

Informe final publicable de proyecto

Desarrollo de nanopartículas con propiedad de conversión ascendente para potenciales aplicaciones biomédicas

Código de proyecto ANII: FCE_3_2020_1_162287

Fecha de cierre de proyecto: 01/09/2023

KEUCHKERIAN, Romina (Responsable Técnico - Científico)

AGUIAR CANTERA, Ivana María (Investigador)

COSTA DE SANTANA, Ricardo (Investigador)

MARTINEZ LOPEZ, Wilner (Investigador)

PÉREZ BARTHABURU, María Eugenia (Investigador)

RODRIGUEZ, Mauricio (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
MINISTERIO DE EDUCACIÓN Y CULTURA. INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS "CLEMENTE ESTABLE" \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. CENTRO UNIVERSITARIO REGIONAL ESTE \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo, siendo el responsable de casi 10 millones de fallecimientos en 2020. Las terapias de uso más común para el tratamiento de varios tipos de cáncer son la quimioterapia y la radioterapia, y ampliamente conocidos son sus efectos secundarios. Buscando minimizar estos efectos y aumentar la eficacia de estas terapias, se investiga constantemente en el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento. Una de estas últimas es la terapia fotodinámica, que se considera un tratamiento prometedor y poco invasivo, y que actualmente se utiliza en el tratamiento de ciertos tipos de neoplasmas. La terapia fotodinámica involucra tres componentes; una fuente de luz específica, un fotosensibilizador y un sustrato (células) que contiene oxígeno y que al interaccionar con el fotosensibilizador produce especies reactivas de oxígeno, las cuales son citotóxicas. Debido a los fotosensibilizadores disponibles, se utiliza en general radiación de la región UV-visible en el tratamiento de cáncer de piel o de otras enfermedades superficiales, lo que limita su posible aplicación a zonas más profundas. En esta tesis se estudia la posibilidad utilizar nanopartículas de fluoroperoskitas (matriz $KMgF_3$) dopadas con Tierras Raras y con Metales de Transición que confieren la propiedad de conversión ascendente y por tanto la utilización de radiación IR de mayor penetración. Para ello, las nanopartículas fueron sintetizadas mediante el método solvotérmico. Se estudiaron distintas condiciones de síntesis y a partir del análisis del tamaño de partícula usando la técnica de difracción de rayos X y la microscopía electrónica de transmisión, se establecieron, utilizando herramientas estadísticas, las mejores condiciones de síntesis que permiten tener un tamaño de partícula menor a 50 nm. Esto demuestra que son adecuadas para la aplicación deseada. Posteriormente se prepararon nanopartículas dopadas con Eu^{3+} , Mn^{2+} , Nd^{3+} . Las propiedades ópticas de estas nanopartículas dopadas fueron estudiadas mediante reflectancia difusa, espectros de excitación y emisión correspondientes. A partir del análisis de los resultados se demostró el proceso de conversión ascendente en las muestras dopadas con Nd^{3+} y la emisión característica de Mn^{2+} necesarias para la aplicación. El sistema elegido permitiría ser utilizado en la preparación de nanopartículas para aplicaciones en la terapia fotodinámica.

Ingeniería y Tecnología / Nanotecnología / Nano-materiales (producción y propiedades) / Nanopartículas con propiedad de conversión ascendente de energía con aplicación en terapia fotodinámica

Palabras clave: Terapia termodinámica / Nanopartículas / Conversión ascendente /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo, responsable de casi 10 millones de fallecimientos en 2020 [1]. Las terapias de uso más común para el tratamiento de varios tipos de cáncer son la quimioterapia y la radioterapia, y ampliamente conocidos son sus efectos secundarios. Buscando minimizar estos efectos y aumentar la eficacia de estas terapias, se investiga constantemente en el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento. El gran incremento, hasta la fecha, de artículos publicados relacionados con terapias alternativas de cáncer es significativamente notorio (base de datos Scopus®). Estos temas preocupan especialmente al Grupo de Desarrollo de Materiales y Estudios Ambientales (GDMEA), donde se llevó a cabo esta Maestría, y se ha incursionado en ellos recientemente, precisamente en el desarrollo de nanopartículas sensibilizadoras para radioterapia [2]. En el trabajo que concierne a la Maestría nos enfocaremos en la terapia fotodinámica (TF), otra terapia alternativa cuyo interés ha aumentado en los últimos años debido a su potencial uso y a que ya hay tratamientos aprobados por la FDA.

La TF es una modalidad de tratamiento de enfermedades malignas y pre-malignas que se remonta a la antigüedad. Se considera un método de tratamiento prometedor con ventajas sobre las terapias tumorales convencionales, como efectos secundarios leves, toxicidad acumulada mínima, excelentes resultados funcionales y estéticos, tratamiento preciso del área a tratar y que además minimiza el daño a los tejidos normales vecinos, con una regresión tumoral óptima a largo plazo [3]. Las ventajas de esta terapia anteriormente mencionadas han permitido ampliar la gama de enfermedades objetivo. Por lo tanto, la TF se ha utilizado clínicamente para el tratamiento de diversas enfermedades (por ejemplo, cáncer, acné y degeneración macular relacionada con la edad) [4].

La TF involucra tres componentes claves: 1) una fuente de luz específica (que proporciona energía), 2) una molécula llamada fotosensibilizador (FS), que absorbe la energía proveniente de la radiación incidente para llevar a cabo una reacción fotodinámica específica, y 3) sustratos que contienen oxígeno (oxígeno molecular, agua) que, al interaccionar con los FS activados producen especies reactivas de oxígeno (ROS, "reactive oxygen species"), las cuales son citotóxicas [5][1]. Las ROS oxidan importantes biomoléculas (por ejemplo, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) y organelos intracelulares y destruyen células anormales o microorganismos, además inducen apoptosis o necrosis celular y dañan la matriz extracelular [4][2].

El nivel de profundidad en la piel que alcanza la TF depende de la longitud de onda utilizada para la excitación del FS. En general, se utiliza radiación de la región UV-visible en el tratamiento de cáncer de piel o de otras enfermedades superficiales [6] debido a que la excitación del FS se hace con luz de esa longitud de onda. Por ejemplo, la profundidad de penetración de la luz roja (645-700 nm), rango del espectro visible de mayor penetración en el tejido biológico, es solo de 1 a 3 mm, lo que imposibilita el tratamiento de tumores sólidos o profundos [7]. Por otro lado, la región del infrarrojo cercano (NIR), comprendida entre 700 y 1300 nm se conoce como la "ventana biológica", ya que presenta una gran profundidad de penetración. Sin embargo, por encima de 950 nm la absorción por parte del agua se vuelve muy importante y esta penetración en el tejido biológico disminuye considerablemente [8]. Por este motivo se han desarrollado FS con absorción en el rango 790-810 nm, pero han mostrado una eficiencia de generación de ROS baja [6].

Si bien se ha avanzado en el desarrollo de nuevos FS para aplicaciones en la región del infrarrojo, una estrategia alternativa que permitiría el uso de FS ya aprobados que absorben radiación de la región visible, es el desarrollo de nanopartículas (Nps) con la propiedad de conversión ascendente (CA) [9] que interaccionen localmente con el FS. En la Figura 1 del anexo se muestra un esquema del uso de las UCNps (término del inglés, *upconverting nanoparticles*) para tratamiento de tumores profundos con TF.

Existen algunos FS aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) para su uso en TF como es el caso de la pre-droga ácido 5-aminolevulínico (ALA o Levulan®), que presenta varias ventajas frente a otros FS. Además de su bajo costo es una molécula hidrofílica, presenta mayor selectividad por las células cancerosas y posee una fotosensibilidad concomitante reducida, lo que lleva a un mínimo daño en el tejido circundante [8]. Esta molécula es una pre-droga que se convierte en el fotosensibilizador protoporfirina IX (PpIX) mediante la vía biosintética hemo, mayoritariamente en células cancerígenas. Si bien el máximo de absorción del PpIX se encuentra a 405 nm, también presenta una banda más débil a 635 nm, y como ventaja esta longitud de onda tiene mejor penetración en el tejido biológico que la de 405 nm [10]. Esta molécula es actualmente estudiada para la TF, por ejemplo, se ha reportado una alta eficacia para el tratamiento de glioma mediante el ALA unido a nanoplateformas [11] y la evaluación de la eficacia diagnóstica de la citología urinaria fluorescente inducida por 5-ALA para el carcinoma urotelial [12], entre otras. Por lo tanto, en base a reportes bibliográficos, este FS podría ser utilizado para funcionalizar las UCNps.

Existen reportes recientes del desarrollo de Nps con propiedades de CA para su aplicación en TF, como es el caso de la estrategia de combinar Yb³⁺, Nd³⁺ y Er³⁺ como dopantes en una fluorperovskita (KMnF₃). Mediante un diseño racional de estas Nps con estructuras "core shell" se logra una emisión en la región de 650 nm utilizando una fuente de excitación de 800 nm [13]. Adicionalmente se puede mencionar, el desarrollo de Nps NaGdF₄:Yb,Er@NaGdF₄:Nd,Yb para TF y diagnóstico simultáneo a través de bioimagen de fluorescencia [14], como también Nps KMnF₃: Yb³⁺/Er³⁺ funcionalizadas con el FS ftalocianina de zinc (ZnPc) con una banda de absorción principal a 670 nm en busca de un método eficaz para matar bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR)[15].

Para cumplir con la funcionalidad prevista, el tamaño de las Nps deberá ser adecuado para ser introducidas en el torrente sanguíneo y alcanzar así las células que pueden ser objeto de una terapia. Existen reportes que muestran la dependencia de la internalización de las Nps en células con el tamaño de las partículas, donde se demuestra la importancia del control del tamaño para la aplicación deseada [15]. Un factor limitante para la internalización es el diámetro de los endosomas, ya que las vesículas pueden acomodar partículas de hasta aproximadamente 200 nm. Los endosomas son compartimentos dentro del citoplasma delimitados por una membrana simple de clatrina, que funcionan como transportadores de material en las células animales o fúngicas. Las vías de endocitosis mediadas por clatrina son predominantes para nanopartículas menores de 200 nm, y se ha demostrado tanto teóricamente como experimentalmente que las partículas de 50 nm se endocitan más eficientemente [16]. En función de esto último, se considera que tamaños menores a 100 nm serían adecuados para la aplicación propuesta.

Existen varios métodos para obtener Nps de materiales con propiedad de CA: termólisis, solvotérmico (incluye hidrotérmico), co-precipitación, sol-gel, etc. Los métodos más frecuentemente empleados para ello son la termólisis y solvotérmico. En este sentido, se han obtenido Nps de NaLnF₄ (Ln: Ce, Pr, Nd, Sm, Tb, Dy, Ho, Y) empleando la termólisis en ácido oleico (OA), oleilamina (OLA) y octadeceno (ODE) [17]. En este procedimiento se emplean precursores organometálicos que se descomponen en solventes orgánicos de alto punto de ebullición, y se usan agentes encapsulantes (AE) para ayudar en el proceso. Controlando las variables experimentales como la temperatura, concentración de precursores, tiempo y surfactantes o encapsulantes se pueden obtener Nps con buena cristalinidad, pequeña distribución de tamaño y excelentes propiedades ópticas. En general el AE que queda unido a las Nps obtenidas por este método es miscible con solventes no polares, debiendo ser removido o intercambiado posteriormente si se quiere usar las Nps en solventes polares (como es el caso de la TF)..

El método solvotérmico es ampliamente conocido, las reacciones ocurren a alta presión y temperatura. También se emplean AE que se unen a los cationes metálicos y regulan de esta manera su disponibilidad en la solución. Controlan entonces el tamaño, fase cristalina y morfología. A diferencia del método termolítico, en el caso del método solvotérmico, se podrían usar

AE que ya fueran útiles para la aplicación final (como lo pueden ser AE biocompatibles como el polietilenglicol (PEG) o la polivinilpirrolidona (PVP)), evitando de esta manera el paso posterior de intercambio de AE. Con este método se han obtenido Nps de NaYF₄, NaLaF₄, KMnF₄, entre otras [18-22]

Una estrategia, para el control de tamaños de nanopartículas, planteada para el método solvotérmico es el proceso líquido-sólido-solución (LSS), el cual se basa en un mecanismo general de transferencia y separación de fases que se produce en las interfaces de las fases líquida, sólida y de solución presentes durante la síntesis. Se plantea un esquema de síntesis LSS en base a un reporte con condiciones similares [23], Figura 2 del anexo. Esta estrategia se planteó inicialmente para la obtención de nanocristales de metales nobles y también se ha utilizado en la síntesis de semiconductores, fluoruros de tierras raras y de fluoroperovskitas de tipo ABF₃[48,49]. En este sistema, Figura 8, se forman tres fases: oleato de potasio (sólido, interfase que forma micelas inversas), la fase líquida de etanol y ácido oleico (líquido, donde se dispersan las micelas) y la solución de agua y etanol que contiene iones precursores (Mn⁺, F⁻) de la perovskita ABF₃ (solución, parte interna de las micelas). Primero tiene lugar un proceso de transferencia de fase de los iones de metales (Mn⁺) que ocurre espontáneamente a través de la interfaz de oleato de potasio (sólido) y la solución de agua-etanol (solución) basado en el intercambio iónico. Este hecho permite la formación de oleato de metales y la entrada de los iones de potasio a las fases acuosas. Luego, a una temperatura designada, los metales de los oleatos reaccionan con el K⁺ y F⁻ formando las nanopartículas de composición ABF₃. Junto con este proceso, el ácido oleico generado in situ se absorbe en la superficie de los nanocristales con las cadenas de alquilo en el exterior, resultando una superficie hidrofóbica. Finalmente, según su tamaño los nanocristales obtenidos pueden decantar en el fondo del recipiente o pueden ser colectados mediante el uso de equipos como una centrífuga y separados del líquido sobrenadante [23-25].

Este proyecto plantea como objetivo general el desarrollo de nanopartículas de fluoro-perovskitas dopadas con MT y TR, con propiedades de conversión ascendente y potencial aplicación en terapia fotodinámica para tratamiento de cáncer, implementando principios de síntesis amigable con el ambiente. Asimismo, se busca estudiar la incorporación de metales de transición con el fin de modular la emisión de las nanopartículas en el rango de absorción del fotosensibilizador y obtener una mayor eficiencia que las reportadas hasta la fecha, a la vez que se disminuye el uso de TR.

Como principales resultados se espera obtener, en primer lugar, las condiciones de síntesis adecuadas para la obtención de las nanopartículas de un tamaño medio menor o igual a 50 nm a partir del diseño experimental de síntesis. Las propiedades ópticas de las Np KMgF₃ sin dopar deben poseer ser apropiadas de forma que no interfiera con las propiedades ópticas de los dopantes. En segundo lugar se espera obtener nanopartículas dopadas con Nd³⁺ y Mn²⁺ con propiedades ópticas adecuadas y características de los iones. Por último se espera que las nanopartículas dopadas presenten la propiedad de conversión ascendente (emisión luminiscente, región 400-600 nm) al utilizar un láser de 800 nm.

Adicionalmente, en este trabajo se pretende conocer las características de la síntesis utilizada y cómo estas afectan a las características de las Np, conocer la composición superficial de las Np y por último conocer el comportamiento óptico de la matriz y de los dopantes lo que permitirá diseñar las condiciones de síntesis óptimas de nanopartículas con aplicación en TF.

Metodología/Diseño del estudio

1 Síntesis de Nanopartículas

Todos los reactivos químicos se usaron tal como se recibieron sin purificación adicional. Los reactivos utilizados en este trabajo fueron MgCl₂·6H₂O (grado ACS, Carlo Erba), KOH (grado ACS, Merk), NH₄F (grado ACS, Carlo Erba), C₄H₆MnO₄·4H₂O (99%, Marca:Sigma-Aldrich), Eu₂O₃ (99.9%, Sigma-Aldrich), Nd₂O₃ (99.9%, Sigma-Aldrich), etanol absoluto (grado ACS, Carlo Erba) y ácido oleico (grado técnico, Sigma-Aldrich).

1.1 Síntesis de nanopartículas de KMgF₃

La síntesis se realizó basándose en un método previamente reportado [26]. La principal diferencia es que utilizamos NH₄F como fuente de flúor en lugar de KF debido a que no se consiguió en plaza. Se realizó un diseño experimental de 4 factores a dos niveles para determinar el efecto de las variables de síntesis (tiempo, temperatura y concentración de NH₄F y MgCl₂) sobre el tamaño de partícula. En una síntesis típica, se mezclaron 0.25 mmol de MgCl₂·6H₂O, 15 mmol de KOH, 0.75 mmol de NH₄F, 4.2 mL de agua destilada, 3.8 mL de etanol y 9 mL de ácido oleico en un vaso reacción de 25 mL de Teflon para autoclave bajo agitación magnética para formar una solución homogénea. La mezcla se colocó en autoclave y se calentó a 160/200 °C durante 6/24 h. Las condiciones de síntesis específicas se pueden ver en la Tabla 1 del anexo y un esquema del procedimiento en la Figura 3 del anexo. Para la recolección y purificación de las nanopartículas primero se centrifugó la solución de reacción a 6000 rpm (RCF=4163, r=9.8cm) por 20 min para eliminar el sobrenadante obtenido. Posteriormente se realizaron dos lavados con una solución de etanol absoluto:agua destilada 1:1 y un lavado con solución de etanol absoluto:acetato de etilo 1:1, para eliminar el ácido oleico residual y otras sustancias remanentes. Posteriormente se dejó secar el sólido en estufa a 40°C por 24 h.

1.1.1 Diseño experimental y estadísticos

Se realizó un diseño factorial completo 2^4 para determinar el efecto de las variables de síntesis (tiempo, temperatura y concentración de NH_4F y MgCl_2) y sus interacciones (primer orden) sobre el tamaño de las nanopartículas de KMgF_3 estimado por XRD. Los resultados experimentales se analizaron mediante regresión lineal múltiple, donde el tamaño de partícula fue la variable de respuesta. Asimismo, el tiempo, la temperatura, las concentraciones de NH_4F y MgCl_2 y todas sus interacciones de primer orden fueron las variables predictoras. Las interacciones de orden superior no se consideraron debido al número limitado de muestras en comparación con el número de variables predictoras [27].

La regresión lineal y el análisis estadístico relacionado se realizaron en el software R utilizando el entorno de trabajo RStudio[28]. El análisis de regresión múltiple se implementó utilizando la función `lm()` del paquete base R. Después de ajustar el modelo, evaluamos, en primer lugar, los supuestos del modelo. La linealidad se probó a través de la prueba de Lack of Fit, mientras que la normalidad y la homocedasticidad de los residuales se evaluaron mediante inspección visual y pruebas estadísticas. La prueba de Kolmogorov-Smirnov (`ks.test()` function, R Base Package) fue utilizada como test de normalidad y la prueba Breusch-Pagan test (`bptest()` function, `lmtest` package[29]), fue implementada para testear la homocedasticidad. Posteriormente, se realizó una selección de características para retener el modelo óptimo. Para esto, fue aplicado un procedimiento automático usando la función `stepAIC()` del paquete MASS [30]. Esta función realiza la selección de modelo paso a paso por el criterio de información de Akaike (AIC). En este trabajo se consideró la opción de selección "backward", en el procedimiento de selección de variables (`direction = "backward"`, en la función `stepAIC`). La visualización de la salida del modelo (es decir, cómo las variables predictoras y sus interacciones afectan la respuesta) se realizó utilizando la función `visreg` del paquete `visreg`[31].

1.1.2 Escalado de la síntesis

Debido a que la cantidad de muestra obtenida era poca y dificulta las caracterizaciones, se realizó una prueba de escalado de la síntesis a modo de confirmar si era posible obtener KMgF_3 , manteniendo la fase y sin modificar significativamente el tamaño promedio y la distribución de tamaños. En un reactor de 100.0 mL, con un volumen de solución de 75.0 mL, se agregó 18.1 mL de agua destilada, 16.3 mL de etanol absoluto y 40.6 mL de ácido oléico. En una síntesis típica, se mezclaron 0.2252 g de NH_4F , 0.4121 g MgCl_2 y 3.3208 g KOH y los solventes mediante agitación magnética. La reacción se realizó en un autoclave a 160°C por 24 horas. El proceso de recolección y purificación de las Np fue idéntico a las síntesis anteriormente mencionadas.

1.1.3 Cambio de agente estabilizante

Se realizó una reacción de cambio de agente estabilizante, con el fin de conocer las características de la reacción y confirmar el cambio de AE con el método seleccionado. Esta reacción se realizó en un balón de 100 mL, donde se colocaron 0.0290 g de nanopartículas KMgF_3 previamente sintetizadas en iguales condiciones que la muestra escalada, 24 mL de acetato de etilo y una solución de 6.76 g de polivinilpirrolidona (PVP) previamente disuelto en 12 mL etanol absoluto. Se colocó un sistema refrigerante y se calentó la solución de reacción a 130°C , en constante agitación, hasta alcanzar el reflujo y se dejó 4 h reaccionando. Luego se agregaron 40 mL de acetato de etilo y se colectaron las nanopartículas por centrifugación a 6000 rpm ($\text{RCF}=4163$, $r=9.8\text{cm}$) por 20 min. El producto obtenido fue purificado mediante 3 lavados con una solución de acetato de etilo:etanol absoluto 1:1 centrifugando a 6000 rpm ($\text{RCF}=4163$, $r=9.8\text{cm}$) por 20 min. El sólido se dejó secar en la estufa a 40°C por 24 h. El intercambio de AE se estudió mediante espectroscopía FTIR difusa, midiendo las muestras en un Espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier (Shimadzu IRPrestige-21) usando un accesorio DiffusIR Pike Technology acoplado para reflectancia difusa.

1.2 Nanopartículas de KMgF_3 dopadas

Los porcentajes de dopante se expresan en relación a los moles de KMgF_3

Nanopartículas $\text{KMgF}_3:\text{Ln}$ ($\text{Ln}=\text{Eu}^{3+}$, Nd^{3+})

Se realizó una solución stock para cada dopante disolviendo óxidos de las tierras raras (Ln_2O_3) en ácido nítrico diluido en un volumen conocido. A partir del valor de la concentración se calcularon los volúmenes de agregado correspondiente a cada porcentaje de dopante.

Se utilizó un reactor hidrotérmico de 100 mL, cuyo volumen total de llenado fue 75 mL, con los solventes agua destilada 18.1 mL, etanol absoluto 16.3 mL y ácido oléico 40.6 mL. Para el caso de dopaje con tierras raras se colocaron cantidades estequiométricas de MgCl_2 y NH_4F y volúmenes de solución conteniendo 1, 3 o 5% de Eu^{3+} o 1, 3, 4, 5, 7% de Nd^{3+} en las cantidades de dopante que se deseaba incorporar. En una síntesis típica, se mezclaron los reactivos sólidos 0.1096 g de NH_4F , 0.2006 g MgCl_2 y 3.3208 g KOH, el volumen correspondiente al porcentaje de Eu^{3+} o Nd^{3+} y los solventes, mezclando mediante agitación magnética. La reacción se realizó en un autoclave a 160°C por 24 h. El proceso de recolección y purificación de las Np fue idéntico a las síntesis anteriormente mencionadas.

-Nanopartículas $\text{KMg}_{(100-x)}\text{F}_3:\text{xMn}^{2+}$

Se utilizó un reactor de 100 mL, cuyo volumen total de llenado fue 75 mL, con los solventes agua destilada 18.1 mL, etanol absoluto 16.3 mL y ácido oléico 40.6 mL. Para el caso del dopaje con el Mn^{2+} , los moles agregados de Mg^{2+} corresponden a los moles totales de KMgF_3 (producto) menos los moles agregados de Mn^{2+} , a modo de sustitución. El metal de transición fue

incorporado en las cantidades 1, 2, 3, 4 y 5% de los moles totales. En una síntesis típica, se mezclaron los reactivos sólidos 0.1096 g de NH_4F , 3.3208 g KOH , masas de $\text{C}_4\text{H}_6\text{MnO}_4$ correspondientes a 1, 2, 3, 4 y 5 % de Mn^{2+} y masa de MgCl_2 con la resta de moles de Mn^{2+} correspondiente. Se agregaron adicionalmente los solventes mezclando mediante agitación magnética. La reacción se realizó en un autoclave a 160°C por 24 h. El proceso de recolección y purificación de las Np fue idéntico a las síntesis anteriormente mencionadas.

2 Caracterizaciones

2.1 Difracción de rayos-X de polvo (XRD)

Mediante estas medidas se obtuvo información de la fase nanocrystalina obtenida, parámetros de celda cristalina y el tamaño estimado de las partículas. Las medidas se realizaron en el Centro Universitario Regional del Este, Rocha, Uruguay (CURE-Uruguay). Los experimentos de difracción de rayos X de polvo (DRX) se llevaron a cabo utilizando un difractor PANalytical Modelo Empyrean con radiación $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) a temperatura ambiente para determinar la fase cristalina obtenida, los parámetros de red y el tamaño del cristalito. Los datos obtenidos se refinaron por el método de Rietveld [33] usando el software GSASII [32], y el tamaño medio de partícula se estimó por la ecuación de Scherrer [34].

Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HR-TEM) y espectroscopia de dispersión de energía (EDS)

Mediante estas medidas se obtuvo información sobre la fase nanocrystalina obtenida, la morfología, el tamaño estimado y su distribución. Para estas medidas se utilizó un equipamiento ubicado en el CURE-Uruguay. Las imágenes de HR-TEM fueron obtenidas en un microscopio JEOL 2100 de 200 kV para estimar el tamaño medio de partícula y determinar la morfología. Adicionalmente se utilizó la sonda EDS acoplada al microscopio para confirmar la composición. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de la suspensión de las nanopartículas sobre grillas de cobre recubiertas con carbono. Las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando el software ImageJ [35]

2.2 Reflectancia difusa

Con el objetivo de conocer las propiedades de absorbancia de la matriz y de los dopantes además de confirmar la presencia de estos últimos, se realizaron medidas de reflectancia difusa. Las caracterizaciones espectrofotométricas UV-Vis de las nanopartículas en polvo fueron realizadas con equipamiento ubicado en Facultad de Química, Montevideo, Uruguay (FQ-Uruguay) y en el Instituto de Física de la Universidad Federal de Goias, Goiania, Brasil (UFG-Brasil). En Facultad de Química se utilizó un espectrómetro UV/VIS (Shimadzu UV 2600) con accesorio de esfera integradora, utilizando como blanco Spectralon. Las medidas de reflectancia difusa, a temperatura ambiente, se realizaron en la UFG-Brasil utilizando un espectrofotómetro VIS/NIR (PerkinElmer WB1050) de 700 a 1050 nm utilizando el accesorio de reflexión difusa Praying Mantis y polvo de BaSO_4 como referencia.

2.3 Fotoluminiscencia (PL)

De modo de determinar las propiedades luminiscentes de la matriz sin dopar y dopada se realizaron medidas de PL. Las caracterizaciones de PL fueron realizadas con equipamiento ubicado en FQ-Uruguay y en UFG-Brasil. El equipamiento de Uruguay es un Fluorímetro (RF-5301PC), marca Shimadzu con accesorio para muestras sólidas y lámpara de xenón de 150 W. Las medidas fueron realizadas a temperatura ambiente. El equipamiento usado en Brasil es un espectrofluorímetro Fluorolog 3-222 (FL3-222) marca Horiba Jobin Yvon de trabajo a temperatura ambiente, con excitación con una lámpara de xenón de 450 W para espectros de luminiscencia en estado estacionario y un fotomultiplicador de Hamamatsu. En ambos casos, la emisión fue corregida por la respuesta espectral de los monocromadores y por el detector utilizando un espectro de corrección típico proporcionado por el fabricante. Las medidas de conversión ascendente se llevaron a cabo mediante el uso de un láser de diodo de Crystal Laser LC de 804 nm. Los espectros de emisión fueron recogidos en el rango 410 a 650 nm, potencia 700 mW, y filtro inside 10SWF-800-B y outside FSR-RG780.

2.4 Espectroscopia FTIR difusa

Con el fin de determinar si fue posible hacer el cambio de AE de las nanopartículas se realizaron medidas de FTIR. Las muestras obtenidas fueron caracterizadas mediante FTIR difusa, con un equipo ubicado en FQ-Uruguay. Las medidas fueron realizadas en un Espectrofotómetro de infrarrojo de transformada de Fourier (Shimadzu IRPrestige-21) usando un accesorio DiffusIR Pike Technology acoplado para reflectancia difusa y bromuro de potasio como blanco de referencia.

2.5 Termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Con el objetivo de obtener información de la composición superficial y el porcentaje de agente estabilizante presente se realizaron medidas de TGA y DSC. El equipamiento que se utilizó para realizar las caracterizaciones de termogravimetría (TGA) y calorimetría diferencial de barrido (DSC) se encuentra en CURE-Uruguay. Se utilizó un analizador térmico simultáneo Netzsch F5 TG-DSC, con 7,4 mg de muestra en crisol de aluminio, bajo un caudal de nitrógeno de 50 mL/min, y calentado desde temperatura ambiente hasta 600°C .

Resultados, análisis y discusión

Con el objetivo de obtener nanopartículas dopadas para aplicaciones de terapia fotodinámica se elige la composición KMgF₃ como matriz hospedera (matriz o muestra sin dopar) de los dopantes seleccionados. En esta sección se discuten los principales resultados referentes a las muestras sin dopar y al diseño experimental llevado a cabo para evaluar las condiciones de síntesis de las nanopartículas de KMgF₃ y a la caracterización de las mismas.

Como característica general se observó que las muestras obtenidas como resultado de las síntesis por el método solvotérmico de KMgF₃ sin dopar eran de apariencia sólida y de color blanco amarronado. Dada las características de la síntesis, donde se observó que el AE representa un porcentaje importante de la muestra obtenida y que puede ser variable su cantidad (ver más adelante), no fue posible determinar un rendimiento específico para todas las muestras de nanopartículas sin dopar.

A partir de los resultados obtenidos por difracción de rayos X en polvo, se observó que para todas las condiciones evaluadas se obtuvo la fase cristalina deseada, la fase cúbica de KMgF₃. La Figura 3 a) del anexo muestra un ajuste representativo utilizando el método de Rietveld [36] de los datos de difracción de rayos X con la fase cúbica de KMgF₃ (Pm-3m) del archivo ICSD #28949. Sin embargo, bajo condiciones en las que el precursor de flúor está en exceso, se genera una fase cristalina adicional el compuesto K₂SiF₆ (Fm-3m, ICSD #29407) mostrando un buen resultado del ajuste y permitiendo estimar el tamaño de partícula a partir del refinamiento. Se realizaron algunos experimentos para confirmar la proveniencia de la impureza pero no serán presentados en este resumen.

Los resultados de los datos XRD refinados se resumen en la Tabla 2 del Anexo. El rango de tamaño medio de las nanopartículas de todas las muestras obtenidas, estimado por esta técnica es de 13.5 ± 0.6 nm a 32.2 ± 1.2 nm. El error es expresado con un nivel de confianza del 95% (K=2), de la forma Tamaño $\pm 2 \times$ sd nm.

Todas las muestras caracterizadas por TEM y HR-TEM presentan una morfología aparentemente cúbica (Figuras 5 y 6 del anexo) y presentan un buen ajuste de distribución de tamaños de tipo lognormal. El rango de tamaños estimados por esta técnica es 13.4 ± 3.8 nm a 30.7 ± 2.8 nm.

Adicionalmente se realizó un estudio de correlación entre los tamaños estimados del procesamiento de datos de la técnica de XRD y TEM (Figura 7 del anexo), donde se muestra un ajuste lineal de la correlación con su intervalo de confianza (95%), el coeficiente de correlación de Pearson de 0.94 y un p-valor menor que el valor de significancia de 0.05. En este caso, existe una buena correlación entre los datos, lo que indica que no hay diferencias significativas al estimar el tamaño promedio por cualquiera de las dos técnicas empleadas.

Análisis estadístico

Los resultados de la prueba Lack of fit indicaron que la suposición lineal podría conservarse (valor $p > 0.05$). La inspección visual de los residuos (gráficos de Normal Q-Q normal y Scale-Location) y los resultados de las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Breusch-Pagan (valores de p de ambas pruebas > 0.05) permitieron mantener los supuestos de normalidad y homocedasticidad respectivamente.

El modelo óptimo seleccionado por la función stepAIC()[37] tuvo como variables predictoras: temperatura, tiempo y concentración de NH₄F y MgCl₂ y las interacciones entre tiempo y NH₄F, y temperatura y MgCl₂. Este modelo explicó el 36% de la variación de los datos (R² ajustado=0.36). El intercepto, la temperatura y la interacción entre temperatura y MgCl₂ presentaron coeficientes significativos (p-valor < 0.05) (Tabla 3 anexo). Aunque algunas de las variables seleccionadas por el criterio AIC no fueron significativas, decidimos retenerlas en el modelo final ya que este modelo tenía mayor R² (R²=0.36 vs R²=0.23) y menor AIC (más de dos unidades por debajo) que el modelo con solo variables significativas. Debe notarse que como la interacción temperatura:MgCl₂ fue significativa, no tiene sentido analizar el efecto principal significativo de la interacción (es decir, la Temperatura) individualmente [38].

El resultado gráfico del modelo de la interacción significativa, Figura 9 del anexo, indica que el efecto de la temperatura sobre el tamaño medio de las partículas cambia de positivo a ligeramente negativo a niveles más altos de concentración de MgCl₂ con respecto a los niveles más bajos. Los valores predichos de tamaño de partícula más bajos se encontraron a Temperatura = 200°C y masa correspondientes a MgCl₂=0.0962 g al considerar estas dos variables predictoras en el modelo.

De todas formas, considerando el rango de tamaño de nanopartícula obtenido, todas las muestras presentaron un tamaño adecuado para aplicaciones biomédicas. Se eligen las condiciones de síntesis 160oC (nivel inferior), 24 h (nivel superior), 0.0526 g de NH₄F (nivel superior) y 0.0962 g de MgCl₂ (nivel superior).

La muestra del escalado de síntesis se caracterizó mediante XRD y TEM (datos en tabla del anexo) y esta presentó características esperadas y similares a la muestra obtenidas en el reactor de 25 mL. Este resultado es muy útil, dado que nos indica que es posible a priori realizar las síntesis en el reactor grande y mantener el tamaño de partícula deseado.

Con el fin de determinar si fue posible realizar el cambio de AE de las nanopartículas se llevaron a cabo medidas de FTIR a los efectos de identificar señales correspondientes al oleato en el caso de las nanopartículas obtenidas con la síntesis solvotérmica y al PVP en la muestra luego del cambio de recubrimiento. El análisis de estas medidas por un lado confirma la presencia de ácido oleico en las nanopartículas precursoras y PVP luego del cambio de AE y por otro lado indica que existe una modificación de la superficie en la reacción. Los espectros FTIR se muestran en las Figuras 10 y 11 y las bandas identificadas

en la tabla 6 y 7 del anexo.

Se caracterizó ópticamente (Figura 12 y 13 del anexo) mediante medidas de reflectancia, luminiscencia y termoluminiscencia la muestra KMgF3 en condiciones de síntesis 160 oC, 24h, 0.2252 g de NH4F, y 0.4121 g de MgCl2 .

Se observó que coeficiente de absorción, de la muestra de KMgF3 sin dopar presenta una señal (banda en torno a 230 nm) atribuible al ácido oleico presente en la superficie de las nanopartículas. No se esperaría observar señales de la pervoskita dado que presenta un band gap de entorno a 12 eV [39] no se esperaría absorción en la región 1.5-6.5 eV.

A partir de las medidas de luminiscencia se observó una única banda ancha de emisión con posición del máximo en 470 nm. Existen varios reportes que asignan la banda en torno a 470 nm a defectos de la red, normalmente se forman vacantes de flúor en la red de fluoro-perovskitas de tipo AMgF3 durante la preparación de la muestra[40-42].

KMgF3 : z%Eu3+

Con el objetivo de confirmar si la matriz estudiada en el presente trabajo es adecuada para la incorporación de dopantes en relación a la alteración o conservación de las propiedades ópticas de los iones se estudiaron las nanopartículas dopadas con Eu3+, que presenta características de absorción y emisión sensible a simetría de su entorno. Las concentraciones de dopante elegidas fueron 1, 3 y 5 % de los moles de la perovskita a obtener.

A partir de las medidas de difracción de rayos x de polvo y su posterior refinamiento se confirmó que la única fase presente es KMgF3 (Pm-3m) del archivo ICSD #28949.

En primer lugar, se midió la reflectancia difusa entre 250-1800 nm (medidas realizadas en el Instituto de Física de UFG, Brasil) de las muestras dopadas con Eu3+. Se puede evidenciar que existe una fuerte absorción en la región 300-400 nm (similar a las No sin dopar), mientras que en la región 450-800 nm no se observan las bandas de absorción características del dopante.

Se registraron los espectros de emisión correspondientes a las muestras dopadas con 1, 3 y 5% de Eu3+ con longitudes de onda de excitación 394 nm. En las tres muestras se identifica una banda ancha (entre 350-500 nm) la cual se atribuye a la red KMgF3. También se observan bandas características del Eu3+ en 580, 590, 613, 650 y 698 nm las cuales pueden ser asignadas a las transiciones del nivel 5D0 a los niveles 7F0, 7F1, 7F2, 7F3 y 7F4 correspondientemente.

Teniendo en cuenta la intensidad relativa de la transición 5D0 -> 7F2 y 5D0 -> 7F1, siendo mayor la primera en todas las muestras, los resultados indican que la transición que predomina es dipolo eléctrico y que se estaría en una condición de baja simetría. Se ha reportado que el dopado con Eu3+ produce una modificación de la red, y que éste podría ocupar la posición del K+ en la red de KMgF3 [43,44].

KMgF3: y%Nd3+

Los resultados de XRD y TEM de las muestras dopadas con Nd3+ en el rango 1-7%, confirman la obtención de nanopartículas de KMgF3 y la presencia de Nd3+. En base a estudios previos [45], podemos suponer que el Nd3+ ocuparía la posición del K+ con la correspondiente generación de defectos.

En los gráficos de coeficiente de absorción para las muestras dopadas con Nd3+ se observa la presencia de bandas de absorción características del ion y son asignadas a las transiciones desde el nivel fundamental 4I9/2 a niveles tales como 2G7/2+2K13/2, 4G5/2+2G7/2, 4F9/2, 4F7/2 +4S3/2, 4F5/2+2H9/2 and 4F3/2 (521, 577, 681, 740, 800 y 866 nm). A medida que aumenta la concentración, parecería existir un quenching de la señal de absorción. Este comportamiento ha sido observado en otros sistemas [46,47].

También se registró el espectro de emisión luminiscente, en la región 410-650 nm, de 4 muestras dopadas con Nd3+ excitadas con un láser de 804 nm. En el mismo, aparecen bandas características de la conversión ascendente del Nd3+. En este caso, considerando que se absorben dos fotones de 800 nm aproximadamente, se excitaría desde el nivel basal 4I9/2 a los niveles 2H9/2, 4F5/2 y luego de una relajación no radiactiva se llegaría al nivel metaestable 4F3/2. En el caso de absorber tres fotones se podría llegar al nivel 3P1/2. A partir de estos niveles se pueden obtener las emisiones correspondientes a las siguientes transiciones 2P3/2 -> 4I13/2 (445 nm aprox), 2P1/2 -> 4I13/2 (512 nm aprox), 4G7/2 2K13/2 -> 4I9/2 (526 nm aprox.), 4G7/2 2K13/2 -> 4I11/2 (582 nm aprox.)[48]. Por lo tanto, en función de las bandas de emisión observadas estaríamos en este último caso, demostrando la posibilidad de utilizar el fenómeno de conversión ascendente en la matriz elegida para los fines planteados.

KMg(100-x)F3: x%Mn2+

A continuación, se presentan los resultados de XRD, TEM y XPS de las muestras dopadas con Mn2+ en el rango 1-5%. Se confirma la fase cristalina obtenida (Pm-3m), la morfología (cúbica), el tamaño estimado (aproximadamente 30 nm) y su distribución (lognormal), y adicionalmente se intenta confirmar el estado de oxidación del manganeso presente en las muestras. Diagramas de XRD, TEM y XPS en el anexo.

El aumento del contenido de Mn2+ provoca un corrimiento gradual de todos los picos de difracción hacia ángulos más bajos (Figura 32b), debido a que el reemplazo parcial de los iones Mg2+ (r = 0.72 Å) por iones Mn2+ (r = 0.80 Å) conduce a una expansión gradual de la red, comportamiento ya observado en trabajos anteriores [49].

Los valores de energía obtenidos del ajuste de las señales de XPS son más cercanos a los reportados para Mn³⁺ y Mn⁴⁺; de todas formas, es difícil descartar la posibilidad de la presencia de Mn²⁺ teniendo en cuenta además de la diferencia con los valores de referencia, la baja relación señal ruido consecuencia de la baja cantidad de manganeso en la muestra (muestras con concentraciones menores no pudieron ser detectadas). Por lo tanto, es probable que el Mn sea oxidado durante la forma de síntesis.

A continuación, se presentan los principales resultados de reflectancia difusa y luminiscencia de las muestras dopadas con 1 a 5% de Mn²⁺. No se logró observar la banda característica del Mn²⁺, 6A1(G)→4A1(G), 4E(G), en un entorno octaédrico [49].

En base a estos últimos resultados se podría concluir que el Mn²⁺ está presente en la muestra, pero dada su baja cantidad no fue posible determinar su concentración, ni su estado de oxidación con una incertidumbre adecuada.

Adicionalmente cabe destacar, que en la mayoría de los casos se utiliza como fuente de flúor de tipo AF para obtener las perovskitas de tipo ABF₃ dopadas con Mn²⁺. De todas formas como no fue posible conseguir ese reactivo a lo largo de la Maestría (debido a problemas de importación del reactivo) se utilizó NH₄F, el cual se utiliza en algunos reportes de este tipo de matrices.

Se realizaron nuevos experimentos dopando las nanopartículas con Mn (5-20%) orden de síntesis del esquema y con variación de la cantidad de KOH agregado. A partir de los resultados de esta prueba y de la información de los antecedentes presentados anteriormente se decidió hacer el experimento de síntesis de las nanopartículas dopadas con Mn²⁺ con el orden de síntesis del esquema y con variación de la cantidad de KOH agregado. Adicionalmente, se incluyó la variable de cantidad de Mn (5-20%) a modo de confirmar si se observan características de absorbancia y luminiscencia esperadas.

KMg(100-x)F₃: x%Mn²⁺ (x=5,15, 20) y variación de KOH

A continuación se presentan los resultados de las medidas de difracción de rayos-X para las muestras obtenidas con el nuevo orden de síntesis, por un lado dopadas con 5% de Mn²⁺ y variación de KOH de 60-3 mmol y por otro lado con cantidades de KOH 3 y 6 mmol y Mn²⁺ 5, 15 y 20%, Figuras 14 y 15 del anexo correspondientes. En todas las muestras se pudo obtener nanopartículas de KMgF₃. Se observó nuevamente el comportamiento del aumento del tamaño de celda al aumentar la cantidad de Mn²⁺.

En base a lo observado para la variación de KOH y la variación de Mn²⁺ inferimos que la aparición del fluoruro de magnesio está relacionada al mecanismo de síntesis determinado por la concentración del hidróxido. Un estudio exhaustivo de cómo afectaría el hidróxido de potasio en la formación de la fase secundaria MgF₂ excede el alcance de este trabajo, por lo que se podría evaluar como trabajo futuro.

En cuanto al efecto de la cantidad de KOH en el tamaño de las nanopartículas dopadas con Mn²⁺, se observó que las mismas aumentan de tamaño al disminuir la cantidad de la base, Tabla 7. En este sistema de síntesis, el KOH reacciona primero con OA y forma oleato de potasio (RCOOK), debido al mecanismo de reacción LSS [50]. Al agregar el resto de los reactivos precursores de Mg²⁺ y Mn²⁺ se libera K⁺ que queda disponible para formar la perovskita KMgF₃ o KMnF₃. Si se reduce la cantidad de KOH en el medio de reacción disminuye la cantidad de RCOOK, responsables de la formación de las micelas inversas (gotas de solución acuosa en inmersas en una fase oleosa). Por esta razón las gotas de solución donde se forman las partículas son más grandes, dando lugar a nanopartículas de mayor tamaño.

Los resultados de las medidas de luminiscencia de las muestras sintetizadas con 3 y 6 mmol de KOH y dopadas con 5-20% de Mn²⁺ se muestran en la Figura 16 anexo. Para ambas muestras con distinta cantidad de base podemos ver que en 15 y 20% de Mn²⁺ aparece la señal luminiscente 4T₁(G)→6A₁(G), en torno a 600 nm al ser excitada con 395 nm. Esta banda es característica de este metal de transición en un entorno octaédrico. En las Figuras 45 b y d podemos ver las bandas de excitación características del Mn²⁺ en un entorno octaédrico.

En el mecanismo de síntesis elegido LSS, la cantidad de oleato generado al reaccionar la base con el ácido oleico es determinante en la obtención de nanopartículas de tamaños pequeños [40]. Y como ya se mencionó al ser menor el tamaño de partícula puede ser más afectado por los defectos superficiales. En el caso de las muestras dopadas con Eu³⁺ a pesar de ser obtenidas con 60 mmol de KOH y presentar tamaños pequeños, se observó la ausencia de las propiedades de absorción del ion pero las propiedades de luminiscencia pudieron determinarse. En el caso del Mn²⁺ el efecto que presenta el tamaño de la partícula hospedera (con oleato como ligando) es muy significativo, dado que las muestras obtenidas con mayores cantidades de KOH no presentan señales características del ion Mn²⁺ ni en reflectancia ni en luminiscencia.

Conclusiones y recomendaciones

Con el método de síntesis propuesto, fue posible obtener Nps de KMgF₃ en un rango de tamaños de partícula y una distribución de tamaño adecuada para su aplicación en TF. El tamaño estimado de las Nps mediante el procesamiento de datos de imágenes de TEM y de los resultados de refinamiento a partir de mediciones de XRD, con sus incertidumbres asociadas, presentaron una muy buena correlación.

El análisis estadístico del diseño experimental arrojó que la variable Temperatura y la interacción de la Temperatura con la concentración de $MgCl_2$ tienen un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, para un nivel de significancia de 0.05. Los valores de tamaño de partícula más bajos previstos se encontraron a Temperatura = 200 °C y concentraciones de $MgCl_2$ = 0.0962 g. Trabajando con un nivel de confianza de 95 %, 14 de las condiciones experimentales no presentaron diferencias significativas en el tamaño de partícula, por lo que la elección de cualquiera de estas condiciones de síntesis son apropiadas para obtener Nps de tamaño adecuado para su aplicación en TF. Adicionalmente, el escalado de la síntesis no afecta el tamaño de las Nps.

Se confirmó la presencia del oleato en la superficie de las nanopartículas y fue posible modificar la superficie de las mismas con la reacción de cambio de AE.

Las caracterizaciones ópticas realizadas sobre las Nps sin dopar mostraron señales atribuibles a defectos de la red, por ejemplo la banda ancha luminiscente con máximo en 470 nm. Las simulaciones computacionales sobre la red $KMgF_3$ ideal muestran la ausencia de esas señales en el espectro de absorbancia, confirmando que los defectos producidos por el método de síntesis son los responsables de la mencionada señal.

Fue posible obtener muestras de la fase cúbica $KMgF_3$ dopadas con 1, 3 y 5% de Eu^{3+} y se confirmó mediante las características de las medidas de luminiscencia que el ion está presente y mostrando una mayor intensidad para la transición $5D_0 \rightarrow 7F_2$, lo que ocurre en 614 nm. Además se comprobó que la calcinación de estas muestras presentaron un efecto negativo en la luminiscencia.

Fue posible obtener muestras de la fase cúbica $KMgF_3$ dopadas con 1, 3, 4, 5 y 7% de Nd^{3+} y se confirmó que el ion está presente mediante las características de las medidas de reflectancia y luminiscencia. Adicionalmente se confirmó la propiedad de CA de energía para este ión en la matriz estudiada.

Fue posible obtener muestras de la fase cúbica $KMgF_3$ dopadas con 1, 2, 3, 4 y 5 % de Mn^{2+} y se confirmó que el ion está presente mediante las modificaciones de la red de la matriz. A partir de la optimización en la preparación de Nps dopadas con Mn^{2+} se logró demostrar la emisión de Mn^{2+} necesaria para aplicaciones en TF.

Los resultados obtenidos en esta Maestría claramente permiten avanzar en el desarrollo de Nps con aplicación en TF como alternativa al tratamiento de una enfermedad tan preocupante como lo es el cáncer. Asimismo, establece un precedente en Uruguay generando una nueva línea de investigación en el área y contribuyendo al desarrollo de la nanotecnología en el País. Los avances realizados en esta Tesis son un punto de partida para continuar las investigaciones de Nps con propiedades de CA, no sólo con aplicación en TF sino también en otras biomédicas (imagenología y etiquetado in vitro, entre otras). También los resultados del sistema óptico estudiado son importantes para avanzar en otros usos tecnológicos como en dosimetría termoluminiscente.

Trabajo Futuro

A continuación se presentan algunos posibles trabajos futuros que pretenden responder algunas hipótesis planteadas en la sección de resultados y son los siguientes:

I) Estudio del efecto de la síntesis en el porcentaje de recubrimiento para determinar rendimiento y reproducibilidad de la síntesis.

II) Repetir experimentos utilizando como fuente de flúor KF para determinar el efecto del uso de los dos precursores de flúor en las muestras de $KMgF_3$.

III) Realizar un estudio variando condiciones de reacción para optimizar la reacción del cambio de AE.

IV) Estudio de la modificación en composición y estructura de las Nps dopadas con Eu^{3+} de las muestras calcinadas.

V) Diseñar un experimento para adicionar un recubrimiento de tipo shell a las Nps obtenidas de $KMg(100-x)F_3: x\%Mn^{2+}$ para mejorar sus propiedades ópticas.

VI) Síntesis con las mismas condiciones de las muestras $KMg(100-x)F_3: x\%Mn^{2+}$ ($x=15-20$) con 3 mmol de KOH y co-dopar con Nd^{3+} . Esto servirá para confirmar si es posible obtener una emisión luminiscente en torno a 600 nm del Mn^{2+} con la excitación del Nd^{3+} utilizando un láser de 800 nm.

VII) Funcionalización de las Nps con el FS ácido 5-aminolevulínico y estudiar estabilidad en medio biológico de interés.

VIII) Realizar estudios de citotoxicidad en células normales, de las nanopartículas con las propiedades adecuadas para TF y funcionalizadas con ácido 5-aminolevulínico.

Referencias bibliográficas

- [1] H. Sung et al., "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] M. Isabel Galain, "Estudio de materiales nanoestructurados como potenciales radio-sensibilizadores para terapia de cáncer," Maestría, Facultad de Química, 2019.
- [3] L. Cheng, C. Wang, L. Feng, K. Yang, and Z. Liu, "Functional nanomaterials for phototherapies of cancer," *Chemical Reviews*, vol. 114, no. 21. American Chemical Society, pp. 10869–10939, Nov. 12, 2014. doi: 10.1021/cr400532z.
- [4] J. Kim, Y. um Jo, and K. Na, "Photodynamic therapy with smart nanomedicine," *Archives of Pharmacal Research*, vol. 43, no. 1. Pharmaceutical Society of Korea, pp. 22–31, Jan. 01, 2020. doi: 10.1007/s12272-020-01214-5.
- [5] Abdel-Kader and M. H., Eds., *Photodynamic Therapy: from theory to applications*. Springer, 2014.
- [6] Q. Q. Dou, C. P. Teng, E. Ye, and X. J. Loh, "Effective near-infrared photodynamic therapy assisted by upconversion nanoparticles conjugated with photosensitizers," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 10, pp. 419–432, 2015, doi: 10.2147/IJN.S74891.
- [7] N. L. Oleinick and H. H. Evans, "The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms," 1998. [Online]. Available: www.jstor.org
- [8] A. Punjabi et al., "Amplifying the red-emission of upconverting nanoparticles for biocompatible clinically used prodrug-induced photodynamic therapy," *ACS Nano*, vol. 8, no. 10, pp. 10621–10630, 2014, doi: 10.1021/nn505051d.
- [8] G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, and X. Chen, "Upconversion Nanoparticles?: Design , Nanochemistry , and Applications in Theranostics," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 10, pp. 5161–5214, 2015, doi: 10.1021/cr400425h.
- [10] K. R. Rollakanti, S. C. Kanick, S. C. Davis, B. W. Pogue, and E. V. Maytin, "Techniques for fluorescence detection of protoporphyrin IX in skin cancers associated with photodynamic therapy," *Photonics Lasers Med.*, vol. 2, no. 4, pp. 287–303, 2013, doi: 10.1515/plm-2013-0030.
- [11] X. Wang et al., "Enhancing selective photosensitizer accumulation and oxygen supply for high-efficacy photodynamic therapy toward glioma by 5-aminolevulinic acid loaded nanoplatfrom," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 565, pp. 483–493, Apr. 2020, doi: 10.1016/j.jcis.2020.01.020.
- [12] G. Yamamichi et al., "High diagnostic efficacy of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescent urine cytology for urothelial carcinoma," *Int. J. Clin. Oncol.*, vol. 24, no. 9, pp. 1075–1080, Sep. 2019, doi: 10.1007/s10147-019-01447-5.
- [13] L. Jing et al., "Aqueous Based Semiconductor Nanocrystals," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 18, pp. 10623–10730, 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00041.
- [14] J. Xu et al., "Highly Emissive Dye-Sensitized Upconversion Nanostructure for Dual-Photosensitizer Photodynamic Therapy and Bioimaging," *ACS Nano*, vol. 11, no. 4, pp. 4133–4144, Apr. 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b00944.
- [15] X. Zhu et al., "One-step self-Assembly of ZnPc/KMnF3:Yb, Er upconversion photodynamic therapy system for antibacterial applications," *Nano*, vol. 15, no. 6, Jun. 2020, doi: 10.1142/S1793292020500757.
- [16] A. E. Guller et al., "Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells," *Nano Res.*, vol. 8, no. 5, pp. 1546–1562, May 2015, doi: 10.1007/s12274-014-0641-6.
- [17] R. Si, Y. W. Zhang, H. P. Zhou, L. D. Sun, and C. H. Yan, "Controlled-synthesis, self-assembly behavior, and surface-dependent optical properties of high-quality rare-earth oxide nanocrystals," *Chem. Mater.*, vol. 19, no. 1, pp. 18–27, 2007, doi: 10.1021/cm0618392.
- [18] L. Wang, W. Qin, Z. Liu, D. Zhao, G. Qin, and W. Di, "Improved 800 nm emission of Tm³⁺ + sensitized by 980 nm excitation," *Opt. express*, vol. 20, no. 7, pp. 2557–2559, 2012, doi: 10.1364/OE.20.007602.
- [19] Q. T. Zhi-Jun Liu, Xiao-Xia Song, "Development of PEGylated KMnF₃ Nanoparticle as a T1-weighted Contrast Agent: Chemical Synthesis, In-vivo Brain MR Images, and Account for High Relaxivity," *Nanoscale*, no. 207890, 2010.
- [20] Z. J. Liu, X. X. Song, X. Z. Xu, and Q. Tang, "Biocompatible KMnF₃ nanoparticular contrast agent with proper plasma retention time for in vivo magnetic resonance imaging," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 15, 2014, doi: 10.1088/0957-4484/25/15/155101.
- [21] L. Wang, P. Li, and Y. Li, "Down- and up-conversion luminescent nanorods," *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 20, pp. 3304–3307, 2007, doi: 10.1002/adma.200700144.
- [22] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "Hydrothermal Synthesis of Rare-Earth Fluoride Nanocrystals," *Inorg. Chem.*, vol. 45, no. 17, pp. 6661–6665, 2006, doi: 10.1021/ic051683s.
- [23] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "A general strategy for nanocrystal synthesis," *Nature*, vol. 437, no. 7055, pp. 121–124, 2005, doi: 10.1038/nature03968.

- [24] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "Liquid-solid-solution synthesis of biomedical hydroxyapatite nanorods," *Adv. Mater.*, vol. 18, no. 15, pp. 2031–2034, Aug. 2006, doi: 10.1002/adma.200600033.
- [25] Y. Li, K. Pan, G. Wang, N. Fan, and X. Miao, "Synthesis and photoluminescence properties of perovskite $\text{KMgF}_3\text{:Eu}$ nanocubes," *J. Mater. Res.*, vol. 26, no. 22, pp. 2867–2870, Nov. 2011, doi: 10.1557/jmr.2011.320.
- [26] Y. Li, K. Pan, G. Wang, N. Fan, and X. Miao, "Synthesis and photoluminescence properties of perovskite $\text{KMgF}_3\text{:Eu}$ nanocubes," *J. Mater. Res.*, vol. 26, no. 22, pp. 2867–2870, 2011, doi: 10.1557/jmr.2011.320.
- [27] D. C. Montgomery, *Design and analysis of experiments*.
- [28] R Core Team, "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>." 2022.
- [29] H. T. Zeileis A, "Diagnostic Checking in Regression Relationships," 2002, [Online]. Available: <https://cran.r-project.org/doc/Rnews/>.
- [30] B. D. Venables, W. N. and Ripley, "Random and Mixed Effects," 2002. [Online]. Available: <http://nlme.stat.wisc.edu>.
- [31] P. Breheny and W. Burchett, "Visualization of Regression Models Using visreg," 2013. [Online]. Available: <http://cran.r-project.org/package=visreg>
- [32] H. M. Rietveld, "A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures," 1969.
- [33] B. H. Toby and R. B. Von Dreele, "GSAS-II: The genesis of a modern open-source all purpose crystallography software package," *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 46, no. 2, pp. 544–549, Apr. 2013, doi: 10.1107/S0021889813003531.
- [34] A. L. Patterson, "The Scherrer Formula for X-Ray Particle Size Determination," 1939.
- [35] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis," *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, Jul. 2012. doi: 10.1038/nmeth.2089.7
- [36] H. M. Rietveld, "A Profile Refinement Method for Nuclear and Magnetic Structures," 1969.
- [37] P. Breheny and W. Burchett, "Visualization of Regression Models Using visreg," 2013. [Online]. Available: <http://cran.r-project.org/package=visreg>
- [38] R Core Team, "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>." 2022.
- [39] A. Borges Andrade, "Universidade Federal De Sergipe Pró-Reitoria De Pós-Graduação E Pesquisa Núcleo De Pós-Graduação Em Física Tese De Doutorado Síntese, Caracterização Estrutural E Óptica De Compostos Fosfato E Fluoretos Micro E Nanoestruturados," 2016.
- [40] J. J. Schuyt and G. V. M. Williams, "Photoluminescence, radioluminescence and optically stimulated luminescence in nanoparticle and bulk $\text{KMgF}_3\text{(Eu)}$," *J. Lumin.*, vol. 204, pp. 472–479, Dec. 2018, doi: 10.1016/j.jlumin.2018.08.056.
- [41] J. J. Schuyt and G. V. M. Williams, "F-centre/Mn complex photoluminescence in the fluoroperovskites $\text{AMgF}_3\text{:Mn}$ (A = Na, K, or Rb)," *Opt. Mater. X*, vol. 1, Jan. 2019, doi: 10.1016/j.omx.2019.100010.
- [42] J. J. Schuyt and G. V. M. Williams, "Radiation-induced changes in the optical properties of $\text{NaMgF}_3\text{(Sm)}$: Observation of resettable Sm radio-photoluminescence," *Mater. Res. Bull.*, vol. 106, pp. 455–458, Oct. 2018, doi: 10.1016/j.materresbull.2018.06.039.
- [43] N. Pathak, S. Mukherjee, D. Das, D. Dutta, S. Dash, and R. M. Kadam, "Evolution of different defect clusters in Eu^{3+} -doped KMgF_3 and Eu^{3+} , Li+co-doped KMgF_3 compounds and the immediate impact on the phosphor characteristics," *J. Mater. Chem. C*, vol. 8, no. 21, pp. 7149–7161, Jun. 2020, doi: 10.1039/d0tc00146e.
- [44] H. Elkholy, H. Othman, I. Hager, M. Ibrahim, and D. de Ligny, "Europium-doped tellurite glasses: The Eu^{2+} emission in tellurite, adjusting Eu^{2+} and Eu^{3+} emissions toward white light emission," *Materials (Basel)*, vol. 12, no. 24, 2019, doi: 10.3390/ma12244140.
- [45] M. Rodríguez Chialanza et al., "Continuous trap distribution and variation of optical properties with concentration in oxifluoroborate glass doped with Nd^{3+} ," *J. Non. Cryst. Solids*, vol. 559, May 2021, doi: 10.1016/j.jnoncrysol.2021.120683.
- [46] V. Lupei, et. al., "Emission dynamics of the $4F_{3/2}$ level of Nd^{3+} in YAG at low pump intensities," *Optical Society of America*, 2004.
- [47] Ryabova A.V., "Visualization Of Nd^{3+} -Doped LaF_3 Nanoparticles For Near Infrared Bioimaging Via Upconversion Luminescence At Multiphoton Excitation Microscopy," *Biomed. PHOTONICS*, 2018.
- [48] E. Song et al., "Tailored Near-Infrared Photoemission in Fluoride Perovskites through Activator Aggregation and Super-Exchange between Divalent Manganese Ions," *Adv. Sci.*, vol. 2, no. 7, Jul. 2015, doi: 10.1002/advs.201500089.
- [49] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "A general strategy for nanocrystal synthesis," *Nature*, vol. 437, no. 7055, pp. 121–124, 2005, doi: 10.1038/nature03968.
- [50] F. Wang, J. Wang, and X. Liu, "Direct evidence of a surface quenching effect on size-dependent luminescence of upconversion nanoparticles," *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 41, pp. 7456–7460, 2010, doi: 10.1002/anie.201003959.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-NC-SA)