



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**PROPIEDADES ÓPTICAS DE LAS**  
**NANOPARTÍCULAS DE SULFURO DE PLATA**

**Autor:** Mario García-Calvo López

**Fecha:** Junio de 2020

**Tutor:** Benito Jorge Rubio Retama

# Índice

	Página
1. RESUMEN .....	2
2. ABSTRACT .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. OBJETIVOS .....	6
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	6
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	6
6.1. Síntesis de las nanopartículas Ag <sub>2</sub> S .....	6
6.2. Propiedades ópticas de las nanopartículas Ag <sub>2</sub> S .....	9
6.3. Aplicaciones clínicas de las nanopartículas Ag <sub>2</sub> S .....	12
6.3.1. Diagnóstico in vivo con termometría transitoria .....	12
6.3.2. Imagen en células diana .....	13
6.3.3. Nanopartículas de Ag <sub>2</sub> S en estudios cerebrales .....	15
6.3.4. Otras aplicaciones nanopartículas Ag <sub>2</sub> S .....	16
6.3.5. Limitaciones nanopartículas de Ag <sub>2</sub> S en la clínica .....	18
7. CONCLUSIONES .....	19
8. BIBLIOGRAFIA .....	20

## 1. RESUMEN

Los sistemas capaces de utilizar el rango del espectro NIR-II están demostrando tener un gran potencial tanto para el diagnóstico como el tratamiento de diversas enfermedades. Esto conduce al desarrollo de nuevas tecnologías y por tanto investigaciones sobre nuevas sondas fluorescentes capaces de utilizar esta técnica. Entre ellas destacan las nanopartículas de sulfuro de plata debido a su gran multifuncionalidad, ya que además de emitir en NIR-II muestran una gran sensibilidad térmica. Esto les hace ideales para varias técnicas que abarcan desde imagen de tejidos tisulares profundos a técnicas termométricas.

En este trabajo se van a analizar estas propiedades termo-ópticas; como afecta la síntesis de las nanopartículas en ellas y como podríamos aprovecharlas en el campo del diagnóstico y la terapéutica.

Las palabras clave han sido *“imagen NIR-II, nanopartículas, Ag<sub>2</sub>S, fluorescencia, rendimiento cuántico, termoterapia”*

## 2. ABSTRACT

The systems capable of using the spectral range NIR-II are showing a great potential not only for the diagnostic but also for the treatment of various diseases. This has brought into the development of new technologies and therefore the research of new fluorescent probes able to use this technique. Among them, silver sulfide nanoparticles have been outstanding due to their great thermal sensitivity. This makes them ideal for different applications that go from deep-tissue imaging to thermometry.

In this report these thermo-optical properties are going to be analyzed; how the synthesis affects them and how can we make them work in the diagnostic and therapeutic field.

The key words have been *“NIR-II imaging, nanoparticles, Ag<sub>2</sub>S, Fluorescence, Quantum Yield, thermotherapy,”*

### 3. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de imagen biomédicas se usan de forma rutinaria en la práctica clínica, ya que proveen de una información esencial sobre los órganos y tejidos de los seres vivos que de otra forma sería inalcanzable. Estas técnicas no invasivas permiten el diagnóstico y seguimiento de diferentes enfermedades lo que ha incrementado el interés en su investigación clínica.

La fluorescencia ha aparecido en la última década como una técnica con diversas ventajas sobre las ya existentes, como la resonancia magnética o la tomografía. Esta técnica que utiliza radiación no ionizante como fuente de excitación es además la única que da la posibilidad de visualizar la imagen a tiempo real. Su gran relación efectividad-coste las sitúan como una de las técnicas más utilizadas en la visualización de células y tejidos in vitro.<sup>1</sup>

La técnica de la fluorescencia se basa en que las moléculas tienen diferentes estados llamados niveles de energía. En general, las especies tendrán un estado electrónico basal (un estado de baja energía) de interés, y un estado electrónico excitado de mayor energía. Dentro de cada uno de estos estados electrónicos hay diferentes estados vibracionales.

En la espectroscopia de fluorescencia, primero se excita la muestra mediante la absorción de un fotón de luz, desde su estado electrónico basal a uno de los distintos estados vibracionales del estado electrónico excitado. Las colisiones con otras moléculas causan que la molécula excitada pierda energía vibracional hasta que alcanza el estado más bajo.

La molécula desciende luego a uno de los distintos niveles de vibración del estado electrónico basal, emitiendo un fotón en el proceso. Como las moléculas pueden caer a cualquiera de los diferentes niveles de vibración en el estado basal, los fotones emitidos tendrán diferentes energías y, por lo tanto, frecuencias. Así pues, mediante el análisis de las diferentes frecuencias de luz emitidas junto con sus intensidades relativas, se puede determinar la estructura de los diferentes niveles de vibración.<sup>2</sup>

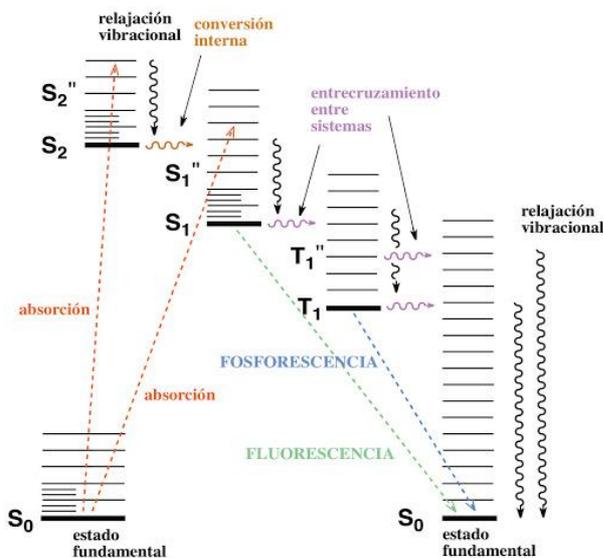


Figura 1. Diagrama de Jablonski.

Este diagrama permite visualizar los procesos asociados a la irradiación de luz: Excitación del estado fundamental (S), vibracional (S\*) y recuperación del estado fundamental (S<sub>0</sub>) con emisión de fluorescencia.<sup>2</sup>

En un experimento típico, se miden las diferentes frecuencias de luz fluorescente emitida por una muestra, manteniendo la luz de excitación a una longitud de onda constante. A esto se le llama espectro de emisión. Un espectro de excitación se mide mediante el registro de una serie de espectros de emisión utilizando luz de diferentes longitudes de onda.<sup>2</sup>

En la imagen in vivo la profundidad de penetración de los fotones depende de la absorción y dispersión de los elementos tisulares. Mientras, la fluorescencia y dispersión de fotones generados por el tejido en si mismo causara interferencias de ruido y radiación de fondo. Por lo tanto la imagen fluorescente tiene limitaciones en la práctica clínica ya que hay componentes activos del organismo (melanina, hemoglobina...) que tienen una mayor absorción de luz y dispersión en lo que llamamos banda visible (que se sitúa entre los 400-700nm) lo que hace que se reduzca la penetración de la luz visible.

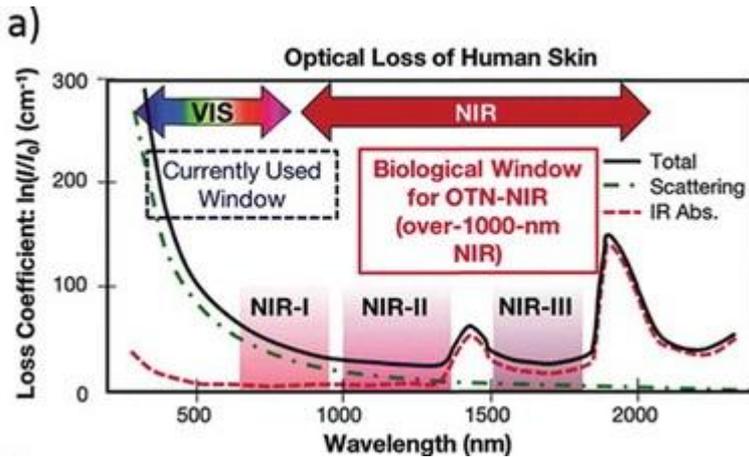
Sin embargo la luz infrarroja cercana (NIR) es menos absorbida y dispersada por los tejidos biológicos que la luz visible, es por esto que la primera es capaz de penetrar en estos tejidos, véase la piel, de una manera mucho más eficaz.<sup>3 4</sup>

Para este tipo de visualizaciones se utilizan las conocidas como sondas fluorescentes, que permiten una visualización tridimensional de forma no destructiva. Sin embargo son muy poco estables, lo que motivó la búsqueda de alternativas que han resultado en la investigación y desarrollo de nanopartículas luminiscentes. De este modo podemos encontrar nanopartículas orgánicas, metálicas o de ascensión trascendente. Por encima de todas ellas destacaron las nanopartículas semiconductoras, en concreto los denominados puntos cuánticos (QDs). Estas mostraban unas cualidades ópticas sobresalientes como una alta estabilidad fotoquímica, una gran posibilidad de absorción, gran fluorescencia de campo cuántico, facilidad para modificar su superficie y la posibilidad de confeccionar estas propiedades mencionadas cambiando su composición y tamaño.<sup>5</sup>

En los primeros experimentos con este tipo de nanopartículas se vio que eran excelentes sondas fluorescentes pero se encontraron con el problema de la luz visible emitida por los tejidos. Para una alta penetración en las imágenes in vivo se necesitarían agentes de contraste que se sitúen en rangos espectrales donde los tejidos sean prácticamente transparentes.

Todo esto llevo a diversos estudios que concluyeron que la mejor opción sería usar sondas fluorescentes que se exciten ópticamente en la primera ventana biológica (NIR-I) y que se muestren en la segunda ventana biológica (NIR-II). Como ejemplo principal de nanopartícula semiconductora que cumpla este requisito tenemos los PbS QDs. Estas nanopartículas tienen unas propiedades ópticas casi insuperables que sin embargo no se pueden ver reflejadas en la práctica clínica debido a que en su composición se encuentra el plomo, un metal pesado que pondría en riesgo la salud del paciente en caso de que se acumulara en el organismo.<sup>5</sup>

Es necesario el desarrollo de agentes de contraste que no sean tóxicos y capaces de producir imagen en la ventana NIR-II. No hay muchas nanopartículas semiconductoras capaces de cumplir todos los requisitos, entre estas las más investigadas han sido las nanopartículas de sulfuro de plata (Ag<sub>2</sub>S QDs).



**Figura 2.** Absorción de la piel humana en las regiones del espectro visible, NIR-I, NIR-II y NIR-III<sup>6</sup>

Aparte de ser biocompatible, uno de los mayores retos para la aplicación de las sondas fluorescentes está relacionado con lo que conocemos como rendimiento cuántico. Este concepto es una medida para medir la eficiencia de la emisión de un fotón a través de la fluorescencia y se define como el ratio del número de fotones emitido entre el número de fotones absorbido. En otras palabras, el rendimiento cuántico fluorescente nos da la probabilidad de que nuestro campo excitado sea desactivado por la fluorescencia y no por otro mecanismo no radiactivo. Esta medida nos proporciona un valor de entre 0 y 1, a mayor valor mayor será la intensidad de la señal fluorescente.<sup>7</sup>

Aplicando este concepto a algunos ejemplos de nanopartículas fluorescentes capaces de producir imagen en la ventana NIR nos encontramos valores inferiores al 1% en distintos compuestos orgánicos que emiten en la región NIR-II como CH1055 o SWNT. Con respecto a los compuestos inorgánicos los valores aumentan considerablemente hasta el 40% cuando hablamos de nanopartículas que se componen de metales pesados (PbS o CdHgTe) pero estas, como ya hemos comentado anteriormente, se han descartado por su toxicidad. Por desgracia y a pesar de ser también un compuesto inorgánico, las nanopartículas de sulfuro de plata registran en casi todas las investigaciones un rendimiento cuántico muy inferior al que cabría esperar situándose normalmente en valores sobre el 1%.<sup>1</sup>

Este trabajo se va a dividir en 3 secciones en las que se va a exponer un resumen de las características y aplicaciones de Ag<sub>2</sub>S QDs. En la sección 1 hablaremos de la síntesis de las nanopartículas y cómo influye en las propiedades de estas. En la sección 2 expondremos estas propiedades ópticas que hacen este compuesto el ideal para su desarrollo experimental. Por último en la sección 3 veremos los posibles usos que se le pueden dar en el ámbito sanitario y científico, su traslado a la clínica así como las limitaciones que le impiden dar este paso.

## 4. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en realizar una revisión bibliográfica de los estudios realizados hasta la fecha sobre las nanopartículas de sulfuro de plata.

- Cuáles son los avances que se han realizado recientemente sobre este material.
- Por qué sus propiedades ópticas resultan idoneas y mejoran a las de sus homólogos.
- Analizar las posibles aplicaciones clínicas que podemos dar a este sistema.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Para la elaboración de este trabajo se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica, cuyo principal objetivo era recopilar información mediante la lectura y comprensión de artículos científicos publicados en los últimos años, obtenidos en páginas webs como PubMed (motor de búsqueda de la base de datos Medline) o ScienceDirect así como en el buscador Google Académico.

Los criterios de búsqueda fueron publicaciones entre 2010 y 2020, tanto en inglés como en castellano.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Rutas de síntesis de las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

El sulfuro de plata en su estructura  $\alpha$  es uno de los materiales semiconductores mas antiguos empleados, desde el siglo XIX sus propiedades como conductor a altas temperaturas y aislante son bien conocidas.

Este compuesto se puede encontrar en tres formas cristalinas principales dependiendo de la temperatura a la que se encuentre:  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>S es estable a temperaturas inferiores a 178°C y tiene estructura cristalina monoclinica. Además de esta fase sólida encontramos también: la cúbica centrada en el cuerpo (estable de 178 a 586°C) y la cúbica centrada en las caras ( a temperaturas superiores a 586°C). La química de este compuesto es bastante simple, lo que resulta en una ruta de síntesis mucho mas sencilla que los de otras nanoestructuras como pueden ser la de los nanotubos de carbono de pared simple (SWNTs).<sup>5</sup>

Sin embargo, la síntesis de una matriz de Ag<sub>2</sub>S de alta eficiencia resulta mucho mas complicado. Esto es así por la alta movilidad que presentan los iones de plata así como la alta reactividad que bajo condiciones sintéticas favorece la aparición de fases metálicas dentro de la matriz. Estos dos factores pueden ser responsables de

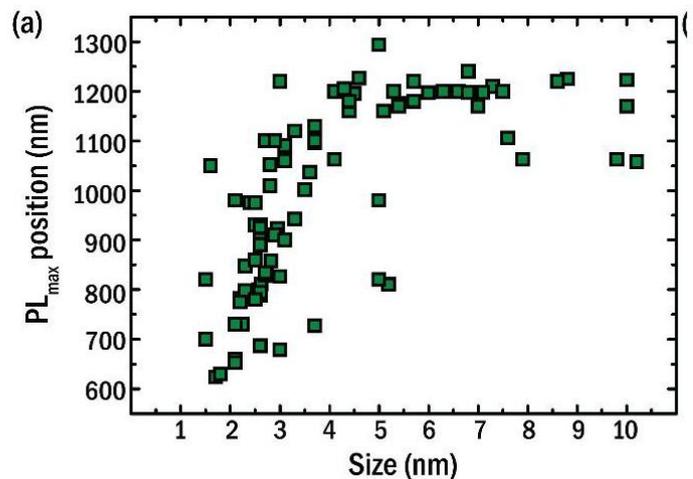
un rendimiento cuántico bajo por lo que buscar una técnica adecuada es esencial para producir nanopartículas de sulfuro de plata con las mejores propiedades ópticas posibles.

Se han usado diferentes métodos y rutas para la síntesis de las nanopartículas de  $\text{Ag}_2\text{S}$ , los mas representativos son:

1. Conversión en fase sólida de nanopartículas de plata en polímeros
2. Reacción de co-precipitación entre los iones de  $\text{Ag}^+$  y  $\text{S}^{2-}$  en presencia de agentes estabilizadores como tioles o polímeros. El problema de esta técnica es el extremadamente bajo producto de solubilidad del  $\text{Ag}_2\text{S}$  ( $K_{sp}=6.1 \cdot 10^{-51}$ ) que lo hace termodinámicamente difícil de controlar.
3. Síntesis en medio polar en presencia de albúmina
4. Decomposición térmica en medio orgánico a alta temperatura. Esta ha sido la técnica mas usada para producir nanopartículas controlando su tamaño.<sup>5</sup>

Diferentes rutas de síntesis dan lugar a diferentes tamaños en las nanopartículas (entre 1.5nm y 10 nm) que a su vez dan lugar a diferentes propiedades ópticas. Sin embargo podemos correlacionar estos aspectos.

Si enfrentamos la longitud de onda media del  $\text{Ag}_2\text{S}$  con el tamaño de la partícula vemos como aquellas que refieren un tamaño menor a 4nm muestran una gran variación en su pico de emisión. Por otro lado, aquellas cuyo tamaño es superior a 4nm muestran un pico de emisión comprendido entre 1050 y 1250nm. Esto se puede explicar sabiendo que el radio de excitación de Bohr esta cercano a los 2nm por lo que nanopartículas de tamaños proximos se ven afectadas por lo que llamamos efecto de confinamiento cuántico.<sup>5</sup>



**Figura 3.** Comparación de la fotoluminiscencia máxima con el tamaño para  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs.<sup>5</sup>

Otro factor a tener en cuenta a la hora de seleccionar la ruta de síntesis es su origen sintético. Las nanopartículas producidas a través de la decomposición de sales metálicas en medio orgánico muestran bandas de emisión en el rango NIR-II (1000-1500nm), pero si seguimos una ruta de síntesis llevada a cabo en un medio polar nos encontramos con una mayor variabilidad en las bandas de emisión (500-1300nm) así como una mayor variabilidad en el tamaño de la partícula.

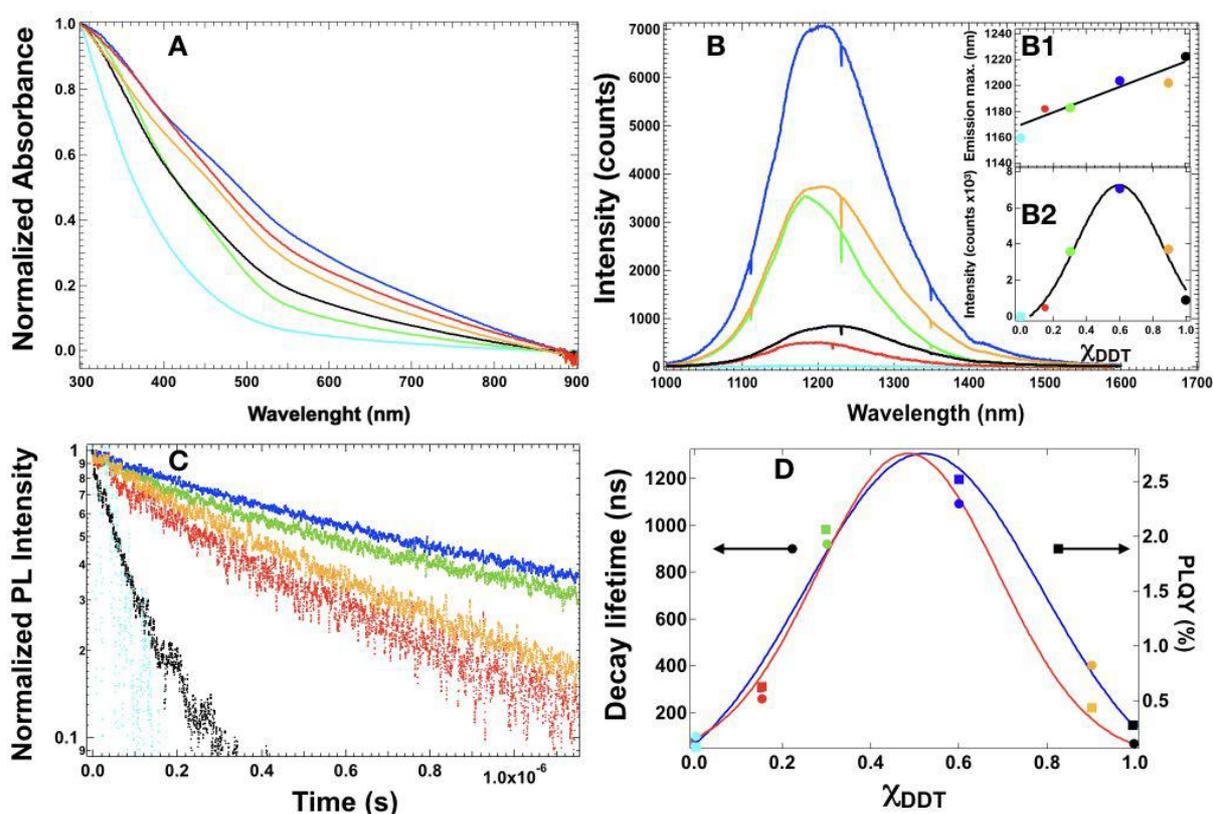
Un estudio de este mismo año realizado en España ha demostrado que condiciones se han de seguir en la ruta sintética de las nanopartículas de sulfuro de plata para que estas tengan unas propiedades fotolumínicas óptimas.<sup>1</sup>

Gracias a este trabajo podemos afirmar que una cantidad específica de la plata que componen las nanopartículas mejora tanto el rendimiento cuántico como la vida media de ellas.

Para demostrarlo se siguió la misma ruta de síntesis para todas las nanopartículas pero con diferentes proporciones en el solvente. Este solvente es una mezcla basada en dos compuestos distintos llamados OLA y DDT por lo que podemos modificar la fracción molar ( $X_{DDT}$ ) e ir probando distintos ratios. Se utilizaron seis fracciones molares distintas para este estudio;  $X_{DDT}$  de 0,00; 0,15; 0,30; 0,60; 0,90; 1,00.

Los resultados mostraron que muchas de las características se veían afectadas por este parámetro, por ejemplo se pudo observar como según aumenta el ratio  $X_{DDT}$  va disminuyendo el tamaño medio de las nanopartículas.

Sin embargo cabe destacar como en la **figura 4** podemos apreciar que a una proporción específica, concretamente  $X_{DDT}$  de 0,60 (marcada con el color azul) las propiedades ópticas (absorción, fotoluminiscencia, tiempo de vida y rendimiento cuántico) de nuestras nanopartículas alcanza su grado más óptimo.<sup>1</sup>



**Figura 4.** a) Espectro visible de las nanopartículas. b) Fotoluminiscencia en diferentes condiciones de las NPs sintetizadas. Dentro b1) y b2) muestran variación de la emisión máxima y la intensidad en función del solvente c) Decaimiento de la fotoluminiscencia d) Tiempo de vida y rendimiento cuántico en función del solvente. Leyenda Ag<sub>2</sub>S-0.00 cian, Ag<sub>2</sub>S-0.15 rojo, Ag<sub>2</sub>S-0.30 verde, Ag<sub>2</sub>S-0.60 azul, Ag<sub>2</sub>S-0.90 naranja, Ag<sub>2</sub>S-1.00 negro.<sup>1</sup>

La **gráfica A** muestra la absorción normal para todas las muestras en un rango comprendido entre 300 y 900 nm, en una longitud de onda del espectro visible es cuando la absorbancia es más fuerte para todas las muestras.

En la **gráfica B** podemos ver la banda de emisión obtenida a una excitación de 800 nm en las diferentes muestras. Aquí podemos apreciar la primera diferencia clara en

las propiedades atendiendo a la ruta de síntesis, la intensidad varía en función de la proporción pero además en la **figura B1** podemos apreciar como el pico de esa intensidad se da en valores mas cercanos a la banda infrarroja según vamos aumentando la fracción molar de  $X_{DDT}$ .

Finalmente observamos en las **gráficas C y D** el tiempo de decadencia de la luminiscencia. En la primera vemos que la diferencia del tiempo de vida sube desde los 120 ns a los 1200 ns cuando se utiliza  $X_{DDT}$  0,60. En la segunda de estas gráficas los resultados son acordes y es también con esta fracción molar donde conseguimos un mayor rendimiento cuántico de 2,3%. Cabe destacar también que los resultados no siguen una proporción lineal en estos dos últimos casos, ambos parámetros son bajos para un ratio bajo, van aumentando hasta el 0,60 y es a partir de este valor cuando a pesar de aumentar la proporción de  $X_{DDT}$  los parámetros vuelven a valores similares a fracción molar bajo de solvente.

Posteriormente se procedio a inyectar las nanopartículas que habian resultado tener las mejores propiedades ópticas en un ratón para comprobar que mantenian dichas características en estudios in vivo.

Las conclusiones fueron exitosas por lo que se pudo afirmar que estas nanopartículas con esta nueva síntesis mejoran considerablemente a las que están disponibles actualmente en el mercado. <sup>1</sup>

## 6.2. Propiedades ópticas de las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

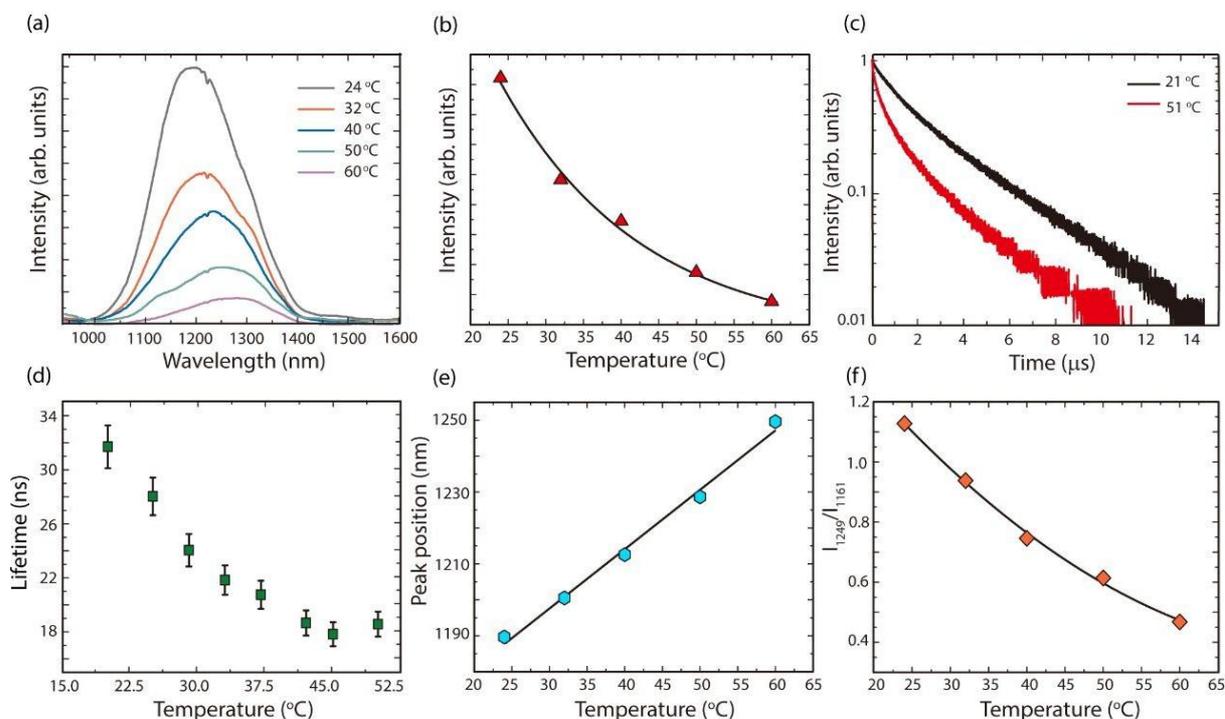
Como ya sabemos este material es capaz de presentar una banda de emisión en la ventana biologica NIR-II (sobre 1200nm), sin embargo, lo que hace a este tipo de nanopartículas únicas con respecto a sus competidoras es su fuerte termodependencia en rangos de temperaturas que consideramos biológicas (unos 37°C). Esto nos permite usarlas no solo como agentes de contraste NIR-II sino como nanotermómetros fluorescentes para imagen in vivo.

Si enfrentamos nuestro material a la variación de temperatura nos encontramos unas serie de propiedades singulares que vamos a analizar a través de la **figura 5**: <sup>5</sup>

- En la **gráfica A** se muestra el espectro de emisión obtenido de una dispersión coloidal de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S, de 10 nm de diámetro, a una longitud de onda de 808nm. Estos valores se obtienen para temperaturas entre 24°C y 60°C. El efecto mas notable que podemos observar es el fuerte cambio en la intensidad de la fluorescencia que ocurre en un margen de temperatura relativamente pequeño.
- En la **figura B** podemos examinar en profundidad esta tendencia. Comprobamos que la banda de fluorescencia correspondiente a 1200nm decae casi un 90% su intensidad cuando incrementamos la temperatura de 20°C a 60°C.

En estudios previos se habia presentado que la relación entre la intensidad de la fluorescencia y el incremento de la temperatura es prácticamente lineal, sin embargo esta gráfica nos muestra como esto solo es cierto para temperaturas por debajo de 45°C.

- La **gráfica C** corresponde a la curva de decaencia de la fluorescencia de nanopartículas de sulfuro de plata dispersadas en agua a dos temperaturas diferentes. En ella se ve como la curva es mas pronunciada a temperaturas altas.
- Si relacionamos la temperatura con el tiempo que tardan en extinguirse las nanopartículas como en la **gráfica D** nos encontramos con el mismo patron. A temperatura ambiente encontramos el valor mas alto, pero este va disminuyendo rápidamente. De hecho, si medimos la velocidad de decrecimiento de las nanopartículas nos encontramos que por cada grado que aumentamos se pierde un 4% de tiempo de vida. Este valor es el doble del que podemos encontrar en otras nanopartículas semiconductoras y recalca el potencial como nanotermómetros luminiscentes basados en el tiempo de vida. Pero a su vez se vuelve mas complicado la implementación práctica ya que se requieren de equipo que sea capaz de excitar y detectar la emisión de forma mucho mas rápida. Este tipo de láseres y detectores rapido son mas faciles de aplicar en medidas in vitro. Sin embargo, si queremos aplicar las nanopartículas como medidores de la temperatura local debemos saber que es lo que provoca dichos cambios tan pronunciados en los valores estudiados.
- Incremento de la temperatura significa un desplazamiento hacia el infrarrojo en la emisión de Ag<sub>2</sub>S como muestra la **figura E**. Esto significa que a medida que sube la temperatura las nanopartículas tienen su pico de intensidad en una posición mas cercana a longitudes de onda mas altas. En la mayoría de sistemas este proceso depende de otros factores físicos como la brecha energética o el confinamiento cuántico. Al ser un parámetro multidependiente en principio no podría usarse como medidor de la temperatura, sin embargo en la gráfica se puede observar una tendencia lineal lo que indicaría que para este compuesto el proceso depende casi exclusivamente de la temperatura. Este hecho abre las puertas a la posibilidad de utilizar estas nanopartículas como nanotermómetros teniendo que hacer una simple medición espectral y posteriormente aplicar una relación lineal aunque esta forma de medición esta aún por explorar.
- El desplazamiento espectral inducido por la temperatura también se hace visible cuando medimos la intensidad de la emisión a dos longitudes de onda distintas. En la **gráfica F** se ha utilizado el ratio entre la intensidad medida a 1161 nm y a 1249 nm enfrentada a un incremento de temperatura. Como consecuencia directa del desplazamiento al infrarrojo anteriormente mencionado el ratio la diferencia se hace un 3% mas pequeña a medida que aumenta la temperatura. Este parámetro es mucho mas alto que el de otros nanotermómetros que emiten en NIR-II que suelen estar en torno al 1%.<sup>5,8</sup>



**Figura 5.** a) Espectro emisión para NPs entre 24 y 60°C b) Intensidad de la emisión enfrentada a la temperatura c) Decaimiento de la fluorescencia de las Ag<sub>2</sub>S NPs d) Tiempo de vida en el agua de las NPs frente a la temperatura e) Pico de emisión obtenido para diferentes temperaturas f) Dependencia de la temperatura al ratio de intensidad.<sup>5</sup>

Todas estas propiedades son muy importantes ya que nos muestran la sensibilidad a la temperatura de este material siendo capaz de proveer una lectura de la temperatura absoluta de un medio sin verse afectado por los cambios de concentración que puedan haber en este.

Otra característica ya mencionada era su bajo rendimiento cuántico, recordemos que situado sobre un 1%. Sin embargo este material ha demostrado que permite visualizaciones en tejidos profundos, esto es posible ya que tiene una alta conversión fototérmica. La fracción absorbida por este material es muy pequeña pero la cantidad de esta transformada en calor es muy alta (mas del 99%).

Es por ello que Ag<sub>2</sub>S muestra propiedades que la hacen óptima para tres aspectos muy importantes como son la imagen in vivo, sensibilidad térmica in vivo y calentamiento remoto. Realizar estas tres técnicas sabemos que es posible con otras nanopartículas como PbS pero todavía no se ha demostrado para Ag<sub>2</sub>S aunque muestra potencial para ello.<sup>5</sup>

Visto el potencial que le confieren las diversas propiedades de las nanopartículas de sulfuro de plata podemos realizar una comparación con otros sistemas capaces de emitir en NIR-II y cuya funcionalidad en la aplicación clínica sea posible (descartamos comparaciones con nanopartículas que contengan metales pesados).

- La primera propiedad comparable sería su simplicidad en la síntesis, en la que solo el verde de indocaina (tinte) puede superarlo.
- Con respecto a la luminosidad al emitir en NIR-II las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S se muestran superiores a sus competidores
- La cualidad en la que destaca este sistema de forma más clara es la sensibilidad térmica, solo las nanopartículas dopadas con lantánidos pueden acercarse ligeramente.

- Por último en la eficiencia de calentamiento destacan dos sistemas por encima del resto; los nanotubos de carbono y las nanopartículas de sulfuro de plata.<sup>5</sup>

Así pues podemos observar como en el cómputo general nuestro sistema muestra unas mejores propiedades que sus competidores haciéndolo el material idóneo para continuar las investigaciones en el campo de la emisión NIR-II.

### 6.3. Aplicaciones clínicas de las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

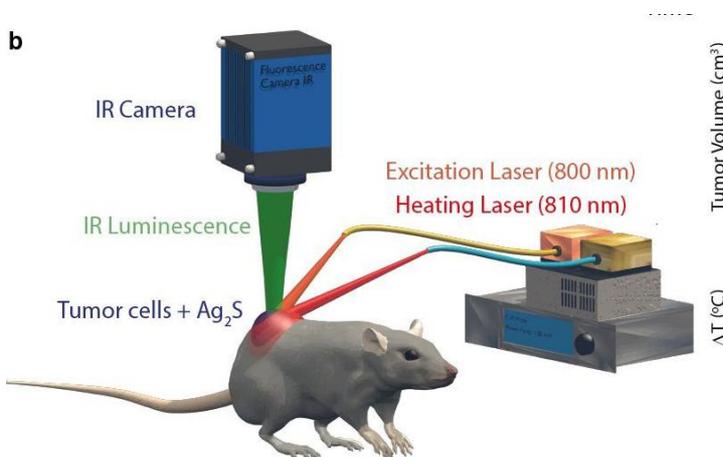
#### 6.3.1. Diagnóstico in vivo con termometría transitoria

Hay muy pocas sondas luminiscentes que emitan en NIR-II que sean capaces de al mismo tiempo calentar y tener una sensibilidad al calor a través de un rayo de excitación óptica, Ag<sub>2</sub>S es uno de ellos.

Esta característica tan especial puede llevar a las nanopartículas de sulfuro de plata a jugar un papel crucial en este tipo de termometría.

Esta técnica se basa en la diferencia de conducción del calor que tienen los distintos tejidos de un organismo dependiendo de características como la densidad del tejido, generación metabólica, perfusión sanguínea o calor específico entre otras.

De esta manera, elevamos la temperatura del tejido por encima de su temperatura basal por una fuente externa y de manera natural la temperatura volverá a su valor habitual tras la exposición a la fuente de calor. La variación del tiempo por el cual la temperatura vuelve a su estado basal nos va a proporcionar información sobre las características del tejido analizado.<sup>5</sup>



**Figura 6.** Diagrama esquemático de la disposición del experimento usado para medir in vivo en la termometría transitoria tanto células tumorales como sanas.<sup>9</sup>

Se ha demostrado que esta propiedad puede repercutir en un gran avance en el diagnóstico precoz de tejidos dañados. Así por ejemplo se han utilizado nanopartículas NIR-II en el tejido subcutáneo de ratones sanos y en tejidos isquémicos dando resultados prometedores ya que se apreciaba una diferencia en ambos parámetros.

Uno de los últimos estudios en esta materia inyectó intratumoralmente nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S para evaluar el desarrollo tumoral en un murino con

melanoma. Se estudió la evolución desde el día 0 hasta que la necrosis se hizo evidente sobre el día 14. Para ello se utilizó un láser que elevó la temperatura del tejido tumoral 7°C y que fue apagado tras cuatro minutos de acción y a su vez se utilizó otro láser de menor intensidad cuyo objetivo era captar la excitación óptica de las nanopartículas. Se observaron diferencias en las características térmicas del tejido tumoral que se atribuyeron a cambios en la perfusión de sangre así como en la generación de calor metabólico sobretodo durante la fase del desarrollo del tumor correspondiente al paso de angiogénesis a necrosis.

Los resultados fueron muy positivos concluyendo que la termometría transitoria acortó el tiempo requerido para diagnosticar el tumor en un 60% en comparación con los métodos de diagnóstico habituales.<sup>9</sup>

### 6.3.2. Imagen en células diana con nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S

Existen varios estudios en los que se ha modificado la superficie de las nanopartículas de modo que actúen en un tejido diana en concreto tanto a nivel de diagnóstico como terapéutico, sin embargo son pocos los que han resultado con éxito. En nuestro caso el sulfuro de plata se ha utilizado sobretodo para la detección de tumores in vivo de la siguiente forma:<sup>10</sup>

- Se marca la nanopartícula con ácido fólico de modo que se detecta el tumor por la unión de la nanopartícula con receptores de ácido fólico que están sobreexpresados en las células cancerígenas.
- Modificación de la superficie de la nanopartícula con anticuerpos y péptidos capaces de unirse a factores de crecimiento vasculares. Con este método podemos encontrar tejidos que están sufriendo la fase conocida como angiogénesis en tumores y que se caracteriza por un cambio de la vascularización local de la zona.
- Se ha conseguido localizar y dar imagen a células MCF 7 características del cáncer de mama a través de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S conjugadas en su superficie con aptámeros de ADN. Estas células consiguen desplazarse de la zona tumoral al torrente sanguíneo por lo que su detección es difícil, se consiguió utilizando la sinergia existente entre Ag<sub>2</sub>S y otras nanopartículas magnéticas.
- Uniendo la superficie de la nanopartícula a alendronato se ha podido visualizar la metástasis ósea in vivo. Este hecho es muy importante ya que se consiguió utilizar un fármaco aprobado como modificador de superficie para que la nanopartícula se dirigiera a una célula diana, en este caso osteoclastos de los huesos.
- Detección in vivo de células cancerígenas metastásicas de un cáncer de mama a través de la adhesión de nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S al receptor de quimioquinas 4 (CXCR4). Esto se consiguió modificando la superficie de la nanopartícula con un fármaco llamado plerixafor que se utiliza para la inhibición de dicho receptor.<sup>5, 10, 11</sup>

Todos estos estudios han sido realizados con el objetivo de encontrar nuevas formas de detección de tumores, sin embargo, no es la única aplicación clínica que

podemos encontrar utilizando las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S para la visualización de imágenes en células diana específicas.

Las enfermedades cardiovasculares tienen actualmente una alta prevalencia en la sociedad y en su diagnóstico y tratamiento pueden jugar un papel clave estas nanopartículas. Recientemente se publicó un estudio en el que se modificaba la superficie de la nanopartícula con angiotensina II, un péptido endógeno que tiene alta afinidad por el receptor AT1R.<sup>12</sup>

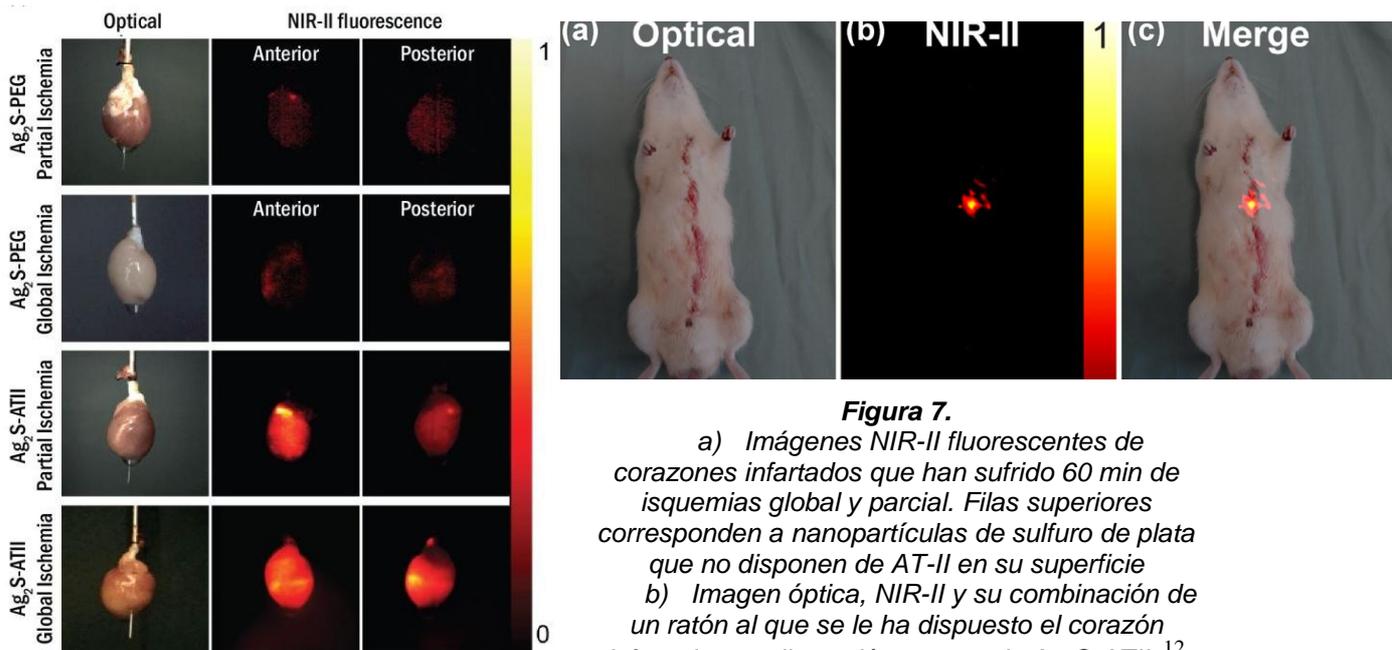
Al producirse un episodio isquémico se dañan las células del miocardio que sobreexpresan este receptor, de esta forma las nanopartículas se dirigen al tejido infartado donde se unen a él de forma rápida. Esto permite una visualización casi inmediata sin tener que disponer de largos periodos de circulación de las sondas fluorescentes en el organismo.

En la **figura 7a** podemos ver un corazón ex vivo que ha sufrido una isquemia parcial y otra global. Las dos filas superiores se puede comprobar que tras 60 minutos la fluorescencia es mucho más débil que en las dos filas inferiores en las que la superficie de la nanopartícula sí ha sido modificada con el péptido.

Los resultados muestran una clara correlación entre la luminosidad de la señal y la localización, extensión y el nivel de daño de los tejidos afectados. La duración del proceso isquémico afecta tanto al daño como a la extensión de dichos tejidos.

También se exploró la posibilidad de utilizar estas nanopartículas para la detección de tejido infartado pero esta vez utilizándose todo el cuerpo de un ratón. Para ello se colocó el corazón afectado dentro del animal y se procedió a comprobar si la fluorescencia era lo suficientemente fuerte como para conseguir imágenes nítidas.

En la **imagen 7b** podemos comprobar como esta técnica permite también su aplicación in vivo ya que la emisión consigue llegar a tejidos profundos. El resultado concluyó que el uso de las nanopartículas de sulfuro de plata conjugadas con AT-II puede suponer un gran paso a la hora de diagnosticar enfermedades cardiovasculares y de localizar tejidos infartados en el organismo con una técnica mínimamente invasiva.<sup>12</sup>



**Figura 7.**

a) Imágenes NIR-II fluorescentes de corazones infartados que han sufrido 60 min de isquemias global y parcial. Filas superiores corresponden a nanopartículas de sulfuro de plata que no disponen de AT-II en su superficie  
b) Imagen óptica, NIR-II y su combinación de un ratón al que se le ha dispuesto el corazón infartado con dispersión acuosa de Ag<sub>2</sub>S-ATII.<sup>12</sup>

### 6.3.3. Nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S en estudios cerebrales

Las propiedades de estas nanopartículas lo han situado como una potencial herramienta para la terapia y el diagnóstico en este ámbito, teniendo un amplio rango de aplicaciones que pueden ser fármacos dirigidos contra esta diana, terapia fototermal o visualización en imagen.

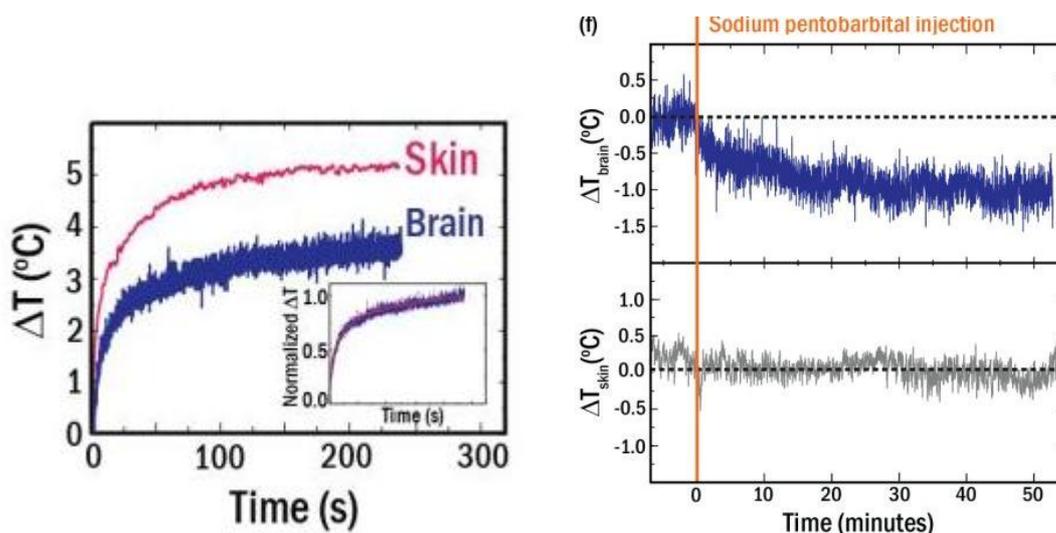
El principal problema que nos encontramos en este tipo de clínica es la barrera hematoencefálica, que separa y controla el tráfico de moléculas hacia el tejido cerebral. Para poder dirigir las nanopartículas hacia el cerebro se han seguido una serie de estrategias como la administración por rutas específicas, funcionalización de las nanopartículas con péptidos cuya diana son receptores expresados específicamente en la barrera hematoencefálica o incluso la rotura artificial transitoria de esta.

Se han realizado estudios con diversas nanopartículas tales como nanotubos de carbono o NPs polimericas entre otras. Sin embargo son escasos los estudios que han utilizado sulfuro de plata con aplicaciones cerebrales por lo que su traslado a la clínica en este aspecto esta prácticamente inexplorado. Vamos a remarcar dos de ellos.<sup>5</sup>

En el primer caso se va explorar la aplicación clínica de estas nanopartículas diseñadas de forma dual junto con Gd-DOTA. Esto combina la profundidad a la hora de visualizar tejidos que nos da la resonancia magnética (Gd) con la buena resolución espaciotemporal del nanosulfuro de plata. Se inyectaron estas nanopartículas Gd-DOTA-Ag<sub>2</sub>S en un ratón con un tumor cerebral inducido para averiguar el potencial que esta herramienta podía tener tanto a nivel preoperatorio para la detección del tumor como durante la operación para aumentar la precisión a la hora de extirpar el tejido cáncergenico. La cirugía guiada por esta técnica resulto un éxito consiguiendo una reducción de células tumorales 3 veces mayor que con cirugía a simple vista. Además la combinación de ambas nanopartículas no dió toxicidad destacable en el mes posterior a su administración. Este tipo de técnica muestra un gran potencial ya que podría mejorar la cirugía que requiere de una gran precisión como puede ser la cerebral.<sup>13</sup>

El segundo utiliza estas nanopartículas como nanotermómetros. Se sabe que las variaciones de temperatura en el cerebro son normalmente menores de 3°C ya que existen mecanismos circulatorios que evitan grandes cambios. Esto hace que sea imprescindible utilizar herramientas de medición con gran sensibilidad que sean capaces de captar esta variación. Es por ellos que las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S resultan muy útiles para esta tarea ya que son capaces de registrar cambios de temperatura inferiores a un grado.

Para demostrar esto se inyectaron intracerebralmente las nanopartículas para posteriormente hacer una lectura remota de la temperatura cerebral bajo una excitación óptica de 808 nm. El valor obtenido debia ser correctamente contrastado, para ello primero se indujo un calor moderado en la piel del ratón a través de un láser. Enfrentando la temperatura con el tiempo podemos apreciar en la gráfica de la izquierda como las curvas siguen tendencias similares lo que nos muestra una clara relación entre el valor obtenido gracias a la emisión de las nanopartículas y la temperatura cerebral.<sup>14</sup>



**Figura 8.** a) Temperatura de la piel y el cerebro aumentando tras administrar calor a través de un láser b) Cambios de temperatura en el cerebro y en la superficie de la piel durante un coma barbiturico.<sup>14</sup>

A su vez se realizó un experimento similar para proveer de más pruebas que reafirmen la teoría de que existe un mecanismo que regula la temperatura del cerebro. De este modo se procedió a realizar un enfriamiento total a un ratón anestesiado. Los valores de temperatura corporal bajaron hasta 20°C menos de la temperatura habitual sin embargo para el cerebro solo se produjo una bajada de 3°C y a una velocidad tres veces más lenta.

Por último, se indujo un coma barbiturico a un ratón obteniéndose evidencias de que la temperatura del cerebro y su actividad están correlacionadas.<sup>14</sup>

Estos tres experimentos fueron posibles gracias a las propiedades termo-ópticas de las nanopartículas de sulfuro de plata.

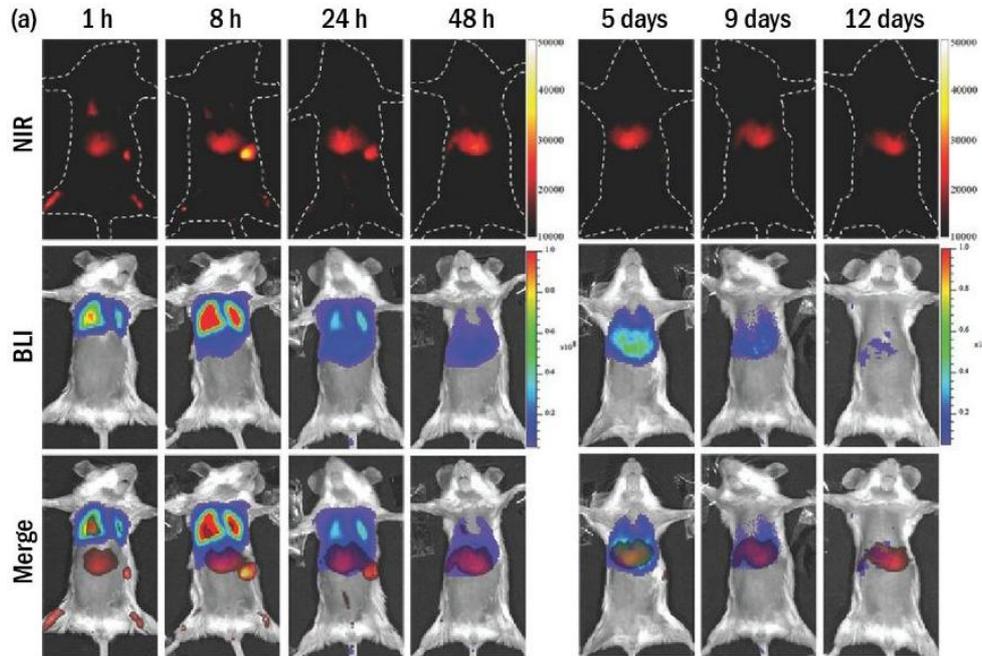
#### 6.3.4. Otras aplicaciones nanopartículas Ag<sub>2</sub>S

Las propiedades ópticas de este compuesto nos hacen relacionarlo con técnicas orientadas a la imagen y la termoterapia sin embargo existen otras aplicaciones potenciales para las nanopartículas de sulfuro de plata.

Una de las más prometedoras es el rastreo de células en el organismo. Tratamientos como la terapia con células madre están a la vanguardia de la investigación, aunque si bien son muy prometedores todavía hace falta conocer más sobre sus mecanismos de acción. Uno de los principales problemas con esta terapia es la falta de información sobre la distribución, viabilidad y aclaramiento celular de las células madre una vez son transplantadas. Resulta esencial conocer el proceso y su mecanismo regenerador antes de poder aplicar esta técnica en la clínica. Es aquí donde las nanopartículas de sulfuro de plata pueden ser muy útiles.<sup>5</sup>

Un estudio refleja como la fluorescencia NIR-II puede ayudar a monitorizar la distribución de células madre marcadas tras su trasplante en un ratón. A través de la sinergia de nuestras nanopartículas con la imagen bioluminiscente (BLI), que es una técnica de imagen molecular, se consiguió localizar y cuantificar las células

madre mesenquimales (mMSCs). Mientras tanto la emisión NIR-II resaltó la distribución tanto de las células vivas como las muertas por todo el cuerpo. Estos resultados no son posibles de alcanzar con la técnicas actuales ya que el BLI solo permite observar las células vivas al igual que la resonancia magnética que tampoco nos permite ver que células han sobrevivido tras el transplante.<sup>15</sup>



**Figura 9.** En esta imagen podemos apreciar el rastreo de de las células mMSCs trasplantadas a un ratón para la regeneración del hígado. Se muestran las imágenes NIR-II, BLI y una combinación de ambas.<sup>15</sup>

También se ha utilizado recientemente las nanopartículas de sulfuro de plata como parte de la terapia fotodinámica. Este tipo de técnica es utilizada entre otras como supresor de células tumorales sobretodo en la piel. Se basa en dos etapas que combinan energía luminosa con un fármaco fotosensibilizante que es activado a una longitud de onda concreta. En este estudio las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S fueron sintetizadas de manera que tuvieran una configuración especial que permite provocar radicales de oxígeno singlete. Esto combinado con polidopamina conjugada en la superficie de la nanopartícula refirió unos muy buenos resultados. Según el estudio, utilizando un láser con una radiación de 808nm se consiguió dañar irreversiblemente y selectivamente las células tumorales.<sup>16</sup>

Aparte de estas dos técnicas existen mas investigaciones tanto pasadas como en curso en las que se estudian otras aplicaciones clínicas para estas nanopartículas. Entre ellas podíamos destacar sondas nanoclusters cargadas con fármacos, rastreo de fármacos en el organismo o en la técnica de imagen molecular.

### 6.3.5. Limitaciones de las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S en la clínica

Este tipo de nanopartículas deben jugar un papel crucial en un futuro cercano, siendo el traslado a la clínica mucho más cercano en dos de las aplicaciones anteriormente mencionadas como son la detección por imagen NIR-II y la terapia fototermal automonitorizada las más cercanas en el tiempo. Aún así debemos afrontar una serie de limitaciones que nos separan de este punto actualmente, estas serían las siguientes: <sup>5</sup>

- **Luminosidad:** Este problema lo hemos ido tratando en las secciones anteriores. Su bajo rendimiento cuántico repercute directamente en la intensidad de la fluorescencia. Remarcar que los estudios en las nuevas rutas de síntesis parecen ser la solución ya que se está consiguiendo mejores resultados con respecto a este parámetro.
- **Producción en masa:** Para un traslado a la clínica se requeriría de un gran número de experimentos lo que conllevaría la necesidad de una capacidad de síntesis a gran escala. Esto constituye un problema ya que actualmente el material comercial de las nanopartículas Ag<sub>2</sub>S es muy caro, por poner un ejemplo, 1 ml de una suspensión acuosa con este material a concentración 1,25 mg/ml tiene un precio de 500 euros. Así mismo, son necesarias nuevas rutas de síntesis que tengan la capacidad de producirse en masa a unos costes más bajos.
- **Toxicidad, aclaramiento y bioacumulación:** Existen varios estudios que avalan la baja toxicidad del Ag<sub>2</sub>S tanto in vitro como in vivo. Sin embargo, la mayoría de estos estudios se han hecho en células inmortalizadas (células cancerígenas por ejemplo) o monitorizando animales tras la administración de las nanopartículas por lo que es necesario aplicar estos mismos estudios en células sanas o en cajas metabólicas para comprobar estos resultados. También queda por explorar el ámbito de la bioacumulación, no se conoce exactamente el motivo por el cual ciertas nanopartículas atendiendo a su tamaño o el diseño de su superficie muestran mayor afinidad por un órgano u otro. Para considerar el traslado a la clínica de cualquier agente de contraste utilizado es necesario conocer exactamente sus rutas de aclaramiento y su biodistribución.
- **Propiedades termo-ópticas estandarizadas:** Anteriormente hemos comentado la gran sensibilidad que las nanopartículas de Ag<sub>2</sub>S muestran a la temperatura y su potencial como nanotermómetros. Sin embargo, antes de dar el paso a la clínica se necesita caracterizar correctamente la respuesta termal y ver si es comparable a la encontrada in vivo. Para ello se necesita un conjunto de condiciones que llamemos estándar y en la cual podamos medir la respuesta termal dada por este compuesto. Con ello nos aseguraremos conocer mejor tanto las lecturas térmicas que nos den las nanopartículas de sulfuro de plata como comparar de forma fiable este compuesto con otros nanotermómetros fluorescentes NIR-II. <sup>5</sup>

## **7. CONCLUSIONES**

- En la actualidad la nanotecnología en general y el estudio de las nanopartículas luminiscentes en particular esta captando la atención de varios investigadores. El potencial que muestran las nanopartículas de sulfuro de plata repercuten en nuevos avances que hemos podido mostrar en este trabajo como son nuevas rutas de síntesis o diversos experimentos que evidencian su enorme rango de aplicaciones clínicas.
- Se ha demostrado que las características que muestran las nanopartículas de sulfuro de plata son en general superiores a las de otros sistemas con capacidad para emitir en el rango espectral NIR-II. Esto es así no solo en cuanto a propiedades ópticas sino mas aún cuando atendemos a las propiedades térmicas de los compuestos competidores.
- Este sistema se muestra con capacidad para estar presente en diversas técnicas clínicas, sin embargo no ha sido explorado en profundidad debido a su prácticamente recién descubiertas capacidades.

Por tanto, tras analizar los resultados y la información obtenida sobre las nanopartículas de sulfuro de plata podemos concluir que, aunque en la actualidad su uso esta limitado a la práctica experimental, muestran un conjunto de propiedades termo-ópticas que nos invita a pensar que pueden jugar un papel muy importante en técnicas de diagnóstico y terapéuticas en un futuro.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Ortega-Rodríguez A, Shen Y, Zabala Gutierrez I, Santos HDA, Torres Vera V, Ximendes E, Villaverde G, Lifante J, Gerke C, Fernández N, Calderón OG, Melle S, Marques-Hueso J, Mendez-Gonzalez D, Laurenti M, Jones CMS, López-Romero JM, Contreras-Cáceres R, Jaque D, Rubio-Retama J. 10-Fold Quantum Yield Improvement of Ag<sub>2</sub>S Nanoparticles by Fine Compositional Tuning. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2020 Mar 18;12(11):12500-12509.
- <sup>2</sup> Fundamento de la técnica | Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (TALQ). *Grupo GIDOLQUIM* Tema 3.7.1 Universitat de Barcelona. [Internet]. [cited 2020 Jun 6]. Disponible en: <http://www.ub.edu/talq/es/node/259>
- <sup>3</sup> Chenghao Lu, Guihuan Chen, Bing Yu, and Hailin Cong in Recent Advances of Low Biological Toxicity Ag<sub>2</sub>S QDs for Biomedical Application . 2018 Feb 20
- <sup>4</sup> Cao J, Zhu B, Zheng K, He S, Meng L, Song J, Yang H. Recent Progress in NIR-II Contrast Agent for Biological Imaging. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Jan 30;7:487.
- <sup>5</sup> Shen Y, Lifante J, Ximendes E, Santos HDA, Ruiz D, Juárez BH, Zabala Gutiérrez I, Torres Vera V, Rubio Retama J, Martín Rodríguez E, Ortgies DH, Jaque D, Benayas A, Del Rosal B. Perspectives for Ag<sub>2</sub>S NIR-II nanoparticles in biomedicine: from imaging to multifunctionality. *Nanoscale*. 2019 Nov 7;11(41):19251-19264.
- <sup>6</sup> Chinnathambi S, Shirahata N. Recent advances on fluorescent biomarkers of near-infrared quantum dots for *in vitro* and *in vivo* imaging. *Sci Technol Adv Mater*. 2019 Apr 15;20(1):337-355.
- <sup>7</sup> What is fluorescence quantum yield? | AAT Bioquest [Internet]. [cited 2020 Jun 6]. Disponible en: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-is-fluorescence-quantum-yield>
- <sup>8</sup> Miroslav Dramićanin. *Luminescence Thermometry: Methods, Materials, and Applications*. Woodhead publishing Series in Electronic and Optical Materials (Elsevier). 2018.
- <sup>9</sup> H. D. Santos, E. C. Ximendes, M. d. C. Iglesias-de la Cruz, I. Chaves-Coira, B. del Rosal, C. Jacinto, L. Monge, I. Rubia-Rodríguez, D. Ortega and S. Mateos, *Adv. Funct. Mater.*, 2018, **28**, 1803924.
- <sup>10</sup> C. Lu, G. Chen, B. Yu and H. Cong, *Adv. Eng. Mater.*, 2018, **20**, 1700940.
- <sup>11</sup> Hong, Guosong & Robinson, Joshua & Zhang, Yejun & Diao, Shuo & Antaris, Alexander & Wang, Qiangbin & Dai, Hongjie. (2012). In Vivo Fluorescence Imaging with Ag<sub>2</sub>S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region. *Angewandte Chemie*. 124. 10.1002/ange.201206059.
- <sup>12</sup> Ortgies, Dirk & García-Villalón, Ángel & Granado, Miriam & Amor, Sara & Martín Rodríguez, Emma & Santos, Harrison David & Jingke, Yao & Rubio Retama, Jorge & Jaque, Daniel. (2019). Infrared fluorescence imaging of infarcted hearts with Ag<sub>2</sub>S nanodots. *Nano Research*. 10.1007/s12274-019-2280-4
- <sup>13</sup> C. Li, L. Cao, Y. Zhang, P. Yi, M. Wang, B. Tan, Z. Deng, D. Wu and Q. Wang. Preoperative Detection and Intraoperative Visualization of Brain Tumors for More Precise Surgery: A New Dual-Modality MRI and NIR Nanoprobe *small*, 2015, 11, 4517-4525
- <sup>14</sup> B. del Rosal, D. Ruiz, I. Chaves-Coira, B. H. Juárez, L. Monge, G. Hong, N. Fernández and D. Jaque, In vivo contactless brain nanothermometry *Adv. Funct. Mater.*, 2018, **28**, 1806088.
- <sup>15</sup> G. Chen, S. Lin, D. Huang, Y. Zhang, C. Li, M. Wang and Q. Wang, Revealing the Fate of Transplanted Stem Cells In Vivo with a Novel Optical Imaging Strategy *Small*, 2018, 14, 1702679.
- <sup>16</sup> K. Cheng, X.-S. Zhang, J. An, C. Li, R.-Y. Zhang, R. Ye, B.-J. Ye, B. Liu and Y.-D. Zhao, *Chemistry – A European Journal*, 2019, **25**, 7553-7560.