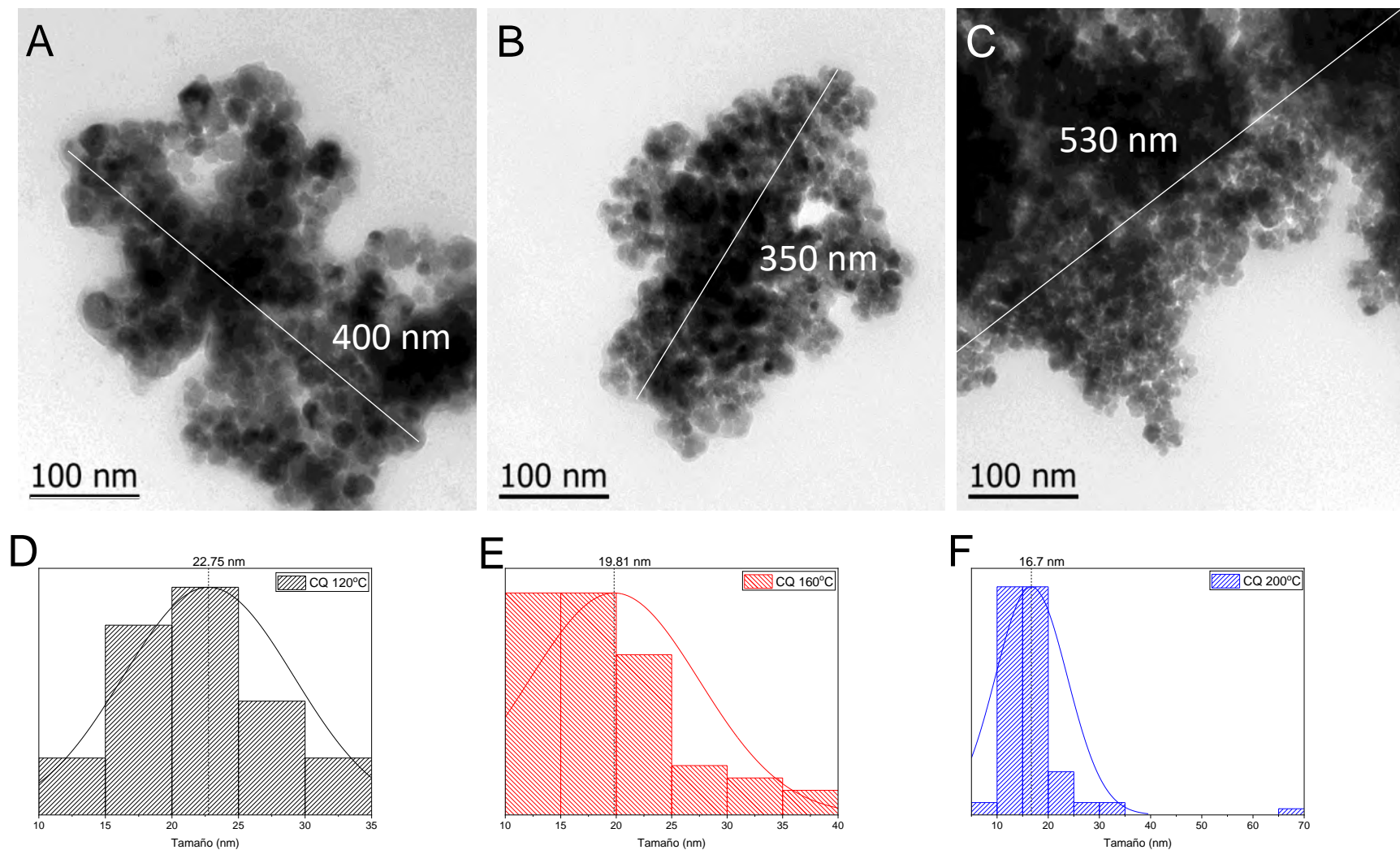
los electrones secundarios (SE) se originan a partir de los átomos de la muestra; son el resultado de interacciones inelásticas entre el haz de electrones y la muestra; con esto, podemos inferir que las zonas de mayor intensidad lumínica son átomos de mayor peso molecular, es decir el hierro en este material, mientras que las zonas con menos intensidad son átomos de menor peso molecular, es decir el oxígeno [159]. Se puede observar que el oxígeno ocupa mayormente la superficie de los materiales CQMNP salvo en las esquinas (**Figura 26A, 26B y 26C**), mientras que en los hilos hay más presencia de hierro en la superficie (**Figura 26D, 26E y 26F**). Esto puede deberse a la forma en la que está creciendo el material, dado que en la coprecipitación química la síntesis se da de forma libre, en medio acuoso, mientras que en la reducción química el pirrol actúa de molde, podemos inferir que el material crece en el plano (4 4 0).

Se analizaron también las micrografías obtenidas de TEM para obtener el tamaño promedio aproximado de las partículas amorfas CQMNP y el ancho y largo de los hilos RQMNP. Las micrografías mostraron tamaños promedio de partícula de 22.75, 19.81 y 16.7 nm, formando aglomerados de 400, 350 y 530 nm para las CQMNP a 120, 160 y 200 °C respectivamente, obtenidos con el programa de medición de pixeles *ImageJ Image Software Analyzer* de las micrografías resultantes de TEM (**Figura 28**).

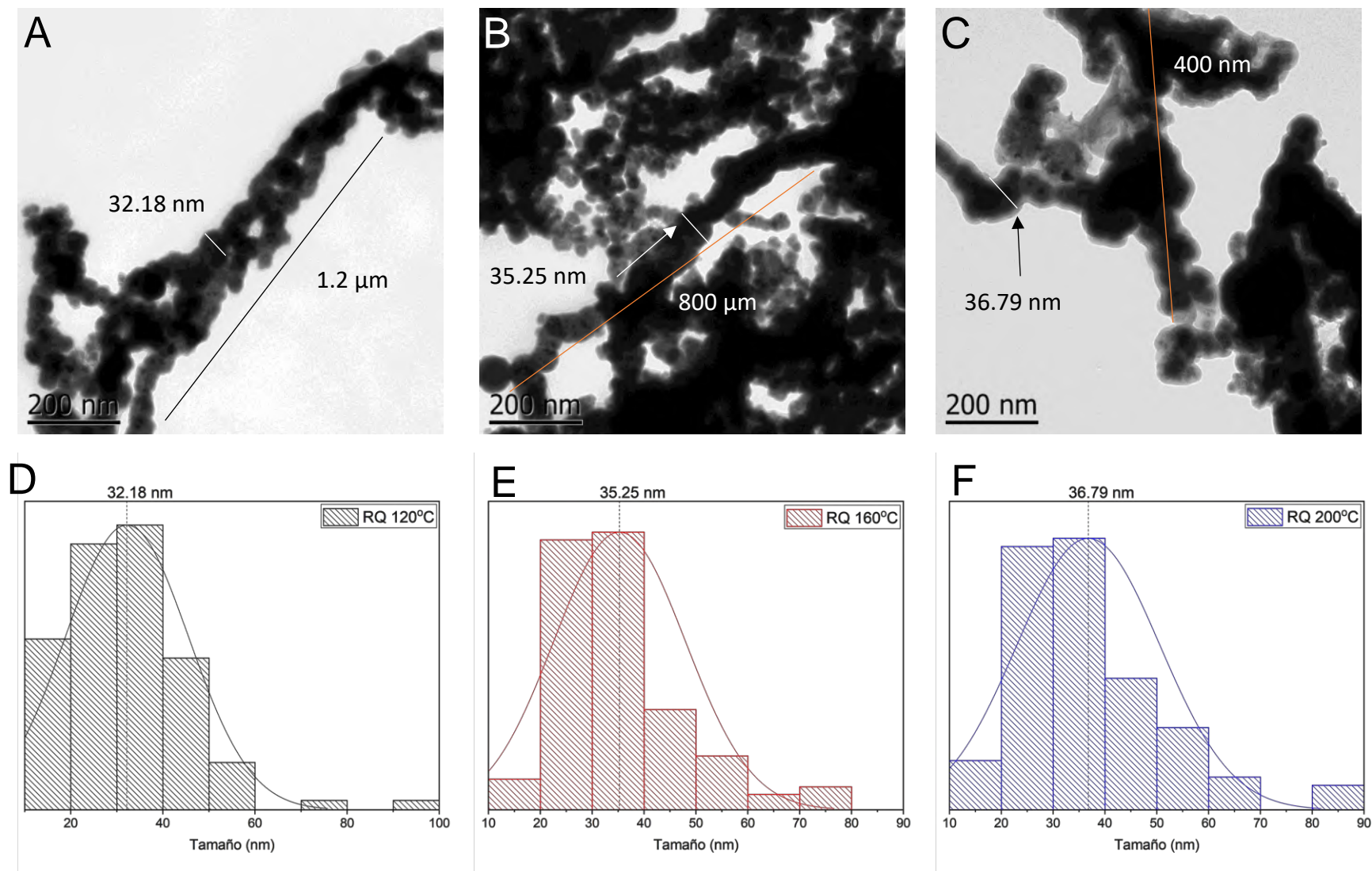




**Figura 26.-** Micrografías SEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante coprecipitación química (CQ) a (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (amorfos) y reducción química (RQ) a (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C.



**Figura 27.-** Micrografías TEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante coprecipitación química (CQ) a (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (amorfos) y sus respectivos tamaños (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C.



**Figura 28.-** Micrografías TEM de las MNP sin recubrir. Nanopartículas sintetizadas mediante reducción química (RQ) a (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C (hilos) y sus respectivos tamaños (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C.

### VII.1.2. Carga y radio hidrodinámico (PZ)

La carga superficial y el tamaño en solución o radio hidrodinámico fue obtenido mediante la técnica de *potencial Z* en la solución fisiológica o solución de Krebs, utilizada para llevar a cabo la evaluación biológica de las MNP (**Anexo A.5**).

La inestabilidad intrínseca que presentan las MNP en el rango de tamaño nanométrico, se manifiesta de dos formas principales:

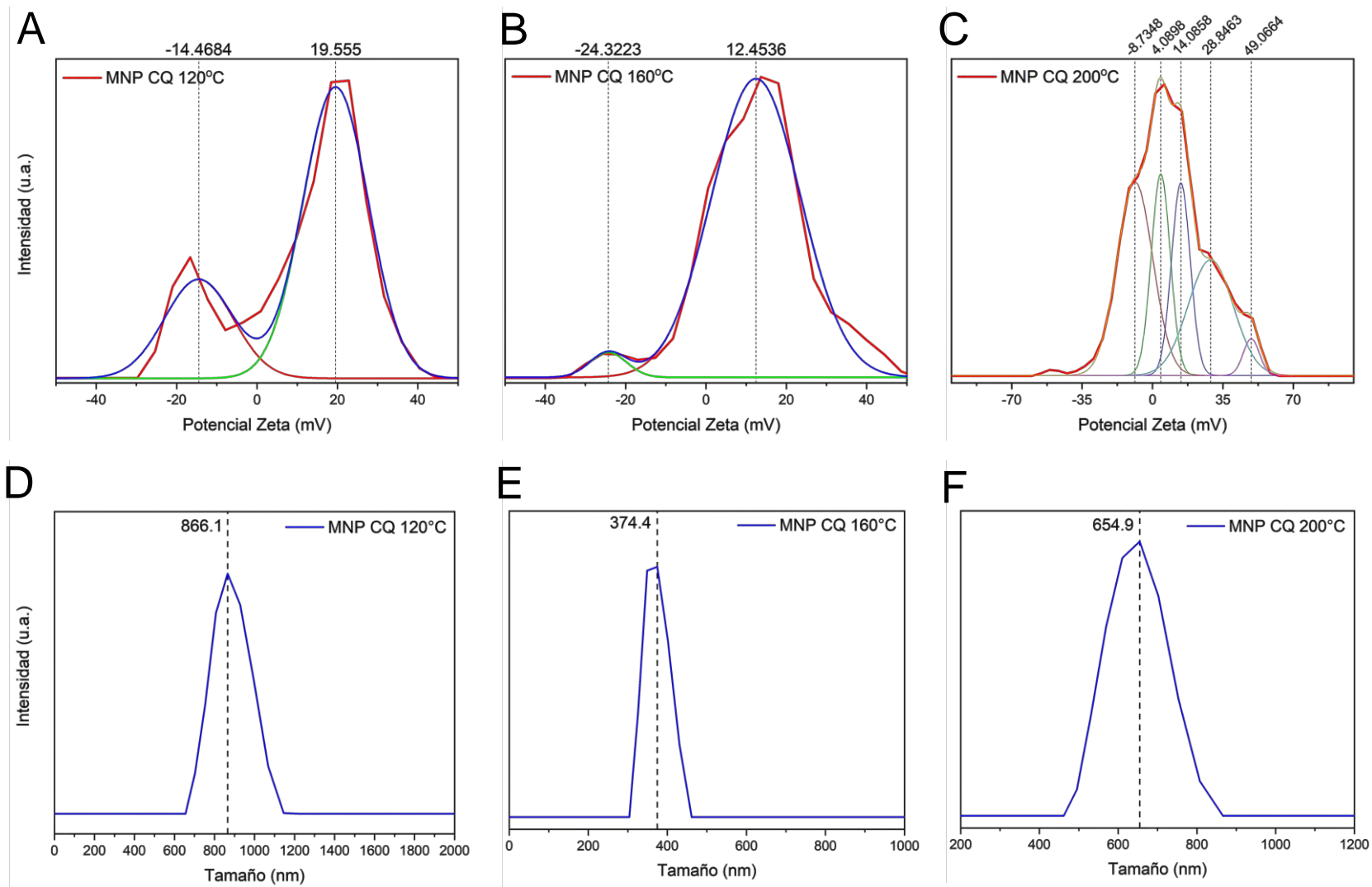
- Alta polidispersión, donde los NP pequeños tienden a agregarse y formar partículas grandes para reducir la energía superficial [160].
- Pérdida de magnetismo, donde las MNP desnudos se oxidan fácilmente en el aire debido a su alta actividad química, especialmente la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) es un problema inevitable asociado con estos materiales durante períodos largos [161].

La lectura de las MNP se llevó a cabo concentraciones relativamente altas debido a la presencia de su campo magnético con un valor aproximado entre 40 y 100  $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$  de susceptibilidad magnética ( $M_s$ ) en una solución de concentración  $0.001 \text{ mgmL}^{-1}$ . Al analizar los potenciales de las MNPs, se observa una alta polidispersidad, esperada en las MNPs, con valores de carga superficial negativo y positivo en las MNP amorfas CQ. Esto puede deberse a la presencia de iones de sales en la solución de Krebs utilizada en el análisis ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , glucosa y piruvato). Al ser partículas negativamente cargadas naturalmente, con valores reportados de alrededor de -15 a -20 mV [162], las MNP atraen iones cargados positivamente [163] lo cual podría explicar el comportamiento polipotencial de las partículas (**Figura 29A, 29B y 29C**). Podemos corroborarlo en los potenciales de las partículas recubiertas, donde este fenómeno desaparece a pesar de ser partículas negativas también. Tienen poca estabilidad coloidal dado que se encuentran en el umbral de  $\pm 30 \text{ mV}$  [164], [165], siendo las más estables entre las MNP sintetizadas con el tratamiento térmico de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ .

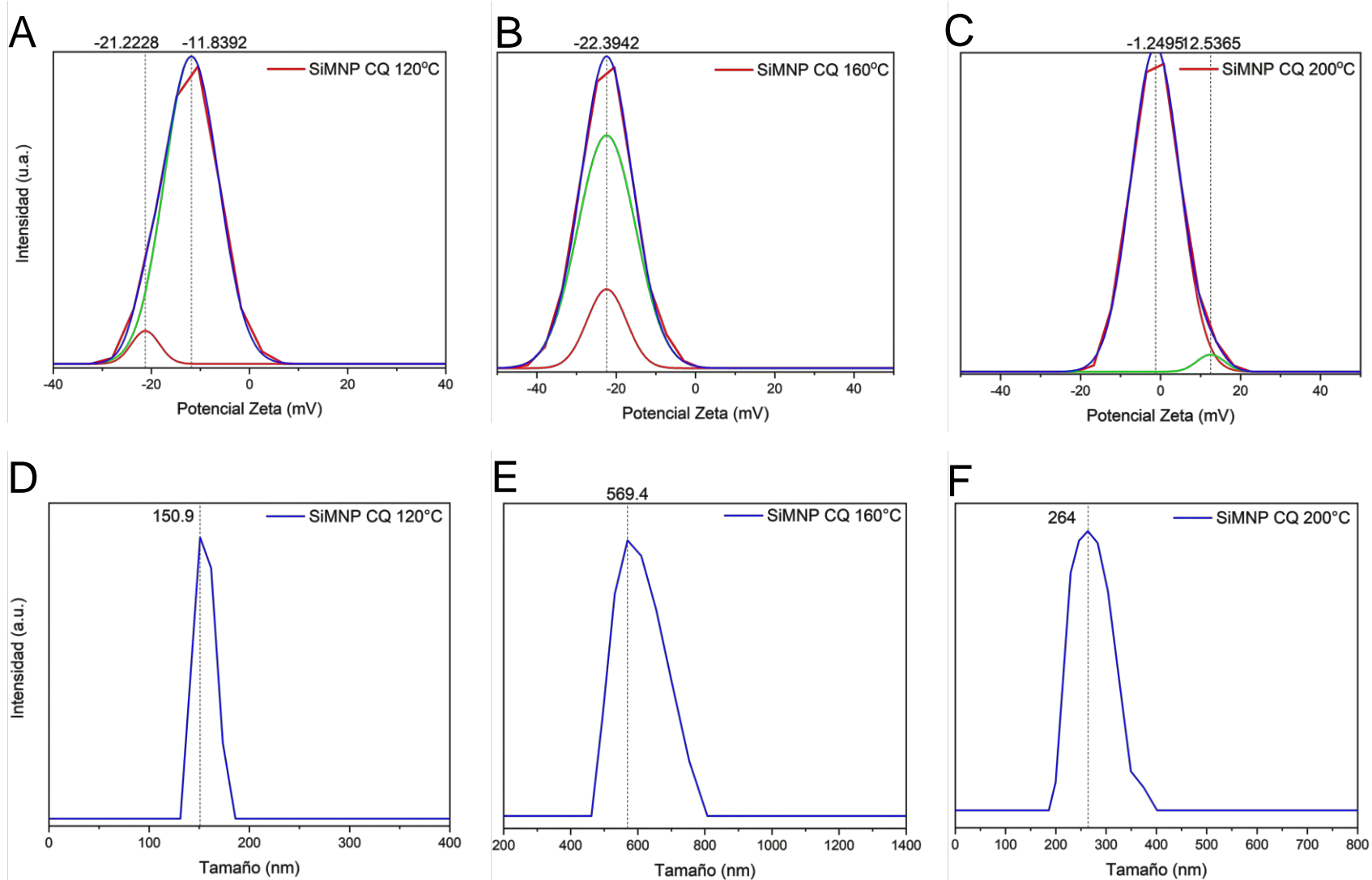
Se observó un tamaño de partículas de alrededor de 866.1, 374.4 y 654.9 nm para las MNP de temperaturas 120, 160 y  $200^\circ\text{C}$  de las partículas amorfas CQ (**Figura 29D, 29E y 29F**). Estos valores son esperados debido a su naturaleza magnética y tamaño de las partículas individuales vistas en TEM.

Una vez recubiertas las partículas amorfas como se observa en TEM los polipotenciales que se presentaban en las partículas amorfas desnudas se concentraron en un solo potencial, negativo para todas las temperaturas con valores de -11.84, -22.39 y -1.24 mV para las temperaturas de 120, 160 y 200°C respectivamente (**Figura 30A, 30B y 30C**). Esto es debido a que la interacción con los iones se vuelve más débil cuando el campo magnético es recubierto con una capa externa de material dieléctrico como el silicio [75]. Aunque el potencial es más definido y centrado en un solo punto, las partículas siguen siendo inestables en solución dado que se encuentran dentro del umbral de  $\pm 30$  mV. Esto puede indicar un recubrimiento exitoso mediante el método de Stöber. La dispersión previa a la que se someten las partículas antes de añadir la solución de TEOS a la reacción pudiera evitar la aglomeración y así recubriéndolas en tamaños más pequeños que los que presentan las partículas sin recubrir, agrupadas por su comportamiento magnético, reduciendo su tamaño.





**Figura 29.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de las partículas amorfas CQ.



**Figura 30.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de las partículas amorfas recubiertas SiMNP CQ.

Un comportamiento similar de aglomeración se puede observar en los análisis de los hilos magnéticos RQ; sin embargo, los hilos magnéticos presentan menor sensibilidad magnética, alrededor de  $40 \text{ Am}^2\text{kg}^{-1}$ , y su morfología en forma de red les permite tener una menor aglomeración [61]. Similar a las partículas amorfas CQ, la carga se mantiene en valores negativos, pero con curvas de potencial más definidas, lo que infiere que la distribución de potencial del material en solución atraviesa el umbral de estabilidad, haciéndolas más estables que los hilos magnéticos RQ con una sensibilidad magnética menor [163] obteniendo valores de 2.7, -36.2 y -31.9 mV para las temperaturas de 120, 160 y 200 °C, respectivamente; así también, el tamaño de los arreglos se ve afectado por el arreglo en red de los hilos magnéticos, arrojando valores de 169.9, 374.4 y 161.8 nm para las temperaturas de 120, 160 y 200 °C, respectivamente.

Los hilos magnéticos RQ, a pesar de tener una apariencia intrincada en SEM, se observa que en TEM tienen una separación mayor que los aglomerados en las partículas amorfas CQ, y comparando los tamaños de las dos morfologías (**Tabla 2**), se observa la tendencia de en la reducción de los aglomerados debido a la morfología y sensibilidad magnética.

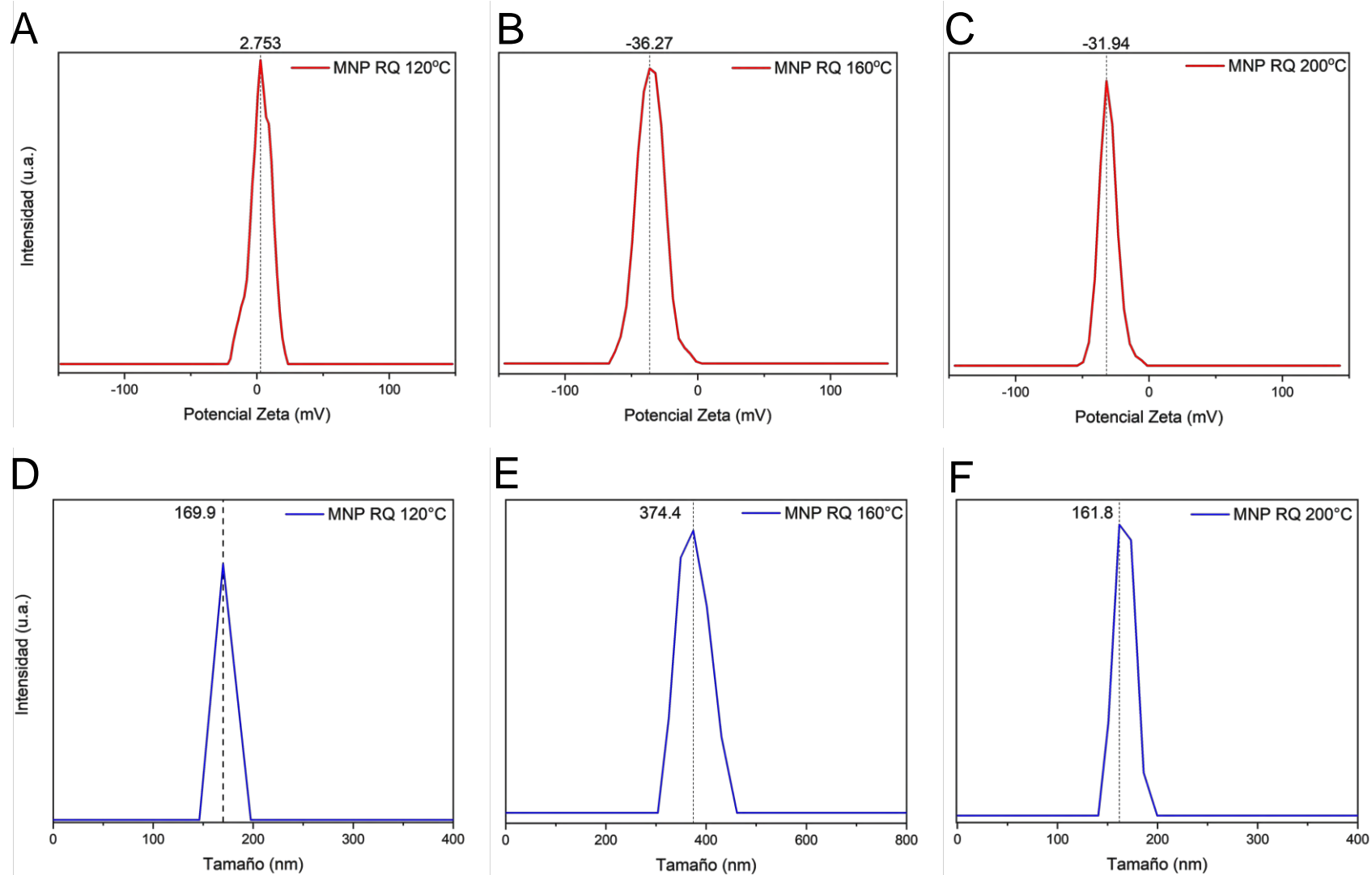
*Tabla 2.- Tamaños obtenidos mediante DLS en potencial Z de las MNP, amorfas e hilos.*

| Temperatura (°C) | CQ (radio hidrodinámico) | RQ (radio hidrodinámico) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| 120              | 866 nm                   | 169 nm                   |
| 160              | 374 nm                   | 374 nm                   |
| 200              | 654 nm                   | 161 nm                   |

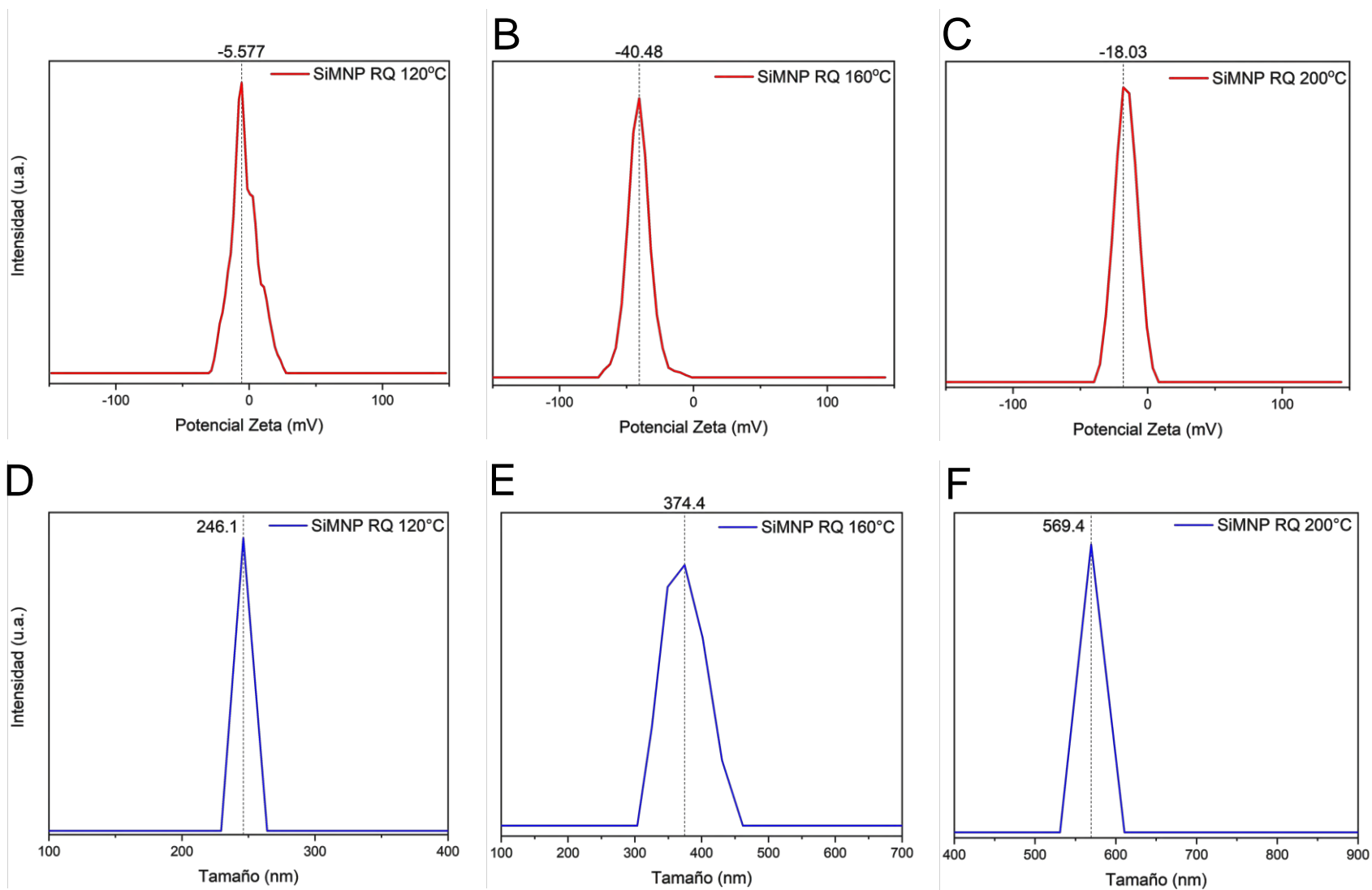
Una vez recubiertos, los hilos presentaron un incremento en el potencial para las temperaturas de 120 y 160°C, llegando a -5.5 y -40.4 mV respectivamente, mientras que para la temperatura de 200°C el potencial se redujo a -18 mV (**Figura 31A, 31B y 31C**). Con respecto al tamaño, se incrementaron los valores a 264nm para la condición de calcinado de 120°C, el tamaño para la temperatura de 160°C se mantuvo en valores similares y los hilos de obtenidos en condiciones de 200°C



aumentaron su tamaño alrededor de 4 veces su valor sin recubrimiento de silicio, lo cual puede explicar la caída de estabilidad en solución.



**Figura 31.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de los hilos magnéticos RQ.



**Figura 32.-** Carga superficial de las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y radio hidrodinámico (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C de los hilos magnéticos recubiertos SiMNP RQ.

### VII.1.3. Sensibilidad magnética ( $M_s$ )

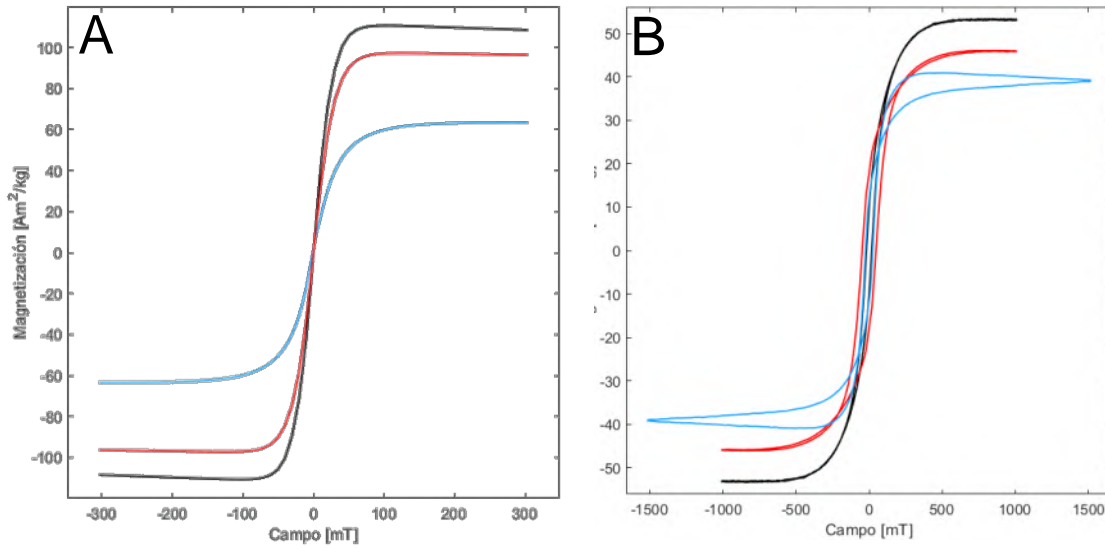
Para asegurar el comportamiento magnético del material se realizó la prueba de sensibilidad magnética mediante magnetometría suspendida.

Al modificar las condiciones de síntesis utilizando un sonotrodo en lugar de un baño ultrasónico y concentrado así los puntos calientes producidos durante la sonoquímica, se logró mejorar la sensibilidad magnética con lo reportado en la bibliografía [166].

La caracterización magnética de las MNP se registró en los de campos magnéticos  $B = 500$  y  $B = 1000$  mT para asegurar que se alcanzara la saturación de los materiales. Las curvas de magnetización de las partículas amorfas y los hilos magnéticos RQ.

Este análisis reveló que las muestras obtuvieron valores de saturación de magnetización ( $M_s$ ), en 105, 92 y 59  $\text{Am}^2\text{kg}^{-1}$  para las temperaturas de 120, 160 y 200 °C, respectivamente, con una aportación de aumento después de la saturación pudiendo atribuirse a la presencia de diferentes tamaños de partícula [166]. Este incremento en la magnetización se observa en la curva de histéresis de la **Figura 33**, previo a alcanzar el punto de saturación  $M_s$ , lo cual parece revelar la presencia de partículas superparamagnéticas más pequeñas [167].

Las curvas de histéresis muestran el comportamiento característico de los materiales superparamagnéticos, los cuales no presentan un ensanchamiento en la histéresis, lo que se puede interpretar como la falta de coercividad (medición de la capacidad de un material para soportar un campo magnético externo sin desmagnetizarse) [167]–[169]. La presencia de los dominios magnéticos individuales alineándose al campo magnético externo les da esa característica, que es de gran utilidad en las aplicaciones biomédicas en imagenología y teranóstica, ya que pueden cambiar súbitamente en modificaciones de campo magnético y proveer imágenes más claras [170].

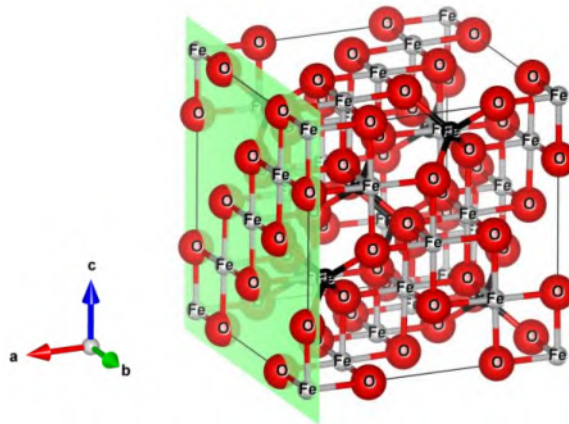


**Figura 33.-** Curvas de magnetización de histéresis magnética de las partículas amorfas CQ (A) e hilos magnéticos RQ (B).

#### VII.1.4. Cristalinidad

Para comprobar que el material tuviera la estructura correcta de la magnetita se llevaron a cabo análisis de difracción de rayos X (XRD).

Los difractogramas arrojaron una tensión e intensidad mayores en el plano cristalino (4 0 0), lo cual indica una compresión en la red cristalina y un aumento de presencia del plano, con lo que se puede inferir que los hilos están creciendo preferencialmente en el plano (4 0 0) (**Figura 34**).



**Figura 34.-** Estructura de la magnetita propuesta de crecimiento en la síntesis de reducción y coprecipitación química. Se observa una línea de hierro en el plano (1 1 1) donde pueden estar creciendo las partículas amorfas. Se marca el plano (4 4 0) como el plano

La fase cristalina de las nanopartículas se puede determinar observando dónde se ubican las reflexiones de Bragg en el patrón de difracción (**Figura 35 y 36**). El patrón de difracción de las MNP exhibe reflexiones en ángulos  $2\theta$  en  $30,2^\circ$ ,  $35,5^\circ$ ,  $43,2^\circ$ ,  $53,5^\circ$ ,  $57,1^\circ$  y  $62,9^\circ$ , que corresponden a la estructura espinela de la magnetita en los planos cristalinos (2 2 0), (3 1 1), (4 0 0), (4 2 2), (5 1 1) y (4 4 0), respectivamente, de acuerdo a la base de datos de estructuras cristalinas americana (AMCSD, código 0002400), siendo los más representativos los planos (3 1 1), que pueden deberse a la contribución de magnetita en las nanopartículas amorfas CQ (**Figura 35A**) y no otras estructuras de hierro [171], [172].

Las difracciones de Bragg que caracterizan una estructura tipo espinela de magnetita persistieron después de aplicar el tratamiento de Stöber (**Figura 35B**). Existe un ligero desplazamiento de las difracciones hacia la derecha en los planos (5 1 1) y (4 0 0) que pudiera indicar la tensión dentro de la estructura exhibe uniformemente dentro de la red cristalina [173] que fue calculada más adelante mediante el análisis de Williamson-Hall.

En la **Figura 36A** se muestran los hilos magnéticos que, por otra parte, perdieron la mayoría de los planos cristalinos de la magnetita y ganaron otros nuevos dentro de los ángulos  $2\theta$  de  $20^\circ$  y  $40^\circ$  que pueden indicar el cambio de estructura a wustita y goetita respectivamente [174].

Una vez que los hilos magnéticos RQ se recubrieron con silicio, las reflexiones de Bragg que aparecieron diferentes a los representativos de la magnetita en  $2\theta$  de  $20^\circ$  y  $40^\circ$ , lo que puede significar que esos planos se vieron reducidos al aplicar el recubrimiento (**Figura 36B**).

Ambos difractogramas (CQ y RQ) muestran una pobre presencia de calidad cristalina, dado que el “ruido” de los difractogramas (presente como la ausencia de la línea discontinua en la medición), lo cual es evidente debido a los tratamientos térmicos que, a la par de promover el crecimiento de la estructura cristalina debido al aumento en el tamaño de grano gracias a las altas temperaturas, también podría propiciar un ambiente que favorezca la oxidación [175], modificando la estructura espinela y eliminar las propiedades magnéticas.

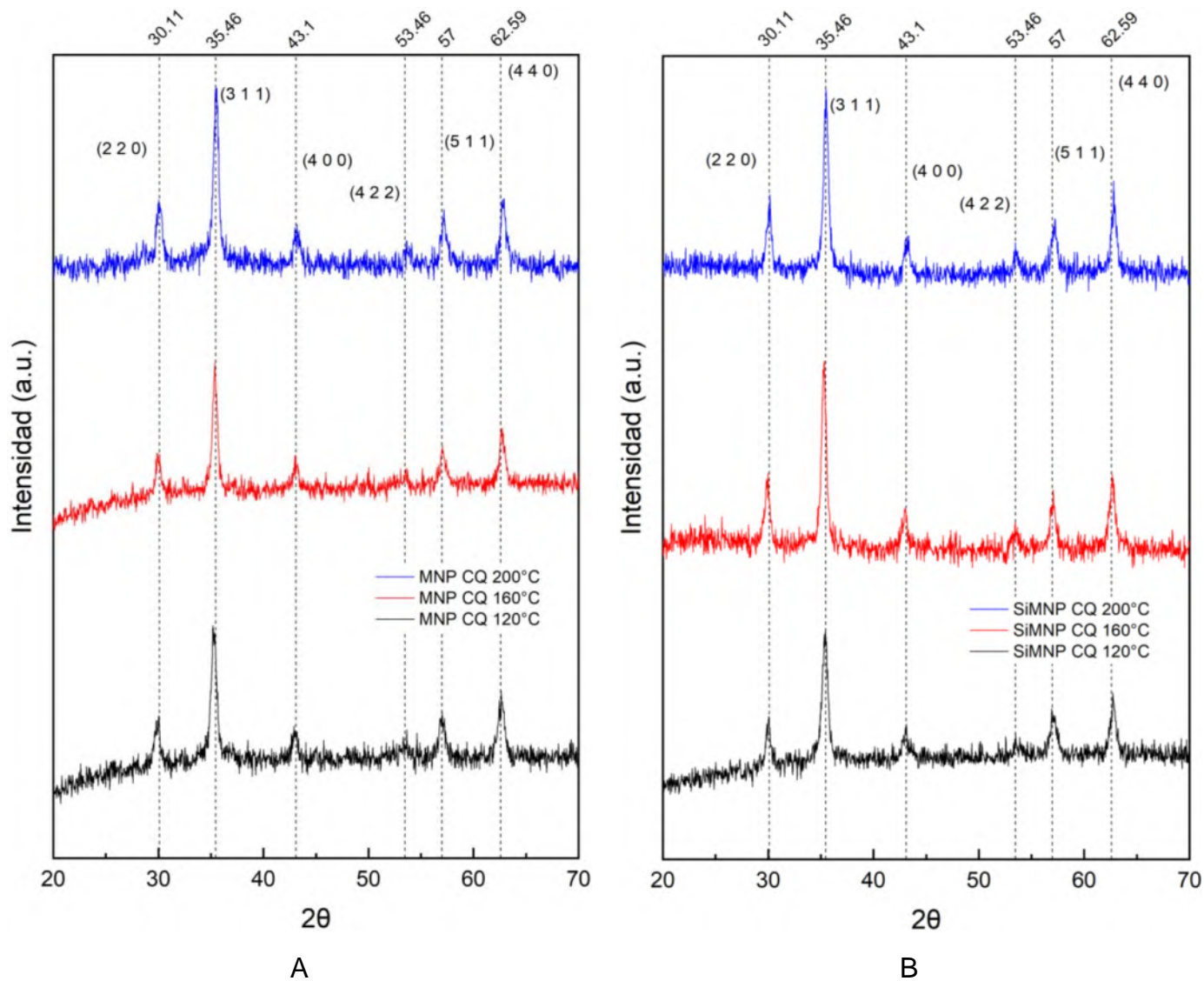


Figura 35.- Difractogramas de las partículas amorfas CQ (A) sin recubrir y (B) recubiertas de silicio.

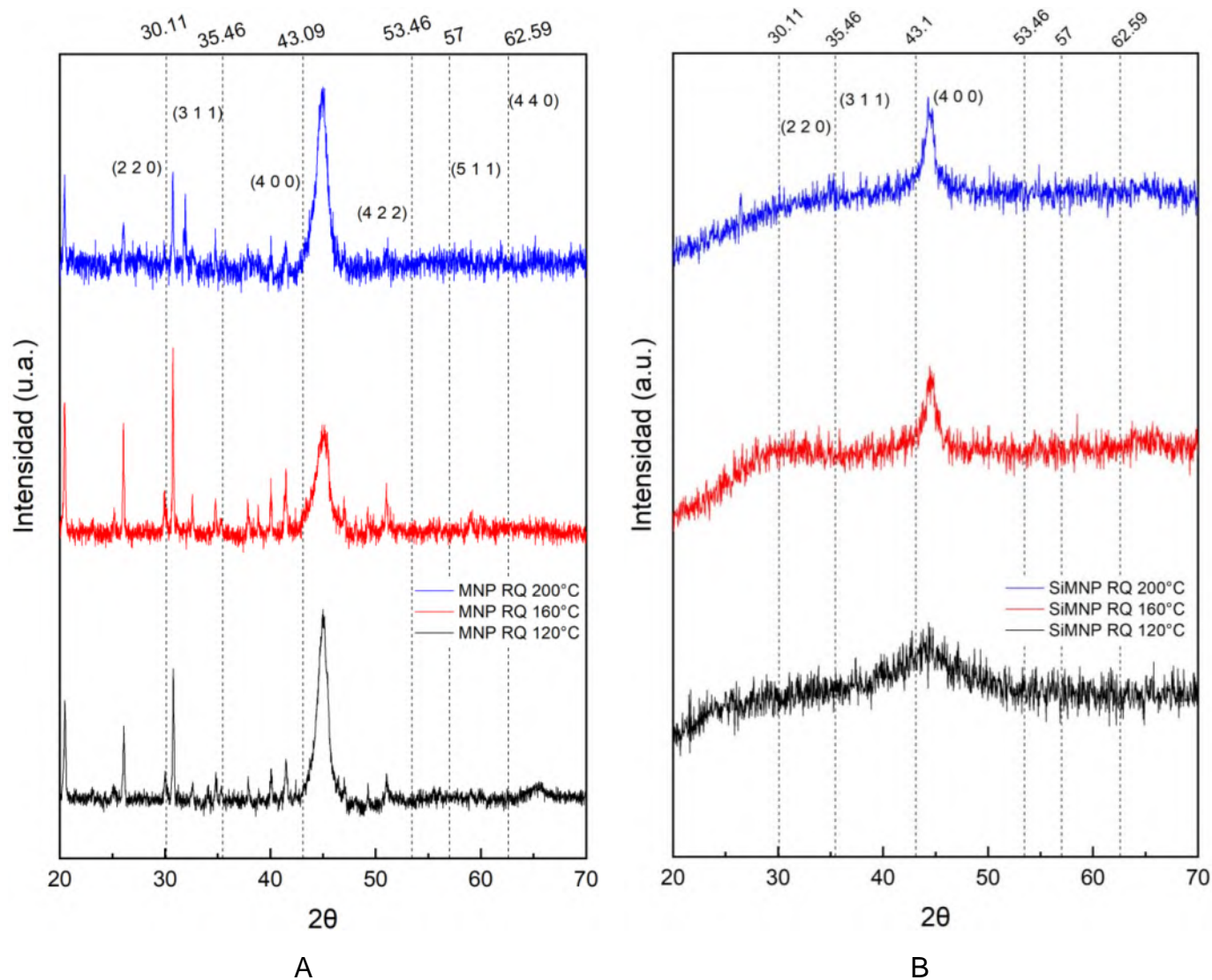


Figura 36.- Difractogramas de los hilos magnéticos RQ (A) sin recubrir y (B) recubiertas de silicio.



El tamaño del cristalito y la tensión se obtuvieron utilizando la determinación de Williamson - Hall (**ANEXO A.7**) de cada una de las difracciones presentes en los difractogramas. Dando como resultado los valores de la **Tabla 3**.

**Tabla 3.-** Valores de tamaño de cristalito y tensión obtenidos de los difractogramas de CQ y RQ mediante Williamson - Hall.

| Material        | Tamaño de cristalito<br>D (nm) | Tensión<br>$\epsilon \times 10^3$ |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>CQ 120°C</b> | 13.26                          | 0.101                             |
| <b>CQ 160°C</b> | 16.8                           | 0.501                             |
| <b>CQ 200°C</b> | 16.33                          | 0.586                             |
| <b>RQ 120°C</b> | 86.72                          | 6.096                             |
| <b>RQ 160°C</b> | 80.45                          | 1.615                             |
| <b>RQ 200°C</b> | 45.54                          | 0.822                             |

Los valores de tensión en la red se muestran más prominentes en los hilos magnéticos, lo cual puede indicar que la red está siendo presionada dada la restricción del pirrol, dándole el crecimiento preferencial en el plano cristalino (4 0 0) y su corrimiento hacia ángulos superiores [176].

Los tamaños de cristalito aumentan con la temperatura de 120°C a 160°C en las partículas amorfas CQ, lo cual es de esperarse ya que a mayor temperatura el tamaño de cristalito crece. Al llegar a los 200°C sin embargo, el cristalito disminuye 0.5 nm, que no es suficiente para ser significativo pero podría deberse a que la temperatura es demasiado alta y se expone el material a la oxidación, cambiando su estructura y su factor de empaquetamiento [177]. Sin embargo, en los hilos magnéticos el tamaño de cristal se reduce a partir de los 160°C, disminuyendo su tamaño a la mitad cuando se somete a 200°C. Cabe aclarar que en la literatura obtenida para la metodología de síntesis mediante pirrol no se utiliza ningún tratamiento térmico [151], pero se le dieron estos tratamientos para observar las variaciones en la estructura.

De los difractogramas se llevó a cabo el análisis cristalográfico denominado refinamiento Rietveld (utilizando mínimos cuadrados para refinar un difractograma

teórico hasta que coincida con el perfil del difractograma obtenido, **Anexo A.7.3)** para obtener su porcentaje en fase y recreación de acomodo interno (**Figura 37**).

La **Tabla 4** contiene los valores de las fases obtenidas de los refinamientos Rietveld de las partículas amorfas CQ. Se puede observar que para todos los materiales la estructura de la magnetita es mayoritaria, arriba del 60%, donde la cantidad de magnetita disminuye con la temperatura, lo cual es esperado ya que la estructura se somete a un ambiente que propicia la oxidación cuando se aumenta la temperatura cuando no se encuentra en una atmosfera inerte [178], formando la creación de fases como la magnesita, lo que puede deberse a una contaminación dentro del ambiente de calcinado o bien, la magnesita presenta reflexiones de Bragg similares a la maghemita que aparecen al ser calcinado a 200°C (AMCD, código 0000099) [48].

**Tabla 4.-** Porcentajes de las diferentes fases obtenidas de los refinamientos Rietveld de las partículas amorfas CQ.

| Muestra      | Fase      | Wt%  | $\chi^2$ | GoF  |
|--------------|-----------|------|----------|------|
| <b>CQ120</b> | Maghemita | 1.21 | 1.52     | 1.23 |
|              | Magnetita | 97.2 |          |      |
|              | Wustita   | 0.63 |          |      |
|              | Goetita   | 0.98 |          |      |
| <b>CQ160</b> | Maghemita | 1.19 | 1.26     | 1.12 |
|              | Goetita   | 0    |          |      |
|              | Magnetita | 97.2 |          |      |
|              | Wustita   | 0.68 |          |      |
| <b>CQ200</b> | Hematita  | 0    | 1.20     | 1.10 |
|              | Maghemita | 1.53 |          |      |
|              | Magnetita | 69.3 |          |      |
|              | Wustita   | 1.26 |          |      |
|              | Magnesita | 28.8 |          |      |

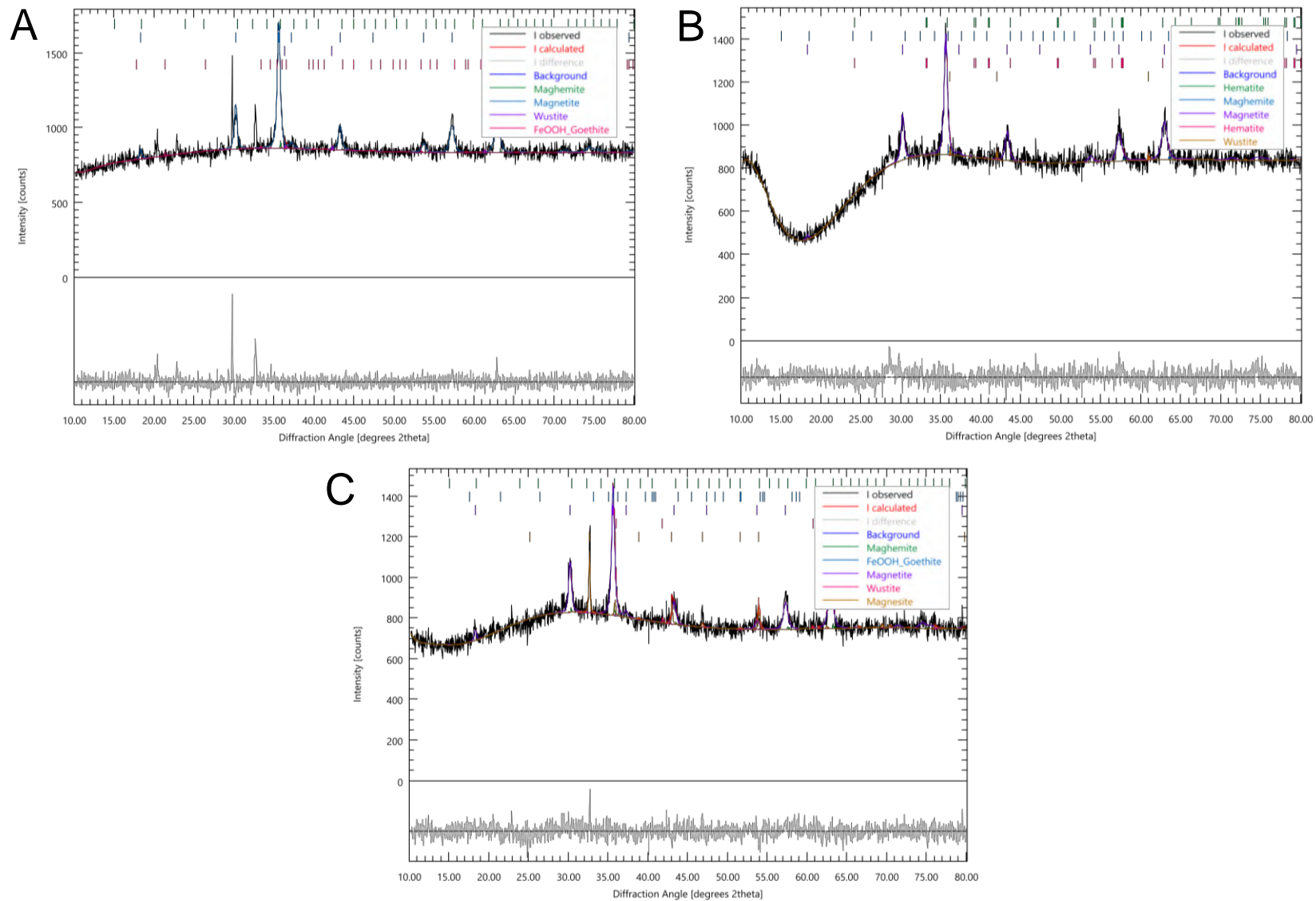


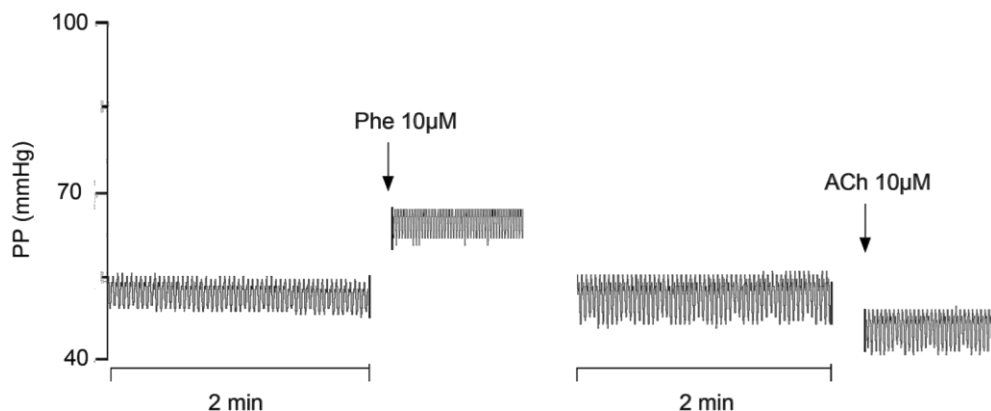
Figura 37.- Refinamientos Rietveld de las partículas amorfas CQ a (A) 120°C, (B) 160°C y (C) 200°C.

## VII.2. Pruebas Biológicas

El efecto biológico a nivel cardiovascular inducido por de las MNP se ha publicado anteriormente en el grupo de investigación a diferentes condiciones a las presentadas en el presente trabajo, diferente grado de cristalinidad y morfología. Condiciones que promovieron perfiles fisiológicos a nivel cardiovascular asociados con valores elevados de presión de perfusión (PP) y elevadas concentraciones de óxido nítrico (NO) [179]. Para identificar las propiedades que provocan este comportamiento se siguió el mismo protocolo para diferenciar los efectos de morfología, cristalinidad, tamaño, carga, magnetismo, composición de superficie y radio hidrodinámico y así identificar y relacionar la propiedad con el efecto fisiológico y el NO como mediador de este.

Dado que cada corazón funge como su propio control, a cada uno se le administró su propio control previo a administrar los materiales magnéticos para garantizar que cada uno de estos respondiera adecuadamente a estos controles, denominados sustancias vasoactivas, fenilefrina (Phe) como control de respuesta contráctil (identificada como un aumento en la PP) y acetilcolina (ACh) como control de respuesta relajante (identificada como un aumento en la PP) (**Figura 38**). El enfoque de Langendorff, que se obtuvo, establece que antes de que comience la administración de reactivación, se le da al corazón un intervalo de estabilidad de 20 minutos para lograr una PP constante o de referencia y se siguió el protocolo descrito en la sección de metodología (**Sección VI.3.2, Figura 23**).

Una vez transcurrido el tiempo de estabilización, se introdujeron las sustancias vasoactivas control a cada corazón; Después de eso, se da un período de efecto y lavado de 10 minutos para observar el efecto de las sustancias control; así como para cada administración en concentraciones crecientes de los tratamientos de MNP, con diez minutos de efecto entre ellos. En el corazón, la ACh disminuyó la PP, pero Phe tuvo un efecto estimulante como se ve por un aumento en PP.



**Figura 38.-** Registros característicos de las sustancias control. Fenilefrina (Phe) como control contráctil y acetilcolina (ACh) como control relajante.

### VII.2.1. Evaluación de las MNP en corazón aislado y perfundido de rata

Las MNP produjeron un efecto contráctil a partir de la primera administración de las partículas amorfas CQ con la menor concentración en el rango de 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 39**), manteniendo el efecto contráctil con un incremento sustancial en la PP, aproximadamente 130, 110 y 100 para las temperaturas de 120 °C, 160°C y 200°C, respectivamente. Las partículas amorfas CQ bajo las tres condiciones de temperatura promovieron un incremento mayor de la PP, alrededor de 30 mmHg en la administración de 10 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 39A**). Este efecto puede deberse a la aglomeración que este tipo de MNP desnudas presentan, ya que al incrementar la concentración de las partículas con cada administración, pudieran aumentar de tamaño [180].

Asimismo, se observó un incremento de tamaño en el corazón como resultado de las administraciones consecutivas de las MNP. Aunque la posibilidad de un infarto no se descarta, los registros se mantuvieron en el efecto sostenido hasta el final del experimento, alrededor de dos horas, y el corazón no presentó signos que indicaran un infarto (rompimiento de capilares), dado que las partículas amorfas CQ llegan a medir en el orden de 20 nm en partículas individuales y 800 nm (0.8  $\mu\text{m}$ ) de radio hidrodinámico cuando se aglomeran, podrían ser capaces de obstruir los vasos coronarios (alrededor de 100 a 260  $\mu\text{m}$  de espesor) [100].

Las partículas amorfas CQ a 160°C tuvieron un comportamiento similar, llegando a un valor máximo del efecto contráctil sostenido hasta 110 mmHg con un tamaño de aglomerados de 30 nm. Sin embargo, se obtuvieron valores de alrededor de 25 mmHg en la primera administración a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a diferencia de las partículas amorfas CQ 120°C que tuvieron un aumento similar a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 39B**). Las partículas amorfas CQ a 200°C por otro lado, fueron las que presentaron el menor incremento en la PP (100 mmHg), con un tamaño similar a las CQ120°C en 600 nm cuando están en solución, en partículas individuales, sin embargo, obtuvieron un valor de 16 nm en partículas individuales mediante TEM. Esto pudo permitir que las partículas no interaccionaran con la superficie celular [181].

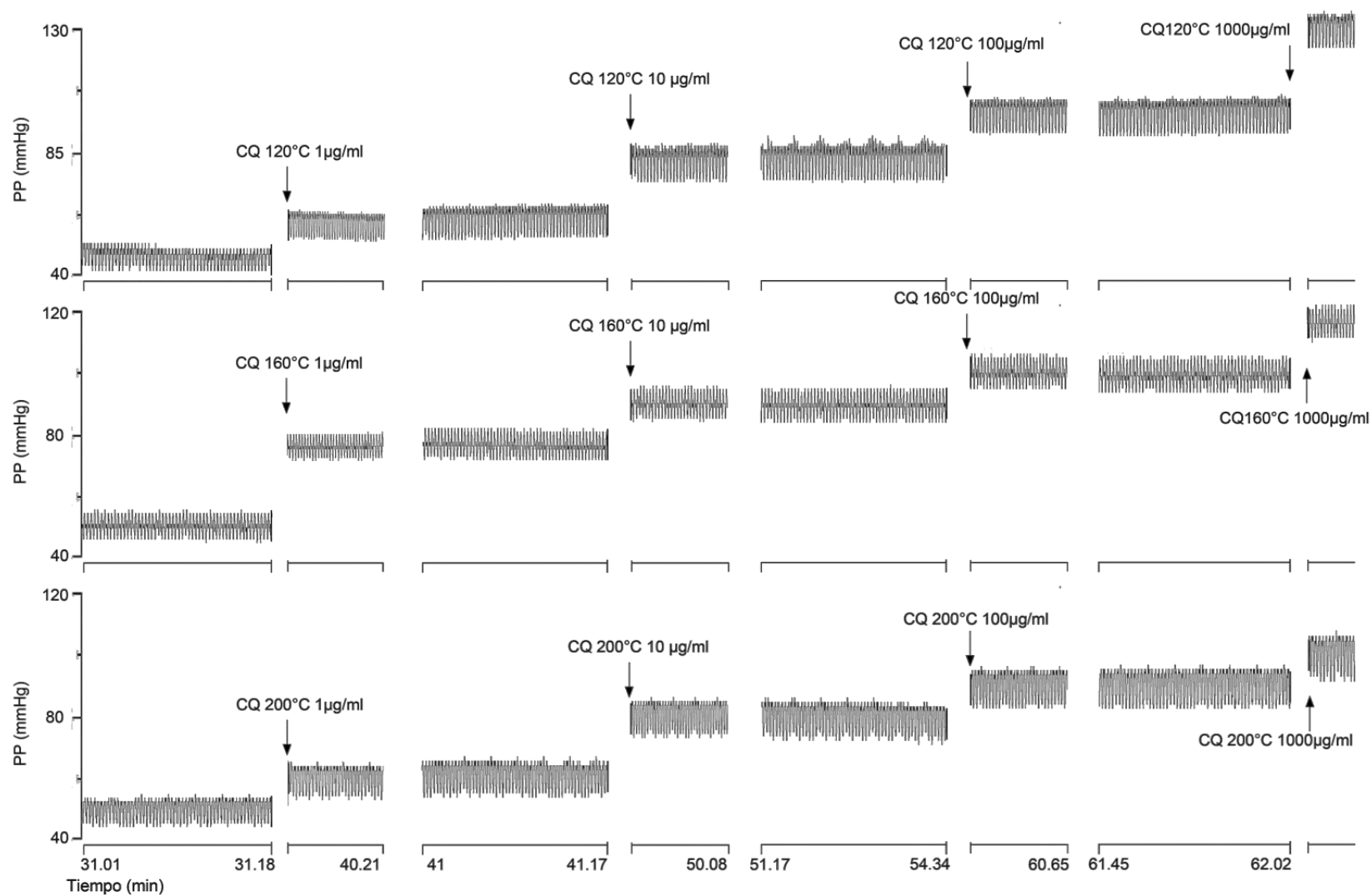
Se requiere un estudio histológico para poder discernir si existe una bioacumulación o si las partículas logran penetrar la membrana celular. Sin embargo, existe evidencia que las MNP no logran atravesar la membrana salvo por transporte activo, que requiere un campo magnético intenso para permear la membrana en sistemas *in vitro* de células madre/estromales mesenquimales amnióticas humanas [182].

Tomando en cuenta las propiedades magnéticas de las MNP y su reducido tamaño, incluso menor a una micra cuando aglomeradas, se podría sugerir la formación de un complejo de iones de la solución de fisiológica [183], limitando al corazón de factores que intervienen en la vía de señalización de los factores de relajación como el óxido nítrico (NO) como el calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y la posterior elevación de la presión [184]. Los dos estados de oxidación fisiológicamente significativos del hierro son ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Numerosas proteínas y enzimas que permiten procesos biológicos vitales, incluido el transporte de oxígeno, la producción de energía, la síntesis de ADN, la replicación celular y el desarrollo, dependen del hierro como componente clave [185], [186]. La lixiviación producida de iones  $\text{Fe}^{2+}$  que se producen al estar presente el material en la solución [138] se podría estar interfiriendo con la liberación de NO generados como respuesta del corazón en presencia de las partículas amorfas CQ, que se ha reportado los compuestos de hierro como los iones solubles  $\text{Fe}^{2+}$  (presente en la hemoglobina) tienden a ser inhibidores en la señalización de NO [9].

A la par de los experimentos de Langendorff se realizaron las determinaciones de la producción de NO con las alícuotas del perfil de administración (**Figura 40D, 40E y 40F**), donde se observa un incremento significativo en la concentración producida de NO, la cual tiene un valor basal aproximado de 15 a 20 $\mu$ M (ACh) y 1 a 5  $\mu$ M de corazón sin ACh. Aumentos de alrededor de 20 $\mu$ M referente al control de ACh, sugiriendo que las partículas CQ producen procesos de liberación de NO en el tejido del corazón, que puede indicar la estimulación de la isoforma responsable de la producción de NO inducible (iNOS) [10], o a través de un bloqueo de los receptores muscarínicos, los cuales presentan afinidad por la ACh y iones Fe<sup>2+</sup> [187].

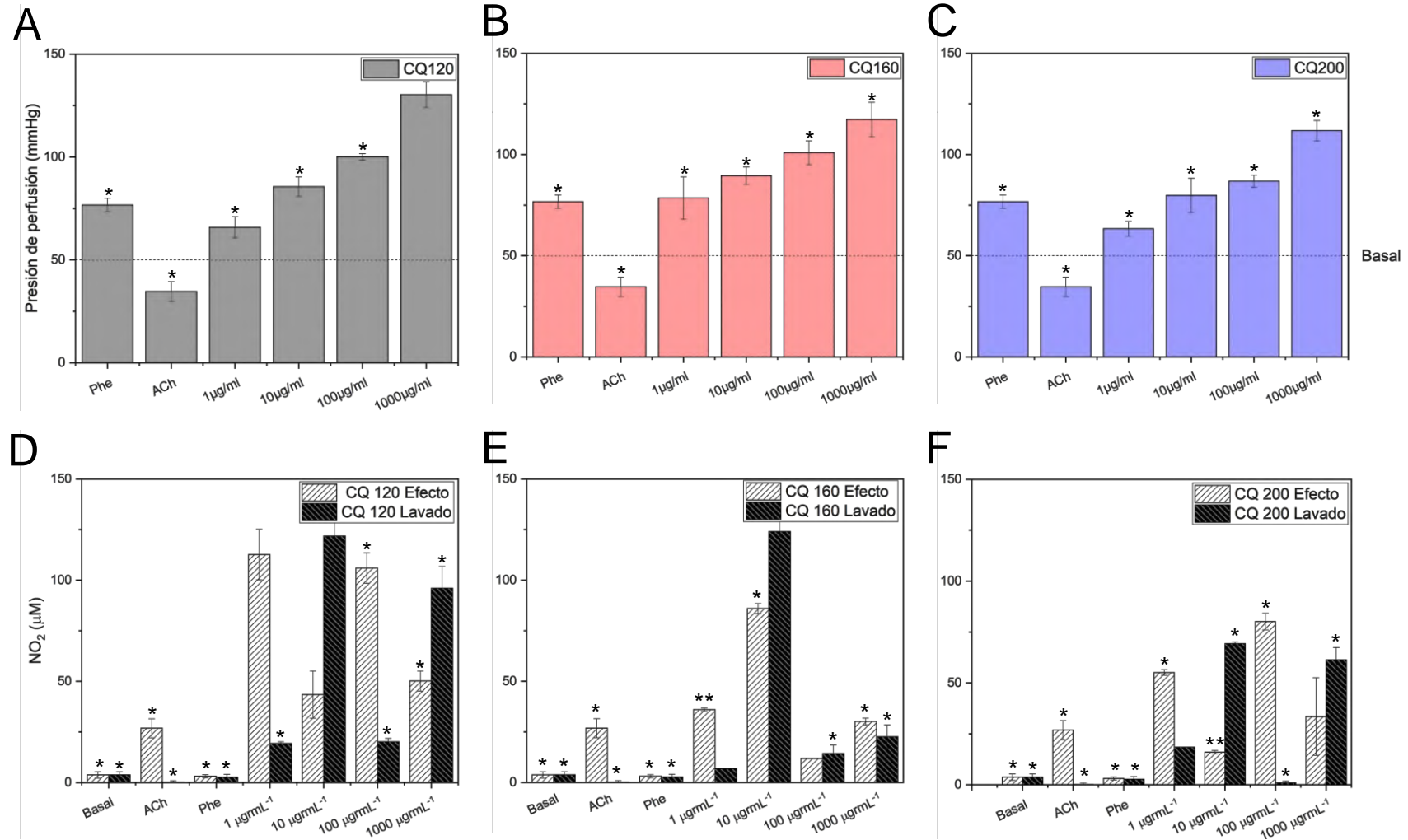
Los iones que conforman la solución de Krebs parecen no poseer un impacto en la dispersión de las MNP [188], ya que de acuerdo a las cargas superficiales obtenidos en la sección anterior (**Figura 29**) las MNP presentan superficies cargadas negativamente (en su mayoría en polidispersión), lo cual podría causar interferencia en iones importantes para la célula, como el calcio, magnesio y potasio [189] al estar negativamente cargada. Por el otro lado, las propiedades magnéticas de las MNP no afectan iones en solución sin la presencia de un campo magnético polarizado linealmente de frecuencia única, específicamente para el calcio 156:5  $\mu$ T [190].

Una vez que las partículas se recubren con silicio, todos los efectos sostenidos de contractilidad desaparecen por completo (**Figura 41A, 40B y 40C**). Esto agrega un fundamento sólido más a la interacción del hierro lixiviado con la vía de señalización del NO, puesto que cuando se realiza una modificación del material en superficie, en este caso silicio, los efectos contráctiles del corazón se vuelven nulos, tanto en los datos estadísticos de los registros de la PP (**Figura 42A, 41B y 41C**) y la producción del NO (**Figura 42D, 41E y 41F**), por lo que se puede suponer que el tamaño de las partículas no es un factor y no están interaccionando mecánicamente o, al menos, no están actuando las vías mecánicas de los receptores muscarínicos de la sintetasa endotelial de NO [191].

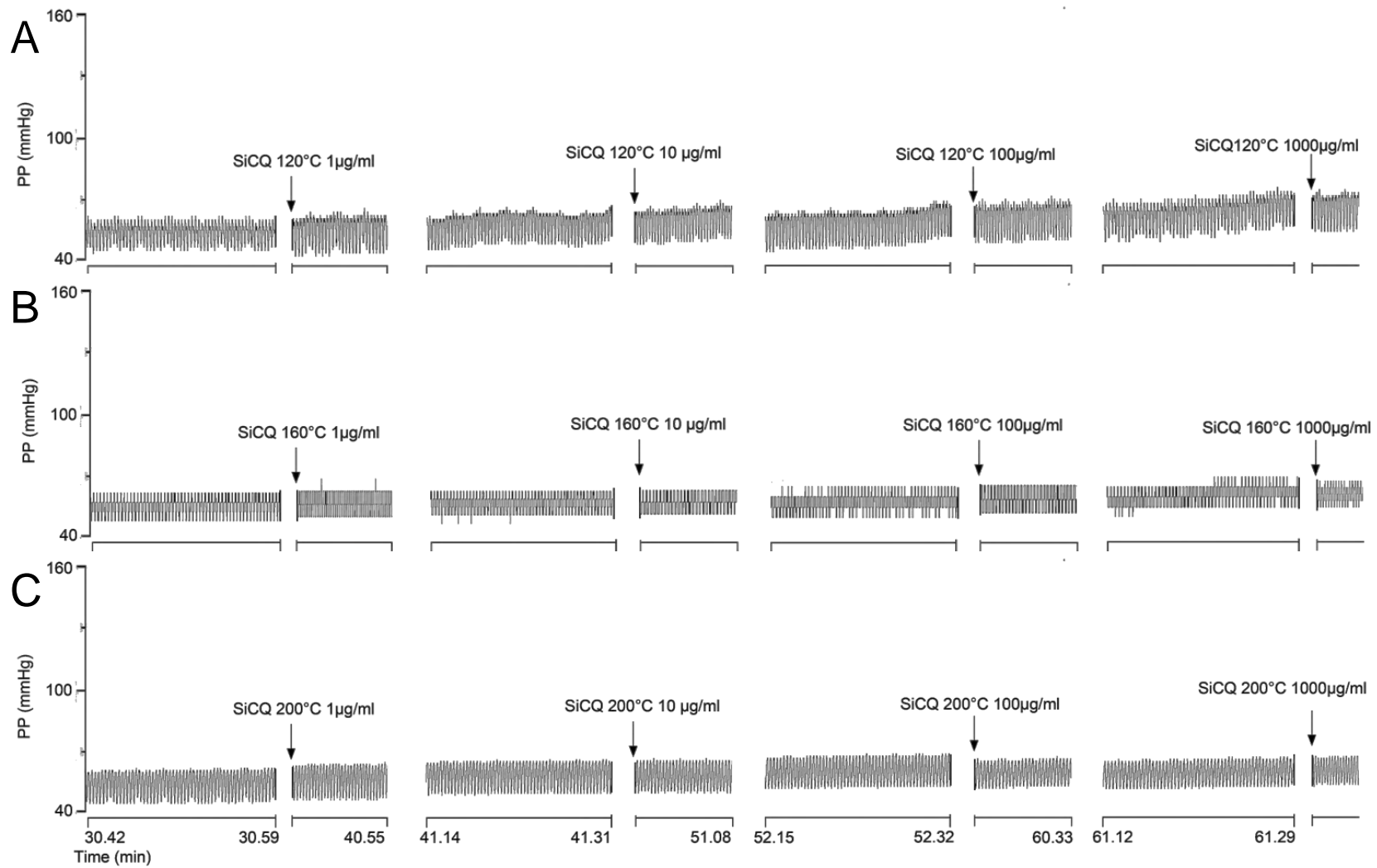


**Figura 39.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de MNP amorfas CQ sin recubrir a (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata.

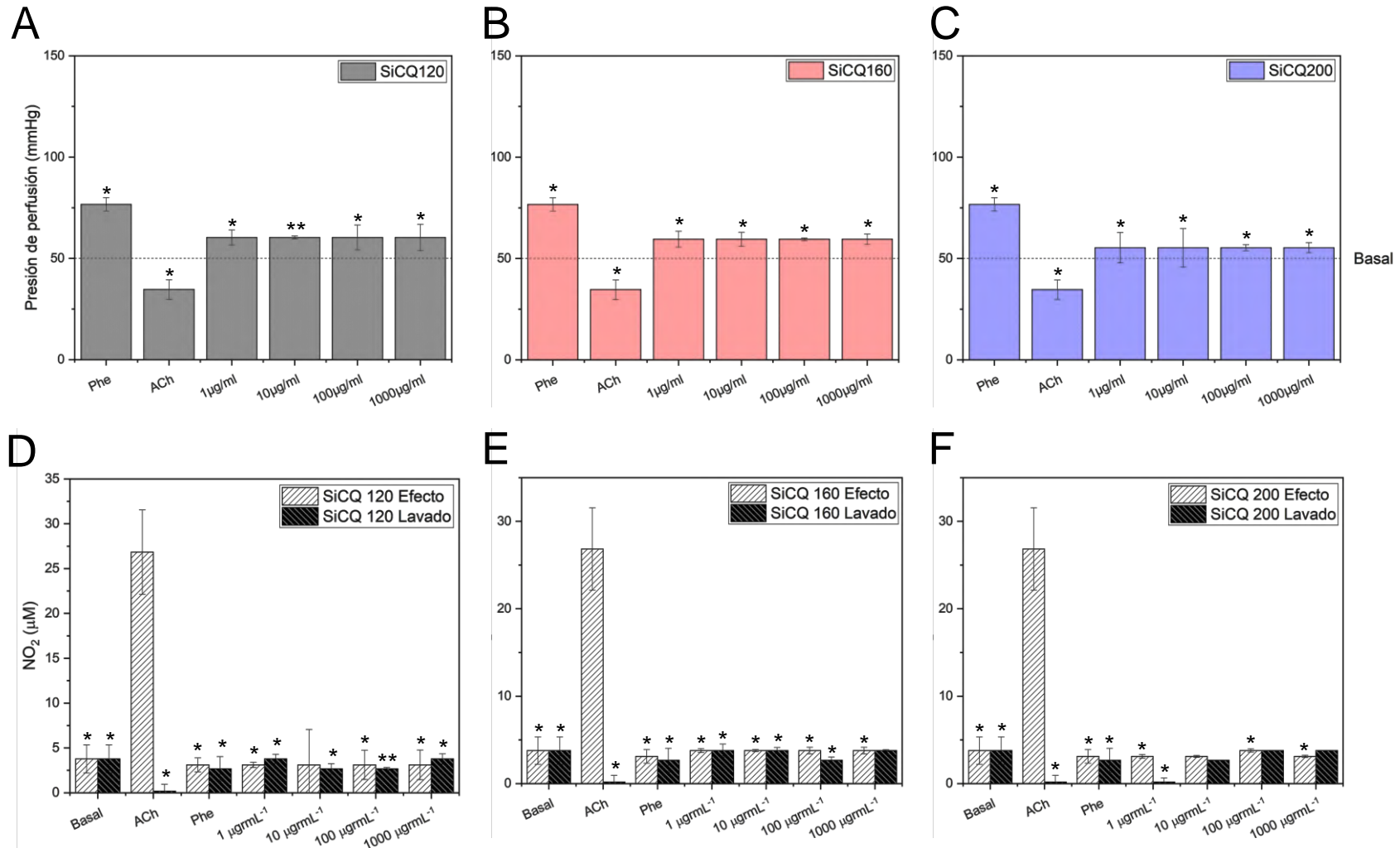




**Figura 40.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para las MNP amorfas a las diferentes temperaturas (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 41.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de MNP amorfas CQ recubiertas a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata.

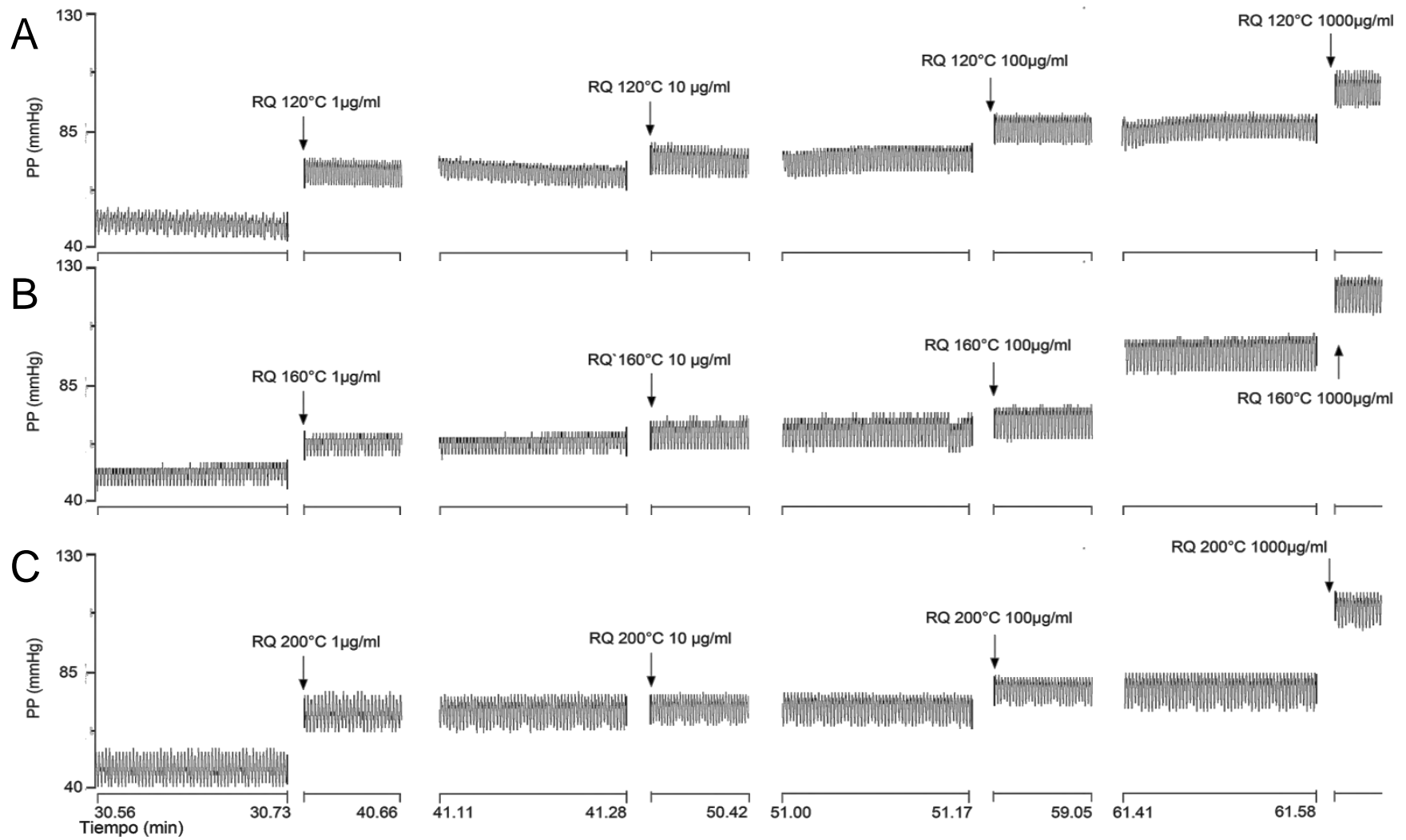


**Figura 42.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para las MNP amorfas recubiertas a las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

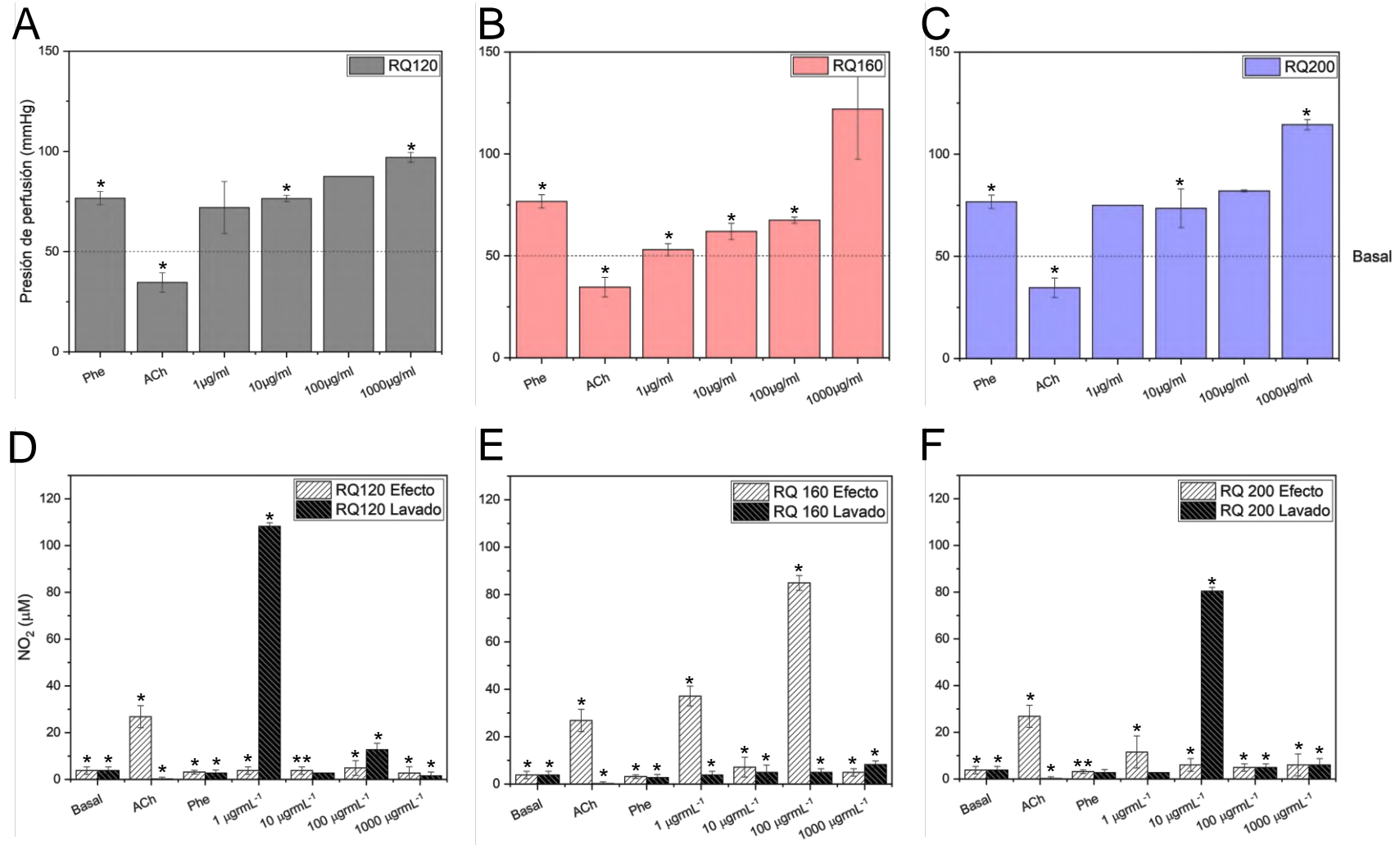
De forma similar, las barras magnéticas tuvieron efectos contráctiles sostenidos elevando la PP hasta valores de 102, 125, y 107 mmHg para las temperaturas de 120, 160 y 200°C, respectivamente.

Este comportamiento análogo parece indicar que la lixiviación de iones es similar entre ambos materiales. Los efectos en los hilos magnéticos, sin embargo, no produjeron un aumento en la producción de los valores de NO, salvo en las concentraciones 1, 100 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para las temperaturas de 120, 160 y 200°C, respectivamente. Para los hilos RQ120 se observa que el aumento en la concentración de NO se dio al finalizar la administración, lo que puede indicar que fue el paso de las nanopartículas y no su presencia lo que causó la producción de NO, pero vuelve a su basal terminado el periodo de lavado (**Figura 44D**). Para los hilos RQ160, los valores de NO aumentaron en 1 y 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  pero, al igual que los hilos RQ120, están dentro del rango del control ACh (**Figura 44E**) junto con los hilos RQ200, los cuales mostraron un aumento en 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en el proceso de lavado (**Figura 44F**). Estos efectos pueden indicar que la morfología tiene un impacto en la internalización y lixiviación de los iones  $\text{Fe}^{2+}$  [192], [193].

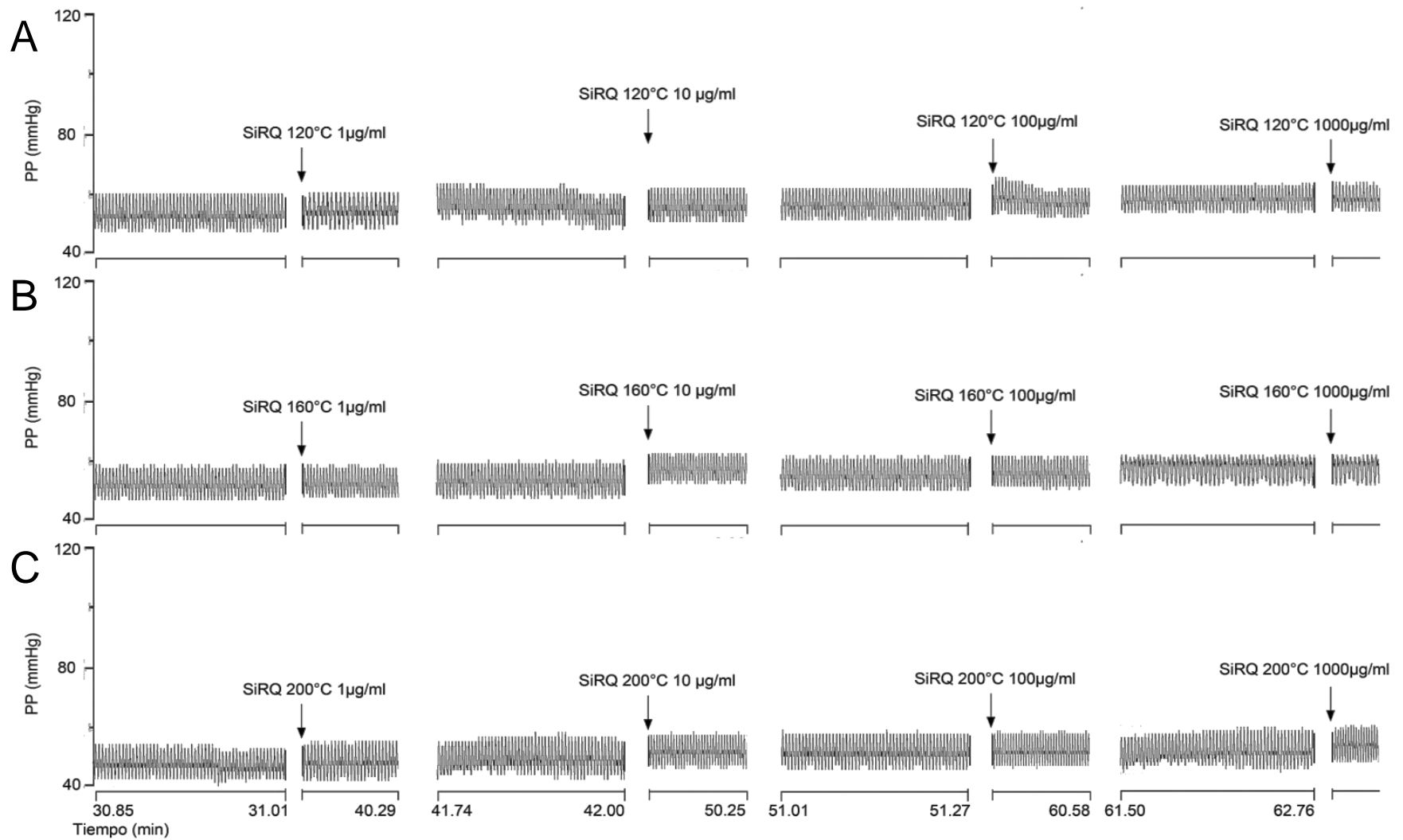
Una vez recubiertos los hilos magnéticos RQ, se obtuvieron resultados similares a los de las partículas amorfas CQ. Los efectos contráctiles sostenidos se eliminaron dando registros basales (**Figura 45**). De forma similar, los hilos RQ120 y RQ160 arrojaron valores de NO basales, es decir que no hubo producción de NO por ninguna vía (**Figura 46D y 46E**), con el cambio en la producción de NO en RQ200, donde en el caso de los hilos magnéticos RQ recubiertos se obtuvieron valores elevados en los hilos RQ200 (**Figura 46F**). Esto pudo deberse a que tenían un tamaño de 560 nm y una estabilidad de -18mV, parámetros similares a las partículas CQ200, lo cual pudo hacer que los hilos tuvieran un comportamiento similar a una aglomeración de partículas, alcanzando valores de 120  $\mu\text{M}$ .



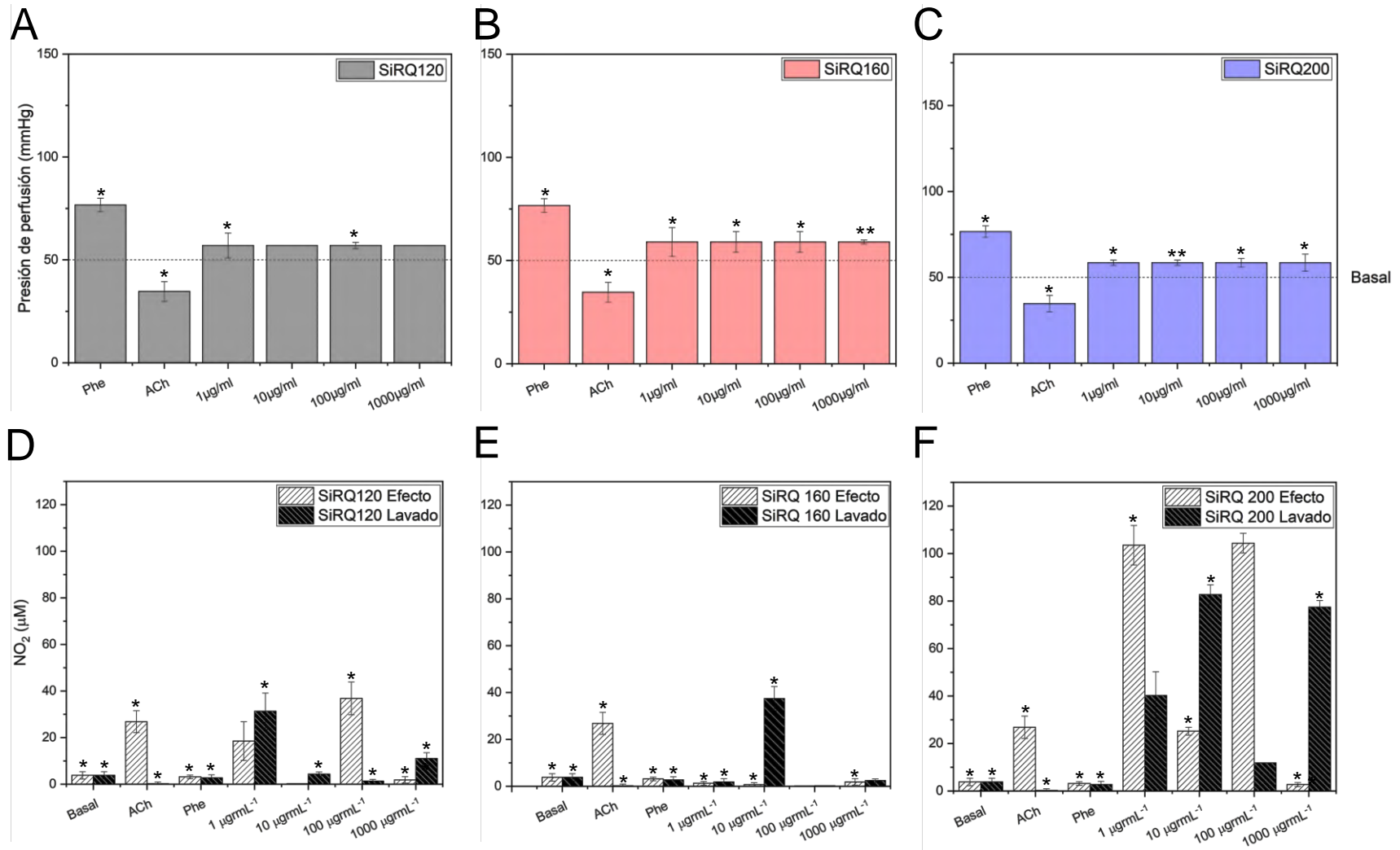
**Figura 43.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de los hilos magnéticos RQ sin recubrir a (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata.



**Figura 44.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para los hilos magnéticos a las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D)120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 45.-** Diagramas representativos de los registros de las concentraciones crecientes de los hilos magnéticos RQ recubiertos a (A)120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C en corazones perfundidos de rata.



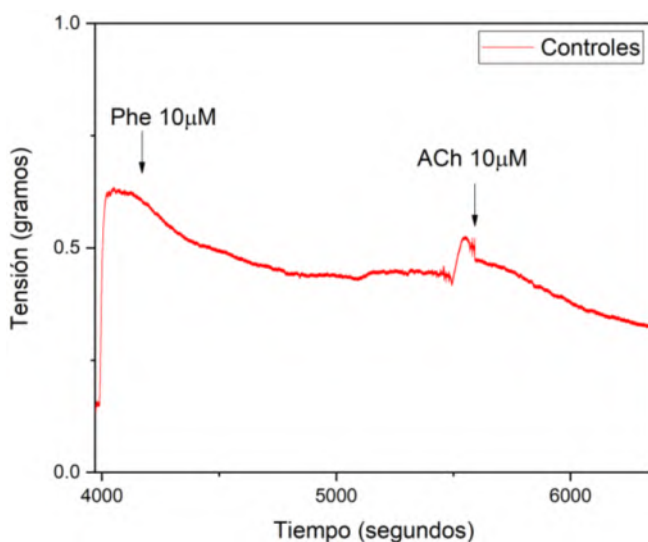
**Figura 46.-** Datos estadísticos obtenidos de los registros del sistema de corazón perfundido Langendorff y los valores de óxido nítrico para los hilos magnéticos recubiertos a las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 160 °C y (C) 200 °C y (D) 120°C, (E) 160 °C y (F) 200 °C. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \*p < 0.05; \*\*p < 0.01.



### VII.2.2. Evaluación de las MNP en segmentos de anillos aislados de aorta de rata

Para conocer los efectos del sistema vascular se sometieron segmentos de tejido de aorta a las mismas concentraciones que en corazón (1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), simulando su paso por el sistema vascular.

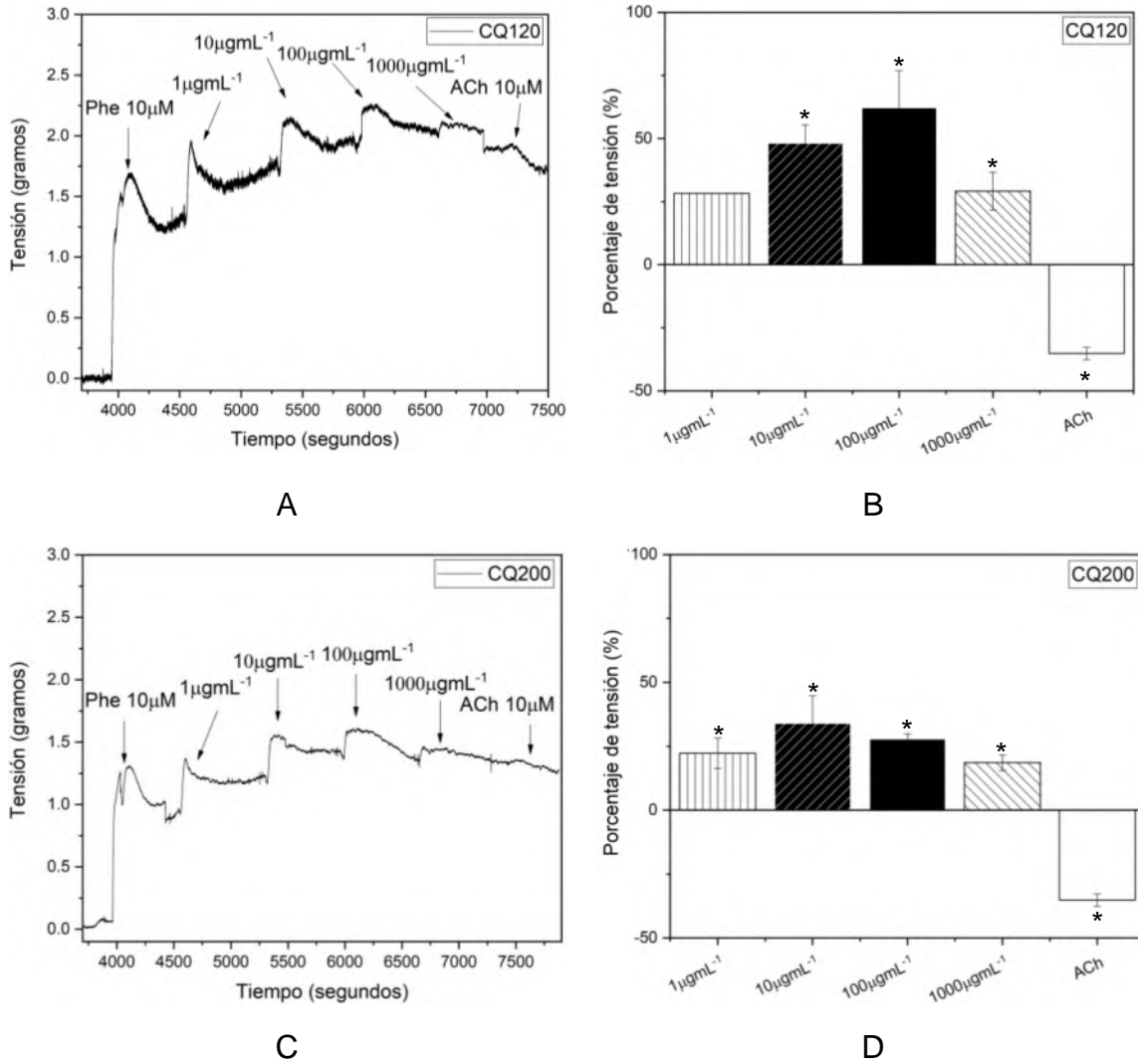
Al igual que en el sistema de Langendorff de corazones de rata, los anillos de aorta necesitan tener un control al inicio del experimento para comprobar la viabilidad del tejido administrando una concentración  $2\mu\text{M}$  de Phe como control contráctil y al final de las administraciones un control relajante de  $2\mu\text{M}$  de ACh (**Figura 47**).



**Figura 47.-** Registro representativo que muestra los efectos inducidos por las sustancias vasoactivas fenilefrina (Phe) y acetilcolina (ACh) utilizadas como controles de contracción y relajación vascular respectivamente en el fisiógrafo de tejidos aislados.

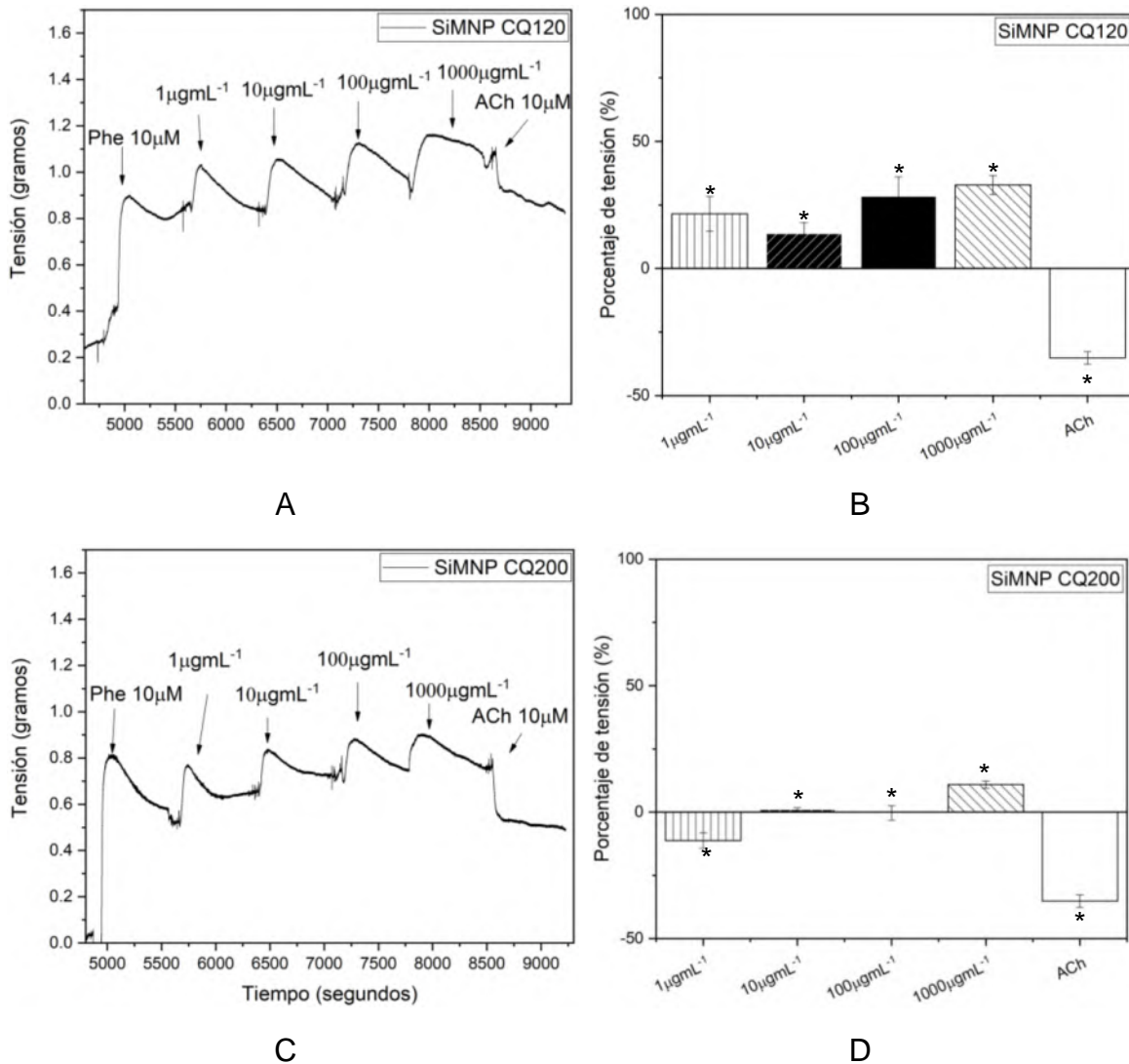
Al administrar las diferentes concentraciones de las nanoestructuras magnéticas sin el recubrimiento de silicio a los anillos de aorta, se observó un comportamiento similar al observado en el corazón. La tensión aumentó hasta un 50% del control contráctil (Phe), teniendo un comportamiento característico de horméis (respuesta biológica a dosis donde la respuesta aumenta, existe una zona de estabilización y una zona de daño) ante agentes externos de pruebas de toxicidad (**Figura 48A y 48D**) [194] aumentando en los valores de  $100\mu\text{g mL}^{-1}$  para la temperatura de  $120^{\circ}\text{C}$ , mientras que en  $200^{\circ}\text{C}$  el aumento de tensión ocurre en  $10\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 48B y**

**48C).** Al finalizar las administraciones se añadió el control dilatador ACh para reducir la tensión del tejido y se observó una disminución del efecto relajante.



**Figura 48.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de las nanoestructuras amorfas A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C sin recubrimiento. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Una vez que se recubren las nanoestructuras amorfas con silicio mediante el método de Stöber, el resultado es similar a lo observado en los corazones, donde tenemos una disminución de los valores de tensión hasta de un 25% del valor del control, la mitad del valor máximo observado para las estructuras amorfas magnéticas (**Figura 49A y 49B**). Mientras que para la temperatura de 200°C el efecto fue casi nulo, obteniendo valores de 5 a 10 % con respecto al control contráctil (Phe) (**Figura 49C y 49D**). Esto puede deberse de igual manera a que el tamaño de las partículas no es un factor y no están interaccionando mecánicamente o, al menos, no están actuando las vías mecánicas de los receptores muscarínicos de la sintetasa endotelial de NO [191] mediante lixiviación, la cual se ve afectada por el recubrimiento de silicio al no estar expuesto el hierro a la solución fisiológica [195].

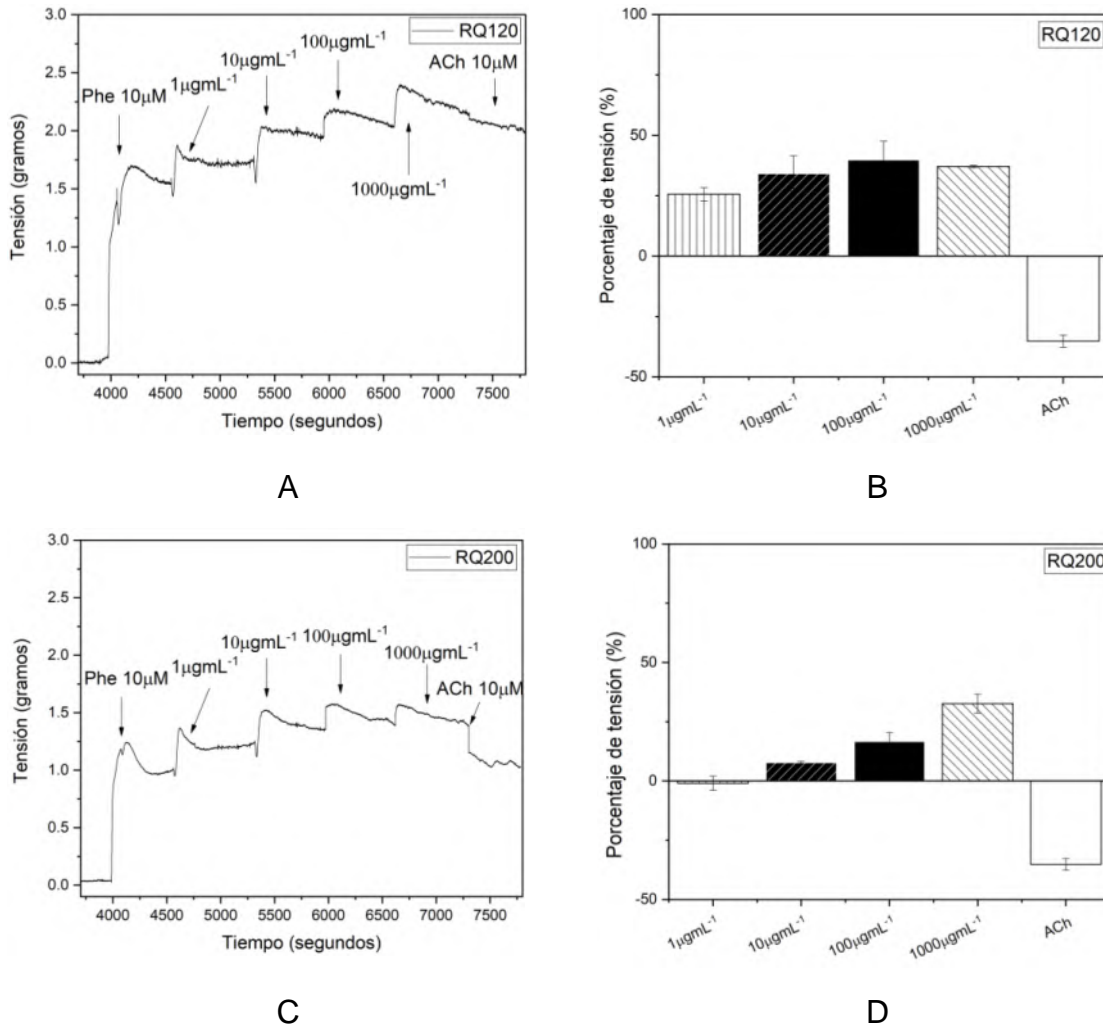


**Figura 49.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de las nanoestructuras amorfas A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C con recubrimiento de silicio. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

En el caso de los hilos magnéticos, el comportamiento de hormesis no se encuentra presente, a diferencia de las estructuras amorfas, pero se alcanzan valores máximos similares de alrededor de 40 a 50% para la temperatura de 120°C (Figura 50A y 48B) por lo que, al igual que el corazón, la composición parece jugar un papel más importante que el del tamaño.

Por otro lado, los hilos magnéticos a temperatura de 200°C tuvieron un efecto similar a lo observado hasta ahora por os materiales recubiertos, lo que puede deberse a la disponibilidad de los iones de hierro mediante la morfología, ya que estas

estructuras a esta temperatura no mostraron la misma distribución que las otras temperaturas menores.

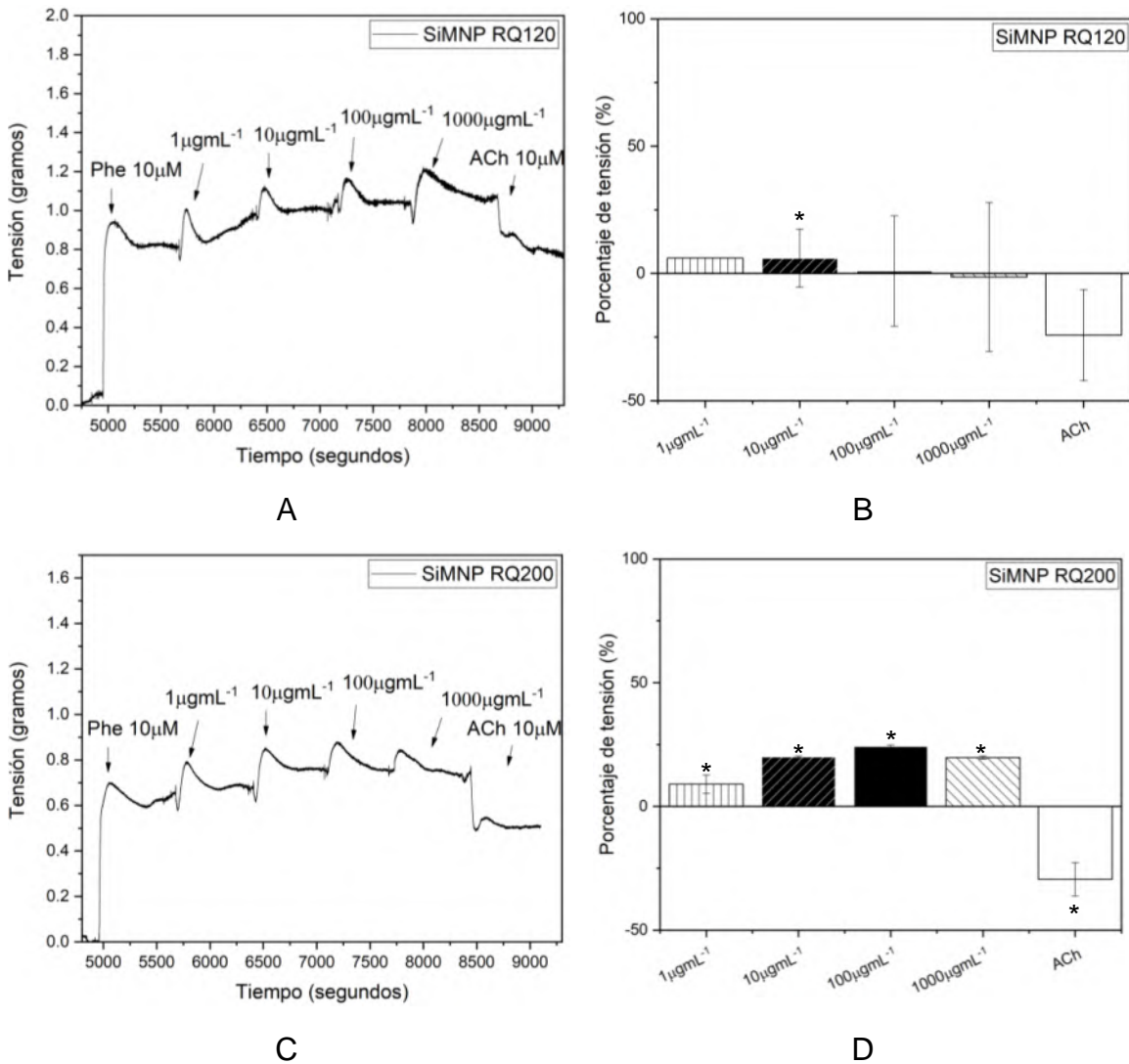


**Figura 50.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de los hilos magnéticos A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C sin recubrimiento. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Cuando se aplicó el recubrimiento de silicio, las nanoestructuras de hilos magnéticos a temperatura de 120°C tuvieron un comportamiento similar al observado a lo largo de los experimentos. El efecto de contracción sostenido desapareció casi por completo en los valores de 100 y 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (**Figura 51A y 51B**) reforzando la premisa en que el factor más importante es la composición de hierro la que provoca los efectos contráctiles dentro del tejido aórtico.

Posteriormente, para la temperatura de 200°C se observa una disminución del valor máximo en 1000 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , pero aumentaron los valores de concentraciones menores (**Figura 51C y 51D**).

Estos resultados son consistentes con lo observado en el corazón, donde los efectos de contracción sostenida presentados de los materiales magnéticos sin un recubrimiento, se ve mitigado o desaparece por completo cuando al recubrir con silicio. El análisis del recubrimiento total o parcial podría dar explicación a los resultados.

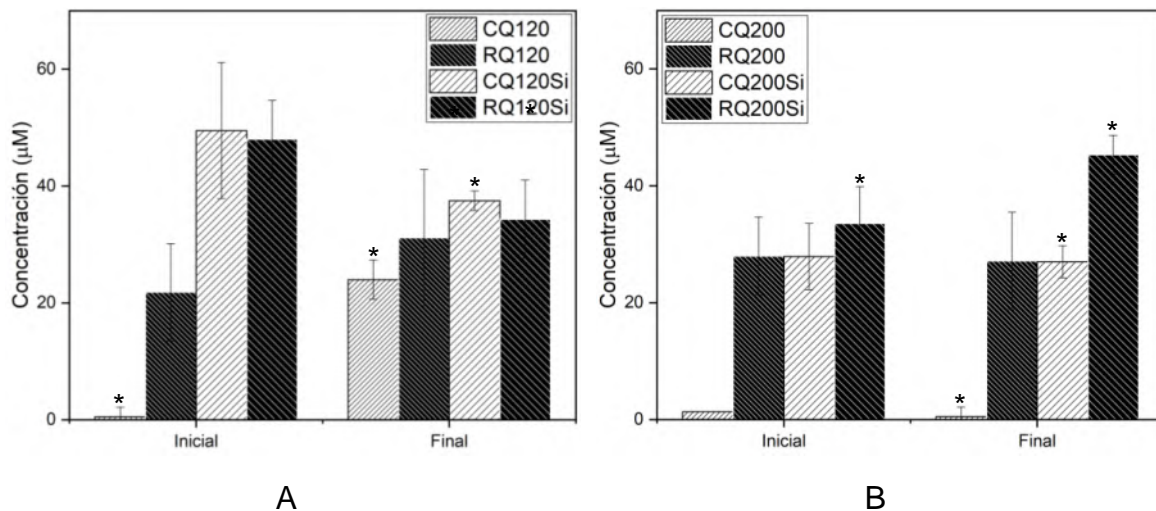


**Figura 51.-** Registros representativos del fisiógrafo de anillos de aorta de los hilos magnéticos A) 120°C y C) 200°C y sus valores estadísticos B) 120°C y D) 200°C con recubrimiento. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Al igual que en el corazón, se tomó un alícuota para determinar la concentración del óxido nítrico para reconocer las posibles vías de acción de los materiales.

A diferencia de los corazones, únicamente se tomaron alícuotas al principio y al final de las administraciones de las estructuras magnéticas, ya que no es un flujo constante como en el corazón aislado, sino que es un volumen definido y no se toman alícuotas para evitar dejar el tejido expuesto al aire.

En los análisis de NO, se observa un aumento en los valores de concentración en respuesta a la elevada contractilidad provocada por las nanoestructuras magnéticas (**Figura 52A y 51B**). Sin embargo, los niveles de contracción se elevan a concentraciones similares a los valores de ACh presentes en el corazón (**Figura 52**) mantienen sin cambios durante todo el experimento, por lo que se puede proponer que la producción de NO no se ve afectada desde dentro de la célula del musculo liso, si no que una vez liberado, el hierro parece interferir con la vía de señalización del NO, posiblemente por lixiviación.



**Figura 52.-** Valores de óxido nítrico del sistema de anillos aislados de aorta los para los hilos magnéticos recubiertos a las diferentes temperaturas (A) 120°C, (B) 200 °C. Se representa el análisis ANOVA de una vía vs el control como: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Los valores del aumento sostenido de la contractilidad tanto para corazón como para aorta indican que hay una interacción de los materiales con el tejido vascular que impide que este vuelva a relajarse de nuevo como se observó en los resultados

de óxido nítrico donde estos aumentan sin un efecto visible de relajación para ambos tejidos corazón tanto como para aorta un análisis más profundo dentro de las vías de señalización de la producción de NO es necesario para reafirmar las suposiciones presentadas indirectamente en el trabajo mediante las expresiones de las diferentes isoformas de NO (eNOS, iNOS y nNOS).

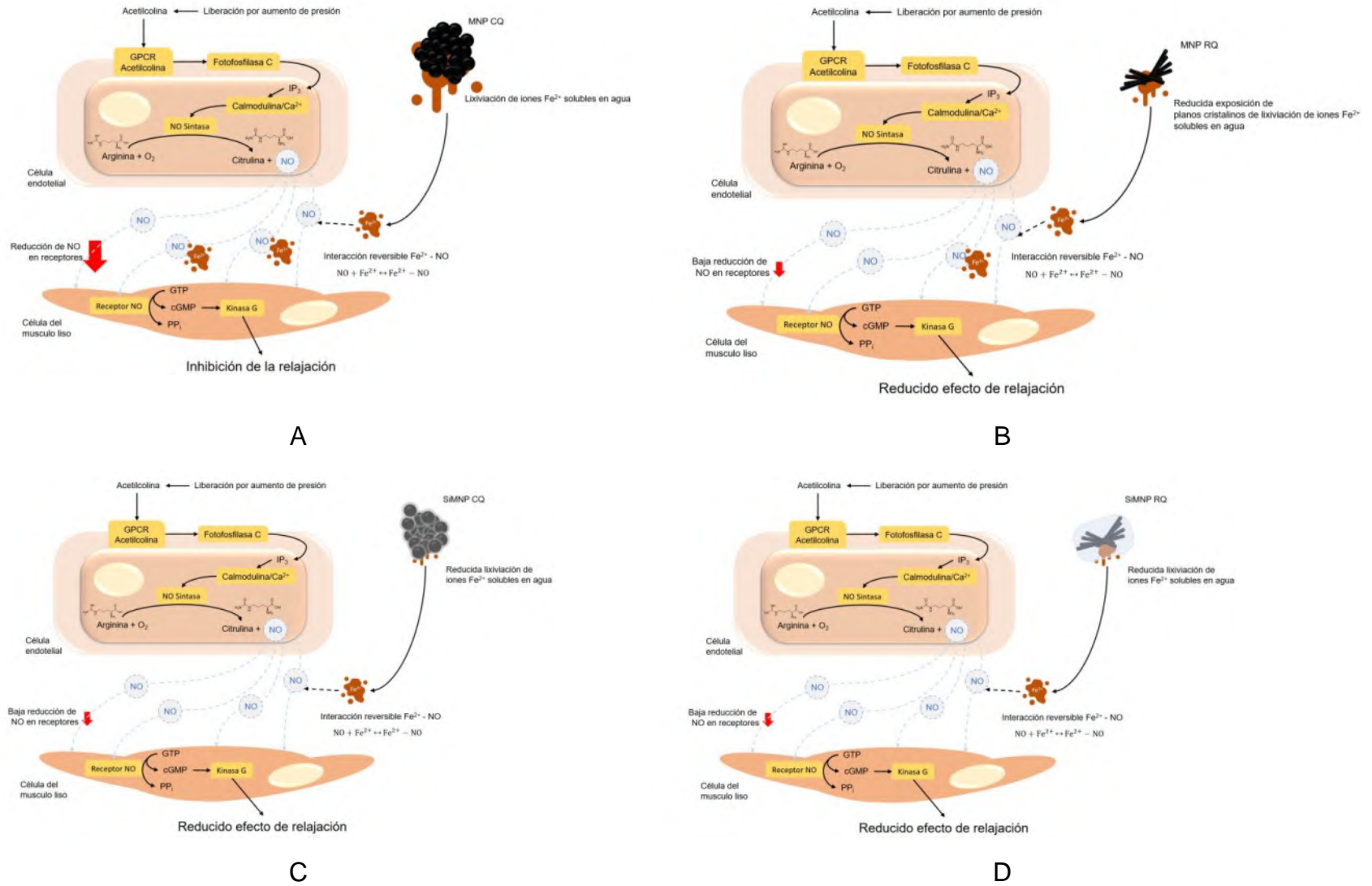
Con estos resultados, es posible observar el comportamiento de los materiales mediante un análisis de similitudes de PCA.

### **Propuesta de los efectos observados**

Las MNP presentan efectos adversos severos sobre el tejido cardiaco del corazón debido, como primera conjetura, basada en el cambio de presión y forma del tejido, a su tamaño y relativa facilidad de atraer a los iones presentes en la solución, que pueden fácilmente entrar en contacto con los receptores muscarínicos y afectar la señalización del NO, provocando así los efectos de la contracción observados en la ACh con las nanoestructuras sin recubrir (**Figura 53A y 53B**) ya que los iones de hierro solubles en agua  $Fe^{2+}$  tiende a formar ligandos reversibles con las moléculas de NO [133], los cuales no pueden ser anclados a los receptores de NO en la membrana de las células del musculo liso, por lo que se observa la producción de NO mas no sus efectos en los ensayos tanto de corazón como de anillos de aorta.

Las nanoestructuras recubiertas en cambio, dada su coraza de silicio y en los hilos magnéticos, el crecimiento preferencial cambiando los planos cristalinos expuestos al agua, presentan propiedades vistas dentro de materiales en bulto de sus contrapartes nanoestructuradas [196], lo que podría suponer que están produciendo lixiviación de iones solubles en agua  $Fe^{2+}$  disminuido por el silicio, pero al ser nanoestructurados, interfieren también, aunque de forma más débil, con el NO como los materiales sin recubrir (**Figura 53C y 53D**).





**Figura 53.-** Posibles efectos de las estructuras amorfas CQ A) sin recubrir y C) recubiertas, así como los hilos magnéticos RQ B) sin recubrir B) y D) recubiertas en el tejido vascular.

### VII.3. Modelo estadístico de análisis de componentes principales (PCA)

Una vez obtenidos los valores de cristalinidad, morfología, tamaño (individual y radio hidrodinámico), carga, recubrimiento y sus efectos en el tejido, valores del PP, concentración de NO y tensión en anillos aórticos (**Tabla 5**) se procedió a introducir los valores en el código diseñado en el software **R** para el análisis de contribuciones de componentes principales o PCA (**Anexo A.8**).

*Tabla 5.- Valores obtenidos de las propiedades y efectos provocados por las MNP.*

| MNP     | TAMAÑO (nm) | RADIO HIDRODINÁMICO (nm) | CARGA SUPERFICIAL (mV) | PRESIÓN DE PERFUSIÓN (mmHg) | TENSIÓN (gr) | CONCENTRACIÓN DE NO ( $\mu\text{M}$ ) | RECUBRIMIENTO |
|---------|-------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|--------------|---------------------------------------|---------------|
| CQ120   | 22          | 866                      | 19                     | 15                          | 62.21        | 24                                    | No            |
| CQ160   | 19          | 374                      | 12                     | 20                          | -            | -                                     | No            |
| CQ200   | 16          | 654                      | 4                      | 30                          | 34.00        | 0.5                                   | No            |
| SICQ120 | 50          | 150                      | -11                    | 10                          | 32.63        | 37.5                                  | Si            |
| SICQ160 | 60          | 569                      | -22                    | 13                          | -            | -                                     | Si            |
| SICQ200 | 50          | 264                      | -1                     | 15                          | 10.87        | 27                                    | Si            |
| RQ120   | 50          | 169                      | 2                      | 13                          | 39.84        | 31.16                                 | No            |
| RQ160   | 60          | 374                      | -36                    | 15                          | -            | 5                                     | No            |
| RQ200   | 60          | 161                      | -31                    | 35                          | 32.63        | 27.16                                 | No            |
| SIRQ120 | 100         | 246                      | -5                     | 1                           | 10.87        | 34.33                                 | Si            |
| SIRQ160 | 70          | 374                      | -40                    | 2                           | -            | -                                     | Si            |
| SIRQ200 | 80          | 569                      | -18                    | 3                           | 24.26912     | 45.33                                 | Si            |

El análisis de PCA arroja dos resultados diferentes, las similitudes entre los individuos o sujetos de prueba, en este caso los materiales CQ y RQ con sus diferentes temperaturas, y el análisis de las contribuciones de las variables, es decir, cristalinidad, morfología, tamaño, carga y recubrimiento.

En la primer grafica de individuos (**Figura 54**) podemos observar la similitud entre el comportamiento de los individuos, entre más cercanos se encuentren entre ellos, el comportamiento que presentaron de las variables fue parecido, representado por el código de semáforo (**cos2**). En la gráfica podemos observar que los materiales recubiertos se encuentran agrupados en un espacio en común, lo cual indica que los materiales se comportaron de forma similar, el recubrimiento hace que los materiales tengan efectos similares y se comporten de una manera predecible. Los materiales sin recubrir, por el contrario, presentan un comportamiento más disperso

ninguno de los materiales sin recubrir presentó un comportamiento similar a otro, siendo el más alejado los hilos magnéticos RQ120, lo cual indica que aun siendo de la misma composición y método de síntesis ningún nanomaterial (al menos los presentados aquí) pueden tomarse como algo ya conocido.

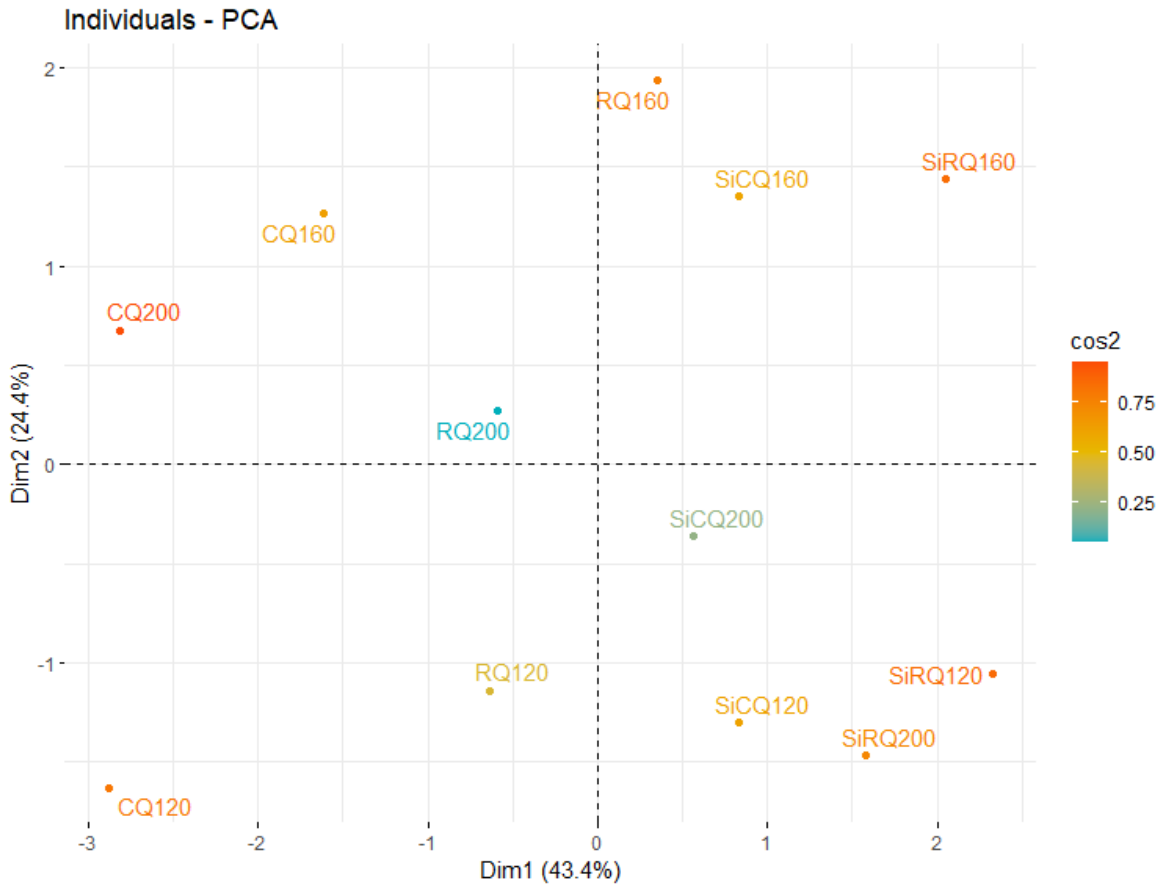
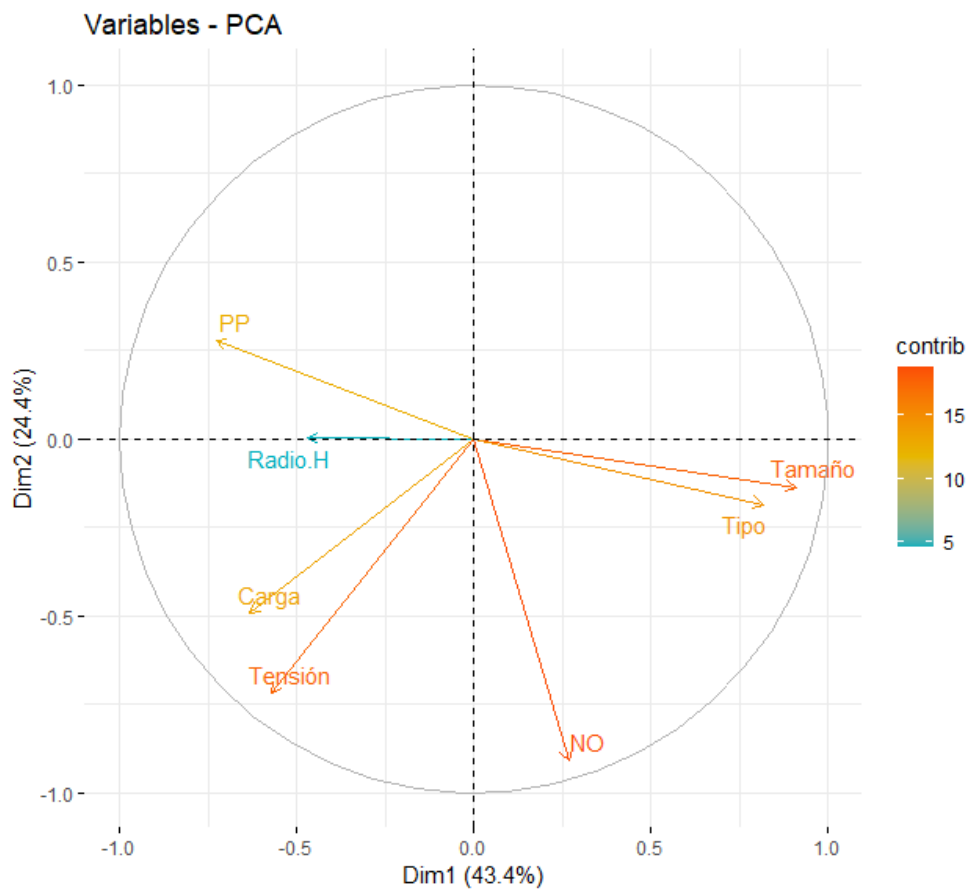


Figura 54.- Diagrama de PCA de distribución de individuos (materiales magnéticos) y su similitud entre ellos.

Al realizar el análisis de las variables y su contribución se obtuvo la Figura 55, donde se crean vectores con el análisis de varianza de cada uno de las variables y sus interacciones entre ellas para formar un vector de contribución, representado por la flecha del vector y el semáforo de contribución, rojo siendo el más representativo. El círculo representa el todo de las contribuciones (con valor de 1), es decir, entre más cercano se encuentre un valor del círculo. Se observa que la PP fue la más representativa para el análisis entre propiedad-efecto, seguido de la concentración

de NO y la gráfica arroja también que la variable a considerar que produjo los efectos observados fue el tamaño de las partículas o hilos individuales obtenido mediante TEM, mientras que el tamaño obtenido mediante DLS (radio hidrodinámico) fue el menos relevante. Esto indica que, para los materiales nanoestructurados estudiados en este proyecto, el tamaño es el factor crucial que considerar al momento de diseñar materiales con una aplicación dentro del sistema vascular, seguido por la composición o modificación en la superficie, el recubrimiento, en este caso de silicio representada con la leyenda “Tipo” dentro de la **Figura 55**.



**Figura 55.-** Diagrama de PCA de contribución de variables (materiales) y su similitud entre ellos.

Estos diagramas de contribución de variables y comportamiento de individuos pueden graficarse para ver la distribución de quienes fueron los individuos que

aportaron a que las variables aportaran considerablemente a los resultados finales (Figura 56).

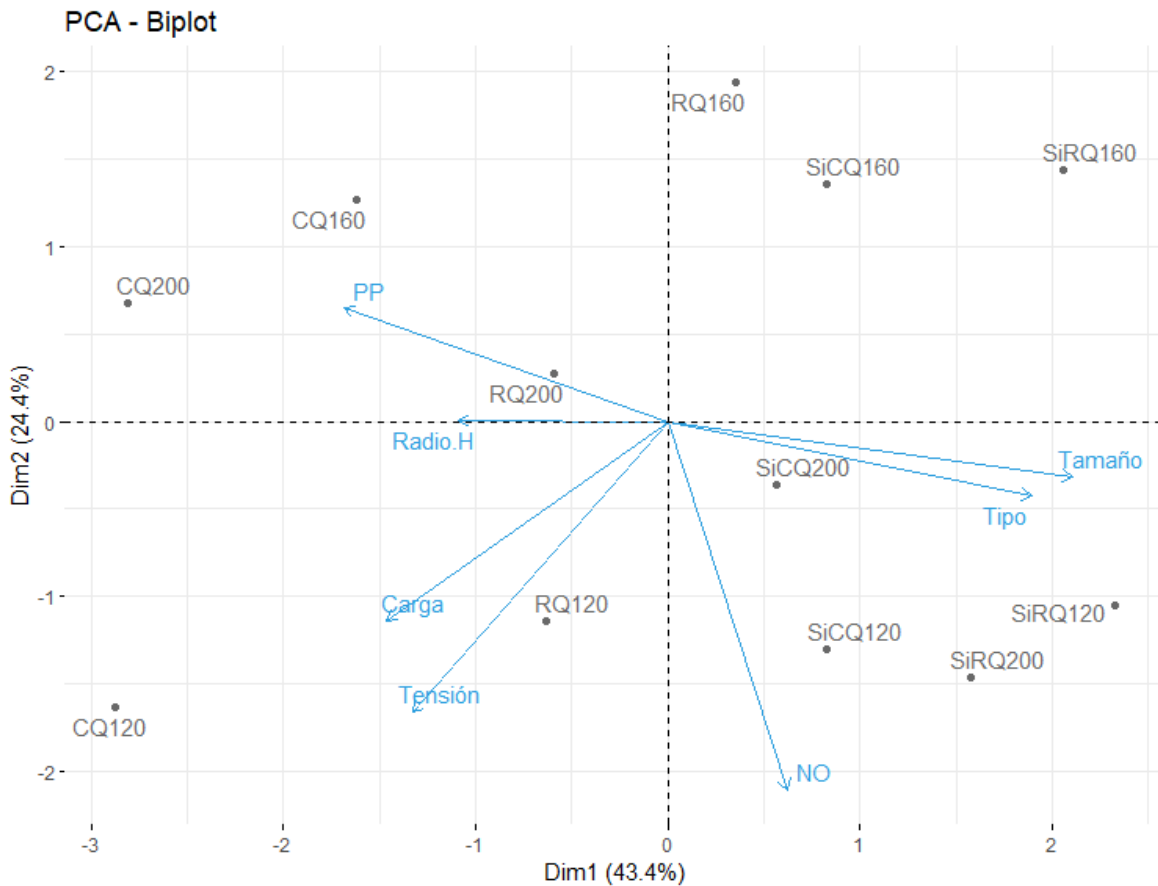


Figura 56.- Diagrama completo PCA de distribución de individuos (materiales) y sus variables.

Este diagrama denominado *biplot* muestra la distribución de los individuos (materiales magnéticos) y su relación con la contribución de las variables observadas. Como se puede apreciar la liberación de NO está ligada con los materiales recubiertos, así como el tamaño y el recubrimiento, lo cual puede deberse a que estos materiales no generaban una producción elevada ni un efecto contráctil dentro del tejido por la protección contra la lixiviación. Mientras que los materiales sin recubrir, especialmente las estructuras amorfas CQ120, CQ160 y los hilos magnéticos RQ200 fueron los responsables de generar una mayor contribución al aumento de la PP. Así como las estructuras amorfas CQ120 e hilos

magnéticos RQ120 ambos a 120°C de condición de calcinado, mostraron una mayor contribución a la carga y tensión dentro de la estructura.

El radio hidrodinámico no tuvo un impacto significativo dentro de los efectos presentados, debido probablemente a que no existe interacción magnética con los iones presentes en la solución, por lo que el radio hidrodinámico a pesar de ser grande, no es lo suficientemente intenso para hacer que se muevan en la solución [197], [198].

# **CAPITULO VIII**

## **Conclusiones**

## Conclusiones

Los nanomateriales poseen diferentes propiedades que les confieren múltiples aplicaciones que pueden revolucionar y/o cambiar el alcance de tecnologías actuales, sobre todo en el campo de la medicina. Pero, el uso de nuevas tecnologías y tratamientos emergentes siempre trae consigo un margen de riesgo, que, cabe aclarar, no demerita ni descarta el uso del material, por el contrario, se debe tener un margen de aplicación para tener un cuadro de integración entre los efectos que pueden causar y las propiedades que las ocasionan.

Estos materiales presentaron efectos adversos al tejido vascular aumentando la PP y los niveles de NO sin importar la morfología, pues la diferencia entre partículas e hilos no fue significativa, ambas nanoestructuras elevaron la PP hasta un 150% del valor del control; sin embargo, hubo resultados que fueron diferentes para cada morfología en la concentración de NO. Las partículas amorfas elevaron la concentración de NO hasta valores de 100  $\mu\text{M}$  en todas sus concentraciones; mientras que los hilos magnéticos no provocaron un aumento de la concentración basal (10 $\mu\text{M}$ ). Los hilos magnéticos, al no tener un área de contacto tan alta con las células debido a su composición parecida a una red, parecen no interactuar de forma tan marcada como las partículas. Las desventajas de las MNP, su nivel de lixiviación y su aglomeración atribuida a su magnetismo se vio reducida con el recubrimiento de silicio, que cae al menos en dos órdenes de magnitud, lo que los convierte en una opción plausible para usar dentro del cuerpo, como lo muestra la bibliografía.

La morfología, el tamaño y la composición desarrollaron un papel importante en los efectos presentados dentro del tejido vascular, por lo que deben ser factores que considerar, al menos en el alcance de este proyecto, a los materiales magnéticos de óxidos de hierro para posibles aplicaciones biomédicas. Futuras investigaciones son necesarias para discernir las rutas específicas de los materiales, su internalización, señalización y efecto global que las partículas tienen en el sistema vascular y, eventualmente, los demás sistemas.



### **Perspectivas a futuro**

1. Realizar histología para comprender en su totalidad la bioacumulación de los materiales.
2. Análisis de expresión génica de las diferentes vías de producción de NO (eNOS, iNOS, nNOS) para dilucidar los efectos mecánicos, inhibidores competitivos o respuesta del sistema vascular.
3. Modificar superficialmente los materiales y separarlos mediante surfactantes para apreciar la interacción partícula-tejido individual.
4. Simular *in silico* con la información obtenida la posible interacción e internalización de las partículas amorfas e hilos.
5. Cambiar la composición de los materiales magnéticos para observar el efecto de diferentes composiciones magnéticas.

### Referencias Bibliográficas

- [1] European Chemicals Agency, "Understanding REACH - ECHA," 2018. [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/regulations/reach/understanding-reach>. [Accessed: 26-Sep-2018].
- [2] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, and M. Dusinska, "Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles," *Nanotoxicology*, vol. 8, no. 3, pp. 233–278, 2014.
- [3] H.-G. Zimmer, "The Isolated Perfused Heart and Its Pioneers," *Physiology*, vol. 13, no. 4, pp. 203–210, 1998.
- [4] C. m. Tipton, R. D. Matthes, T. Tchong, R. T. Dowell, and A. C. Vailas, "The use of the Langendorff preparation to study the bradycardia of training," *Med. Sci. Sports*, 1977.
- [5] N. Motayagheni, "Modified Langendorff technique for mouse heart cannulation: Improved heart quality and decreased risk of ischemia," *MethodsX*, vol. 4, no. November, pp. 508–512, 2017.
- [6] V. Stone, H. Johnston, and R. P. F. Schins, "Development of in vitro systems for nanotoxicology: Methodological considerations in vitro methods for nanotoxicology Vicki Stone et al.," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 39, no. 7, pp. 613–626, 2009.
- [7] H.-W. Yuen and W. G. Gossman, *Toxicity, Iron*. StatPearls Publishing, 2018.
- [8] A. Sukhanova, S. Bozrova, P. Sokolov, M. Berestovoy, A. Karaulov, and I. Nabiev, "Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 13, 2018.
- [9] V. C. Wong and E. Lerner, "Nitric oxide inhibition strategies," *Futur. Sci. OA*, vol. 1, no. 1, 2015.
- [10] R. Rastaldo *et al.*, "Nitric oxide and cardiac function," *Life Sci.*, vol. 81, no. 10, pp. 779–793, 2007.
- [11] A. Calver, J. Collier, and P. Vallance, "Nitric oxide and blood vessels: physiological role and clinical implications," *Biochem. Educ.*, vol. 20, no. 3, pp. 130–135, Jul. 1992.
- [12] R. M. Patil *et al.*, "Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Biochem. Biophys. Reports*, vol. 13, no. January, pp. 63–72, 2018.
- [13] E. J. Van Den Bos *et al.*, "Improved Efficacy of Stem Cell Labeling for Magnetic Resonance Imaging Studies by the Use of Cationic Liposomes," *Cell Transplant.*, vol. 12, no. 7, pp. 743–756, 2003.
- [14] E. C. Theil, M. Matzapetakis, and X. Liu, "Ferritins: Iron/oxygen biominerals in protein nanocages," *J. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 11, no. 7, pp. 803–810, 2006.
- [15] A. K. Gupta and A. S. G. Curtis, "Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors," *Biomaterials*, vol. 25, no. 15, pp. 3029–3040, 2004.
- [16] A. Villanueva *et al.*, "The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 11, 2009.

- [17] N. D. Thorat, O. M. Lemine, R. A. Bohara, K. Omri, L. El Mir, and S. A. M. Tofail, "Superparamagnetic iron oxide nanocargoes for combined cancer thermotherapy and MRI applications," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 18, no. 31, pp. 21331–21339, 2016.
- [18] H. Lee, E. Lee, D. Kim, N. Jang, Y. Jeong, and S. Jon, "Antibiofouling polymer-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic ...," *J. Am. Chem. Soc.*, no. 19, pp. 7383–7389, 2006.
- [19] O. Mykhaylyk, Y. S. Antequera, D. Vlaskou, and C. Plank, "Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 10, pp. 2391–2411, 2007.
- [20] A. Naveau *et al.*, "Phenotypic Study of Human Gingival Fibroblasts Labeled With Superparamagnetic Anionic Nanoparticles," *J. Periodontol.*, vol. 77, no. 2, pp. 238–247, 2006.
- [21] C.-M. Cheng *et al.*, "Hapten-derivatized nanoparticle targeting and imaging of gene expression by multimodality imaging systems," *Cancer Gene Ther.*, vol. 16, no. 1, pp. 83–90, Jan. 2009.
- [22] G. J. R. Delcroix *et al.*, "Mesenchymal and neural stem cells labeled with HEDP-coated SPIO nanoparticles: In vitro characterization and migration potential in rat brain," *Brain Res.*, vol. 1255, pp. 18–31, 2009.
- [23] FDA, "Information on Gadolinium-Based Contrast Agents Regulatory History and Labeling from Drugs @ FDA," 2017.
- [24] C. Comanescu, "Magnetic Nanoparticles: Current Advances in Nanomedicine, Drug Delivery and MRI," *Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 872–930, 2022.
- [25] K. Wu, D. Su, J. Liu, R. Saha, and J. P. Wang, "Magnetic nanoparticles in nanomedicine: A review of recent advances," *Nanotechnology*, vol. 30, no. 50, 2019.
- [26] X. Han, K. Xu, O. Taratula, and K. Farsad, "Applications of nanoparticles in biomedical imaging," *Nanoscale*, vol. 11, no. 3, pp. 799–819, 2019.
- [27] M. Norek and J. A. Peters, "MRI contrast agents based on dysprosium or holmium Małgorzata," vol. 59, pp. 64–82, 2011.
- [28] C. Neeley, M. Moritz, J. J. Brown, and Y. Zhou, "Acute side effects of three commonly used gadolinium contrast agents in the paediatric population," no. January, pp. 0–4, 2016.
- [29] Z. Zhen and J. Xie, "Development of Manganese-Based Nanoparticles as Contrast Probes for Magnetic Resonance Imaging," vol. 2, no. 1, 2012.
- [30] L. M. De León-Rodríguez, A. F. Martins, M. Pinho, N. Rofsky, and A. D. Sherry, "Basic MR Relaxation Mechanisms & Contrast Agent Design," vol. 42, no. 3, pp. 545–565, 2016.
- [31] A. Szpak, S. Fiejdasz, and W. Prendota, "T1 – T2 Dual-modal MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles with surface attached gadolinium complexes," pp. 1–11, 2014.
- [32] N. Salutar, "The use of gadolinium and dysprosium chelate complexes as contrast agents for magnetic resonance imaging This substituent group is believed to provide

- the required," vol. 208, pp. 14–19, 1994.
- [33] Y. A. Urian, J. J. Atoche-Medrano, L. T. Quispe, L. León Félix, and J. A. H. Coaquira, "Study of the surface properties and particle-particle interactions in oleic acid-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 525, p. 167686, May 2021.
- [34] M. Mirhosseini, R. Dehestani, M. Biotechnology, A. Branch, and A. Info, "Increasing the Shelf Life of Milk by Metal Oxide Nanoparticles and Mild Heat," vol. 5, no. 3, pp. 227–235, 2020.
- [35] G. Kandasamy and D. Maity, "Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics," *Int. J. Pharm.*, vol. 496, no. 2, pp. 191–218, 2015.
- [36] V. Weissig, T. K. Pettinger, and N. Murdock, "Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 4357–4373, 2014.
- [37] J. J. Ramsden, "Nanotechnology in a Modern Economy," in *Applied Nanotechnology*, Third., William Andrew, 2018, pp. 61–80.
- [38] J. Alonso, J. M. Barandiarán, L. Fernández Barquín, and A. García-Arribas, *Magnetic Nanoparticles, Synthesis, Properties, and Applications*. 2018.
- [39] A. B. Raies and V. B. Bajic, "In silico toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity," *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.*, vol. 6, no. April, pp. 147–172, 2016.
- [40] D. V. Voronin *et al.*, "In Vitro and in Vivo Visualization and Trapping of Fluorescent Magnetic Microcapsules in a Bloodstream," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 8, pp. 6885–6893, 2017.
- [41] O. K. Arriortua *et al.*, "RGD-Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for magnetic hyperthermia," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 165, pp. 315–324, 2018.
- [42] W. S. Aronow, "Cardiovascular System," *Encycl. Biomed. Gerontol.*, pp. 351–356, Jan. 2020.
- [43] I. Khan, K. Saeed, and I. Khan, "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," *Arab. J. Chem.*, vol. 12, no. 7, pp. 908–931, Nov. 2019.
- [44] S. Gaarn, "Assessing human health and environmental hazards of nanomaterials-Best practice for REACH Registrants," no. January, pp. 21–22, 2013.
- [45] T. S. Qiu, X. H. Fang, H. Q. Wu, Q. H. Zeng, and D. M. Zhu, "Leaching behaviors of iron and aluminum elements of ion-absorbed-rare-earth ore with a new impurity depressant," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)*, vol. 24, no. 9, pp. 2986–2990, 2014.
- [46] H. Strasser, H. Brunner, and F. Schinner, "Leaching of iron and toxic heavy metals from anaerobically-digested sewage sludge," *J. Ind. Microbiol.*, vol. 14, no. 3–4, pp. 281–287, 1995.
- [47] M. L. Guerinot, "Microbial Iron Transport," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 48, no. 1, pp. 743–772, 1994.
- [48] J. W. Anthony, R. A. Bideaux, K. W. Bladh, and M. C. Nichols, "Handbook of Mineralogy Crystal Data," *Mineral. Soc. Am.*, p. 657, 2001.
- [49] E. Zaki, Z. Jakub, F. Mirabella, G. S. Parkinson, S. Shaikhutdinov, and H. J. Freund,

- "Water Ordering on the Magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Surfaces," *J. Phys. Chem. Lett.*, vol. 10, no. 10, pp. 2487–2492, 2019.
- [50] L. Minerals *et al.*, "Magnetite," pp. 1–6, 2008.
- [51] Q. Li, C. W. Kartikowati, S. Horie, T. Ogi, T. Iwaki, and K. Okuyama, "Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–4, 2017.
- [52] J. Liu, S. Z. Qiao, Q. H. Hu, and G. Q. Lu, "Magnetic nanocomposites with mesoporous structures: Synthesis and applications," *Small*, vol. 7, no. 4, pp. 425–443, 2011.
- [53] H. Ahmad Panahi and H. S. Alaei, "β-Cyclodextrin/thermosensitive containing polymer brushes grafted onto magnetite nano-particles for extraction and determination of venlafaxine in biological and pharmaceutical samples," *Int. J. Pharm.*, vol. 476, no. 1, pp. 178–184, 2014.
- [54] F. Tian *et al.*, "Fates of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> at SiO<sub>2</sub> nanoparticles in human mesenchymal stem cells assessed by synchrotron radiation-based techniques," *Biomaterials*, vol. 35, no. 24, pp. 6412–6421, 2014.
- [55] M. Jouyandeh *et al.*, "Curing behavior of epoxy/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposites: A comparison between the effects of bare Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/chitosan and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/chitosan/imide/phenylalanine-modified nanofillers," *Prog. Org. Coatings*, vol. 123, no. May, pp. 10–19, 2018.
- [56] X. Hu, Y. Wang, L. Zhang, M. Xu, J. Zhang, and W. Dong, "Design of a pH-sensitive magnetic composite hydrogel based on salectan graft copolymer and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> nanoparticles as drug carrier," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 107, pp. 1811–1820, 2018.
- [57] Y. Deng, D. Qi, C. Deng, X. Zhang, and D. Zhao, "Superparamagnetic high-magnetization microspheres with an Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core and perpendicularly aligned mesoporous SiO<sub>2</sub> shell for removal of microcystins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, no. 1, pp. 28–29, 2008.
- [58] M. Mostafaei, S. N. Hosseini, M. Khatami, A. Javidanbardan, A. A. Sepahy, and E. Asadi, "Isolation of recombinant Hepatitis B surface antigen with antibody-conjugated superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> core-shell nanoparticles," *Protein Expr. Purif.*, vol. 145, no. September 2017, pp. 1–6, 2018.
- [59] L. Yang, N. Li, K. Wang, X. Hai, J. Liu, and F. Dang, "A novel peptide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-Au nanocomposite-based fluorescence biosensor for the highly selective and sensitive detection of prostate-specific antigen," *Talanta*, vol. 179, no. September 2017, pp. 531–537, 2018.
- [60] S. Luo, Y. Liu, H. Rao, Y. Wang, and X. Wang, "Fluorescence and magnetic nanocomposite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@Au MNPs as peroxidase mimetics for glucose detection," *Anal. Biochem.*, vol. 538, pp. 26–33, 2017.
- [61] D. M. de Santiago Colín *et al.*, "Sonochemical coupled synthesis of Cr-TiO<sub>2</sub> supported on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> structures and chemical simulation of the degradation mechanism of Malachite Green dye," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 364, no. May, pp. 250–261, 2018.

- [62] A. L. Linsebigler, G. Lu, and J. T. Yates, "Photocatalysis on TiO<sub>2</sub> Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results," *Chem. Rev.*, vol. 95, no. 3, pp. 735–758, May 1995.
- [63] H. L. Ding, Y. X. Zhang, S. Wang, J. M. Xu, S. C. Xu, and G. H. Li, "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>core/shell nanoparticles: The silica coating regulations with a single core for different core sizes and shell thicknesses," *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 23, pp. 4572–4580, 2012.
- [64] Z. Zhang *et al.*, "Influence of exposed magnetic nanoparticles and their application in chemiluminescence immunoassay," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 520, pp. 335–342, May 2017.
- [65] S. Dembski, C. Schneider, B. Christ, and M. Retter, *Core-shell nanoparticles and their use for in vitro and in vivo diagnostics*. Elsevier Ltd, 2018.
- [66] F. Ahmadpoor, A. Masood, N. Feliu, W. J. Parak, and S. A. Shojaosadati, "The Effect of Surface Coating of Iron Oxide Nanoparticles on Magnetic Resonance Imaging Relaxivity," *Front. Nanotechnol.*, vol. 3, no. April, pp. 1–12, 2021.
- [67] M. A. M. Tarkistani, V. Komalla, and V. Kayser, "Recent Advances in the Use of Iron – Gold Hybrid Nanoparticles for Biomedical Applications," 2021.
- [68] J. Zaloga, C. Janko, R. Agarwal, J. Nowak, and R. Müller, "Different Storage Conditions Influence Biocompatibility and Physicochemical Properties of Iron Oxide Nanoparticles," no. March, pp. 9368–9384, 2015.
- [69] M. Widdrat, M. Kumari, É. Tompa, M. Pósfai, A. M. Hirt, and D. Faivre, "Keeping Nanoparticles Fully Functional : Long-Term Storage and Alteration of Magnetite," pp. 1225–1233, 2014.
- [70] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W. S. Kim, "Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 16, no. 2, p. 23501, 2015.
- [71] V. I. Shubayev, T. R. Pisanic, and S. Jin, "Magnetic nanoparticles for theragnostics ☆," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 61, no. 6, pp. 467–477, 2009.
- [72] F. Lopez-Campos, D. Candini, E. Carrasco, and M. A. Berenguer Francés, "Nanoparticles applied to cancer immunoregulation," *Reports Pract. Oncol. Radiother.*, vol. 24, no. 1, pp. 47–55, 2019.
- [73] B. Siddhardha and P. Parasuraman, *Theranostics application of nanomedicine in cancer detection and treatment*. Elsevier Inc., 2019.
- [74] A. Avasthi *et al.*, *Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents*. Springer International Publishing, 2020.
- [75] S. Mourdikoudis, A. Kostopoulou, and A. P. LaGrow, "Magnetic Nanoparticle Composites: Synergistic Effects and Applications," *Adv. Sci.*, vol. 2004951, pp. 1–57, 2021.
- [76] N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, and I. Kammakakam, "Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges," *Mater. Adv.*, vol. 2, no. 6, pp. 1821–1871, 2021.
- [77] G. Singh *et al.*, "Coumarin–derived Organosilatrane: Functionalization at magnetic silica surface and selective recognition of Hg<sup>2+</sup> ion," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol.

- 266, pp. 861–872, 2018.
- [78] X. Pham *et al.*, “Silica-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Grafted onto Graphene Oxide for Protein Isolation,” pp. 1–14, 2020.
- [79] Z. Sharafi, B. Bakhshi, J. Javidi, and S. Adrangi, “Synthesis of Silica-coated Iron Oxide Nanoparticles: Preventing Aggregation without Using Additives or Seed Pretreatment,” vol. 17, no. July 2017, pp. 386–395, 2018.
- [80] W. Stober, A. Fink, and E. Bohn, “Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 26, no. 1, pp. 62–69, 1968.
- [81] G. B. Arfken, D. F. Griffing, D. C. Kelly, and J. Priest, “Magnetism and the Magnetic Field,” in *International Edition University Physics*, 1984, pp. 602–627.
- [82] C. M. Schneider and J. Kirschner, “Magnetism at surfaces and in ultrathin films,” in *Handbook of Surface Science*, vol. 2, 2000, pp. 511–668.
- [83] A. Hernando, M. A. García, F. Gálvez, and F. Guinea, “Direct and inverse spin Hall effects: Zeeman energy,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 500, no. September 2019, pp. 2–5, 2020.
- [84] C. Binns, *Nanomagnetism: Fundamentals and Applications*. Elsevier, 2014.
- [85] W. SASLOW, *The Magnetism of Magnets*. Thomson Learning, Inc., 2002.
- [86] Y. H. Chen and J. F. Zhang, “Effect of crystal morphology on magnetic structure of nano-magnetites,” *Solid State Commun.*, vol. 250, no. September 2016, pp. 92–98, 2017.
- [87] I. Reference and E. Level, “Silica (crystalline, respirable),” no. February, pp. 1–48, 2005.
- [88] D. R. Askeland, P. P. Fulay, and W. J. Wright, *The science and engineering of materials*, 6th ed. CENGAGE Learning, 2009.
- [89] C. Kittel, “Introduction to Solid State.” 2004.
- [90] Y. Sun *et al.*, “Sonochemical fabrication of reduction-responsive magnetic starch-based microcapsules,” *Ultrason. Sonochem.*, vol. 49, no. March, pp. 169–174, 2018.
- [91] Q. Ruan *et al.*, “Ultrasonic-irradiation-assisted oriented assembly of ordered monetite nanosheets stacking,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 113, no. 4, pp. 1100–1106, 2009.
- [92] A. Morel *et al.*, “Sonochemical Approach to the Synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> Core/Shell Nanoparticles with Tunable Properties,” *ACS Nano*, vol. 2, no. 5, pp. 847–856, 2008.
- [93] F. Grieser, M. Ashokkumar, and J. Z. Sostaric, “Sonochemistry and Sonoluminescence in Colloidal Systems,” in *Sonochemistry and Sonoluminescence*, Dordrecht: Springer Netherlands, 1999, pp. 345–362.
- [94] K. S. Suslick, “Sonochemistry,” *Compr. Coord. Chem. II*, vol. 1, pp. 731–739, 2004.
- [95] F. Dang, K. Kato, H. Imai, S. Wada, H. Haneda, and M. Kuwabara, “Oriented aggregation of BaTiO<sub>3</sub> nanocrystals and large particles in the ultrasonic-assisted synthesis,” *CrystEngComm*, vol. 12, no. 11, pp. 3441–3444, 2010.
- [96] S. E. Skrabalak and K. S. Suslick, “Porous MoS<sub>2</sub> synthesized by ultrasonic spray pyrolysis,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 28, pp. 9990–9991, 2005.

- [97] S. Sarpong-Kumankomah, M. A. Gibson, and J. Gailer, "Organ damage by toxic metals is critically determined by the bloodstream," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 374, pp. 376–386, 2018.
- [98] G. J. Tortora and B. Derrickson, *Principios de anatomía y fisiología*, 11th ed. 2013.
- [99] K. Rogers, *The Cardiovascular System (The Human Body)*. Britannica Educational Publishing, 2010.
- [100] K. W. Park, H. B. Dai, E. Lowenstein, and F. W. Sellke, "Vasomotor responses of rat coronary arteries to isoflurane and halothane depend on preexposure tone and vessel size," *Anesthesiology*, vol. 54, no. 3, pp. 227–236, 1981.
- [101] P. A. Iazzo, *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices: Second edition*. Humana Press, 2005.
- [102] M. S. Cook and A. J. Weinhaus, *Anatomy of the thoracic wall, pulmonary cavities, and mediastinum*. 2015.
- [103] W. N. Missaoui, R. D. Arnold, and B. S. Cummings, "Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 295, no. July, pp. 1–12, 2018.
- [104] A. A. Selim, A. Al-Sunaidi, and N. Tabet, "Effect of the surface texture and crystallinity of ZnO nanoparticles on their toxicity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 8, pp. 2356–2360, 2012.
- [105] F. Turci *et al.*, "Revisiting the paradigm of silica pathogenicity with synthetic quartz crystals: The role of crystallinity and surface disorder," *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [106] H. Schulz *et al.*, "Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles.," *J. Aerosol Med.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–22, 2005.
- [107] E. D'Angelo, "Cerebellar Granule Cell," in *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, Dordrecht: Springer Netherlands, 2013, pp. 765–791.
- [108] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, "Eggs," 2002.
- [109] D. R. Tobergte and S. Curtis, *Molecular biology of the cell*, vol. 53, no. 9. 2013.
- [110] L. Dean, "Blood and the cells it contains," 2005.
- [111] M. Kendall, P. Ding, and K. Kendall, "Particle and nanoparticle interactions with fibrinogen: The importance of aggregation in nanotoxicology," *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 1, pp. 55–65, 2011.
- [112] H. Bahadar, F. Maqbool, K. Niaz, and M. Abdollahi, "Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models," *Iran. Biomed. J.*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [113] M. Auffan *et al.*, "In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cyto-genotoxicological study," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, no. 14, pp. 4367–4373, 2006.
- [114] V. Stone *et al.*, "Nanomaterials for environmental studies: Classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 7, pp. 1745–1754, 2010.



- [115] K. Shimizu, H. Nakamura, and S. Watano, "MD simulation study of direct permeation of a nanoparticle across the cell membrane under an external electric field," *Nanoscale*, vol. 8, no. 23, pp. 11897–11906, 2016.
- [116] B. Jespersen, N. R. Tykocki, S. W. Watts, and P. J. Cobbett, "Measurement of Smooth Muscle Function in the Isolated Tissue Bath- applications to Pharmacology Research," no. January, pp. 1–9, 2015.
- [117] H. M. Jones and K. Rowland-Yeo, "Basic concepts in physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development," *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, vol. 2, no. 8, pp. 1–12, 2013.
- [118] B. Kappler *et al.*, "Investigating the physiology of normothermic ex vivo heart perfusion in an isolated slaughterhouse porcine model used for device testing and training," *BMC Cardiovasc. Disord.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–16, 2019.
- [119] PanLab Laboratories, "TRANSDUCERS (Panlab) For experiments involving isolated tissues and organs," 2020. [Online]. Available: <https://panlab.com/en/products/transducers-panlab>. [Accessed: 10-Nov-2023].
- [120] A. Arsyad and G. P. Dobson, "Adenosine relaxation in isolated rat aortic rings and possible roles of smooth muscle Kv channels, KATP channels and A2a receptors," *BMC Pharmacol. Toxicol.*, vol. 17, no. 1, p. 23, May 2016.
- [121] M. Watanabe and T. Okada, "Langendorff Perfusion Method as an Ex Vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats," in *Test*, vol. 1937, no. 1992, 2018, pp. 107–116.
- [122] O. Langendorff, "Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen," vol. 4, no. 3, pp. 57–71, 1895.
- [123] C. Gonzalez *et al.*, "16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation," *Endocrinology*, vol. 145, no. 12, pp. 5714–5722, 2004.
- [124] B. B. Hafen and B. Burns, *Anatomy, Smooth Muscle*. StatPearls Publishing, 2020.
- [125] S. Dhein, F. W. Mohr, and M. Delmar, *Practical methods in cardiovascular research*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005.
- [126] I. Y. Kuo and B. E. Ehrlich, "Signaling in muscle contraction," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 7, no. 2, 2015.
- [127] M. D. Bootman and G. Bultynck, "Fundamentals of Cellular Calcium Signaling: A Primer.," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 12, no. 1, p. a038802, Jan. 2020.
- [128] I. Y. T. Kuo, S. E. Wölfle, and C. E. Hill, "T-type calcium channels and vascular function: The new kid on the block?," *J. Physiol.*, vol. 589, no. 4, pp. 783–795, 2011.
- [129] K. J. Chuang *et al.*, "Effects of zinc oxide nanoparticles on human coronary artery endothelial cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 93, pp. 138–144, 2016.
- [130] S. A. Mohamed *et al.*, "Locally different endothelial nitric oxide synthase protein levels in ascending aortic aneurysms of bicuspid and tricuspid aortic valve," *Cardiol. Res. Pract.*, vol. 1, no. 1, 2012.
- [131] P. Pacaud and T. B. Bolton, "Relation between muscarinic receptor cationic current and internal calcium in guinea-pig jejunal smooth muscle cells.," *J. Physiol.*, vol. 441, no. 1, pp. 477–499, 1991.

- [132] T. B. Bolton and S. P. Lim, "Action of acetylcholine on smooth muscle.," *Z. Kardiol.*, vol. 80 Suppl 7, pp. 73–7, 1991.
- [133] C. E. Cooper, "Nitric oxide and iron proteins," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1411, no. 2–3, pp. 290–309, 1999.
- [134] M. Hernández, D. Prieto, U. Simonsen, L. Rivera, M. V. Barahona, and A. García-Sacristán, "Noradrenaline modulates smooth muscle activity of the isolated intravesical ureter of the pig through different types of adrenoceptors," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 107, no. 4, pp. 924–931, 1992.
- [135] G. Haeusler, "Relationship between noradrenaline-induced depolarization and contraction in vascular smooth muscle," *Blood Vessels*, vol. 15, no. 1–3, pp. 46–54, 1978.
- [136] H. Karaki, N. Urakawa, and P. Kutsky, "Potassium-induced contraction in smooth muscle," *Japanese J. Smooth Muscle Res.*, vol. 20, no. 6, pp. 427–444, 1984.
- [137] P. Aisen, C. Enns, and M. Wessling-Resnick, "Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 33, no. 10, pp. 940–959, 2001.
- [138] A. G. Quintero-Gutiérrez, G. González-Rosendo, J. Sánchez-Muñoz, J. Polo-Pozo, and J. J. Rodríguez-Jerez, "Bioavailability of heme iron in biscuit filling using piglets as an animal model for humans," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 4, no. 1, pp. 58–62, 2008.
- [139] N. Abbaspour, R. Hurrell, and R. Kelishadi, "Review on iron and its importance for human health.," *J. Res. Med. Sci.*, vol. 19, no. 2, pp. 164–74, Feb. 2014.
- [140] N. Lehnert *et al.*, "The Biologically Relevant Coordination Chemistry of Iron and Nitric Oxide: Electronic Structure and Reactivity," *Chem. Rev.*, vol. 121, no. 24, pp. 14682–14905, 2021.
- [141] R. Gozalbes, J. V. de Julián-Ortiz, and C. Fito-López, "Métodos computacionales en toxicología predictiva: Aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria reach," *Rev. Toxicol.*, vol. 31, no. 2, pp. 157–167, 2015.
- [142] R. S. Sexton, R. E. Dorsey, and J. D. Johnson, "Optimization of neural networks: A comparative analysis of the genetic algorithm and simulated annealing," *Eur. J. Oper. Res.*, vol. 114, no. 3, pp. 589–601, 1999.
- [143] S. Pirela *et al.*, "Effects of copy center particles on the lungs: A toxicological characterization using a Balb/c mouse model," *Inhal. Toxicol.*, vol. 25, no. 9, pp. 498–508, 2013.
- [144] D. H. Kim *et al.*, "Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction," *Nat. Mater.*, vol. 9, no. 2, pp. 165–171, 2010.
- [145] B. Banerji, S. K. Pramanik, S. Mandal, N. C. Maiti, and K. Chaudhuri, "Synthesis, characterization and cytotoxicity study of magnetic (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles and their drug conjugate," *RSC Adv.*, vol. 2, no. 6, pp. 2493–2497, 2012.
- [146] C. Syms, "Principal Components Analysis," *Encycl. Ecol. Five-Volume Set*, pp. 2940–2949, 2008.
- [147] T. Sapatinas, *Statistics for high-dimensional data*, vol. 39, no. 10. 2012.
- [148] J. Ju, "Quantitative Understanding in Biology 3 . 4 Principal Component Analysis The

- core concept : Change of basis," vol. 1, pp. 1–17, 2015.
- [149] F. Yao, J. Coquery, and K. A. Lê Cao, "Independent Principal Component Analysis for biologically meaningful dimension reduction of large biological data sets," *BMC Bioinformatics*, vol. 13, no. 1, 2012.
- [150] J. Lever, M. Krzywinski, and N. Altman, "Points of Significance: Principal component analysis," *Nat. Methods*, vol. 14, no. 7, pp. 641–642, 2017.
- [151] B. Ankamwar and A. Thorat, "Rod-shaped magnetite nano/microparticles synthesis at ambient temperature," *J. Chem.*, vol. 2013, 2013.
- [152] H. Liu, S. Ji, H. Yang, H. Zhang, and M. Tang, "Ultrasonic-assisted ultra-rapid synthesis of monodisperse meso-SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> microspheres with enhanced mesoporous structure," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 21, no. 2, pp. 505–512, 2014.
- [153] D. B. B. Marky Pitts, Kathryn Bayne, Lynn C. anderson, "Care and Use Institutional Animal Care and Use," *Sect. B*, pp. 43–49, 2002.
- [154] M. Skrzypiec-Spring, B. Grotthus, A. Szelag, and R. Schulz, "Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 55, no. 2, pp. 113–126, 2007.
- [155] C. Gonzalez, G. Navarro Tovar, and M. A. Ramírez Lee, "Perfil fisiológico de los nanomateriales," *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencia y Nanotecnología*, vol. 11, no. 20, p. 27, 2018.
- [156] N. S. Bryan and M. B. Grisham, "Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 43, no. 5, pp. 645–657, 2007.
- [157] P. Corporation, K. M. Miranda, M. G. Espey, and D. a Wink, "Griess Reagent System," *Nitric Oxide*, vol. 5, no. 1, p. 7, 2009.
- [158] J. L. Li, D. C. Li, S. L. Zhang, H. C. Cui, and C. Wang, "Analysis of the factors affecting the magnetic characteristics of nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particles," *Chinese Sci. Bull.*, vol. 56, no. 8, pp. 803–810, 2011.
- [159] G. E. Lloyd, "Atomic number and crystallographic contrast images with the SEM: a review of backscattered electron techniques," *Mineral. Mag.*, vol. 51, no. 359, pp. 3–19, 1987.
- [160] S. Shrestha, B. Wang, and P. Dutta, "Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 279, p. 102162, 2020.
- [161] N. Zhu *et al.*, "Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles," *Nanomaterials*, vol. 8, no. 10, pp. 1–27, 2018.
- [162] M. Kędzierska *et al.*, "The synthesis methodology of pegylated fe<sub>3</sub>o<sub>4</sub>@ag nanoparticles supported by their physicochemical evaluation," *Molecules*, vol. 26, no. 6, 2021.
- [163] S. Karmakar, "Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface Charge Distribution of Charged Colloids," *Recent Trends Mater. Phys. Chem.*, pp. 117–159, 2019.
- [164] V. Pilati, G. Gomide, R. C. Gomes, and G. F. Goya, "Colloidal Stability and Concentration Effects on Nanoparticle Heat Delivery for Magnetic Fluid Hyperthermia," 2021.

- [165] B. Cortés-Illanos *et al.*, “Influence of coating and size of magnetic nanoparticles on cellular uptake for in vitro mri,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 11, pp. 1–20, 2021.
- [166] L. Maldonado-Camargo, M. Unni, and C. Rinaldi, “Magnetic Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications,” in *Sugar Milling*, vol. I, no. March 2019, 2017, pp. 47–71.
- [167] L. Tauxe, T. Pick, and C. Constable, “Wasp-waists, pot-bellies, and superparamagnetism,” *J. Geophys. Res. B Solid Earth*, vol. 101, no. 95, pp. 571–583, 1996.
- [168] M. Benz, “Superparamagnetism : Theory and Applications,” 2012.
- [169] L. Tauxe, T. A. T. Mullender, and T. Pick, “Potbellies, wasp-waists, and superparamagnetism in magnetic hysteresis,” *J. Geophys. Res. Solid Earth*, vol. 101, no. 1, pp. 571–583, 1996.
- [170] D. D. Stueber, J. Villanova, I. Aponte, Z. Xiao, and V. L. Colvin, “Magnetic nanoparticles in biology and medicine: Past, present, and future trends,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 7, 2021.
- [171] L. M. Kustov *et al.*, “Silicon nanoparticles: characterization and toxicity studies,” *Environ. Sci. Nano*, vol. 5, no. 12, pp. 2945–2951, 2018.
- [172] L. F. Espinosa-Cristobal *et al.*, “Toxicity, distribution, and accumulation of silver nanoparticles in Wistar rats,” *J. Nanoparticle Res.*, vol. 15, no. 6, 2013.
- [173] A. Khorsand Zak, W. H. Abd. Majid, M. E. Abrishami, and R. Yousefi, “X-ray analysis of ZnO nanoparticles by Williamson-Hall and size-strain plot methods,” *Solid State Sci.*, vol. 13, no. 1, pp. 251–256, 2011.
- [174] S. Savliwala *et al.*, “Magnetic nanoparticles,” in *Nanoparticles for Biomedical Applications*, Elsevier, 2020, pp. 195–221.
- [175] K. Dinov, K. Ishigure, C. Matsuura, and D. Hiroishi, “Solubility of magnetite in high temperature water and an approach to generalized solubility computations,” *J. Nucl. Mater.*, vol. 207, no. C, pp. 266–273, 1993.
- [176] V. Mote, Y. Purushotham, and B. Dole, “Williamson-Hall analysis in estimation of lattice strain in nanometer-sized ZnO particles,” *J. Theor. Appl. Phys.*, vol. 6, no. 1, 2012.
- [177] S. P. Schwaminger, D. Bauer, P. Fraga-García, F. E. Wagner, and S. Berensmeier, “Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties,” *CrystEngComm*, vol. 19, no. 2, pp. 246–255, 2017.
- [178] R. Nadarajah *et al.*, “Controlling the oxidation of magnetic and electrically conductive solid-solution iron-rhodium nanoparticles synthesized by laser ablation in liquids,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 12, pp. 1–16, 2020.
- [179] J. R. Vargas-Ortíz, H. N. Böhnelt, C. Gonzalez, and K. Esquivel, “Magnetic nanoparticle behavior evaluation on cardiac tissue contractility through Langendorff rat heart technique as a nanotoxicology parameter,” *Appl. Nanosci.*, vol. 11, no. 9, pp. 2383–2396, Sep. 2021.
- [180] A. Rafieepour *et al.*, “Investigation of the effect of magnetite iron oxide particles size on cytotoxicity in A549 cell line,” *Toxicol. Ind. Health*, vol. 35, no. 11–12, pp. 703–

- 713, 2019.
- [181] D. Zanella, E. Bossi, R. Gornati, C. Bastos, N. Faria, and G. Bernardini, "Iron oxide nanoparticles can cross plasma membranes," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–10, 2017.
- [182] H. Wei, Y. Hu, J. Wang, X. Gao, X. Qian, and M. Tang, "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Cytotoxicity, metabolism, and cellular behavior in biomedicine applications," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, no. July, pp. 6097–6113, 2021.
- [183] D. C. Bartos, E. Grandi, and C. M. Ripplinger, "Ion channels in the heart," *Compr. Physiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 1423–1464, 2015.
- [184] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: Regulation and function," *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, pp. 829–837, 2012.
- [185] S. P. Schwaminger, D. Bauer, P. Fraga-García, F. E. Wagner, and S. Berensmeier, "Oxidation of magnetite nanoparticles: impact on surface and crystal properties," *CrystEngComm*, vol. 19, no. 2, pp. 246–255, 2017.
- [186] C. P. Biphenyls, "HHS Public Access," vol. 91, no. 2, pp. 165–171, 2015.
- [187] G. Müller-Strahl, K. Kottenberg, H. G. Zimmer, E. Noack, and G. Kojda, "Inhibition of nitric oxide synthase augments the positive inotropic effect of nitric oxide donors in the rat heart," *J. Physiol.*, vol. 522, no. 2, pp. 311–320, 2000.
- [188] S. R. Lynch, "Interaction of Iron with Other Nutrients," *Nutr. Rev.*, vol. 55, no. 4, pp. 102–110, 2009.
- [189] I. Fleming, "Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 459, no. 6, pp. 793–806, 2010.
- [190] S. Engström and J. D. Bowman, "Magnetic resonances of ions in biological systems," *Bioelectromagnetics*, vol. 25, no. 8, pp. 620–630, 2004.
- [191] Q. Li, J.-Y. Yon, and H. Cai, "Mechanisms and Consequences of eNOS Dysfunction in Hypertension," *J. Hypertens.*, vol. 33, no. 6, pp. 1128–1136, 2015.
- [192] F. Shen and J. K. Park, "Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles Based on Cellular Magnetic Loading Using Magnetophoretic Sorting in a Trapezoidal Microchannel," *Anal. Chem.*, vol. 90, no. 1, pp. 920–927, 2018.
- [193] N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, and G. Bao, "The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction," *Nanomedicine*, vol. 11, no. 6, pp. 673–692, Mar. 2016.
- [194] E. J. Calabrese and M. P. Mattson, "How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?," *npj Aging Mech. Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [195] J. Zhao, J. Brugger, and A. Pring, "Mechanism and kinetics of hydrothermal replacement of magnetite by hematite," *Geosci. Front.*, vol. 10, no. 1, pp. 29–41, 2019.
- [196] A. Ramirez-Lee Manuel *et al.*, "Evaluation of vascular tone and cardiac contractility in response to silver nanoparticles, using Langendorff rat heart preparation," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 13, no. 4, pp. 1507–1518, 2017.
- [197] L. Torrisi and G. Costa, "Magnetic field to focalize and accelerate ions produced by ns laser-generated plasmas," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 59, no. SE, p. SEEG01, Apr. 2020.

- [198] W. Ulmer, "On the role of the interactions of ions with external magnetic fields in physiologic processes and their importance in chronobiology," *In Vivo*, vol. 16, no. 1, pp. 31–6, 2002.
- [199] E. A. Ko, M. Y. Song, R. Donthamsetty, A. Makino, and J. X. J. Yuan, "Tension measurement in isolated rat and mouse pulmonary artery," *Drug Discov. Today Dis. Model.*, vol. 7, no. 3–4, pp. 123–130, 2010.
- [200] M. G. Nieto López, "Fundamentos en la preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido." [Online]. Available: <https://docplayer.es/3046828-Fundamentos-en-la-preparacion-de-muestras-para-microscopia-electronica-de-barrido-m-c-maria-guadalupe-nieto-lopez.html>. [Accessed: 20-Mar-2020].
- [201] V. Everts, A. Niehof, W. Tigchelaar-Gutter, and W. Beertsen, *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, vol. 1914. 2019.
- [202] P. G. T. Howell, K. M. W. Davy, and A. Boyde, "Mean atomic number and backscattered electron coefficient calculations for some materials with low mean atomic number," *Scanning*, vol. 20, no. 1, pp. 35–40, Jan. 1998.
- [203] R. J. Hunter, *ZETA POTENTIAL IN COLLOID SCIENCE Principles and Application*, no. 1. 2014.
- [204] N. Saunders and A.P.Miodownik, "CALPHAD: Calculation of Phase Diagrams," *Pergamon Mater. Ser.*, vol. 1, no. C, pp. 61–87, 1998.
- [205] Y. Waseda, E. Matsubara, and K. Shinoda, *X-Ray Diffraction Crystallography*, vol. 46, no. 1. 2016.
- [206] D. Nath, F. Singh, and R. Das, "X-ray diffraction analysis by Williamson-Hall, Halder-Wagner and size-strain plot methods of CdSe nanoparticles- a comparative study," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 239, no. April 2019, p. 122021, 2020.

# Capítulo IX

## Apéndices

## VIII. Apéndices

### A.1. Solución fisiológica para la técnica de Langendorff

La preparación de la solución para la perfusión de corazón Langendorff se realiza en dos pasos como sigue:

#### A.1.1 Solución madre (stock 10x) (Tabla A 1).

*Tabla A 1.- Solución stock de la solución fisiológica. Almacenar a 4°C.*

| Sustancia                        | Gramos por cada litro a preparar | Concentración Final (mM) |
|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| NaCl                             | 68.84                            | 117.9                    |
| KCl                              | 4.47                             | 6.0                      |
| CaCl <sub>2</sub>                | 1.94                             | 1.7                      |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 1.44                             | 1.2                      |
| MgSO <sub>4</sub>                | 1.44                             | 1.2                      |

#### A.1.2 Se toman **100ml** de la solución stock por cada **1Lt** de solución fisiológica de Krebs que se deseé preparar (Tabla A 2).

*Tabla A 2.- Solución de Krebs. Esta solución es preparada en el MOMENTO del experimento y NO puede ser almacenada.*

| Sustancia          | Gramos por cada litro a preparar | Concentración Final (mM) |
|--------------------|----------------------------------|--------------------------|
| NaHCO <sub>3</sub> | 2.03 g                           | 24.2                     |
| Dextrosa           | 0.90 g                           | 5.0                      |
| Piruvato           | 0.55 g                           | 5.0                      |
| Solución Stock     | 100 mL                           | -                        |

Un volumen adecuado a solución de Krebs se neutraliza a pH neutro (7.4) mediante un constante burbujeo de Carbógeno (**95% O<sub>2</sub>** y **5% CO<sub>2</sub>**) 15 minutos previos al experimento.

Esta solución se debe utilizar para realizar toda manipulación del corazón a **4°C** fuera del equipo para preservarlo.



## A.2. Solución fisiológica para la preparación de los anillos aislados

La preparación de la solución para la técnica de anillos aislados se realiza en un pasos como sigue:

### A.2.1 Solución 1x modificada de Krebs **Tabla A 3:**

**Tabla A 3.-** Solución fisiológica para anillos aórticos. Esta solución se almacena a 4°C.

| Reactivo  | Peso molecular (g/mol) | Concentración stock (M) | 1 L             | Concentración final (mM) |
|---|------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Cloruro de Sodio (NaCl)</b>  | 58.44                  | 2                       | 59              | 118                      |
| <b>Cloruro de Potasio (KCl)</b>                                       | 74.55                  | 2                       | 2.35            | 4.7                      |
| <b>Sulfato de Magnesio (MgSO<sub>4</sub>)</b>                         | 120.37                 | 0.25                    | 4.68            | 1.17                     |
| <b>Fosfato Monobásico de Potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>   | 136.09                 | 0.12                    | 10              | 1.2                      |
| <b>Cloruro de Calcio (CaCl<sub>2</sub>)</b>                           | 110.98                 | 0.5                     | 3.6             | 1.8                      |
|   |                        |                         | mg por preparar |                          |
| <b>Dextrosa</b>   | 180                    | NA                      | 1.8016          | 10.01                    |
| <b>HEPES (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S)</b> | 119.98                 | NA                      | 4.766           | 20                       |

La solución resultante debe ser neutralizada 7.4 pH y almacenada a 4°C.

### **A.3. Técnica de perfusión de corazón de Langendorff**

El sistema de tejidos aislados es un método confiable y tradicional para investigar la fisiología y farmacología de los vasos sanguíneos, las vías respiratorias y los intestinos. Los transductores adecuados pueden producir estímulos que proporcionan diversas señales. Es posible evaluar la contractilidad (medición isotónica) si se mantiene la longitud del tejido invariable, registrando la presión y la carga con un transductor piezoeléctrico (isométrico) y de esta forma observar las variaciones en el movimiento de segmentos de tejido (anillos aislados) [199]. Estos sistemas pueden utilizarse para investigar las diferentes respuestas fisiológicas y patológicas de órganos y tejidos. El modelo de corazón aislado de Langendorff es uno de estos modelos orgánicos que pueden mantener sus procesos fisiológicos durante un tiempo de viabilidad limitado. A diferencia de otros sistemas *ex vivo*, este sistema no es cerrado; en cambio, por los vasos coronarios del corazón pasa una solución fisiológica, manteniendo las funciones fisiológicas de oxigenación, temperatura y pH [155].

#### A.4. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Transmisión (TEM)

Similar a un microscopio óptico, el microscopio electrónico de barrido (SEM) usa un haz de electrones en lugar de luz visible ampliando pequeñas características y detalles más finos de los materiales en un grado mucho mayor en comparación con la luz visible, que de otra manera serían imperceptibles. Las imágenes se obtienen haciendo pasar el haz de electrones de alta energía escaneando la superficie del material, de ahí su nombre microscopio electrónico de barrido (scanning).

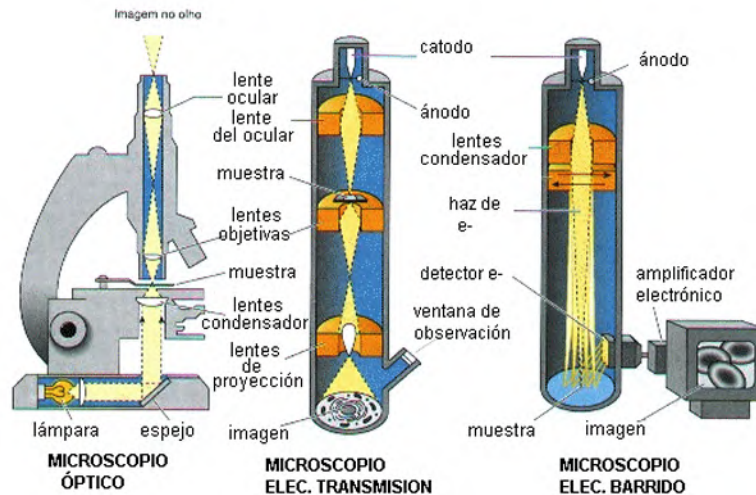
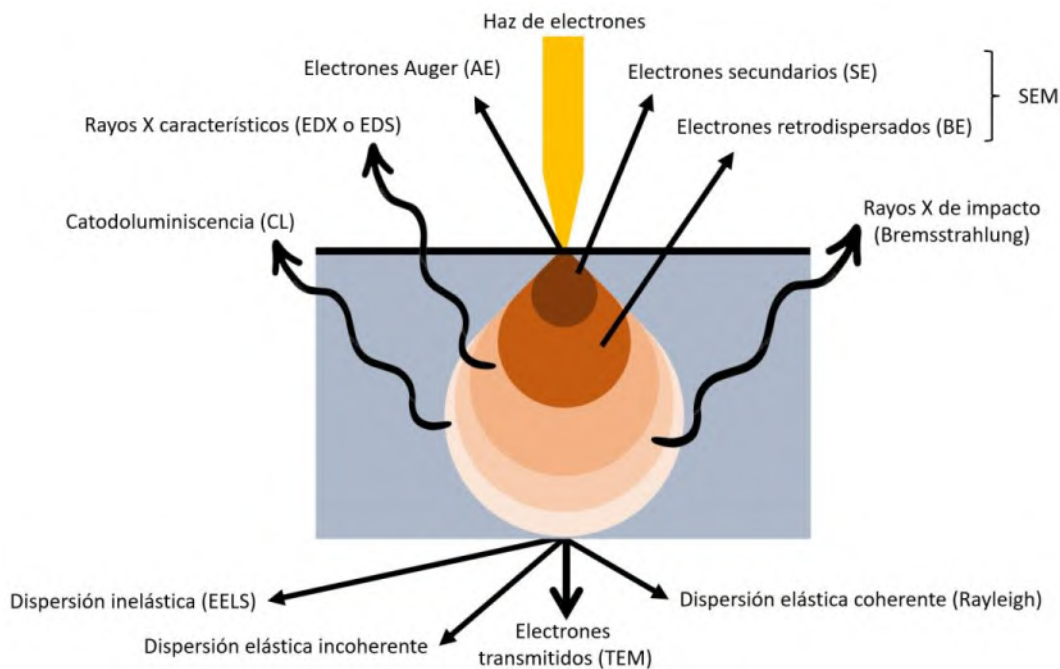


Figura A 1.- Similitudes en el diseño del microscopio óptico, microscopio de barrido y de transmisión [200].

Los electrones proyectados hacia un material pueden tener diferentes resultados: ser "reflejados" (retrodispersados) o proporcionar energía colisionando con electrones presentes en el material para ser liberados como electrones secundarios (**Figura A 2**). Estos electrones brindan otras formas de obtener información de las micrografías de electrones. Los electrones "primarios" son enfocados a un portamuestra de diámetro pequeño que se explora a través del material, gracias al hecho de que los campos electrostáticos o magnéticos se pueden aplicar al haz de electrones en ángulo recto para cambiar su dirección de desplazamiento. La muestra puede tener una superficie cuadrada (llamado también entramado) y reproducir una imagen de esta área mediante el registro y recolección de los datos que proveen los electrones secundarios al "barrer" cada punto de la muestra y escanear simultáneamente en dos direcciones perpendiculares.

Los microscopios, ópticos y electrónicos suelen tener una resolución limitada (escala más pequeña distinguible entre dos puntos) dependiendo de su menor longitud de onda disponible en su espectro; el ojo humano, por ejemplo, puede distinguir entre 0.2-0.1 mm, por lo que al utilizar longitudes de onda menores a 0.1 mm se puede clasificar a cualquier instrumento como microscopio. Como resultado, los microscopios electrónicos fueron desarrollados. Al querer observar objetos más pequeños, se requería aumentar la resolución con la luz visible (400-700 nm), y los lentes de vidrio pulido lograron observar objetos menores a 400 nm, pero una vez más, se requería una fuente luminosa más pequeña, los electrones (**Figura A 1**).



**Figura A 2.-** La interacción de un haz de electrones energético con una muestra delgada produce diferentes efectos cuánticos.

La producción de un amplio espectro de señales de muestra es una de las ventajas del uso de radiación ionizante (**Figura A 2**). El TEM tiene algunos inconvenientes, incluido el costo, la preparación de muestras biológicas y magnéticas, así como cualquier técnica de imagen de alta resolución requiere ver únicamente una pequeña parte de la muestra en cualquier momento y las capacidades de muestreo del instrumento, las cuales disminuyen con la resolución [201].

#### **A.4.1 Imágenes generadas con electrones secundarios (SE)**

El método de imagen más popular en un SEM es la imagen de electrones secundarios. A diferencia de los electrones principales en el haz de electrones incidente, los electrones secundarios son aquellos que han sido expulsados de los átomos dentro de la muestra misma, como sugiere su nombre. Sólo los SE que se producen extremadamente cerca de la superficie de la muestra escaparán (generalmente desde profundidades inferiores a 20 nm), ya que estos electrones suelen tener una energía relativamente baja (50 eV). Dado que los SE tienen un origen poco profundo, las imágenes de SE son un método muy sensible a la superficie con una alta resolución (hasta alrededor de 1 nm en SEM de emisión de campo) [159].

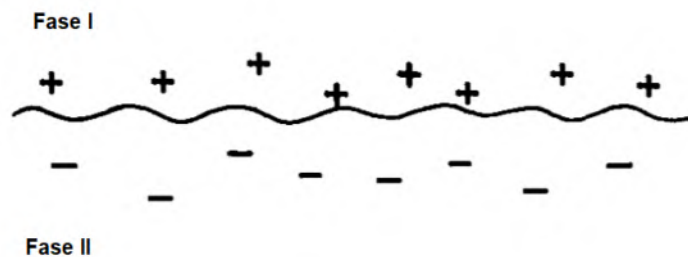
#### **A.4.2 Imágenes generadas con electrones retrodispersados (BSE)**

Los electrones primarios del haz de electrones incidente que se han dispersado hacia afuera del material se conocen como electrones retrodispersados. Los elementos con números atómicos más altos aparecerán más brillantes en la imagen porque la fracción de electrones primarios que dispersan fuera de la muestra depende de su número atómico. Para ver los cambios en la composición de la muestra, la imagen BSE también se conoce como imagen de contraste de número atómico (z). El número atómico del material (un z más alto ofrece una mejor resolución) y la energía del haz de electrones principal (un voltaje de aceleración más bajo brinda una mejor resolución, pero a menudo una señal más pobre) afectan la resolución espacial de las imágenes de BSE. Por lo general, la resolución varía desde unos pocos micrómetros hasta tan solo 10 nm. Dado que los cambios en la topografía también pueden influir en la señal de BSE, se pueden configurar numerosos detectores de BSE para proporcionar imágenes topográficas. Sin embargo, las muestras deben ser planas e, idealmente, pulidas para obtener imágenes de contraste z óptimas [159], [202].

### A.5. Potencial Zeta

Cuando dos fases, fase I y fase II, de distinta naturaleza entran en contacto, surge como resultado una diferencia de potencial entre las dos y, si la naturaleza de las fases varía, suponiendo una de las fases un líquido polar (agua) sus moléculas en dipolos se orientarán en una dirección específica en la interfaz cargada. De este modo, dependiendo de la naturaleza de la muestra y el solvente que la contenga, iones, dipolos o grupos iónicos presentes en la combinación de las dos fases, existe la tendencia de las cargas moleculares de distribuirse de forma no uniforme en toda la diferencia de potencial.

Este potencial electrostático depende de la carga de las fases presentes, si la fase I tiene una carga positiva, el potencial será positivo en relación con el límite de la fase II; sin embargo, si la fase II es presenta iones disueltos en su composición, el potencial electrostático se volverá negativo al cambiar de la fase I hacia la fase II y, por el contrario, a medida que se aleja de la fase I el potencial se reducirá a un valor "invariable" de carga en el interior del líquido lejos de la interface (**Figura A 3**). A esta diferencia de potencial "constante" presente en la mayoría de la suspensión (normalmente un líquido) se toma como la referencia, conocido como potencial cero.



*Figura A 3.- Distribución de dipolos inducidos de los excesos de cargas entre dos fases.*

Este potencial es conocido como potencial  $\zeta$  y es utilizado para calcular el comportamiento de los materiales en suspensión de los sistemas coloidales y su estabilidad en el medio (sedimentación) [203]. Muchas de las características cruciales de los sistemas coloidales de partículas están relacionadas con la carga eléctrica (o potencial). Esta carga y distribución potencial determina la adsorción de

iones y moléculas dipolares e indica la energía de interacción que existe entre las moléculas que conforman cada fase, que es responsable de la estabilidad de las partículas frente a la coagulación y de muchos aspectos del comportamiento del flujo de la suspensión coloidal.

### A.6. Susceptibilidad Magnética

Dado que los tratamientos térmicos producen transiciones de fase, pueden ocasionar también cambios en los momentos magnéticos de un material. La susceptibilidad magnética es una técnica útil para determinar los límites de fase y su fuerza de orientación magnética en estos sistemas magnéticos. Esta técnica utiliza un campo magnético para suspender la muestra sobre un péndulo. (**Figura A 4**).

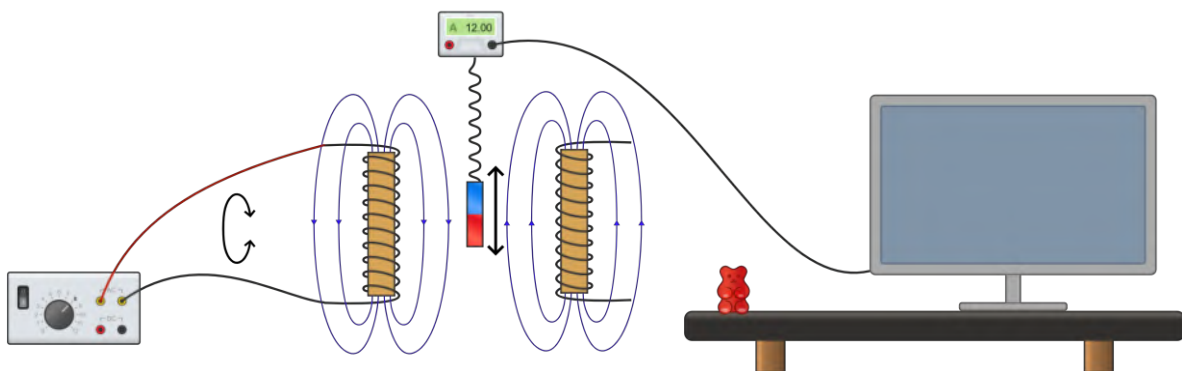


Figura A 4.- Diagrama del funcionamiento del magnetómetro.

Debido a los cambios en su magnetismo, la muestra se mueve de su posición mientras se calienta o enfría durante la transición de fase [204]. La corriente aplicada cambia el campo magnético ocasionando que el péndulo regrese a su posición inicial. Esta respuesta al campo magnético puede ser calculada como sigue:

$$\chi = \left(\frac{K}{m}\right) \cdot I^2 \quad 1$$

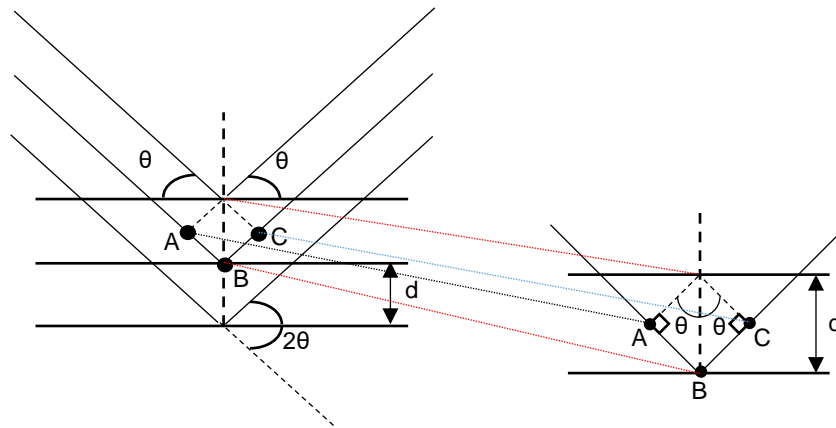
En la ecuación,  $\chi$  representa la **susceptibilidad magnética**,  $K$  representa una constante de susceptibilidad, específica de cada material,  $m$  es la masa del material y la corriente de compensación es representada por  $I$ .



### A.7. Difracción de Rayos X (XRD)

La radiación se dispersa como consecuencia de la colocación de centros a intervalos regulares que son equivalentes en distancia y tienen un área que es igual a la longitud de onda de incidencia de la radiación entrante. El resultado es la difracción. Esto puede causar niveles menores de difracción porque las longitudes en el eje de algunos rayos X son aproximadamente equivalentes a la separación entre planos atómicos en formaciones de cristales sólidos.

Cuando un material incidente se expone a un haz de rayos X con una longitud de onda del mismo orden de magnitud que el espacio atómico, los rayos X se dispersan en todas las direcciones. Sin embargo, los rayos X que se encuentran en planos cristalográficos particulares en ángulos precisos constituyen una interferencia constructiva más que destructiva, que cancela la mayoría de la radiación dispersada por un átomo. Difracción es el nombre que se le da a este fenómeno (**Figura A 5**). Esto sucede si y sólo si se satisface la ley de Bragg.



*Figura A 5.- Representación de la difracción de los rayos X dentro de una estructura cristalina.*

La ecuación de Bragg entonces queda definida como sigue:

$$\overline{AB} = \overline{B'C} = d \operatorname{sen} \theta$$

Entonces:

$$n\lambda = 2d \operatorname{sen} \theta$$

2

En esta ecuación,  $d$  representa la distancia interplanar,  $\theta$  el ángulo de dispersión, conocido como ángulo de Bragg, la radiación X producida por el cobre se representa por  $\lambda$  de y el orden de difracción indicado por  $n$ . La ecuación muestra cómo los cambios angulares de la radiación X difractada se relacionan con la longitud de onda  $\lambda$  incidente y el *espaciado de los planos interplanares*  $d$  presentes en la estructura cristalina. La ley de Bragg se puede tomar como una condición necesaria, mas no suficiente, para que la difracción se presente. Define las condiciones de difracción unicamente para celdas unitarias primitivas, conocidas como redes de Bravais [205].

### A.7.1 Método de Scherrer

La difracción de rayos X debido al efecto del tamaño cristalino y al efecto de deformación intrínseca, el pico se ensancha en los nanocristales, y este ensanchamiento del pico generalmente consta de dos partes: ensanchamiento instrumental y ensanchamiento físico. La siguiente relación se puede utilizar para corregir esta ampliación instrumental:

$$\beta_d^2 = \beta_m^2 - \beta_i^2$$

Donde  $\beta_m$  es el ensanchamiento medido,  $\beta_i$  es el ensanchamiento instrumental y  $\beta_d$  es el ensanchamiento corregido. En este caso, el silicio cristalino se ha utilizado como material de referencia estándar para la calibración de posición y el cálculo de ampliación instrumental. El ensanchamiento instrumental y el ensanchamiento físico de la muestra se midieron como ancho total a la mitad del máximo (FWHM). Usando el ensanchamiento físico corregido, podemos calcular el tamaño promedio de partícula con la ayuda de la ecuación de Scherrer:

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta_d \cos \theta}$$

### A.7.2 Método de Williamson-Hall

La fórmula de Scherrer solo toma en cuenta el impacto del tamaño de los cristalitos en el ensanchamiento del pico XRD, pero no tiene en cuenta las microestructuras

de la red, es decir, la tensión intrínseca que se desarrolla en los nanocristales como resultado de defectos puntuales, límites de grano, fallas de unión triple y apilamiento [206]. Varios métodos, incluido el método de Williamson-Hall y el método de Warren-Averbach, incluyen el efecto del “ensanchamiento” de las reflexiones obtenidas en XRD aunado a la deformación. Estos métodos pueden utilizarse para calcular la deformación intrínseca y el tamaño de la partícula. El método Williamson-Hall (W-H) es el más sencillo y simplificado de estos métodos [20,24].

Según el cual, el tamaño y la microdeformación de los nanocristales causan el ensanchamiento de la línea física de las reflexiones de difracción de rayos X, y el ensanchamiento total se puede escribir como:

$$\beta_{total} = \beta_{tamaño} + \beta_{tensión}$$

El modelo de deformación uniforme (UDM) considera una deformación uniforme en toda la dirección cristalográfica, que se introduce en los nanocristales debido a imperfecciones del cristal. En otras palabras, la UDM considera la deformación, que es de naturaleza isotrópica [22]. Esta tensión intrínseca en realidad afecta la ampliación física del perfil XRD y esta ampliación del pico inducida por la tensión se puede expresar como:

$$\left( \beta_{hkl} = \frac{K\lambda}{D \cos \theta} + 4\varepsilon \tan \theta \right)$$

### A.7.3 Análisis Rietveld

La difracción de rayos X se utiliza en la caracterización estructural de materiales cristalinos porque permite la determinación de la estructura cristalina del material, así como el examen cualitativo y cuantitativo de fases y defectos estructurales.

El método Rietveld es una técnica de refinamiento de estructuras cristalinas que originalmente se desarrolló para analizar patrones de difracción de neutrones, pero con el tiempo también se ha utilizado para analizar patrones de difracción de rayos-X con resultados excepcionalmente buenos. Parámetros de red, posiciones atómicas, tamaño de cristal, micro deformaciones y cuantificación de fases

crystalinas en la muestra a pesar de la superposición de picos de difracción se pueden obtener con mayor precisión con este potente método.

Este método implica ajustar un modelo teórico an un patrón experimental de difracción de rayos-x utilizando el método de mínimos cuadrados hasta encontrar el mejor ajuste entre ambos. El patrón de difracción calculado se basa en un modelo que incluye elementos estructurales (grupos espaciales, átomos en una unidad asimétrica, factores térmicos, etc.), microestructurales (concentración, tamaños de cristales, micro deformaciones) e instrumentales. La función que se reduce por mínimos cuadrados se denomina residuo, cuyo nombre es  $S_y$  y se calcula utilizando la fórmula siguiente:

$$S_y = \sum_i W_i (y_{i(obs)} - y_{i(calc)})^2$$

En esta función,  $y_{i(obs)}$  y  $y_{i(calc)}$  son las intensidades experimentales y calculadas en el punto  $i$  del patrón de difracción, respectivamente,  $W_i$  es el peso respectivo dado a estas intensidades mientras que la sumatoria es sobre todos los puntos del patrón de difracción.

El refinamiento Rietveld requiere una descripción precisa de la forma de los picos de difracción. La forma de los picos en un patrón de difracción varía como una función de  $2\theta$  entre la muestra (tamaño del cristal, micro deformaciones, defectos, etc.) y el instrumento (fuente de radiación, geometría utilizada, tamaño de las rejillas).

**A.8.      Código de análisis PCA. Software R y Rstudio**

```
1. res.pca <- prcomp(data, scale = TRUE)
2. res.pca
3.
4. fviz_eig(res.pca)
5. fviz_pca_ind(res.pca,
6.             col.ind = "cos2",
7.             gradient.cols = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
8.             repel = TRUE
9.           )
10.
11. fviz_pca_var(res.pca,
12.             col.var = "contrib",
13.             gradient.cols = c("#00AFBB", "#E7B800", "#FC4E07"),
14.             repel = TRUE
15.           )
16.
17. fviz_pca_biplot(res.pca, repel = TRUE,
18.                col.var = "#2E9FDF",
19.                col.ind = "#696969"
20.              )
21.
22. groups <- as.factor(data$Tipo)
23. groups
24. fviz_pca_ind(res.pca,
25.             col.ind = groups,
26.             scale_fill_manual(values=palette),
27.             addEllipses = TRUE,
28.             ellipse.type = "confidence",
29.             legend.title = "Groups",
30.             repel = TRUE
31.           )
```