



Holografía, color y aplicaciones biológicas de nanomateriales

Tema 7

1



Tema 7: Holografía, color y aplicaciones biológicas de nanomateriales

- 7.1 Escritura en tres dimensiones*
- 7.2 Forma y color de nanopartículas metálicas*
- 7.3 Impacto de las nanopartículas en la salud*
- 7.4 Nanopartículas como sondas biológicas*

2

- ⊗ Nuevos métodos de fabricación de materiales ⇒ Obtener avances científicos y tecnológicos en diversas áreas de la ciencia.
 - ✓ Gran diversidad de materiales potencialmente interesantes
 - ✓ La longitud de su escala
 - ✓ La arquitectura

¡¡ Necesidad de propuestas de diseños flexibles !!

- ⊗ Propuesta ⇒ Fabricación de estructuras periódicas tridimensionales que constan de polímeros, coloides o materiales semiconductores.
 - ✓ Aplicaciones potenciales ⇒ andamiaje en la ingeniería de tejidos, dispositivos de disposición de drogas, redes de microfluidos, sensores y materiales fotónicos.
- ⊗ **Escritura directa** ⇒ emplea un sistema de traslación controlado por ordenador, que mueve un dispositivo que genera un patrón para crear materiales con composición y arquitectura controlada .
 - ✓ Ofrece gran flexibilidad de materiales
 - ✓ Bajo coste
 - ✓ Capacidad de construir estructura 3d arbitrarias.

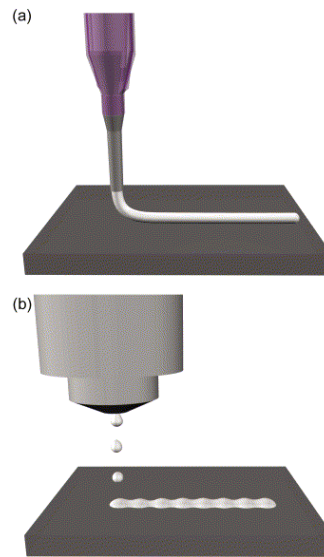
3

Técnicas de escritura con tinta

- ⊗ Estas técnicas conllevan de tintas basadas en coloides, nanopartículas o compuestos orgánicos, para crear estructuras capa a capa.

Technique	Ink design	Minimum printed feature size	3-D periodic structures
Robotic Deposition ¹¹	Concentrated colloidal gel ^{13,14}	200 µm diameter	Yes
"	Concentrated nanoparticle gel ¹⁵	100 µm diameter	Yes
"	Viscous polymer solution ¹⁶⁻¹⁸	200 µm diameter	Yes
"	Concentrated polyelectrolyte complexes ³	<1 µm	Yes
Three-dimensional printing ¹⁹	Binder solution printed on powder bed	170 µm lateral, 45 µm depth	Yes
Ink-jet printing ²⁰	Dilute fluid ²¹	20 µm lateral, 100 nm height	No
"	Concentrated fluid (max. solids ~40%) ²²⁻²⁵	70 µm lateral, <1 µm height	No
Fused deposition	Thermoplastic polymer melt ²⁶	100 µm diameter	Yes
"	Particle-filled polymer melt ²⁷ (max. solids ~50%)	100 µm diameter	Yes
Micropen writing ²⁸	Concentrated, shear-thinning colloidal fluid	25 µm diameter	No
Dip-pen nanolithography ²⁹	Dilute fluid	20 nm	No
Scanning probe contact printing ³⁰	Dilute fluid	<500 nm	No

4



Esquemas de escritura por deposición de tinta: (a) filamento continuo (b) flujo de gotas.

5

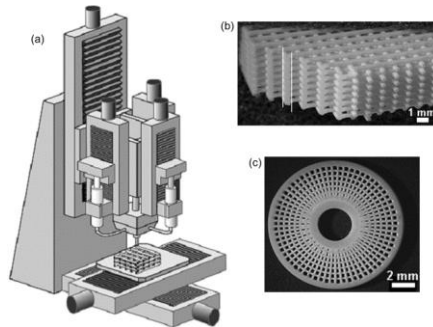
- ⊗ Características de los materiales adecuados para crear una escritura 3D:
 - ✓ Bloques de coloides, polímeros o polielectrolitos suspendidos o disueltos en un líquido, ó calentados.
 - ✓ La tinta ha de ser estable y homogénea que tenga un flujo adecuado y reproducible.
 - ✓ Parámetros reológicos específicos: viscosidad aparente, tensión a la fractura y compresión y viscoelasticidad.
 - ✓ Se requieren o bien de fluidos de baja viscosidad que se puedan eliminar por absorción o evaporación, ó tintas basadas en ceras que se calientan durante el goteo y se solidifican en contacto con la superficie fría.

- ⊗ La dinámica de fluido involucrada en la formación de la gota, la humedad y la difusión, juegan un papel importante:
 - ✓ Definición de la rugosidad de la superficie
 - ✓ Tamaño mínimo de los depósitos realizados con tinta

- ⊗ Ejemplo ⇒ Las tintas de coloides cerámicos se ha de diluir el sólido hasta un máximo de 5% en volumen, de modo que la boquilla no se atasque y se formen gotas consistentes.

6

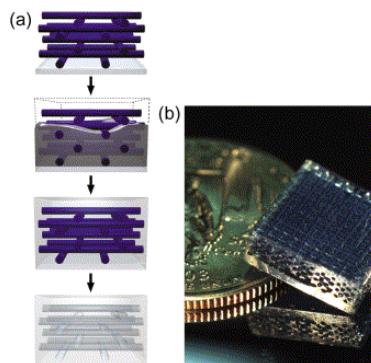
- ☒ Técnicas robóticas de deposición:
 - ✓ Facilitan la escritura
 - ✓ Permiten crear patrones 3D de materiales a las escalas más pequeñas posibles.
- ☒ La viscoelasticidad de geles coloidales se puede modular en muchos órdenes de magnitud :
 - ✓ Facilita el flujo a través de las boquillas
 - ✓ Permiten generar filamentos de diseño específico que mantengan su forma



(a) Esquema de un aparato robótico de deposición; (b) Imagen óptica de una red periódica 3D con geometría tetragonal; y (c) con disposición radial.

7

- ☒ Preparación de redes microvasculares 3D de microcanales, 100-250 μm , interconectados:
 - ✓ Aplicaciones potenciales en áreas donde exista necesidad de disponer de microfluidos: biotecnología, sensores, reactores, químicos, etc.

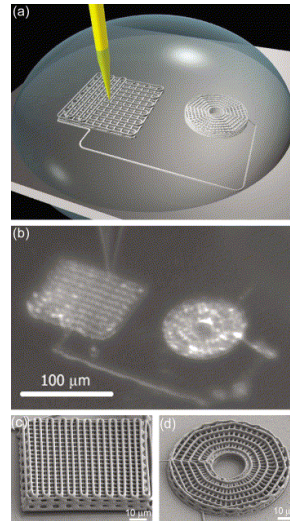


(a) Esquema de ensamblaje de una red 3D microvascular y (b) su imagen óptica. (estructura de 16 capas interconectadas por microcanales de 200 μm).

8

☒ Estructuras microperiódicas 3D ensambladas.

(a) Esquema de deposición con tinta. Una tinta polielectrolito concentrada se dispone en una jeringa (amarillo), en un reservorio de coagulación, y se deposita (gota gris) sobre un sustrato de vidrio. (b) Imagen óptica obtenida in-situ del esquema anterior comentado. La imagen es borrosa por las características del reservorio de coagulación. (c) Estructura 3D de geometría tetragonal centrada en caras (diámetro de filamento = 1 μm , 10 capas). (d) Estructura 3D radial (diámetro de filamento = 1 μm , 5 capas).



☒ Con el uso de tintas basadas en mezclas de polielectrolitos activos biológica, eléctrica ó ópticamente, se podrán diseñar las estructuras deseadas con funcionalidades para aplicaciones en la ingeniería fotónica o de tejidos.

9

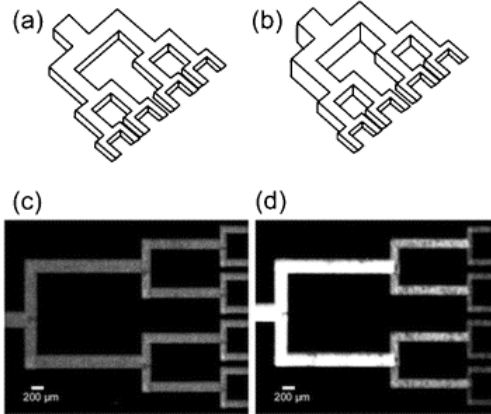
Técnicas de escritura láser

- ☒ El diseño se hace a través de procesos de ablación, sinterización selectiva o reactivos químicos.
- ☒ Cada proceso necesita herramientas de escritura láser diferentes y también los materiales diseñados difieren en sus propiedades físico-químicas.

Technique	Laser use	Minimum printed feature size	3-D periodic structures
Laser ablation ^{47,48}	Removes material in defined pattern	400 nm	No
MAPLE direct-write ^{49,50}	Transfers material from coated ribbon to substrate	40 μm lateral, 10 nm height	No
Selective sintering ⁵¹⁻⁵³	laser Locally sinters powder bed	100 μm	No
Laser chemical vapor deposition ⁵⁴	Reactive deposition from gas phase induced by local heating at laser focus	10 μm	Yes
Stereolithography ^{55,56}	Photopolymerization of UV-curable resin at surface	$\sim 1 \mu\text{m}$	Yes
Two-photon polymerization ^{1,57}	Photopolymerization of UV-curable resin at laser focus within matrix	120 nm	Yes
Holographic lithography ^{2,63}	Four noncoplanar beams generate periodic interference pattern in photopolymerizable matrix	250 nm	Yes

10

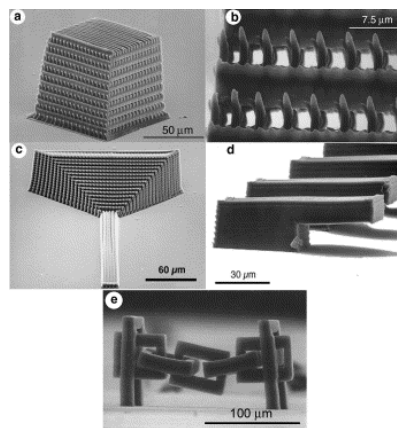
- Las técnicas de ablación consisten bien en la eliminación ó deposición de material.



(a) Esquema de sistema vascular artificial realizado por laser (canales planos con profundidad uniforme de 125 µm y anchos de 250, 200, 160 µm). (b) Esquema de canal de profundidad múltiple (los anchos y profundidades son iguales: 250, 200, 160, y 125 µm). (c) y (d) Imágenes SEM correspondientes.

11

- Polimerización de doble fotón (TPP):
 - ✓ El foco de una láser intenso se traslada dentro de una matriz fotopolimerizable
 - ✓ Se pueden crear estructuras complejas a escala muy pequeña (< 1 µm).

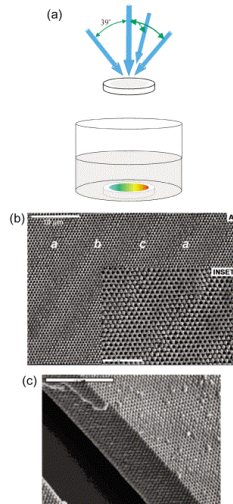


Imágenes de estructuras fabricadas por TPP: (a) Estructura band-gap fotónica; (b) vista ampliada sobre la cara superior de la estructura anterior; (c) estructura e dirección de onda; (d) ordenamiento de cantilevers; (e) microcadena.

12

☒ *Litografía holográfica:*

- ✓ No se considera como una verdadera técnica de escritura directa.
- ✓ Tiene la ventaja de una gran rapidez de fabricación
- ✓ Le falta la flexibilidad inherente de la escritura secuencial de diseño.



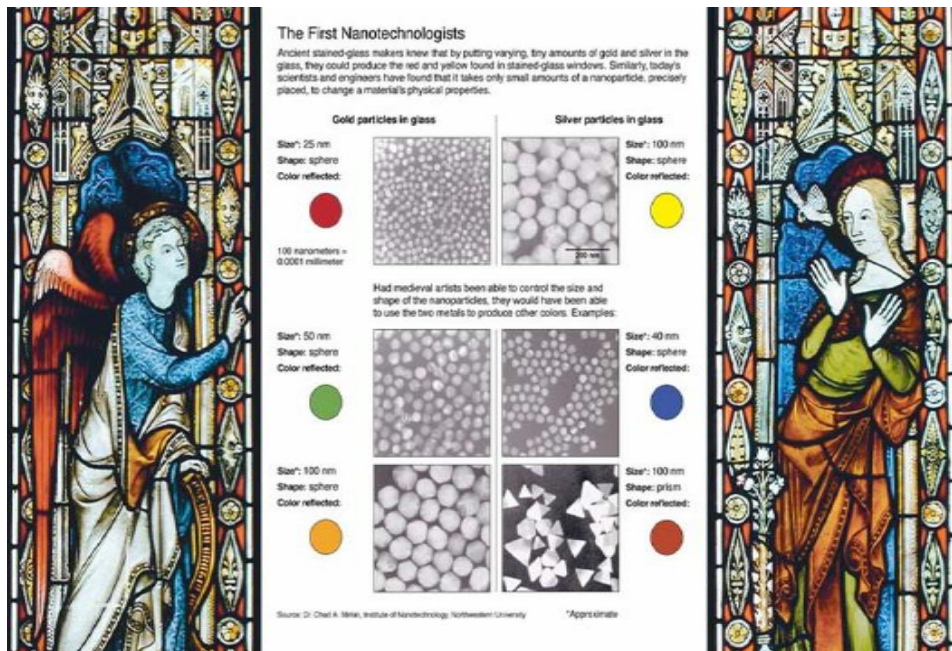
(a) Esquema de la preparación de estructuras periódicas 3D por litografía holográfica. Las flechas azules representan cuatro fuentes láser no coplanares. (b) Imagen SEM de la capa superior de un composite SiO₂-acrilato que muestra las bandas abca de planos (111) planes. (c) Plano de escisión en la estructura anterior.

13



Copa de Lycurgus; contiene pequeñas cantidades de nanocristales (< 70 nm) de Ag y Au en relación molar 14:1.

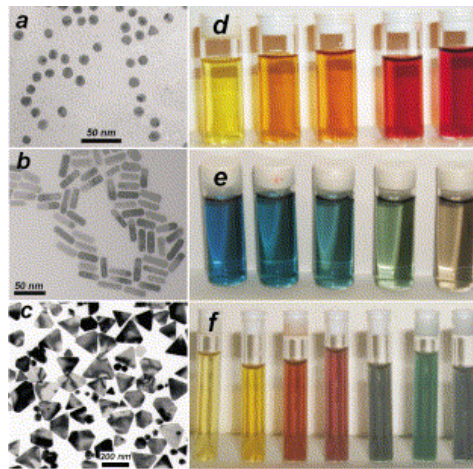
14



15

- ☒ **El color de las nanopartículas metálicas depende de su forma y tamaño**
- ☒ Colores observados para el Au :
 - ✓ **Amarillento** en la luz reflejada
 - ✓ Las capas gruesas de oro aparecen **azules** a la luz transmitida.
 - ✓ Se cambia a color **naranja**, a través de varios tonos de **púrpura** y **rojo**, conforme la partícula de va reduciendo hasta un tamaño de 3 nm.
- ☒ La variación de color se origina por cambios en la **resonancia superficial de plasmón** (frecuencia para la cual la conducción de electrones oscila en respuesta a un campo eléctrico alterno de la radiación electromagnética incidente)
- ☒ Sólo los metales con electrones libres (Au, Ag, Cu y metales alcalinos) poseen resonancias de plasmón en el visible ⇒ colores intensos.
- ☒ Las nanopartículas alargadas (elipsoides y bastones), muestran dos bandas de plasmón diferentes relacionadas con las oscilaciones de electrones transversal y longitudinal.
- ☒ El entorno en el que se dispersan las partículas también es de importancia para sus propiedades ópticas :
 - ✓ Índice de refracción del medio circundante
 - ✓ Distancia entre nanopartículas vecinas

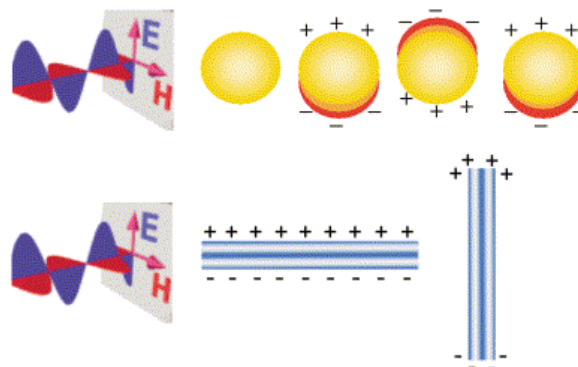
16



Izquierda: Imágenes TEM de (a) nanoesferas y (b) nanobastones de Au, y nanoprismas de Ag. Derecha: fotografías de dispersiones coloidales de aleaciones AuAg (d) aumentando la concentración de Au, (e) aumentando la longitud de los nanobastones y (f) aumentando el tamaño lateral de los nanoprismas de Ag.

17

- Las propiedades ópticas de estas partículas pequeñas se encuentran dominadas por la oscilación colectiva de los electrones de conducción que resultan de la interacción con la radiación electromagnética.

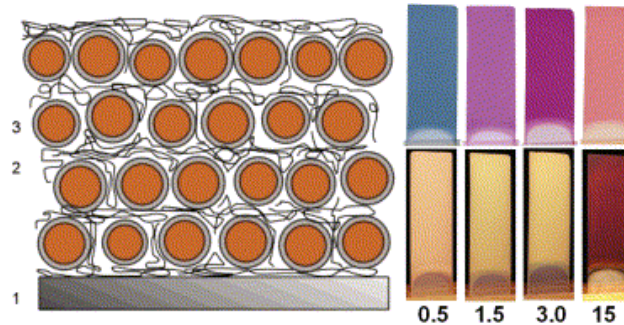


(Arriba) Dibujo esquemático de la interacción de la radiación electromagnética con una nanoesfera metálica. Se induce un dipolo que oscila en fase con el campo eléctrico de la luz incidente. (Abajo) Oscilación transversal y longitudinal de los electrones en un nanobastón metálico.

18

☒ Absorción y reflexión de colores en capas delgadas:

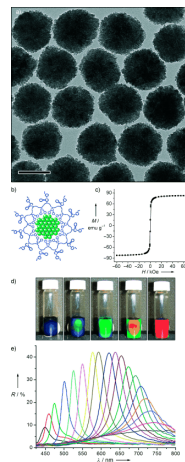
- ✓ Partículas de Au de 15 nm rodeadas de una matriz inerte de SiO₂, en capas de espesor variable



Izquierda: Dibujo esquemático de una lamina formada por ensamblaje capa a capa de nanopartículas de Au recubiertas con SiO₂ (1 = sustrato de vidrio; 2 = polielectrolito cationico; 3 = nanopartículas). Derecha: Fotografías de colores transmitidos (arriba) y reflejados (abajo) de la capa delgada de multilaminas Au@SiO₂ que varían en el espesor de la envoltura de sílice.

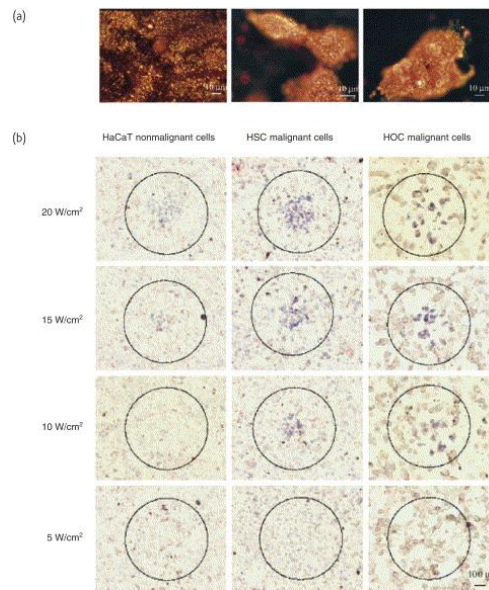
☒ Clúster de coloides nanocrystalinos de óxido de hierro que cambian de color en respuesta a un campo magnético.

- ✓ Las nanopartículas necesitan presentar super-paramagnetismo y tener una elevada superficie de carga, elevado momento magnético y tamaño óptimo.
- ✓ Los clúster son de un tamaño de 30-180 nm, de cristales de unos 10 nm de diámetro.
- ✓ La principal aplicación sería la de fabricar paneles displays planos



a) Imagen TEM y b) ilustración de coloides de clúster nanocrystalinos de poli(acrilato-Fe₃O₄) (barra de escala: 100 nm). c) Ciclo de histéresis que describe el comportamiento super-paramagnético. d) Fotografías de los coloides formados en respuesta a un campo magnético externo, la distancia imán-muestra disminuye de derecha a izquierda. e) Dependencia del espectro de reflexión con la distancia imán-muestra.

7.2 Forma y color de nanopartículas metálicas



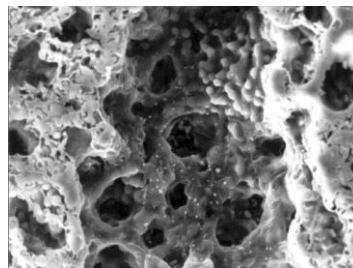
Aplicación de nanopartículas de Au en la detección de células cancerígenas.

21

7.3 Impacto de las nanopartículas en la salud

- ⊗ Existe poca información sobre los efectos de las nanopartículas de ingeniería sobre la salud y el medioambiente.
- ⊗ Las pocas investigaciones existentes se han realizado sobre toxicología en pulmones, en ratas ⇒ mayores indicios de inflamación de los pulmones, fibrosis y tumores.

Nano = Ultrafine	<100 nm
Fine	>0.1 μm – 3 μm
Respirable (rat)	<3 μm
Respirable (human)	<5 μm
Inhalable (human)	~10 – 20 μm



(Izquierda) Definición de tamaño de partículas. (Derecha) Imagen SEM que demuestra la deposición de partículas de carbonilo de hierro en las bifurcaciones alveolares de los pulmones de la rata.

22

☒ A destacar :

- ✓ La mayoría de estos estudios se han realizado sobre tres partículas tipo: TiO_2 , negro de carbono y partículas diesel.
- ✓ Las repuestas de la afección pulmonar respecto a las nanopartículas es muy diferentes en otros seres vivos: perros, primates y humanos.

Classical attributes and sequelae of lung overload	Rats	Dog, monkey, and human
Chronic pulmonary inflammation	yes	not certain
Hyperplasia of macrophages and epithelial cells	yes	not certain
Altered pulmonary clearance (overwhelmed macrophage mediated clearance)	yes	probably not
Large pulmonary burdens of particles	yes	probably not
Increased interstitialization of deposited particles	yes	yes
Increased translocation of particles from lung to thoracic lymph nodes	probably	probably
Interstitial lung disease (fibrosis)	yes	yes, but less severe
Production of lung tumors	yes	no

Comparaciones de atributos en un pulmón sobrecargado en rata, perro, mono y hombre

23

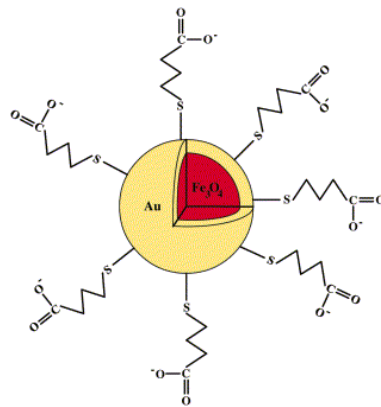
- ☒ Las propiedades superficiales, tales como química en superficie y área deben de jugar un importante papel en la toxicidad de la nanopartícula.
- ☒ La inhalación de nanopartículas en forma separada es muy selectiva respecto al tamaño ⇒ profundizar en el estudio de su efecto sobre la salud.
- ☒ No se conoce si todas las nanopartículas son tóxicas, y si la tipología de estas influye en la toxicidad.
- ☒ Los recubrimientos de las nanopartículas juegan un papel importante en su actividad superficial :
 - ✓ Las nanopartículas de TiO_2 con diversos recubrimientos originan diferente inflamación pulmonar.
 - ✓ Los recubrimientos pueden servir para aumentar los efectos tóxicos.
 - ✓ Nanopartículas sin recubrir de TiO_2 (50 nm) mostraron similares síntomas de inflamación que partículas de tamaño mayor recubiertas (300 nm).

24

- ☒ Interés de investigar aplicaciones biomédicas para micro- y nano- partículas magnéticas de diferentes tamaños, formas y composiciones.
- ☒ Estudios sobre nanopartículas (de 300 a 10 nm) de los óxidos de hierro, Fe_2O_3 y Fe_3O_4 , como ferrofluidos originales.
 - ✓ Exhiben un comportamiento super-paramagnético
 - ✓ Se magnetizan intensamente bajo un campo aplicado, pero no retienen un magnetismo permanente cuando el campo cesa
- ☒ Magnetismo on/off \Rightarrow interés para los procesos de separación magnética.
 - ✓ Las partículas de óxidos de hierro se encapsulan con recubrimientos biocompatibles, glóbulos.
 - ✓ Los glóbulos se funcionalizan
 - ✓ Un imán externo magnetiza y atrae a los glóbulos
- ☒ Las nanopartículas de óxidos de hierro también se pueden utilizar en la obtención de imágenes de resonancia magnética (MRI).
 - ✓ Suspensiones de magnetita se utilizan como agente de contraste

25

- ☒ Recubrimiento de las nanopartículas de Fe con Au :
 - ✓ Evitar su reacción con el medio externo
 - ✓ Facilitar los procesos de funcionalización con agentes químicos o biológicos.



Nanopartículas de ferrita recubiertas con Au a la que se puede unir grupo funcionales a través del enlace Au-S.

26

- ☒ Los nanohilos también son interesantes para aplicaciones biomédicas :
 - ✓ Mayor relación de aspecto \Rightarrow mayor momento dipolar \Rightarrow se puedan manipular con campos magnéticos de menor intensidad.
- ☒ El tamaño, forma y composición de las partículas magnéticas depende de su aplicación y proceso de fabricación.
- ☒ No están claras las ventajas o desventajas de nanopartículas superparamagnéticas vs. ferromagnéticas, o bien de gránulos homogéneos vs. hilos multilaminares.
- ☒ Marcadores (5-10 nm) intracelulares de enfermedades o infección viral \Rightarrow podría ser útil para detectar células individuales de cáncer

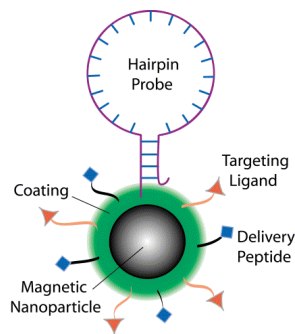
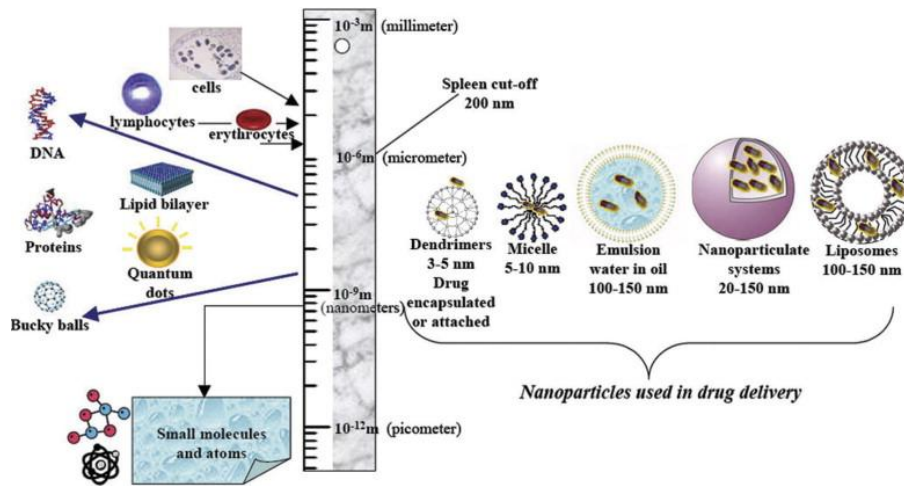


Ilustración de una sonda multifuncional de nanopartícula magnética para MRI de moléculas de tejido. La nanopartícula tiene una sonda de oligonucleótido en la superficie. Los péptidos que penetran en la célula y los ligandos (para unirse a tipos específicos de células) también se conjugan en la superficie de la célula.

27

- ☒ Transporte de moléculas de droga terapéutica :
 - ✓ Empleo de nanopartículas magnéticas etiquetadas
 - ✓ Reducción de la cantidad de fármaco a suministrar
- ☒ Factores a considerar para diseñar la sonda:
 - ✓ Naturaleza
 - ✓ Tamaño
 - ✓ Forma de conjugar la droga a la nanopartícula: unida, adsorbida, encapsulada
 - ✓ Química de superficie
 - ✓ Hidrofilicidad/hidrofobicidad
 - ✓ Funcionalización en superficie
 - ✓ Biodegradabilidad
 - ✓ Propiedades de respuesta física: temperatura, pH, carga eléctrica, luz, sonido, magnetismo

28



Diferentes aplicaciones de las nanopartículas para suministrar fármacos.

☒ Es muy importante conocer el tamaño de las partículas a usar como sonda:

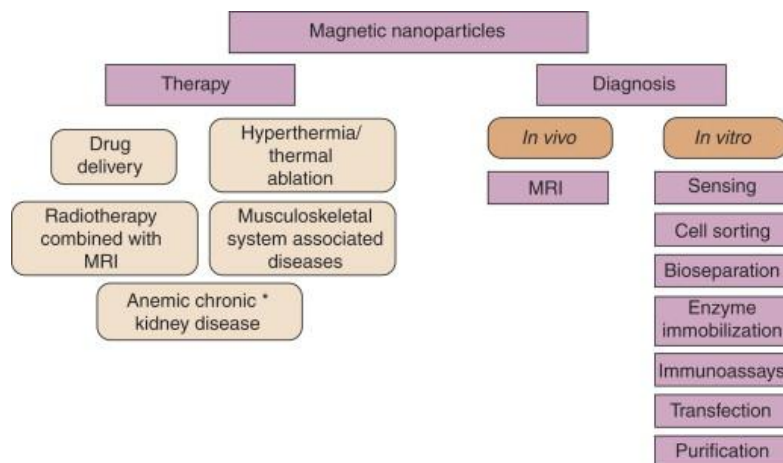
Tamaño de partícula adecuado considerando su distribución y eliminación de las capilaridades del sistema vascular humano.

		Size	System/Organ
Particle removal*	Tight-junction capillaries	< 1 nm	Central nervous system, blood-brain barrier
	Continuous capillaries	~ 6 nm	Tissues such as muscle, skin, and lung
	Fenestrated capillaries	~ 50-60 nm	Kidney, intestine, and some endocrine and exocrine glands
	Sinusoidal capillaries	~ 100-1000 nm	Liver, spleen, and bone marrow
Particle delivery	Arteriole radius	0.005-0.07 mm	Circulatory system. Particles supplied by intravenous administration. Elimination involves opsonization and removal by monocytes in blood
	Artery radius	0.08-7.5 mm	
	Venule radius	8-100 μm	

*It is noted that this table expresses only the morphological pores contributing to diffusive permeability. Actual transcapillary exchanges are modified by vesicular transports, which are able to internalize particles with sizes up to 20-30 nm.
(Adapted with permission from¹⁰. © 1999 Elsevier.)

Limitaciones del empleo de nanopartículas magnéticas como biosondas

- ⊗ El gradiente magnético disminuye con la distancia del objetivo a alcanzar ⇒ se requiere una gran fuerza de campo magnético.
 - ✓ Se podría evitar el uso de campos externos mediante el empleo de implantes magnéticos internos.
- ⊗ Las partículas son super-paragnéticas si su tamaño es muy pequeño.
 - ✓ Se ha de evitar su aglomeración
 - ✓ La respuesta magnética es muy débil
- ⊗ La mayoría de las aplicaciones se han ensayado con animales
 - ✓ Existen limitaciones en la extrapolación a humanos
 - ✓ Parámetros fisiológicos a considerar: peso, volumen de sangre, pulso cardíaco, etc.



Aplicaciones biomédicas de nanopartículas magnéticas

Algunas compañías involucradas en el desarrollo y producción de micro- y nanopartículas magnéticas.

Company	Application	Website
Bangs Laboratories, Inc.	Cell separation, DNA and RNA purification, immunoassays	www.bangslabs.com
Polysciences, Inc.	Magnetic separation, cell sorting, nucleic acid purification, flow cytometry, calibration, immunoassay, fluorescent microscopy, diagnostic assays	www.polysciences.com
Micromod Partikeltechnologie GmbH	Drug delivery, biomagnetic separation, nucleic acid purification	www.micromod.de
Guerbet SA	X-ray and MRI contrast agents	www.guerbet.com
Ademtech SA	Cell sorting, biomagnetic separation	www.ademtech.com
Advanced Magnetics, Inc.	Treatment of anemia, MRI contrast agents	www.advancedmagnetics.com
Invitrogen Corp.	Immunoassay and nucleic acid <i>in vitro</i> diagnostics, DNA and RNA isolation, protein purification, cell separation and expansion, food and environmental testing	www.invitrogen.com
Estapor (Merck & Co. Inc.)	Chemiluminescent and radio-immunoassays, cell separation, protein purification, immuno-precipitation, bacteria detection, immuno-chromatographic assays	www.estapor.com www.merck.com
MagForce Nanotechnologies AG	Hyperthermia	www.magforce.com
Polymicrospheres (division of Vasmco, Inc.)	Drug delivery, diagnostic assays	www.polymicrospheres.com
Spherotech, Inc.	Cell separation, enzyme immunoassay	www.spherotech.com
Alnis Biosciences, Inc.	Drug delivery for anti-cancer and -infective treatments MagNaGel®105 and smart contrast agents	www.alnis.com
Triton Biosystems, Inc.	Hyperthermia	www.tritonbiosystems.com
Sirtex Medical Ltd.	Radiation therapy	www.sirtex.com
Biophan Technologies, Inc.	Drug delivery	www.biophan.com
Magnamedics GmbH	Drug delivery, <i>in vitro</i> diagnostics	www.magnamedics.com
Chemicell GmbH	Drug delivery (FluidMAG®), bioseparation, gene transfection and detection	www.chemicell.com

33

Bibliografía

- N. Grobert, 10(1-2) *Materials Today* (2007) 28.
- J.A. Lewis, G.M. Gratson, 7(7-8) *Materials Today* (2004) 32.
- L.M. Liz-Marzán, 7(2) *Materials Today* (2004) 26.
- P.K. Jain, I.H. El-Sayed, M.A. El-Sayed, 2(1) *Nanotoday* (2007) 18.
- D.B. Warheit, 7(2) *Materials Today* (2004) 32.
- P. Gould, 7(2) *Materials Today* (2004) 36.
- M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M.R. Ibarra, J. Santamaría, 2(3) *Nanotoday* (2007) 22.

34