



Universidad
Rey Juan Carlos

TESIS DOCTORAL

*Nuevos métodos de teragnosis para el tratamiento de
tumores mediante técnicas de fluorescencia
hiperespectral.*

Autora:

Edelweiss Moyano Rodríguez

Directores:

Antonio José Caamaño Fernández.

Victor Antonio de la Peña O'Shea

**Programa de Doctorado Interuniversitario en Multimedia y
Comunicaciones.**

Escuela Internacional de Doctorado

2022

A todas aquellas personas que indirecta o directamente, han aportado un granito de arena a este estudio y han conseguido su finalización.

ÍNDICE

Figuras.....	6
Tablas.....	10
Acrónimos.....	11
Resumen.....	xi
Abstract.....	xvi
Capítulo 1: Introducción.....	18
1. Antecedentes.....	19
1.1. Técnicas de imagen médica.....	19
1.2. Biomarcadores fluorescentes.....	23
1.3. Composición y estructura.....	24
1.4. Metodologías sintéticas.....	27
1.5. Principales aplicaciones.....	29
Capítulo 2: Objetivos.....	31
Capítulo 3: Metodología.....	33
3.1. Productos utilizados.....	34
3.2. Síntesis.....	34
3.3. Técnicas de caracterización.....	38
3.3.1 Difracción de rayos X.....	38
3.3.2. Microscopía electrónica de barrido [Scanning Electronic Microscopy (SEM)].....	40
3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión [Transmisión Electronic Microscopy, TEM].....	42
3.3.4. Espectroscopias ópticas.....	43
3.3.5 Software de simulación.....	43
Matlab.....	43
Capítulo 4: Desarrollo de Sistemas de Emisión Hiperespectral.....	45
4.1 Desarrollo de UC basados en la matriz LaF ₃	46
4.2. Desarrollo de UC basados en la matriz Y ₂ O ₃	53
4.3. Desarrollo de UC basados en la matriz NaYF ₄	60
4.4. Desarrollo de Sistemas de Emisión Hiperespectral basados en NaYF ₄ :Yb,Er.....	65
Capítulo 5: Evaluación de Sistemas de Emisión Hiperespectral en la liberación específica de fármacos en terapias contra tumores.....	111
5.1. Selección de la diana terapéutica contra el proceso tumoral.....	112

5.2 Estudio del espectro de absorción de la ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-Éster.	112
Metodología de medida:	112
Técnicas de medida de las líneas de absorción de CF y CF-OE.	113
Espectro de absorción de Ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-Éster.....	113
5.3. Selección del Sistema upconversion de Emisión Hiperespectral idóneo para la liberación de la ciprofloxacina.	114
5.4. Evaluación del NaYF ₄ :Yb,Tm en la liberación de ciprofoxacina.....	115
Capítulo 6: Desarrollo de un sistema de simulación de tumores dérmicos para la prueba de Sistemas Upconversion de Emisión Hiperespectral	119
6.1. Selección de SEH según sus líneas de fluorescencia, diseño invertido de SEH.	120
6.2. Software de simulación de SEH para tumores dérmicos	124
Capítulo 7: Conclusiones y futuras acciones	128
Anexo I	132
Código de simulación SEH optimizados sobre proceso tumoral dérmico.....	133
Bibliografía	137

Figuras

Figura 1: Esquema generalizado del proceso Upconversion.	24
Figura 2: Esquema general de la disposición en una red cristalina de un compuesto upconversion previo y posterior al dopaje	26
Figura 3: Representación de los mecanismos de transferencia de energía que se pueden dar entre los iones de una red cristalina de un compuesto upconversion para la captación y emisión de energía.	27
Figura 4: Esquema difractor de rayos X básico.	39
Figura 5: Señal de respuesta de la muestra preparada para SEM tras la incisión del haz de electrones.	41
Figura 6: Generación de la imagen a partir de microscopía de transmisión.....	42
Figura 7: Imagen SEM de la matriz LaF ₃	47
Figura 8: A) Valoración de la difracción de rayos X para la muestra LaF ₃ B) Ficha JCPDF de la matriz sintetizada. Picos de NaF destacados sobre la matriz sintetizada.	48
Figura 9: Imagen SEM del sistema LaF ₃ :Tm, Er.	49
Figura 10: Valoración de la difracción de rayos X obtenida sobre la partícula LaF ₃ :Tm,Er sintetizada, en comparación con los picos selectivos que presenta la fase cúbica de dicha partícula y la fase hexagonal de la matriz de la que parte (LaF ₃). Puntualizando los picos no correspondientes a la matriz LaF ₃ hexagonal y que se corresponden con los picos característicos del compuesto NaF.	50
Figura 11: Espectro de fluorescencia de la partícula LaF ₃ :Yb,Tm bajo excitación con radiación infrarroja de 980 nm.	51
Figura 12: Captura de la luminiscencia de la partícula LaF ₃ :Tm,Er con una cámara digital con detectores CCD. A. Montaje de experimento para la detección de la longitud de onda mediante un espectrómetro y la detección de la luminiscencia mediante una cámara digital. B. Dispersión de la muestra en polvo para su detección. C. Captura de la luminiscencia de la partícula LaF ₃ :Tm,Er tanto con iluminación como en completa oscuridad.	52
Figura 13: : Imagen SEM de la matriz Y ₂ O ₃	55
Figura 14: A) Patrón de difracción de rayos X de la muestra Y ₂ O ₃ :Yb,Er, B) Ficha JPCDS del sistema, C) Ficha JPCDS de la matriz.	56
Figura 15: Esquema de transferencia de energía del Erblio, donde se presentan sus líneas de emisión principales en combinación con el Yterbio como sensibilizador y los diferentes caminos luminiscentes y no luminiscentes que dicha energía puede tomar en la vuelta de los electrones excitados a su estado neutro.	58
Figura 16: Espectro de fluorescencia de la partícula Y ₂ O ₃ :Yb,Er bajo excitación infrarroja a 980 nm.	59
Figura 17: Imagen de SEM de la matriz NaYF ₄ con un aumento de 7K. Representación de una región general en la que se observa la homogeneidad de la morfología de la muestra, la aparente homogeneidad de composición y la dispersión de la misma.	62
Figura 18: A) Patrón de difracción de rayos X de la muestra NaYF ₄ :Yb,Er, B) Ficha JPCDS del sistema, C) Ficha JPCDS de la matriz NaYF ₄	63
Figura 19: Espectro de luminiscencia de las partículas NaYF ₄ :Yb,Er y NaYF ₄ :Yb,Tm mediante la síntesis con los parámetros genéricos seleccionados para el estudio de la matriz.	64
Figura 20: Esquema de las diferentes etapas del proceso de síntesis del sistema NaYF ₄ :Yb,Er.	68
Figura 21: Evolución de la morfología de las partículas con la variación de pH: siendo UC _{3,4,7,8} y ₉ A pH 5,6,7,8,10 respectivamente.	69

Figura 22: Modificación del medio de reacción y crecimiento de la semilla del sistema en función de la variación del NaOH como agente precipitante.	70
Figura 23: Determinación de monocristales de las partículas UC _{3,7} y ₉ a través de imagen de TEM por su aumento y difracción.	71
Figura 24: Imágenes de NANO SEM de las partículas UC _{3,4,7,8} y ₉ a los mismos aumentos para la comparación del grosor y el tamaño.	73
Figura 25: Imágenes de TEM y espectro de difracción de rayos X de las partículas UC ₃ y UC ₇ , diferenciadas entre sí por el uso de una fuente de flúor diferente en la reacción siendo esta NH ₄ F y NaF respectivamente.	75
Figura 26: Perfiles de difracción de rayos X para la comparación de las fases cristalinas de las múltiples partículas sintetizadas con diferente tiempo de reacción sin modificación del resto de parámetros de síntesis.	77
Figura 27: Imágenes de NANO SEM de los múltiples sistemas para la comparación de la morfología por el cambio del tiempo de reacción debido a la fase cristalina presente en la muestra.	79
Figura 28: Cambio de la fase cristalina y por lo tanto de la morfología en función de la energía libre durante la síntesis del sistema.	80
Figura 29: Picos de difracción de rayos X de las partículas UC ₁₂ , UC ₁₃ y UC ₁₄ sintetizadas con los mismos parámetros de síntesis a excepción de la temperatura de reacción que se establece en 90°C, 180°C y 190°C respectivamente.	82
Figura 30: Imágenes de NANO SEM de las partículas UC ₁₂ , UC ₁₃ y UC ₁₄ sintetizadas con un aumento de temperatura: 90°C, 180°C y 190°C respectivamente.	83
Figura 31: Espectros de difracción de rayos X de las partículas UC ₉ y UC ₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC ₁₃ Y UC ₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.	84
Figura 32: Imágenes de TEM de las partículas UC ₉ y UC ₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC ₁₃ y UC ₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.	85
Figura 33: Imágenes de TEM y difracción en las partículas UC ₁₀ y UC ₉ para mostrar su poli y mono cristalinidad respectivamente.	86
Figura 34: Espectro de fluorescencia de las partículas UC ₃ , UC ₄ , UC ₇ , UC ₈ y UC ₉ con aumento de pH 5,6,7,8 y 10 respectivamente.	87
Figura 35: Espectro de fluorescencia de UC ₃ y UC ₇ , sintetizadas respectivamente con NH ₄ F y NaF.	89
Figura 36: Espectros de fluorescencia en función del cambio de morfología que supone el cambio de estructura cristalina debido al tiempo de reacción utilizado en la síntesis.	91
Figura 37: Espectros de fluorescencia de UC ₁₂ , UC ₁₃ Y UC ₁₄ , partículas sintetizadas con los mismos parámetros de reacción a excepción de la temperatura 90°C, 180 °C y 190°C respectivamente.	92
Figura 38: Espectros de fluorescencia de las partículas UC ₉ y UC ₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC ₁₃ y UC ₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.	94
Figura 39: Esquema del proceso de selección de los parámetros de síntesis en función de las propiedades estructurales, morfológicas y luminiscentes del sistema buscado.	94
Figura 40: Diagrama de Gamut en representación de la tonalidad cromática de todas las partículas sintetizadas con la composición NaYF ₄ :Yb,Er.	96
Figura 41: Diagrama de comparación de la intensidad de luminiscencia de los picos 545 nm y 660 nm de las partículas seleccionadas mediante el diagrama de Gamut.	97

Figura 42: Evolución de la morfología de las partículas con la variación de pH: siendo UC _{24,25,26,27} y ₂₈ A pH 5,6,7,8,10 respectivamente.	100
Figura 43: Diagrama XRD de las partículas UC ₂₄ y UC ₂₆ junto con sus imágenes de TEM.	101
Figura 44: Diagrama XRD de las partículas UC ₂₂ y UC ₂₃ sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo constantes el resto de parámetros de reacción.	102
Figura 44: Imágenes NANO SEM de las partículas UC ₂₂ y UC ₂₃ sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de reacción.	103
Figura 46: Imágenes de TEM de las partículas UC ₂₃ y UC ₂₄ sometida y no sometida a tratamiento térmico respectivamente.	103
Figura 47: Diagrama de energía del sistema NaYF ₄ :Yb,Tm.	104
Figura 48: Espectros de fluorescencia de las partículas UC _{23,25,26,27} Y ₂₈ sintetizadas con pH 5,6,7,8,10 respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.	105
Figura 49: Espectro de fluorescencia de las partículas UC ₂₂ y UC ₂₃ sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.	107
Figura 50: Espectro de fluorescencia de las partículas UC ₂₃ y UC ₂₄ sintetizadas con tratamiento y sin tratamiento térmico respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.	108
Figura 51: Comparación de la intensidad de picos del Tulio para las partículas sintetizadas con diferentes parámetros de síntesis.	109
Figura 52: A) Espectros de absorción normalizados de derivados de ciprofloxacina (CF o CF-OE, 20 μM) en CH ₂ Cl ₂ (trazas negras y rojas para CF o CF-OE, respectivamente) y en medios ácidos (sombra violeta para CF-OE). El espectro de fotoluminiscencia normalizado de UC3 en sólido (traza azul) se incluye para comparación. B) Fluorescencia en estado estacionario para CF (rojo), CF-OE (negro) y CF-OE un medio ácido (azul) en diclorometano. Recuadro: trazas de descomposición normalizadas. C) Rastros de desintegración de fluorescencia normalizados para UC3 en estado sólido. B) Espectro de absorción transitorio (TAS, λ _{exc} = 980 nm) para UC3 en una solución de suspensión de diclorometano desaireado. El trazo azul corresponde al suavizado de la señal.	114
Figura 53: A) Tasa de conversión de CF (rojo) o CF-OE (azul) usando UC3 al aumentar los tiempos de irradiación (λ _{exc} = 980 nm), a 0.5 M de CF-OE en CH ₂ Cl ₂ desaireado (10% FA v / v); B) Reutilización de UC3 mediante el seguimiento de la tasa de conversión de la formación de CF al aumentar los tiempos de irradiación (λ _{exc} = 980 nm) durante cinco ciclos consecutivos. El gráfico muestra el porcentaje máximo de formación de CF después de 90 min bajo irradiación.	115
Figura 54: Cromatogramas de HPLC del desprendimiento de CF libre (rojo) y desaparición del compuesto CF-OE (azul) al aumentar los tiempos de irradiación (λ _{exc} = 980 nm), a 0,5 M de CF-OE en cloruro de metileno desaireado (10% FA v / v). La fase móvil utilizada en el análisis de HPLC fue 70:50 H ₂ O: CH ₃ CN, que contenía 0,1% de FA.	115
Figura 55: Espectro de absorción transitoria (TAS) para UC3 en solución de suspensión de diclorometano desaireada irradiada bajo A) λ _{exc} = 980 nm, B) λ _{exc} = 500 nm y C) λ _{exc} = 300 nm.	116
Figura 56: A) Espectro de absorción transitoria (TAS, λ _{exc} = 980 nm) para UC3 en solución de suspensión de diclorometano desaireado medido simultáneamente con la reacción fotocatalítica después de 60 minutos. B) Cromatogramas de HPLC de la formación de la benzofenona (BP) como segundo producto al aumentar los tiempos de irradiación (λ _{exc} = 980 nm), a 0,5 mM de CF-OE en cloruro de metileno desaireado (10% FA v / v). La fase móvil utilizada en el análisis de HPLC fue 70:50 H ₂ O: CH ₃ CN, que contenía 0,1% de FA. El trazo naranja corresponde a la referencia comercial de BP. C) Espectros de absorción transitoria	

($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$) para la reacción de la mezcla en cloruro de metileno desaireado (10% FA v / v) tras los tiempos de irradiación. El trazo naranja corresponde a la referencia comercial de BP.	116
Figura 57: Reutilización de UC24 mediante el seguimiento de la tasa de conversión de la formación de CF al aumentar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) durante cinco ciclos consecutivos. Ciclo 1 a 5: negro, rojo, azul, verde y morado, respectivamente.	117
Figura 58: A-E) Espectro de absorción transitorio (TAS, $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) para UC24 en solución de suspensión de diclorometano desaireado después de cinco ciclos consecutivos. F) Comparación de ΔOD para cada repetición.	118
Figura 59: Representación de la atenuación de la radiación a través del tejido biológico en función de la longitud de onda.	120
Figura 60: Esquema de emisión de radiación a través de las partículas depositadas sobre el tumor.	126
Figura 61: Deposición de partículas en la sesión, determinación de la radiación en la superficie en función de la radiación emitida y la extinción de la misma en función de la profundidad.	127

Tablas

Tabla 1: Set de partículas NaYF ₄ :Yb,Er obtenidas a 230 °C en el horno convencional.	66
Tabla 2: Set de partículas NaYF ₄ :Yb,Er en el horno microondas a diferentes temperaturas las diferentes escalas de gris representan las diferentes temperaturas utilizadas: amarillo 90 °C; naranja 180 °C y rojo 190°C.	67
Tabla 3: Set de partículas de NaYF ₄ :Yb,Tm obtenidas en horno convencional a 230°C.....	99
Tabla 4: Resumen de la base de datos en el que se segmentan las nanopartículas en función de rango de aplicabilidad, características estructurales, luminiscencia y proceso de síntesis.	121

Acrónimos

CF: Ciprofloxacina.

ESA: Absorción en Estado Excitado (del inglés, Excited Estate Absorption).

ETU: Transferencia Excitada de conversion ascendente, (del inglés, Excited Transfer Upconversion).

FA: Ácido Formico (del inglés, Formic Acid).

IR: Infrarrojo.

UC: Nanopartícula.

OE: Oxima-Éster.

PDT: Terapia Fotodinámica (del inglés, Photo-Dinamic Therapy).

PPTT: Terapia Térmica Fotoplasmónica (del inglés, Plasmonic Photo-Thermal Therapy).

SEG: Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral.

SEM: Microscopía 11electronica de barrido (del inglés, Scanning Electronic Microscopy).

STG: Sistemas de Teragnosis.

TEM: Microscopía electronica de transmission (del inglés, Transmission Electronic Microscopy).

TPA: Absorción de dos fotones (del ingles, Two Photon Absorption)

UC: Upconversion.

UV-vis: Ultravioleta Visible.

DRX: Difracción de Rayos X

Resumen

ANTECEDENTES

El continuo avance de la tecnología ha supuesto una mejora en todos los ámbitos de nuestra vida, entre los que se encuentra la salud. Hoy día, existen una gran variedad de tecnologías aplicadas a la medicina que permiten realizar procesos, que en el pasado eran complejos y críticos para los pacientes. Una de las estrategias para la simplificación de estos procesos surgió de la mano de los métodos de imagen médica, donde gracias a la detección y segmentación de las zonas concretas a tratar, se ha avanzado en el diagnóstico y tratamiento de una gran variedad de enfermedades.

Se define imagen médica como el conjunto de técnicas y procesos utilizados para la creación de imágenes, de partes o el total, del cuerpo de un paciente, con el fin de diagnosticar o tratar una dolencia. Los principales métodos de imagen médica se engloban en función de la tecnología por la que se crea la imagen, como son: **(1) Radiografía convencional y tomografía computarizada**, ambas basadas en el uso de Rayos X, diferenciándose entre sí, en la obtención de la información para la generación de la imagen; **(2) ecografía o ultrasonidos**, basadas en el uso de ondas ultrasónicas; **(3) resonancia magnética** basada en el uso de pulsos electromagnéticos y **(4) técnicas de medicina nuclear**, donde se engloban aquellas técnicas que suponen la utilización de contrastes o marcadores para su seguimiento in situ en el paciente.

Junto con el desarrollo de estas técnicas de imagen, ha surgido una nueva rama de actuación denominada **teragnosis**, en la que se engloban las funciones de terapia y diagnóstico combinadas como un única. En los últimos años, se han desarrollado diferentes estrategias centradas en la teragnosis, entre las que destacan aquellas que se basan en el uso de luz UV-visible-IR, como son: (1) **Terapia plasmónica fototérmica** (del inglés, Plasmonic Photo-thermal Therapy, PPTT) en la que suelen ser utilizadas nanopartículas metálicas (principalmente oro) a partir de las cuales un haz de luz es absorbido y convertido en calor mediante una serie de procesos fotofísicos en cadena y (2) **Terapia fotodinámica** (del inglés, Photo-Dynamic Therapy, PDT) en la que son utilizados fotosensibilizadores capaces de generar oxígeno singlete, que induce a la muerte celular. Adicionalmente, en este último grupo, se están desarrollando estrategias focalizadas en la liberación de fármacos en dianas específicas, para el tratamiento de enfermedades, basadas en el uso de emisores de luz capaces de permitir la liberación específica de un fármaco concreto. Estos procesos también combinan las bondades de la segmentación y el tratamiento.

Entre la multitud de enfermedades y dolencias que se han beneficiado del desarrollo este nuevo ámbito denominado teragnosis, y de sus técnicas, se encuentra, con una mención especial, los procesos cancerígenos. Los principales retos a resolver cuando existe un proceso cancerígeno son: Conocer la región o regiones afectadas y dentro de ello conocer en cada región, la progresión del daño en cuanto a estructura y funcionalidad y tratar de forma selectiva el proceso tumoral sin dañar el tejido sano. El poder segmentar una lesión, no sólo provee de un diagnóstico, sino también de un tratamiento selectivo sin afectar a otras partes del cuerpo.

Es por ello que surge la presente Tesis Doctoral, *“Nuevos métodos de teragnosis para el tratamiento de tumores mediante técnicas de fluorescencia hiperespectral”*, con el fin de estudiar, generar y desarrollar estrategias de teragnosis, que resuelvan en un único proceso, la detección, segmentación y terapia de un proceso tumoral, conociendo la región afectada y la progresión de daño en cuanto a estructura y funcionalidad. Esto se dará gracias a la fluorescencia

hiperespectral de sistemas luminiscentes, específicamente diseñados tanto para la detección de la lesión, como para la administración del fármaco. El desarrollo de un software de tratamiento de imagen, permitirá evaluar el comportamiento de los sistemas de emisión hiperespectral (SEH) en zonas diferenciadas del tejido, determinando la profundidad de la lesión estudiada.

Con este fin se han desarrollado una serie de sistemas de teragnosis (STG), específicos, denominados **upconversion**, capaces de emitir radiación electromagnética en el rango UV-vis de una energía superior a la absorbida (Infrarrojo). Adicionalmente, se ha diseñado un software que permite la simulación del comportamiento de la fluorescencia de los STG sobre la superficie de una lesión tumoral dérmica a diferentes profundidades. Así, la tecnología propuesta en la presente Tesis doctoral engloba los dos ámbitos de la teragnosis:

(1) El ámbito del diagnóstico mediante un nuevo método de imagen médica que se puede encuadrar dentro de las técnicas de medicina nuclear, debido a que para la generación de la imagen son utilizados marcadores fluorescentes.

(2) El ámbito del tratamiento, donde los marcadores específicos, serán utilizados para la liberación de fármacos en los puntos diana que previamente se han señalado.

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal **la generación de una nueva metodología de teragnosis ,en la aplicación a procesos tumorales dérmicos y la liberación de fármacos específicos**. Con el fin de alcanzar este objetivo se han propuesto diferentes objetivos parciales como son:

1. Desarrollar y optimizar Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral (SEH), para su aplicación en el diagnóstico por imagen de lesiones tumorales.
2. Evaluar los Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral (SEH) en la liberación específica de fármacos en terapias contra procesos tumorales.
3. Desarrollar un sistema de simulación de tumores para la prueba de los Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral (SEH).

METODOLOGÍA

Con el fin de seleccionar y optimizar las propiedades luminiscentes se han propuesto diferentes combinaciones en la composición de los Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral (SEH). En una primera etapa se evaluaron diferentes matrices basadas en: LaF_3 , Y_2O_3 y NaYF_4 . La selección/optimización de cada uno de estos componentes, permite que sus propiedades no interfieran en el dopado con elementos sensibilizadores y activadores. En el caso de los primeros se seleccionó Yterbio (Yb) debido a su capacidad de absorber en el espectro infrarrojo, específicamente a 980 nm. La importancia de esta longitud de onda radica en que se trata de una radiación que atraviesa el tejido sin distorsión, lo que permitirá la localización del marcador independientemente de la profundidad a la que se encuentre. Por último, se seleccionaron como activadores (Er) y Tulio (Tm). La selección/optimización permiten una amplia versatilidad y control tanto de la intensidad como de la longitud de onda de emisión, lo que, por una parte facilita la segmentación en cuanto a la detección en profundidad y por otra la liberación selectiva de fármacos específicos.

Con este fin, la preparación de los SEH está basada en el uso de métodos solvotermales, donde diferentes parámetros de síntesis como: Temperatura y tiempo de reacción, precursores de reacción, pH de reacción y tratamiento térmico, fueron evaluados con el fin de optimizar las

propiedades fisicoquímicas de estos sistemas. Estos estudios permitieron evaluar el efecto de las propiedades morfológicas y estructurales en la emisión hiperespectral, así como en la estabilidad de los mismos. Para ello, se emplearon diferentes técnicas analíticas como la microscopía de barrido (Scanning Emission Microscopy, SEM), la difracción de rayos X (DRX) o la fotoluminiscencia.

Los estudios de teragnosis comenzaron con la evaluación de los SEH en procesos de liberación fotoselectiva de fármacos específicos para terapias contra procesos tumorales. Para ello, se seleccionó la liberación del antibiótico libre Ciprofloxacina (CF) de su derivado oxima-éster (CF-OE) correspondiente. El CF es un antibiótico que pertenece a la familia de las quinolonas y está siendo uno de los más utilizados en los últimos años para tratar infecciones bacterianas. Su relación en la presente Tesis Doctoral se encuentra en que, ciertas bacterias que colonizan los tumores, son capaces de desintegrar la gemcitabina, un fármaco muy utilizado en la quimioterapia. El uso de CF contribuiría a la mejora de los tratamientos de quimioterapia con una mejora de su efectividad. El CF es un compuesto ligeramente soluble en agua y se ha detectado en múltiples biofluidos como orina y sangre. Para lograr la liberación específica del mismo en la diana, se utiliza un profármaco correspondiente para que tenga una menor solubilización en el plasma y sea controlada su liberación en la diana. El problema del profármaco, es que solo absorbe sobre el rango ultravioleta-visible, que es una longitud de onda que no traspasa el tejido, es por ello que se requiere de la utilización de un SEH que absorba en la región infrarroja. En este caso, gracias al desarrollo de los Sistemas de Terganosis, STGs, realizado en la presente tesis doctoral, se seleccionó el $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}$, que bajo iluminación infrarroja (980 nm) presenta una emisión muy intensa en el rango espectral (450 nm) requerido para la excitación del profármaco CF-OE, permitiendo la liberación del CF.

Por otra parte, teniendo en cuenta la variabilidad de los procesos tumorales y sus tratamientos y con el objetivo de proponer una metodología de simulación versátil para la detección de tumores dérmicos se generó una base de datos que incluye las propiedades de emisión de diferentes SEH y sus variaciones con la matriz, sensibilizador y activador, así como con sus características estructurales y morfológicas. Estos datos fueron relacionados con la absorción de la radiación por parte del tejido, tanto en superficie como en profundidad, y su efecto en la generación de imagen de diagnóstico. Estas simulaciones fueron realizadas mediante el software Matlab.

RESULTADOS

A través de los estudios de preparación y optimización de los SEH se seleccionó la matriz de NaYF_4 como la más eficiente, teniendo en cuenta su homogeneidad en cuanto a dispersión, morfología y estructura cristalina, además el dopaje de la misma con los compuestos activadores y sensibilizadores, no suponía una modificación de estos parámetros. En el caso de los activadores, se determinó que los sistemas con Er dan lugar a una emisión hiperespectral formada por diferentes emisiones a 525 nm y 545 nm en el verde y 660 nm en el rojo, cuya intensidad y proporción, de estas líneas espectrales, varía en función de las condiciones de síntesis y por lo tanto sus características estructurales y morfológicas. En el caso del $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Tm}$ se obtuvieron emisiones en: 425 nm y 480 nm en el azul, 652 nm en el verde, 700 nm en el rojo y 800 nm en la región IR, en el caso del dopaje con Tm, no se observó una variación en la proporción de las líneas espectrales con respecto a las condiciones de síntesis, pero sí en cuanto a la intensidad global de fluorescencia del STG.

Adicionalmente, en el caso de los sistemas NaYF₄:Yb, Tm, los estudios fotofísicos por técnicas resueltas en tiempo como fotoluminiscencia o laser flash fotolisis, permitieron determinar estados de transición que no se habían detectado previamente en literatura. Un ejemplo de ellos corresponde a la transición ¹I₆ → ³H₄ (350nm) con un tiempo de vida medio de 10 ns.

En el desarrollo de dicha evaluación se dio a conocer que, al presentar la misma matriz, las modificaciones en la temperatura y el tiempo de reacción afectaban a la estructura cristalina de los STGs seleccionados, conociendo que a mayor tiempo, la estructura cristalina avanzaba hacia la fase que facilita la comunicación entre sensibilizadores y activadores, ocurriendo lo mismo con el aumento de temperatura. En cuanto a los precursores de la reacción se encontraban estrechamente ligados al pH, observando que el avance de pH ácido a básico suponía la evolución de morfologías globulares y dendríticas, que permiten mayor comunicación entre sensibilizadores y activadores, a alargadas y geométricas hasta un pH óptimo encontrado en 8 a partir del cual, se pierden las estructuras geométricas. Por último, el tratamiento térmico afectaba tanto a la fase cristalina como a la morfología, si el sistema, mediante la síntesis, había logrado la fase cristalina idónea, su tratamiento térmico no incorporaba ninguna mejora, solo suponía la aglomeración del mismo y por lo tanto su afectación negativa a la fluorescencia.

Teniendo en cuenta sus propiedades fotoluminiscentes, se seleccionó el SEH, NaYF₄:Yb, Tm para estudiar su efecto en la liberación de fármacos. Como se ha comentado anteriormente, utilizando la Ciprofoxacina (CF) como antibiótico. Se observó que la activación del profármaco para la liberación del CF se da a través de la emisión a 450 nm del SEH. Adicionalmente, se realizaron estudios de estabilidad confirmando la elevada estabilidad del proceso.

Por último, las simulaciones desarrolladas a través del software Matlab a partir de las líneas de fluorescencia que proporcionaron los SEHs seleccionados, permitieron establecer un patrón de colores en función de la profundidad a la que se encuentra la lesión tumoral dérmica, de este modo estructuras contenidas entre [0-0.02]cm muestran en superficie fluorescencia azul; entre [0.02-0.1] cm fluorescencia verde y entre [0.1-10]cm fluorescencia roja.

CONCLUSIONES

Con la presente Tesis Doctoral, se consiguió desarrollar, simular y evaluar una nueva técnica de teragnosis basada en SEH de conversión ascendente. Las principales conclusiones obtenidas de la misma son:

- (1) Se han desarrollado sistemas SEH, basados en NaYF₄:Yb, Er y NaYF₄:Yb,Tm, altamente eficientes en la emisión hiperespectral en el rango del visible a través de una optimización de sus propiedades estructurales, morfológicas y fluorescentes por medio de un estudio sistemático de las condiciones de síntesis.
- (2) Se ha comprobado que los Sistemas de Emisión Hiperespectral basados en NaYF₄:Yb, Er son muy eficientes y estables en la foto-liberación controlada de fármacos. Los resultados obtenidos con luz infrarroja (980 nm) s son muy prometedores y podrían ser probados in vitro o in vivo en un futuro.
- (3) Las simulaciones realizadas han permitido determinar las propiedades de los SEH aplicados a en un sistema tumoral dérmico, simulado a diferentes profundidades, por medio de la determinación del patrón de colores que permitirá in situ la segmentación y determinación de la profundidad de una determinada lesión.

ACCIONES FUTURAS

Como futuros estudios a la presente Tesis Doctoral, se encuentra la bioconjugación de los SEH para la deposición selectiva en los procesos tumorales. Es conocido que cada proceso tumoral va acompañado de una relación característica de antígenos, por lo que la bioconjugación del SEH con relaciones específicas de anticuerpos relativos a los antígenos definidos en función del proceso tumoral, permitirían descartar o determinar la presencia de un determinado proceso tumoral. Esto permitiría la ampliación de la presente técnica a procesos tumorales diferentes a los dérmicos.

CONTRIBUCIONES

1. Patente Nacional: *“Uso de una composición que comprende una combinación de nanopartículas fluorescentes”*. Moyano Rodríguez, Edelweiss; De la Peña O’Shea, Víctor; Caamaño Fernández Antonio; Ramiro Bargaño, Julio; Rojo Álvarez, José Luis; Ramos López, Francisco Javier; Jaque García, Daniel. ES2684057 B1 (04.07.2019). <https://invenes.oepm.es/InvenesWeb/detalle?referencia=P201730451>
2. Artículo Académico: *“Controlle Synthesis of Up-Converison NaYF₄:Yb,Tm Nanoparticles for Drug Realease under Near IR-Light Therapy”*. Edelweiss Moyano Rodríguez, Miguel Gomez-Mendoza, Raúl Pérez-Ruiz, Beatriz Peñin, Diego Sampedro, Antonio Caamaño y Víctor Antonio de la Peña O’Shea. Biomedicines. 2021, 9 ,1953. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121953>.

Abstract

El constante desarrollo de la tecnología ha provisto de grandes avances al área de la salud, es en esta área donde ha surgido una nueva técnica denominada **teragnosis**, la teragnosis supone la unión de dos técnicas médicas, **el diagnóstico y la terapia** o tratamiento.

Las técnicas de diagnóstico más utilizadas en los últimos años, por sus múltiples ventajas, son las técnicas de diagnóstico por imagen, que se engloban en: **(1) Radiografía convencional y tomografía computarizada; (2) ecografía o ultrasonidos; (3) resonancia magnética y (4) técnicas de medicina nuclear.**

Junto a estas técnicas se han desarrollado nuevas técnicas de teragnosis, entre las que destacan la **Terapia Plasmónica fototérmica** y la **Terapia Fotodinámica**, ambas basadas en el uso de marcadores que permiten de forma conjunta la segmentación y el tratamiento de una determinada lesión. A su vez, se ha desarrollado una nueva técnica que cuenta con las bondades de la teragnosis, se trata de **la liberación de fármacos en dianas específicas**. Esta técnica, permite mediante el uso de marcadores la visualización de una lesión y su tratamiento mediante la acción de un fármaco selectivo liberado en una diana seleccionada previamente.

La mayoría de los estudios de evaluación de estas nuevas estrategias de teragnosis han basado su aplicación en procesos cancerígenos. Esto es debido a que los principales retos a resolver en una lesión tumoral son: Segmentar la región afectada y tratarla in situ con el menor daño a las regiones circundantes, con la mayor selectividad. Es por ello, que surge la presente Tesis Doctoral: **“Nuevos métodos de teragnosis para el tratamiento de tumores dérmicos mediante técnicas de fluorescencia hiperespectral”** con el fin de **diseñar, evaluar y simular una nueva estrategia de teragnosis**. Para ello, se procederá al **diseño y desarrollo de nuevos Sistemas de Teragnosis, STG**, específicos, basados en el uso del proceso upconversion, por el que se obtiene una línea de emisión en la región UV-Vis mediante la absorción en la región del infrarrojo, estos sistemas serán denominados Sistemas upconversion de Emisión Hiperespectral, SEH. A continuación, se llevará a cabo **la evaluación los SEH diseñados y optimizados en la liberación de fármacos** en dianas selectivas, para ello se seleccionó la terapia de actuación contra bacterias circundantes en una determinada lesión cancerígena, que suponen el consumo de los fármacos de los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que el fármaco seleccionado es la Ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-Éster, siendo esta un potente antibacteriano. Por último, para la evaluación de los STG en un proceso de diagnóstico por imagen se **desarrolló un software de simulación de un proceso tumoral dérmico**, lo que permitió establecer un patrón de fluorescencia en función de la profundidad de la lesión, pudiendo así segmentarla y localizarla.

Para el diseño y optimización de los SEH se optó por la evaluación de tres matrices LaF_3 , Y_2O_3 y NaYF_4 , un sensibilizador: Yterbio y dos activadores: Yterbio y Tulio, mediante un método de síntesis solvotermal en el que se modificaron los parámetros: Tiempo de reacción, Temperatura de reacción, Precursores de reacción, pH de reacción y Tratamiento térmico, los cuales influyen directamente sobre las propiedades morfológicas y estructurales de los SEH y estas sobre su fluorescencia. En la evaluación de los SEH generados para la liberación de fármacos, se estudiaron las líneas de absorción del fármaco seleccionado, la Ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-éster y se estudió entre los SEH optimizados una correspondencia con las líneas de emisión, su intensidad y estabilidad. Por último, con ayuda del software Matlab, se realizó la simulación de los SEH optimizados sobre una lesión tumoral dérmica, en función de la absorción de las diferentes líneas de emisión por el tejido.

Todo ello supuso la obtención de dos SEH óptimos: $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ con unas condiciones de diseño específicas. La combinación de ambos supone la generación de una fluorescencia hiperespectral que cubre el espectro visible completo con líneas de emisión en: 525 nm y 545 nm en el verde y 660 nm en el rojo para el primero y 425 nm y 480 nm en el azul, 652 nm en el verde, 700 nm en el rojo y 800 nm en la región IR para el segundo.

La evaluación de los SEH en la liberación de fármacos se dio por parte del $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ debido a que presenta una línea de emisión en 425 nm que se corresponde con las líneas de absorción del profármaco para la liberación de la Ciprofloxacina, además la estabilidad de este compuesto permite su uso en hasta 5 ocasiones tras un lavado con solo una pérdida del 3% de eficiencia.

Por último, la simulación de los SEH optimizados permite la generación de un patrón de profundidades que da lugar a la localización de un proceso tumoral dérmico de esta forma: estructuras contenidas entre [0-0.02]cm, muestran en superficie fluorescencia azul; entre [0.02-0.1] cm fluorescencia verde y entre [0.1-10]cm fluorescencia roja.

En futuros trabajos, se estudiará la posible bioconjugación de los SEH para el rastreo y localización de cualquier lesión tumoral

Capítulo 1: Introducción

1. Antecedentes

1.1. Técnicas de imagen médica

Las técnicas de imagen médica aprobadas y utilizadas hoy día de forma convencional son las siguientes (Keith L. Moore A. F., 2006), (Keith L. Moore A. M., 2003), (Pedro Antonio Carrión Pérez, 2006):

1. Radiografía convencional.
2. Tomografía computarizada.
3. Ecografía o Ultrasonidos.
4. Resonancia magnética.
5. Técnicas de medicina nuclear, que se combinan con las anteriores mediante el uso de contrastes.

Estas técnicas se agrupan debido al método de obtención de la imagen:

1. **Radiografía convencional:** dentro de esta técnica se pueden agrupar los rayos X, las mamografías o la tomografía computarizada de rayos X. Como se puede intuir, todas ellas están basadas en la utilización de rayos X, la generación de imágenes a través de rayos X se da por la diferencia de densidad de los elementos que atraviesan, de forma que aquellos más densos, se representarán con tonos más brillantes que los elementos menos densos, pudiendo así diferenciar claramente huesos de órganos o entre órganos. No obstante, los rayos X, por la longitud de onda en la que se encuentran se consideran radiación ionizante, el problema que presenta esta radiación, es que permite observar las estructuras con elevada claridad, pero, ioniza el tejido a través del que pasa, el problema de ello es que la acumulación de esta radiación en el tejido puede conducir a la afectación al mismo y el aumento del riesgo de generación de futuros procesos cancerosos, es por ello que su uso está limitado en el tiempo (Keith L. Moore A. M., 2003) (Keith L. Moore A. F., 2006) (Pedro Antonio Carrión Pérez, 2006).
2. **Tomografía computarizada:** podría estar incluida dentro de los procesos de radiología convencional, debido a que la fuente de energía que permite la detección de las diferentes estructuras es la misma, los rayos X, no obstante, supone una técnica a parte, debido a la generación de la imagen. En la tomografía computarizada, la exploración se lleva a cabo de forma axial y helicoidal, lo que se considera como toma de imágenes en espiral, la contraposición de todas estas imágenes permite establecer una visión tridimensional de los órganos de estudio (David J. Brenner, 2007). No obstante, presenta

la misma premisa negativa que la radiología convencional, al utilizar rayos X su uso en el tiempo está limitado (David J. Brenner, 2007) (Keith L. Moore A. M., 2003) (Keith L. Moore A. F., 2006) (Pedro Antonio Carrión Pérez, 2006).

3. **Ecografía o ultrasonidos:** Esta técnica está basada en la utilización de ondas de ultrasonido, consideradas como ondas de alta frecuencia, las cuales son reflejadas por los límites intertisulares, lo que permite la generación de imágenes a partir de la delimitación de los diferentes tejidos. En este caso, la energía utilizada no es ionizante, lo que es una gran ventaja, presentando el problema de que las imágenes obtenidas son de baja resolución (Keith L. Moore A. M., 2003) (Keith L. Moore A. F., 2006) (Pedro Antonio Carrión Pérez, 2006).
4. **Resonancia magnética:** Esta técnica se basa en la alineación de los spines de los átomos de hidrógenos de los tejidos mediante un fuerte imán. El proceso se basa en la alineación momentánea de los protones mediante un pulso electromagnético corto y fuerte, al relajarse los protones producen un pulso de frecuencia radio, que será diferente en función de la concentración de hidrógeno en el tejido y en su entorno, pudiendo diferenciar así hueso y los diferentes órganos. En este caso, la radiación no es una problemática, pero sí el coste del equipo, que es mucho más elevado que en el resto de técnicas. Además, cualquier movimiento puede distorsionar la imagen (Joaquín Costa Subias, 2021) (Keith L. Moore A. M., 2003) (Keith L. Moore A. F., 2006) (Pedro Antonio Carrión Pérez, 2006).
5. **Técnicas de medicina nuclear:** En este epígrafe se engloban todas aquellas técnicas de imagen en las que se utiliza un contraste, comúnmente, los contrastes son utilizados con las técnicas de tomografía computarizada y la resonancia magnética, y son trazadores ionizantes o no, que siguen diferentes ciclos para marcar funciones o metabolismos. No obstante, existe otra técnica determinada como PET (Positron Emisión Tomógraphy, Tomografía de emisión de positrones) basada en la introducción en el individuo de un trazador que emite positrones. De forma general, este trazador se une a la glucosa, por lo que los positrones marcan aquellas zonas de mayor consumo. El problema de esta técnica se encuentra en que todo aquello que tenga un consumo elevado de glucosa se marcará, y es complejo diferenciar estructuras. Además, la aniquilación de positrones, tiene como resultado la emisión de rayos gamma, radiación aún más ionizante que los rayos X (Keith L. Moore A. F., 2006) (Keith L. Moore A. M., 2003).

Frente al panorama actual, los nuevos trazadores que introduce la nanotecnología a las técnicas de imagen médica, han supuesto que se realicen grandes avances en esta área, ya que podrían solucionar los principales problemas que introducen las técnicas existentes hoy día:

1. Elevados costes.
2. Radiación perjudicial para el individuo.
3. Individuos totalmente inmóviles.
4. Tiempos de procesos muy elevados.

La introducción de trazadores va acompañada de la evolución de las técnicas de imagen médica en una nueva área denominada como teragnosis, la cual se basa en la unión de las técnicas de diagnóstico y el tratamiento como una herramienta única. (1) El diagnóstico se da de forma generalizada a través de una técnica de imagen médica. (2) El tratamiento es múltiple, entre los que destacan, las técnicas de teragnosis más desarrolladas en los últimos años:

- **Terapia plasmónica fototérmica** (Plasmonic Photo-Thermal Therapy, **PPTT**), en este proceso suelen ser utilizadas nanopartículas metálicas (principalmente oro (Laura Martínez Maestro E. C.-G.-O.-B., 2014)) a partir de las cuales un haz de luz es absorbido y convertido en calor mediante una serie de procesos fotofísicos en cadena. Tras absorber la luz por parte de la nanopartícula metálica se produce un proceso de relajación electron-electron, el cual se da en femto-segundos y posteriormente ocurre la relajación electrón-fotón en un proceso de picosegundos. Ambos procesos suponen un aumento de temperatura por parte de las nanopartículas metálicas, las cuales disipan dicho calor en el ambiente circundante. De forma que si dichas nanopartículas se encuentran en la superficie de las células marcadas como cancerígenas, dicho calor se disipa hacia las mismas pudiendo provocar así un cambio en su función, llegando incluso a su destrucción (Xiaohua Huang, 2011), (Vetrone, 2012), (Uéslen Rocha, 2014), (Laura Martínez Maestro P. H.-G.-R., 2013).
- **Terapia Fotodinámica** (Photo-Dinamic Therapy, **PDT**), se trata de un tratamiento mediante el cual son utilizados ciertos elementos químicos que actúan como fotosensibilizadores, generando en el medio requerido oxígeno singlete, que puede producir la muerte celular. El proceso envuelve 3 elementos, un haz de luz (en una longitud de onda determinada, normalmente en el rango visible), un fotosensibilizador y el oxígeno presente dentro del tejido donde se encuentran las células a tratar. De esta forma, bajo el haz de luz adecuado, el fotosensibilizador puede ser excitado, provocando un cruce entre sistemas, generando así la excitación del oxígeno triplete $^3\text{O}_2$ presente en el medio y excitándolo a singlete $^1\text{O}_2^*$, compuesto que es muy reactivo y produce una elevada citotoxicidad (Guanying Chen H. Q., 2014)
- **Liberación controlada de fármacos:** La liberación de fármacos a través del torrente sanguíneo, es un campo en amplio desarrollo durante las últimas décadas (Guarav Tiwari, 2012), (Mandana T. Manzari, 2021). El uso de sistemas de administración de fármacos por medio de liposomas (Haisheng He, 2019), (S. G. Antimisiaris, 2021),

micelas mixtas, (Nuin E. G.-M., 2013), (Nuin E. G.-M., 2013), (Rodríguez- Muñiz, 2017) niosomas (Rianne Batelds, 2012), micelas (Gomez-Mendoza M. N., 2012), sales biliares, agregados (Gomez-Mendoza M. M., 2016), (Gomez-Mendoza M. M., 2011), (Gomez-Mendoza M., 2012) nanopartículas (Jayanta Kumar Patra, 2018), (Michael J. Mitchell, 2021), nanocápsulas, nanopartículas de oro, microsferas (Costantino Del Gaudio V. C., 2017), microcápsulas, nanoburbujas, (Atul P Sherje M. J., 2018) microburbujas y dendrímeros (Vruti Patel, 2020), se están investigando para diagnóstico y terapia (Mine Silindir Gunay A. Y., 2016) (Zhai B, 2018). Portadores basados en micelas (liposomas, micelas mixtas, niosomas, entre otros) están compuestos por sales biliares, fosfolípidos y colesterol. Se encuentran entre las entidades biológicas más importantes en mamíferos, exhibiendo, por ejemplo, una capacidad sobresaliente para solubilizar moléculas lipofílicas (Christopher J. H. Porter, 2007), (M A Hammad, 1998). El estudio de nanopartículas para aplicaciones de administración de fármacos permite tanto el desarrollo de nuevas plataformas para el transporte eficiente, como la liberación controlada de moléculas de fármaco en el microambiente severo (cambios de pH, temperatura) de los tejidos enfermos de los sistemas vivos (Youqing Shen, 2008). Por esta razón, estos sistemas están siendo explotados para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, con una entrega mejorada en la diana (Jiaojiao Din, 2017) (Jan Sobczyński, 2018) (Liang Cheng, 2016). La lipofilicidad y las propiedades de partición de la membrana de los fármacos candidatos potenciales, son clave para el reconocimiento de su objetivo en las células (C A Lipinski, 2001). La combinación de marcadores y liberadores de fármacos hacen a esta técnica una herramienta de teragnosis. Comúnmente, los fármacos utilizados en cualquier dolencia médica, son administrados por vía oral o por inyección, la complejidad de esta administración se encuentra en que tras ingresar en el torrente sanguíneo, estos se trasladan o eliminan rápidamente del cuerpo reduciendo su disponibilidad y aumentando los efectos secundarios (Torchilin, 2006) (Sanjay Kumar, 2019) . La liberación de fármacos tiene como diana aquellas estructuras celulares u orgánulos que contienen la diana del fármaco. Una de las dolencias más beneficiadas de este tratamiento es el cáncer. (Liangliang Dai, 2016), (David Böhme, 2015). Las principales razones de su auge son (1) la reducción de la afectación a tejido sano a causa de los tratamiento contra el cáncer, tales como la quimioterapia (David Böhme, 2015) (Sanjay Kumar, 2019) y (2) el aumento de la efectividad de los tratamiento contra el cáncer, ya sea por disponibilidad del fármaco o por eliminación de agentes competidores (Liangliang Dai, 2016), (Leore T. Geller M. B.- R., 2017).

1.2. Biomarcadores fluorescentes

De forma generalizada se puede definir como biomarcador, al elemento acogido en imagen médica como indicador in vivo de procesos biológicos. Estos procesos pueden ser normales o patológicos, que pueden o no ser consecuencia de una respuesta a un fármaco o intervención. Antiguamente, los biomarcadores se restringían a describir moléculas biológicas, hoy día existe una amplia variedad de compuestos y elementos exógenos al paciente, que permiten actuar en concepto de biomarcador (James P. B. O'Connor, 2016), (Richard G. Abramson, 2014).

Dependiendo de cómo el biomarcador obtenga la información de los procesos biológicos estudiados, se pueden diferenciar tres tipos (Radiology, 2010):

1. Histológicos: Obtienen la información de biopsias o intervenciones.

2. Bioquímicos: obtienen la información de las células procedentes de muestras de sangre u orina.

3. Anatómicos: funcionales o moleculares, obtienen la información de imágenes médicas in vivo.

La presente Tesis Doctoral, se ha centrado en el estudio de biomarcadores anatómicos, funcionales o moleculares, por lo que pondremos la atención en las técnicas de teragnosis in vivo, especialmente en la liberación de fármacos y la incorporación de biomarcadores a las mismas.

La atención en cuanto a los biomarcadores, recae en su mayoría, en los catalogados como fluorescentes, se considera un compuesto fluorescente a aquel que emite luz a través de la caída de sus electrones desde un estado excitado al estado suelo, tras haber sido previamente excitado por la absorción de energía (Lakowicz, 1999). Dentro de los compuestos fluorescentes más utilizados en el área médica y de mayor auge, se encuentran los quantum dots, se trata de cristales inorgánicos semiconductores nanométricos fluorescentes, que pueden ser excitados con una única fuente de energía dando lugar a una emisión multicolor, cuya emisión a su vez depende de su tamaño (Robert E. Bailey, 2004), (Sonal Mazumder, 2009), (Pavel Zrazhevskiy, 2009) aunque se encuentran en una amplia aplicación por su múltiples características fotofísicas, los quantum dots están sintetizados a partir de metales tales como cobalto o cadmio, conociéndose que pueden presentar una elevada toxicidad si son sometidos a radiación ultravioleta durante un periodo prolongado (Sonal Mazumder, 2009), por ello posteriormente a los quantum dots, surgieron los materiales Upconversion, son materiales capaces de emitir en longitudes de onda de energía superior a la energía captada por excitación, gracias a la múltiple excitación de sus electrones antes de caer al estado suelo, estos materiales no presentan

toxicidad y en ellos, está basada la detección del presente estudio, por ello, serán descritos más adelante con mayor profundidad.

2. Materiales upconversion (UC) Se denomina materiales Upconversion, a aquellos capaces de emitir en una longitud de onda superior a la longitud de onda de excitación.

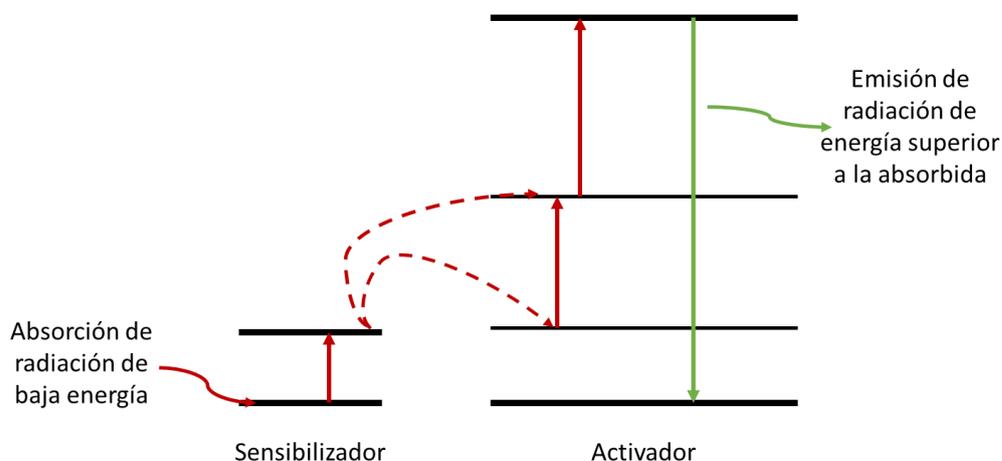


Figura 1: Esquema generalizado del proceso Upconversion.

El proceso upconversion, es un proceso intrínseco en la mayoría de los elementos de transición, no obstante, debido a su configuración electrónica, en los lantánidos se aumenta su eficiencia, debido a una excitación en cadena de los electrones desde el estado suelo a los diferentes estados de excitación como muestra la Figura 1, de modo que un mismo electrón es excitado en múltiples ocasiones, lo que genera que al relajarse se emita una energía por encima de la absorbida. Comúnmente, son excitados en longitudes de onda enmarcadas dentro de la región infrarroja, emitiendo en la región del Uv- Visible (f. Wang, 2011) (Guanying Chen H. Q., 2015).

1.3. Composición y estructura

El proceso upconversion, es un proceso intrínseco de los lantánidos, conociendo que los lantánidos o tierras raras son metales del bloque d, los conocidos como metales de transición, pero, pese a encontrarse en esta sección de la tabla periódica, presentan una reactividad más similar a los metales del Grupo II de la misma (Cotton, 2006). Su reactividad, propiedades catalíticas, magnéticas y metálicas y su fluorescencia, siendo esta última la parte que confiere a este estudio, se deben principalmente a su configuración electrónica. Los orbitales de los lantánidos se van llenando gradualmente, obteniendo una configuración electrónica, donde su distribución de la capa de valencia se define con la fórmula general $4f^{n+1}, 5s^2 5p^6, 6s^2$ la disponibilidad de electrones en los suborbitales 5p y 6s hacen que todos los iones de los lantánidos sean cationes trivalentes, incluidos escandio, itrio y lantano que no presentan electrones en el orbital f (Fernando Echeverri L., 2019). Es exactamente esta propiedad, la

pérdida de electrones en suborbitales para la formación de iones trivalentes, la que le confiere la emisión característica de los lantánidos, definida como una línea estrecha, posicionada principalmente, en los rangos visible e infrarrojo cercano. Esto es debido a que los suborbitales 5p y 6s al estar completos, permiten que se den absorciones e intercambios de energía entre los orbitales 4f-4f (Piguet, 2005).

No obstante, para que se desarrolle en toda plenitud el proceso upconversion, se requiere de una estructura coordinada en una red para que la absorción de energía y el traspaso de la misma para la excitación en cadena sea posible. Esta excitación en cadena se da gracias a la combinación de tres lantánidos, cada cual con una función diferente. Los tres se dispondrán en una matriz cristalina, que se diseña de forma que interfiera lo mínimo en el proceso luminiscente, para ello deberá de cumplir tres criterios (Min Lin Y. Z., 2012) (Alexandre A. Arnold V. T., 2013):

1. Que los iones trivalentes de los lantánidos encajen el entramado generado por la matriz cristalina.
2. Baja energía de vibración fonónica, de forma que se minimice la pérdida de energía entre los estados intermedios de los iones de los lantánidos.
3. Elevada estabilidad química.

En la matriz cristalina (Figura 2) se dispondrán tres lantánidos cada uno con una función claramente definida:

- **El estabilizador:** Forma parte de la matriz cristalina principal. Es el que dispone en la matriz cristalina las posiciones que serán ocupadas por los materiales dopados (resto de iones de lantánidos que juegan otros papeles en el compuesto) (M. R. N. Soares, 2015).
- **El sensibilizador:** Es el elemento lantánido que se encarga de captar la energía de excitación y donarla al siguiente elemento. La energía de excitación del compuesto, dependerá de los niveles de energía del lantánido seleccionado como sensibilizador, el más común es el Yterbio debido a su energía de excitación. El Yterbio, es el único lantánido que presenta un único estado de excitación sin estados intermedios, lo que le hace idóneo para esta tarea. A parte, esa energía de excitación se corresponde con la región del Infrarrojo (980 nm), lo que supone muchas de las grandes ventajas principalmente (Feng Duan, 2012):
 1. Se trata de radiación no ionizante, lo que supone grandes ventajas en el área biomédica.

2. El infrarrojo es capaz de traspasar múltiples medios, incluso medios anisotrópicos, como es el caso del tejido, sin dispersarse.
- **El activador:** Se trata del elemento lantánido capaz de captar la energía donada por el sensibilizador, suelen ser elementos que presentan múltiples estados de excitación, lo que va a definir las longitudes de onda de emisión. Esto es debido a que el sensibilizador donará la energía al activador de manera continua, por lo que los electrones ya excitados, serán capaces de captar de nuevo energía para excitarse de nuevo, esto hará que los electrones puedan alcanzar diferentes estados de excitación, que tras su caída al estado suelo, den lugar a fluorescencias diferentes (Feng Duan, 2012).

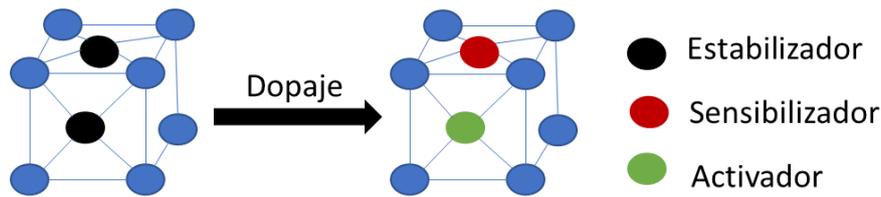


Figura 2: Esquema general de la disposición en una red cristalina de un compuesto upconversion previo y posterior al dopaje.

Existen varios mecanismos por los que los electrones de los iones trivalentes que forman parte del entramado de un compuesto upconversion captan, ceden y emiten energía:

1. **TPA** (Two Photon Absorption, Absorción de Dos Fotones): Es el considerado como mecanismo convencional, supone la absorción de dos fotones por un mismo electrón sin que esa absorción suponga que el electrón se sitúe en un nivel de energía intermedio entre el estado suelo y el estado excitado final (F. Wang R. D., 2011) (J. Chen, 2012) (M. Wang G. A., 2011), como se observa en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**
2. **ESA** (Excited State Absorption, Absorción del Estado Excitado): el mecanismo es el mismo que en el proceso TPA, pero en este caso sí existe un nivel de energía real, **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, al absorber los dos electrones se alcanza entre el estado suelo y el estado excitado final, un estado excitado intermedio (F. Wang R. D., 2011) (M. Wang G. A., 2011) (J. Chen, 2012).
3. **ETU** (Energy Transfer Upconversion, Transferencia de Energía de Conversion Ascendente): Implica la excitación de dos iones vecinos (iones de lantánidos trivalentes de la red), que actúan como sensibilizador, el conocido como donador de energía y activador o aceptor de energía. El proceso sería el siguiente: el sensibilizador es excitado simultáneamente por dos fotones como ocurriría en TPA o ESA y esta energía acumulada, es donada al activador vecino, que será el que tras volver de su estado

excitado al estado suelo, provoque la emisión de energía en forma de luz (F. Wang R. D., 2011) (J. Chen, 2012) (M. Wang G. A., 2011), como se muestra en la **Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

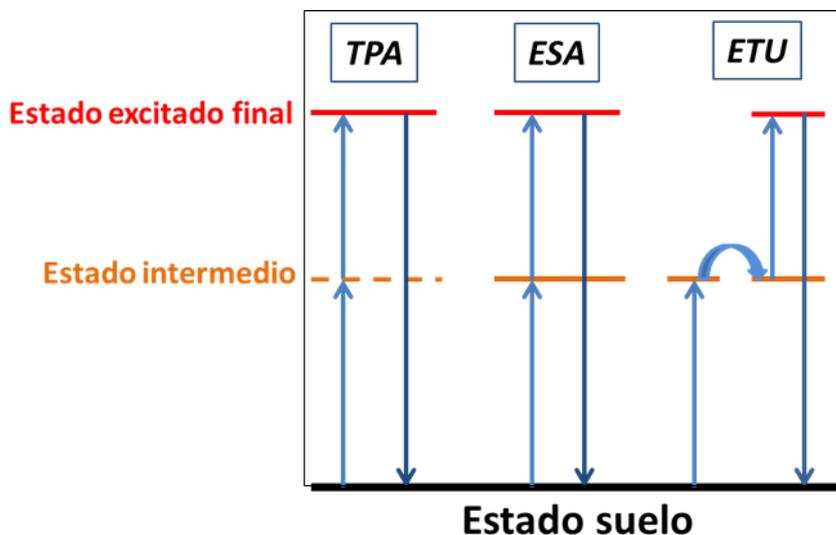


Figura 3: Representación de los mecanismos de transferencia de energía que se pueden dar entre los iones de una red cristalina de un compuesto upconversion para la captación y emisión de energía.

1.4. Metodologías sintéticas

Los diferentes métodos de síntesis se definen buscando como objetivo el aumento de la eficiencia del proceso upconversion, para lo cual, es importante el control de diferentes parámetros físicos en la matriz cristalina sintetizada, estos son: Tamaño, fase cristalina, pureza, morfología y monodispersidad. Existen cuatro métodos documentados y ampliamente estudiados, donde a partir de los parámetros de síntesis: temperatura, pH, tiempo de reacción, precursores de reacción y tratamientos térmicos, se consigue un control de la matriz cristalina final.

1. **Método de coprecipitación:** Es el método que conlleva el proceso más simple, no son necesarios grandes requerimientos de equipo, costes o condiciones críticas de reacción. El proceso más importante en este método de síntesis es la selección de los disolventes donde se producirá la mezcla de los reactivos sólidos para la obtención del compuesto buscado (M. Lin, 2012), normalmente se utiliza octadieno (Y. Liu, 2010) (P. Ptacek, 2007), metanol (C. Dong, 2012) o una mezcla de ambos solventes (J. Wang, F. Wang, C. Wang, Z. Liu, X. Liu, 2011). El problema asociado a este método de síntesis se encuentra en que para obtener la fase cristalina pura deseada es necesario un tratamiento térmico posterior.

Descomposición térmica: Este método es usado cuando el objetivo se encuentra en obtener una buena dispersión de las partículas sintetizadas (M. Lin, 2012) para ello, es necesario el uso de disolventes de elevado punto de ebullición, para que se alcance la disolución de los componentes orgánicos en los reactivos. El problema que supone este método es que las temperaturas de proceso son muy elevadas desde 300°C (D. Yang, 2011) a 750°C (A. M. Pires, 2005). Además, estos disolventes son muy contaminantes y peligrosos, como son el octadieno (D. Yang, 2011), ácido tetraacético etilendiamina conocido como EDTA (A. M. Pires, 2005) (J. Zhuang, 2007) y oleilamina (Q. Liu, 2011)

2. **Proceso Sol-gel:** Este proceso es determinado por la hidrólisis o policondensación del acetato del metal o el alcóxido del metal que actúa como precursor, este contiene los lantánidos que contribuirán a la formación de las partículas upconverison (M. Lin, 2012). El alcóxido más típico usado en este proceso es el tetraetoxisilano, más conocido como TEOS. La principal desventaja que muestra este proceso es que para conseguir los parámetros deseados en la partícula final, es necesario un tratamiento térmico posterior (A. Yanes, 2009).
3. **Proceso solvotermal:** Este método es el más usado debido al control sobre los parámetros de la partícula sintetizada. Este método controla fácilmente: tamaño, morfología, propiedades ópticas y magnéticas a través de la temperatura y tiempo de reacción, valor del pH y precursores de la reacción (M. Lin, 2012) (X. Wang, 2005) (F. Wang Y. H., 2010) (G. Yi, 2004) (F. Wang X. L., 2008). Además, este método puede ser realizado en un horno convencional o en un horno microondas. Esto supone un cambio en los parámetros de las partículas sintetizadas, debido a que la generación del calor de síntesis se dará mediante mecanismos y tiempos diferentes lo que afectará directamente a la morfología y fase de las partículas sintetizadas.

Debido al mayor control que supone este método y al estudio en profundidad que hace el presente trabajo, para controlar la luminiscencia aplicada a la detección tumoral, el método seleccionado para la síntesis de las partículas objetivo fue el método solvotermal. Este método será ampliamente explicado en el **Capítulo 3**, en el apartado de **Síntesis**.

1.5. Principales aplicaciones

Gracias a sus múltiples ventajas, los materiales upconversion han atraído mucha atención en diferentes campos como son:

1. **Ciencias instrumentales:** Estos materiales han sido usados principalmente en la generación de láseres compactos, se trata de elementos que pueden emitir en múltiples longitudes de onda y es aquí donde radica su atracción en estas ciencias. Los pioneros en este proceso fueron E. J. Schimitschec y E. G. Schwarz, desarrollando en 1962 un láser Ultravioleta basado en el fenómeno upconversion (Schwarz, 1962). A partir de este momento, han sido desarrollados muchos láseres basados en el proceso upconversion, donde es de destacar el estudio de láser azul a partir de iones trivalentes de Tulio desarrollado en 1995 por S. Sanders, R. G. Waarts, D. G. Mehuys, y D. F. Welch (S. Sanders, 1995).
2. **Energía y medioambiente:** Estos materiales han sido ampliamente utilizados para llevar a cabo procesos catalíticos mediados con luz (fotocatálisis). Los materiales upconversion han sido definidos previamente, en resumen, como materiales compuestos por elementos lantánidos (semiconductores) capaces de emitir luz visible mediante la captación de luz infrarroja, por lo que son de un amplio interés en su uso como fotocatalizadores (W. Qin, 2010) (Y. Tang, 2013). Como por ejemplo en su uso para la producción de H₂, donde los materiales upconversion proporcionan la energía idónea en el proceso de fotosíntesis artificial mediada por semiconductores (Mariam Brawik Fernando Fresno 2019),(Dandan Li 2018).
3. **Bioaplicaciones:** En esta sección hay una variación muy amplia:
 - 3.1. **Detección de huellas dactilares:** La detección tradicional de huellas dactilares latentes, está basado en el método del espolvoreado, no obstante, este método tiene las desventajas de baja sensibilidad, bajo contraste, alto ruido de fondo y alta interferencia de autofluorescencia (M. Wang Y. Z., 2015), por estas razones, una alternativa al polvo tradicional con compuestos upconversion, supone una mejora de las características buscadas.
 - 3.2. **Biomarcador:** Como ya se definió en el **Capítulo 1 sección 1.2**, un biomarcador es un elemento acogido en imagen médica como indicador in vivo de procesos biológicos (James P. B. O'Connor, 2016) (Richard G. Abramson, 2014). Los compuestos Upconversion han atraído mucha atención como biomarcador, principalmente por las longitudes de onda en las que trabajan. Inicialmente la longitud de onda infrarroja es capaz de atravesar el tejido totalmente sin sufrir

dispersión, lo que favorece que el compuesto pueda ser excitado independientemente de la profundidad a la que se encuentre (Andrew M. Smith M. C., 2009), además de contar con que los rangos infrarrojo y visible en los que trabajan estos compuestos, son radiaciones no ionizantes, lo que supone que no producen daño en el tejido que atraviesan.

Por otra parte, se trata de elementos no tóxicos, varios estudios corroboran la falta de toxicidad y la no incrementación de enfermedades tras su introducción (J. Chen, 2012) (Feng Duan, 2012) (James P. B. O'Connor, 2016).

3.3. Teragnosis: En este campo las partículas upconversion han supuesto un especial interés, debido a que dependiendo de la longitud de onda, intensidad y potencia de la radiación de excitación del compuesto, este puede sufrir procesos de aumento de la temperatura por vibración. Esta actividad, combinada con el tamaño de los compuestos y la capacidad de bioconjugación (unión a estructuras tales como anticuerpos) permite que sean elementos muy selectivos, que puedan unirse a una determinada célula buscada, como puede ser una célula tumoral. Por lo que no solo actúa como biomarcador, sino que una vez señalizada la zona de interés, puede trabajar como herramienta de terapia (Guanying Chen H. Q., 2015).

En la presente Tesis Doctoral, se enfocó la atención principalmente en la acción de los upconversion en el ámbito de la teragnosis, concretamente en el diagnóstico por imagen médica de tumores dérmicos y su tratamiento a través de la liberación de fármacos.

Capítulo 2: Objetivos

Para poder lograr el objetivo final de nuestro estudio, **la generación de una nueva metodología de teragnosis en la aplicación a procesos tumorales dérmicos y la liberación de fármacos específicos para su tratamiento**, se definieron los siguientes hitos:

- 1. Desarrollar y optimizar sistemas upconversion de emisión hiperespectral (SEH), para su aplicación en diagnóstico por imagen de lesiones tumorales.** Este primer objetivo tiene asociado
 - 1.1.1. Optimizar el proceso de síntesis para la modificación selectiva de los parámetros de los SEH con el fin de obtener sistemas altamenteeficientes.
 - 1.1.2. Seleccionar la matriz más adecuada Seleccionar activadores y sensibilizadores, para la generación de las longitudes de onda de fluorescencia acordes con aquellas que permiten la señalización del tejido.
 - 1.1.3. Adecuar los parámetros físicos y morfológicos de las partículas para su aplicación en la detección de tumores subdérmicos.
 - 1.1.4. Obtener correlaciones entre las condiciones de síntesis y las características físicas y morfológicas de las partículas sintetizadas.
 - 1.1.5. Seleccionar las características físicas y morfológicas idóneas para su aplicación en detección sobre tejido.
 - 1.1.6. Seleccionar las condiciones de síntesis en función de las características físicas y morfológicas buscadas en los SEH.
- 2. Evaluar los sistemas upconversion de emisión hiperespectral (SEH) en la liberación específica de fármacos en terapias contra procesos tumorales.**
 - 2.1. sSeleccionar terapia más indicada contra el proceso tumoral.
 - 2.2. Estudiar las líneas de absorción de los fármacos y profármacos a aplicar sobre el proceso tumoral.
 - 2.3. Seleccionar los SEH en función de las líneas de absorción y emisión del fármaco y profármaco seleccionado para la aplicación sobre el proceso tumoral.
- 3. Desarrollar un sistema de simulación de tumores para la prueba de los sistemas upconversion de emisión hiperespectral.**
 - 3.1. Seleccionar los SEH desarrollados según su longitud de onda e intensidad de fluorescencia.
 - 3.2. Combinar de SEH seleccionados y simular su respuesta en la detección de tumores subdérmicos en función de su profundidad.

Capítulo 3: Metodología

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, se ha hecho uso de múltiples técnicas experimentales que han permitido el desarrollo y optimización de los materiales propuestos y su la evaluación en una nueva técnica de teragnosis.

3.1. Productos utilizados

Los compuestos utilizados para la obtención de los SEH en el proceso de síntesis, son los detallados a continuación:

- Óxido de Erblio (Er_2O_3); apariencia física: polvo; pureza $\geq 99.99\%$.
- Óxido de Yterbio (Yb_2O_3); apariencia física: polvo; pureza $\geq 99.99\%$.
- Óxido de Yttrio (Y_2O_3); apariencia física: polvo; pureza $\geq 99.99\%$.
- Fluoruro de amonio (NH_4F); apariencia física: polvo; pureza $\geq 99.9\%$.
- Fluoruro de sodio (NaF); apariencia física: polvo; pureza $\geq 99.99\%$.
- Hidróxido de sodio (NaOH); apariencia física: perlas; pureza $\geq 98\%$.

- Ácido nítrico (HNO_3); apariencia física: incoloro; pureza 65%.
- Agua ultrapura Milli-Q[®] (resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$)
- Ácido oleico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$); apariencia física: amarillenta; pureza $\geq 99\%$.
- Agua ultrapura Milli-Q[®] (resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$); apariencia física: incoloro; pureza $\geq 99.8\%$.

3.2. Síntesis.

Los SEH sintetizados en este trabajo, se basan en los iones trivalentes de lantánidos, que se integran en una matriz cristalina y cuya composición y disposición tiene una importancia capital en su comportamiento luminiscente. Por lo tanto, la elección del método de síntesis tiene una elevada importancia en el desarrollo de estos materiales. La preparación de estos sistemas requiere:

1. Una matriz cristalina utilizada como red estabilizadora de los iones lantánidos.
2. Los elementos lantánidos que actuarán como: Estabilizador, activador y sensibilizador.

Ciertos parámetros físicos de estos materiales, influyen de manera directa sobre las propiedades fluorescentes de las mismas. Por ello, durante los últimos años, se han desarrollado diversos procesos de síntesis que permiten controlar dichas propiedades.

Las propiedades físicas más importantes en los SEH basados en el fenómeno upconversion son: Tamaño, fase cristalina, pureza, morfología y dispersión. Para el control de las mismas se han

desarrollado los siguientes procesos de síntesis (Min Lin Y. Z.-F., 2012): **Método de coprecipitación**: destaca por ser el más sencillo, su importancia recae en la selección del disolvente en el que se produce la mezcla de reactivos, carece de selectividad en cuanto a la fase cristalina sintetizada, por lo que suele necesitar de tratamiento térmico posterior; **descomposición térmica**: permite una buena dispersión de las nanopartículas sintetizadas, lo que es posible gracias a los disolventes utilizados en el proceso, esto a su vez tiene el impedimento de que son disolventes con elevados puntos de ebullición y contaminantes; (Meng Wang G. A., 2011); **proceso sol-gel**: mediante este método se consiguen los parámetros estructurales deseados para los productos con mayor facilidad, con la desventaja de que para ello necesita postratamiento térmico (Meng Wang G. A., 2011), y **método solvotermal**: se trata de un método sencillo en el que existe una elevada facilidad de control de los parámetros estructurales de los productos a través de las condiciones de temperatura, presión, pH y concentración de los reactivos de síntesis. (Min Lin Y. Z.-F., 2012) .

Como se puede observar estos procesos tienen ciertas limitaciones en cuanto a dispersión y tamaño de los cristales generados. El proceso solvotermal, es el que mayores virtudes tiene frente a estas limitaciones, por ello ha sido elegido en la síntesis de los compuestos de la presente Tesis Doctoral.

La síntesis de estos materiales implica el desarrollo de una serie de etapas como son:

Preparación de la disolución madre.

Solución que contiene los iones trivalentes de los lantánidos deseados en los SEH buscados. +

La composición y relación entre los diferentes lantánidos depende de su aplicación. En el proceso de síntesis seleccionado, en esta Tesis Doctoral se utilizaron:

Itrio (Y) como estabilizador,

iterbio (Yb) como sensibilizador

y Erbio (Er) y Tulio (Tm) como activadores.

Para la preparación de la disolución madre se disuelven los óxidos de lantánidos a utilizar en ácido nítrico (HNO_3) 0,5M (Yuhui Wng, 2011) (Jing Li, 2013) (Shu-Nan Shan) (Meng Wang J.-L. L.-X.-L.-K., 2009) (Chow G. S., 2006) (F. Wang R. D., 2011) (Zhang, 2008) (Juayan Liao, 2015) , siendo los correspondientes óxidos Y_2O_3 , Yb_2O_3 y Er_2O_3 . La reacción propuesta en esta Tesis Doctoral tiene una proporción atómica de: $x:0.2x:0.02x$.

Para comenzar, se preparan 10 ml de una disolución de ácido nítrico al 20%, puesto que partimos de una disolución de ácido nítrico al 65%, se mezclarán 2,353 ml de HNO_3 con 7,647 ml de H_2O .

A continuación, se introducen en la proporción estequiométrica los óxidos de los lantánidos seleccionados, en este caso las cantidades exactas fueron: 0,462 g Y_2O_3 ; 0,1616 g de Yb_2O_3 y 0,0157 g de Er_2O_3 .

La mezcla obtenida, fue sometida a temperatura entre 40 – 50°C con continua agitación para la disolución de los lantánidos en la mezcla de ácido nítrico, lo cual, se determina por una variación de color, de blanco opaco a transparente, con ello se obtuvo la mezcla $\text{Ln}(\text{NO}_3)_3$ que actúa como disolución madre en la síntesis.

La función de cada ión trivalente es la que indica la proporción de cada uno en la disolución, en cuanto a porcentaje molar fue utilizado (Chow G. S., 2006) (F. Wang R. D., 2011) (Zhang, 2008) (Juayan Liao, 2015):

Proceso solvotermal

Posteriormente se lleva a cabo el proceso solvotermal bajo una serie de condiciones de presión y temperatura que tienen que ser optimizadas (Demazeau, 1999).

Los procesos solvotermales se basan en un mecanismo centrado en el modelo de nucleación en estado líquido, donde se produce una transferencia de materia entre dos líquidos con fases inmiscibles (Oxtoby, 1992). Para generar este medio de reacción se utilizó una mezcla de disolventes orgánicos en diferentes proporciones.

Estos disolventes son etanol, que actúa como medio de reacción y ácido oleico como estabilizador en una proporción en torno a 1,5:1. (Le-le Li), (Meng Wang J.-L. L.-X.-L.-K., 2009), (Chow G. S., 2006).

Las reacciones solvotermales se llevaron a cabo en un autoclave de 30ml. Por lo que los volúmenes utilizados son 8ml de etanol y 5,3 ml de ácido oleico, añadiéndose 1 ml de disolución madre. A esta disolución se le denominó disolución A, la cual fue sometida a agitación durante 15 min.

Adicionalmente se prepara la disolución que contiene los elementos que conformarán la matriz cristalina. Teniendo en cuenta que en esta Tesis Doctoral se seleccionó una matriz basada en NaF_4 , se seleccionaron diferentes fuentes de fluor: NaF o NH_4F .

Así, por una parte, se preparó una disolución de 10 ml en base acuosa de 0,336 g de NaF y otra de 20 ml de 0,593 g de NH_4F . A ambas disoluciones se les añade NaOH, el cual tiene una doble función, agente de precipitación y agente controlador del pH. Con el fin de optimizar las condiciones de síntesis se realizaron diferentes preparaciones modificando el pH.

1. NaF pH 7, NaOH = 0,68M (0,815 g de NaOH añadidos a la disolución.)
2. NH_4F pH 5, NaOH = 0,064 M (0,0768 g de NaOH añadidos a la disolución.)
3. NH_4F pH 6, NaOH = 0,128 M (0,154 g de NaOH añadidos a la disolución.)
4. NH_4F pH 7, NaOH = 0,192 M (0,2304 g de NaOH añadidos a la disolución.)
5. NH_4F pH 8, NaOH = 0,256 M (0,307 g de NaOH añadidos a la disolución.)
6. NH_4F pH 10, de = 0,407 M (0,489g de NaOH añadidos a la disolución).

Las disoluciones que contienen los elementos lantánidos, como aquellos que constituirán la matriz, se mezclan en continua agitación, gota a gota para favorecer la dispersión coloidal, mientras que la disolución precipita. A continuación, la mezcla de ambas disoluciones se mantiene en agitación durante 15 minutos.

Tras ello, se introduce la disolución final en un autoclave y se comienza el proceso solvotermal, en un horno de reacción donde se han estudiado dos tipos de estrategias térmicas:

- **Horno convencional:** la mezcla es sometida a 230 °C usando diferentes tiempos de reacción 12 h o 24 h.
- **Horno microondas:** Se estudiaron diferentes temperaturas y tiempos de reacción: 90 °C, 180 °C y 190 °C a 4 h y 12 h.

Una vez terminado el proceso de síntesis solvotermal, se colecta la muestra, que se seca y posteriormente se somete a un proceso térmico a 400°C durante 4 h.

3.3. Técnicas de caracterización.

Todas las muestras han sido caracterizadas por diferentes técnicas, con el fin de conocer sus propiedades estructurales, morfológicas y ópticas y su efecto en los procesos de upconversion estudiados en esta Tesis Doctoral.

3.3.1 Difracción de rayos X

Esta técnica está basada en la interacción de la estructura sólida cristalina de la muestra con un haz de rayos X. Para entender la difracción de rayos X, hay que conocer el fundamento de la estructura de los compuestos cristalinos. Una estructura cristalina hace referencia a la posición real en la que se encuentran los elementos que componen a un determinado compuesto cristalino, mientras que si hacemos referencia a una red cristalina, nos referiremos a la ordenación de los elementos de una determinada sustancia, los cuales no tienen por qué referirse a la posición real del elemento, si no a sus puntos de gravedad, la red cristalina será a su vez la unidad de repetición que compone la estructura cristalina global de la sustancia observada (Chow G. S., 2006).

La existencia de una red cristalina, determinará una serie de planos paralelos en la muestra, separados entre sí a una distancia establecida, a su vez, por los elementos que la conforman. La difracción de rayos X está basada en la interacción de estos planos paralelos, de forma que, si en una determinada sustancia existe una única fase cristalina (disposición atómica de los elementos en la red) (Chow G. S., 2006), cuando un haz de rayos X incide sobre dos de los planos de la red, la difracción de esos rayos se dará con un determinado ángulo θ , si ambos planos son paralelos (y por lo tanto están en fase) ese θ dará lugar a una interacción constructiva entre ambos rayos difractados, lo que se proyectará como un pico característico de la red cristalina observada, de lo contrario la interacción será destructiva y no proporcionará señal, determinando que no existe ninguna fase en la muestra (Sands, 1993), (Wormald, 1979).

Todo ello es determinado gracias a la ley de Bragg:

donde:

d : es la distancia entre planos, característica de cada red cristalina.

θ : es el ángulo de difracción de los rayos X.

λ : Es la longitud de onda de los rayos utilizados.

De esta manera se podrá determinar la fase cristalina de la sustancia estudiada en función de la difracción que genere. Gracias a ello, se podrá realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de la muestra.

Un esquema básico de un difractómetro es el mostrado en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

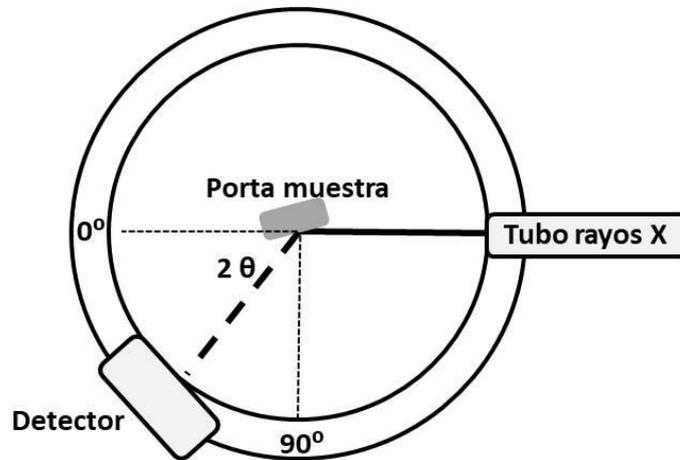


Figura 4: Esquema difractómetro de rayos X básico.

En el esquema de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se puede observar:

- Tubo de rayos X: Basado principalmente en un cátodo formado por un filamento de wolframio y un tubo de vacío, el cátodo es excitado con un voltaje entre 50 – 60 Kv aunque existen equipos de mayor sensibilidad que pueden alcanzar los 100 Kv. El haz obtenido por la excitación del cátodo incide sobre un ánodo elaborado por un blanco metálico, normalmente constituido por cobre o Molibdeno. (Mauricio Wilches Zúñiga, 2007)
- Detectores: dependen de la capacidad de los rayos utilizados, suelen existir cuatro tipos: Proporcionales, de centelleo, semiconductores o PSD.
- Porta muestras: donde el compuesto a analizar será insertado en cantidades del orden de 50 micras.

A su vez, este sistema cuenta con una serie de ventanas de apertura del haz en cada uno de sus caminos, lo que permite la correcta incisión y recogida de la señal generada. Para ellos existen:

- Ventanas de divergencia: Colocada entre el tubo de rayos X y el portamuestras, ajusta el haz incidente a la región de la muestra deseada.

- Ventana de dispersión: Colocada entre la muestra y los detectores, para poder discriminar las señales obtenidas de la misma.
- Ventana del detector: Colocada antes de los detectores para mejorar la resolución de la señal recibida.
- Ventanas de Soller: son las encargadas de eliminar los rayos difractados carentes de información útil.
- Monocromador secundario: Discrimina el ruido de la señal.

3.3.2. Microscopía electrónica de barrido [Scanning Electronic Microscopy (SEM)]

Está basada en la interacción sobre la muestra de un haz de electrones, de esta manera permite la visualización de la extensión y morfología de toda la superficie de la muestra. Para poder obtener una imagen es necesario que la muestra sea conductora, en caso opuesto, esta debe ser recubierta comúnmente por una capa de oro o carbón.

Para poder conseguir el haz de electrones que permite la visualización de la muestra, los electrones son acelerados en el cátodo a través de una diferencia de potencial entre cátodo y ánodo, esta diferencia de potencial suele encontrarse entre 0,1 – 50 KeV, dependiendo del tamaño a visualizar, el potencial de haz variará (Reimer, 1998).

Tras la interacción del haz sobre la muestra, es recogida la señal deflectora de la misma, en función de la energía de los electrones recogidos por la señal de respuesta de la muestra, se podrán observar diferentes estructuras e intervendrán diferentes detectores del equipo. Esta técnica no solo permitirá la visualización de la muestra, si no también, su análisis cualitativo y cuantitativo (Joseph I. Goldstein).

Como las muestras visualizadas en el SEM, no son preparadas en una lámina uniforme, si no que presentan diferentes rugosidades y grosores, la interacción del haz con las diferentes zonas existentes en la muestra, dará lugar a la generación de diferentes señales de respuestas como muestra la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** Cada una de estas señales será recogida por un detector específico y dará una información específica de la muestra.

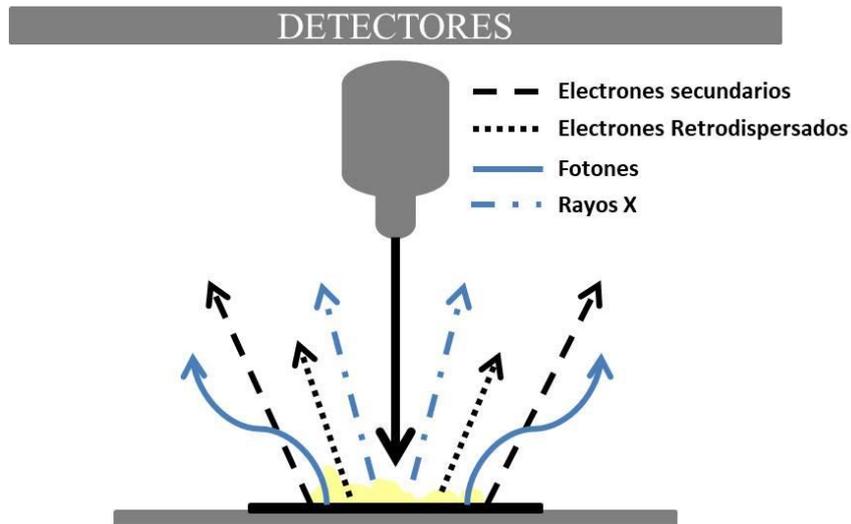


Figura 5: Señal de respuesta de la muestra preparada para SEM tras la incisión del haz de electrones.

- **Electrones secundarios:** Se obtienen cuando el haz de electrones índice sobre la muestra, al incidir esta recibe una energía que provoca la expulsión de un electrón de la muestra con la misma energía que el electrón incidido sobre ella. Por lo tanto, estos electrones son característicos de cada muestra y permiten visualizar la topografía de la misma. Con ellos se obtiene la clásica imagen en blanco y negro de mayor resolución.
- **Electrones retrodispersados:** Son aquellos electrones que provienen de una dispersión del haz original, estos no provocan la excitación de la muestra y la obtención de electrones secundarios, pero si interactúan con la superficie de la misma, siendo así sensibles a la presencia de variaciones de elementos sobre la misma. Esto conduce a la visualización de una imagen con diferentes tonos de grises en superficie, dependiendo del número atómico del elemento de la superficie.
- **Rayos X:** Cuando la muestra es excitada por el haz incidente y emite un electrón secundario, en la misma queda una vacante, cuando esa vacante es ocupada nuevamente por energía del haz incidente, son generados rayos X. La energía de los rayos X, será característica de la energía de la vacante que a su vez es característica del átomo presente en la muestra, lo que permite realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de la misma.
- **Fotones:** Cuando la vacante de energía generada por el haz de electrones incidentes es ocupada por un electrón más externo, es emitido un fotón de energía característica orbital del átomo que lo contiene, debido a que emite una energía igual a la diferencia

de energía de los orbitales que lo contienen. Lo que a su vez proporcionará información específica de los átomos contenidos en la muestra.

Con la información obtenida de cada detector, se generará una imagen en blanco y negro que permitirá conocer topografía y tamaños de la muestra, así como la realización de microanálisis por zonas específicas de la misma.

3.3.3. Microscopía electrónica de transmisión [Transmisión Electronic Microscopy, TEM]

Al igual que el microscopio de barrido, el de transmisión utiliza un haz de electrones para la visualización de la muestra, con la diferencia, que en este caso, la muestra es preparada con un grosor determinado para que el haz de electrones pueda atravesarla para generar la imagen, el grosor de la muestra suele estar comprendido entre 5 – 100 nm. En el microscopio de transmisión el haz tiene una energía comprendida entre 80 – 120 KV, dependiendo de la resolución que se quiera obtener, esta energía podrá variar (Reimer, 1998).

Cuando el haz incide sobre la muestra dependiendo del grosor y de los átomos que contenga, parte de los electrones la atravesarán y otra parte serán totalmente desviados. Ambos fenómenos serán condensados en un único haz de respuesta gracias a las lentes del sistema, como se observa en la Figura 6, el cual será proyectado en una pantalla fluorescente y recogido por una cámara CCD que permitirá la visualización de la imagen. Para evitar que los electrones sean desviados por las moléculas de aire y pueda haber interferencias en la visión de la muestra, la misma está sometida a vacío. (David Brian Williams, 1996).

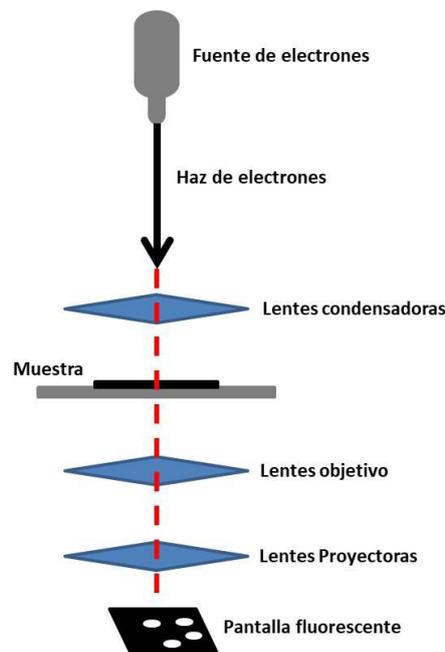


Figura 6: Generación de la imagen a partir de microscopía de transmisión.

La utilidad de cada una de las lentes del sistema es la siguiente (Heindenreich, 1964):

- **Lentes condensadoras:** Son las encargadas de proyectar el haz en la dirección de la muestra para visualizar la región deseada.
- **Lentes objetivo:** Son las encargadas de focalizar el haz en la energía deseada sobre la muestra.
- **Lentes proyectoras:** Expanden el haz hacia la pantalla fluorescente para la generación de la imagen.

El hecho de que los electrones interactúen de diferente manera en función de los átomos que contenga la muestra, permite no solola visualización de la estructura de las muestras, sino también un microanálisis de la misma según la región a la que esté orientada el haz.

Por otra parte, si la muestra es cristalina, se podrá observar la imagen de difracción de la misma, en la cual, se compara la difracción de los electrones por los planos cristalinos en función del punto del haz central (Guerra).

3.3.4. Espectroscopias ópticas

Es una técnica basada en el estudio y la determinación de las longitudes de onda emitidas por la materia. Estas longitudes de onda son estudiadas gracias a lo que se determina como espectro. Un espectro es una señal generada por la representación de la intensidad y la longitud de onda de la emisión de un material determinado (Mesorana),

Para poder medirlo, comúnmente encontramos equipos formados por (Sallee, 1967):

- **Foco luminoso:** Es la fuente de energía que nos permite excitar la muestra a analizar.
- **Monocromador:** Elemento encargado de la selección de la longitud que permite la excitación de la muestra cuya respuesta de excitación se desea analizar.
- **Cubeta:** contiene la muestra que se desea analizar.
- **Fotodetector:** identifica y cuantifica la cantidad de energía radiante emitida por la muestra tras su excitación.

3.3.5 Software de simulación.

Matlab.

Para la simulación del tejido humano y por lo tanto, la simulación de la transmisión de las diferentes longitudes de onda a través del mismo, se ha utilizado el software Matlab, es un software algebraico que permite realizar cálculos complejos a partir de conjuntos de valores organizados matricialmente (Oscar Reinoso García).

El lenguaje de programación utilizado por Matlab es propio y permite reducir la longitud de los códigos implementados por lenguajes como C o C++, no obstante, este permite la comunicación con otros dispositivos y otros lenguajes de programación (Abel., 2014). Este lenguaje se basa en un conjunto de librerías, en las que se encuentran registradas las funciones matemáticas simbólicas, de esta forma, al ir a generar un cálculo, gráfico o simulación de un determinado entorno, Matlab ya conoce las operaciones simbólicas básicas (Gilat, 2006).

Para las simulaciones utilizadas en este estudio, inicialmente, se definirán las expresiones matemáticas que rigen el comportamiento de las diferentes longitudes de onda dentro del tejido humano y posteriormente, se introducirán en el software Matlab, lo que permitirá visualizar la fluorescencia en superficie de los SEH una vez han sido depositados sobre la lesión a detectar. Esta fluorescencia sufrirá absorción y dispersión por las diferentes estructuras del tejido que serán contenidas en las expresiones definidas e introducidas en el software.

Capítulo 4: Desarrollo de Sistemas de Emisión Hiperespectral

La matriz principal de un sistema UC se diseña de manera que no interfiera en el proceso de conversión ascendente de la energía y dé toda la estabilidad posible al sistema. Siguiendo esta premisa fueron estudiadas las matrices LaF_3 , Y_2O_3 y NaYF_4 . Todas ellas fueron sintetizadas mediante el método solvotermal..

4.1 Desarrollo de UC basados en la matriz LaF_3 .

Se trata de una matriz ampliamente estudiada, conocida comúnmente en su dopaje con Yterbio para generar una excitación en 980nm, lo que proporciona gran viabilidad en aplicaciones biomédicas, debido a que esta longitud no produce bioluminiscencia por parte del material biológico, ni pérdida de la misma por absorción (Sri Sivakumar, 2012). Su estabilidad le proporciona un elevado abanico de elementos dopantes que permite emisiones en un amplio rango dentro del visible, gracias a la combinación del yterbio como sensibilizador y dopada con iones trivalentes de lantánidos tales como Tm^{3+} , Er^{3+} o Nd^{3+} (Gejihu De, 2005). Así por la variación de su estructura cristalina, ya que puede formar dos estructuras cristalinas diferentes la Hexagonal y la cúbica (Xiaofeng Yang, 2009). Además, resulta de gran interés el estudio que determina, que la variación de tamaños de la matriz no genera modificación en las propiedades luminiscentes (Sri Sivakumar, 2012).

La síntesis de esta matriz, se realizó a partir de una solución del nitrato del lantánido utilizado $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ al 0.5 M. Para su preparación será disuelto el correspondiente óxido metálico (La_2O_3) en ácido Nítrico (HNO_3) A 40 – 50 °C bajo fuerte agitación. Tras la preparación de la disolución madre, se debe proporcionar el medio en el que se dará la reacción, el cual se da gracias a la combinación de etanol y ácido oleico, que se le denomina **disolución A**, que se adicionará junto con la disolución madre bajo agitación durante 15 min a temperatura ambiente. A la unión de la disolución madre y la disolución A, se le adiciona fluoruro de sodio (NaF), junto con un agente precipitante como es el hidróxido de sodio NaOH (**disolución B**). Ambas se unen durante 30 min bajo fuerte agitación sin presencia de temperatura. Una vez preparada la disolución B se debe someter a la temperatura que permita la unión de los reactivos. Para ello, se introduce en un autoclave y para este caso concreto, fue utilizado un horno convencional bajo una temperatura de 230°C durante un periodo de 24 horas. Finalmente se obtiene un sólido blanco, el cual se lavó sucesivas veces con etanol y agua con la utilización de una centrífuga

En las imágenes obtenidas por SEM, de la muestra obtenida de síntesis, (Figura 7), se observan partículas irregulares con una elevada dispersión del tamaño entre 0.001-1 μm .

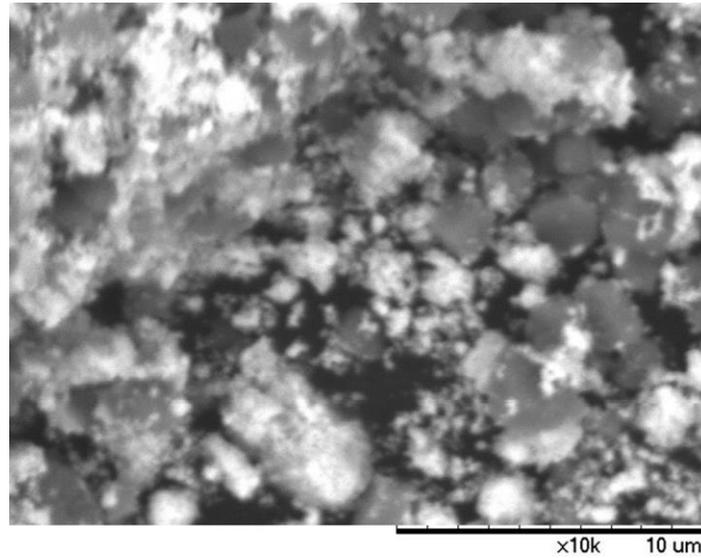


Figura 7: Imagen SEM de la matriz LaF₃

Los estudios por difracción de rayos X muestran que si bien la estructura cristalina de la matriz corresponde la fase hexagonal del LaF₃, aparece también NaF. Estos resultados indican que los rendimientos en el proceso de síntesis no son del 100%.

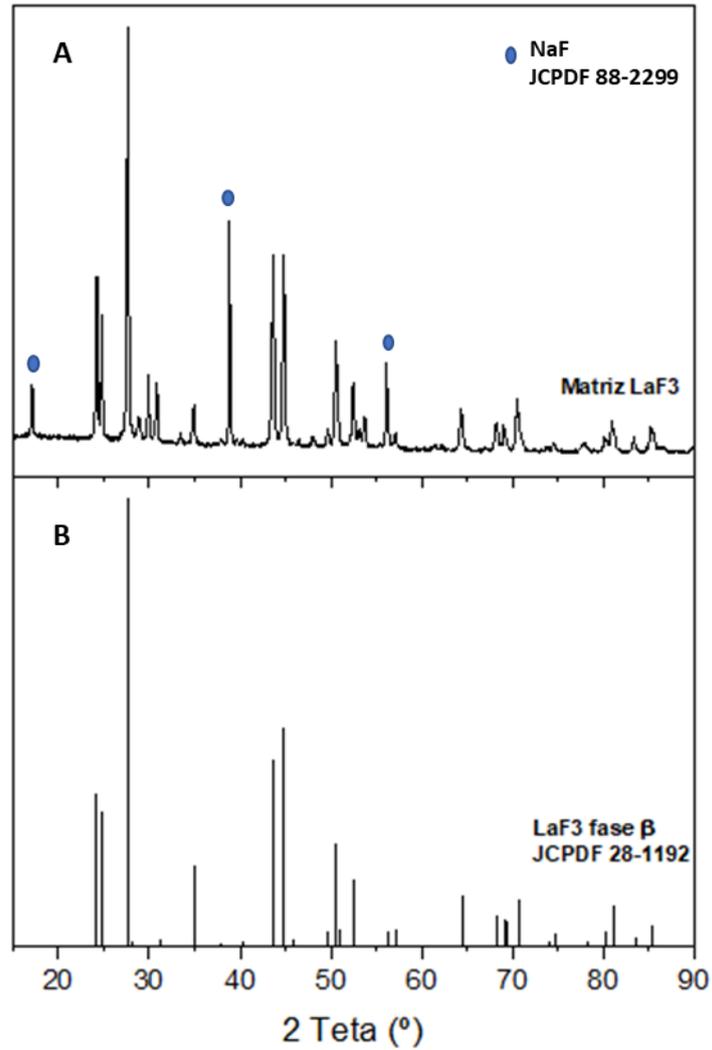


Figura 8: A) Valoración de la difracción de rayos X para la muestra LaF_3 B) Ficha JCPDF de la matriz sintetizada. Picos de NaF destacados sobre la matriz sintetizada.

Esta matriz fue dopada con Tm^{3+} como sensibilizador y Er^{3+} como activador (Sri Sivakumar, 2012). La caracterización de la muestra $\text{LaF}_3:\text{Tm},\text{Er}$, determinó que los cristales de fluoruro de sodio presentes en la matriz, no se eliminan posteriormente al dopar la muestra **Figura 9()** :

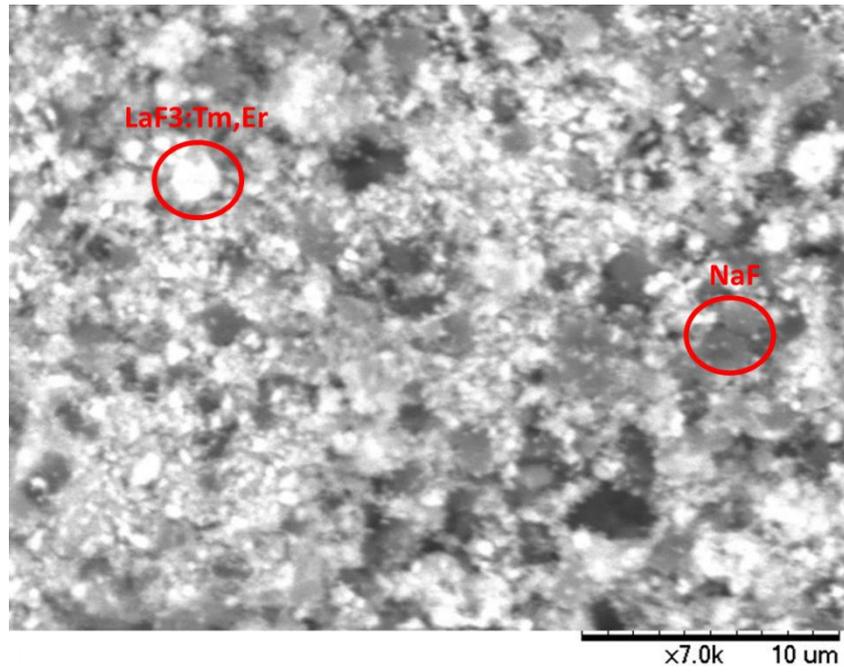


Figura 9: Imagen SEM del sistema LaF₃:Tm, Er.

Lo que a su vez fue confirmado mediante los gráficos XRD de la misma, **Figura 10**.

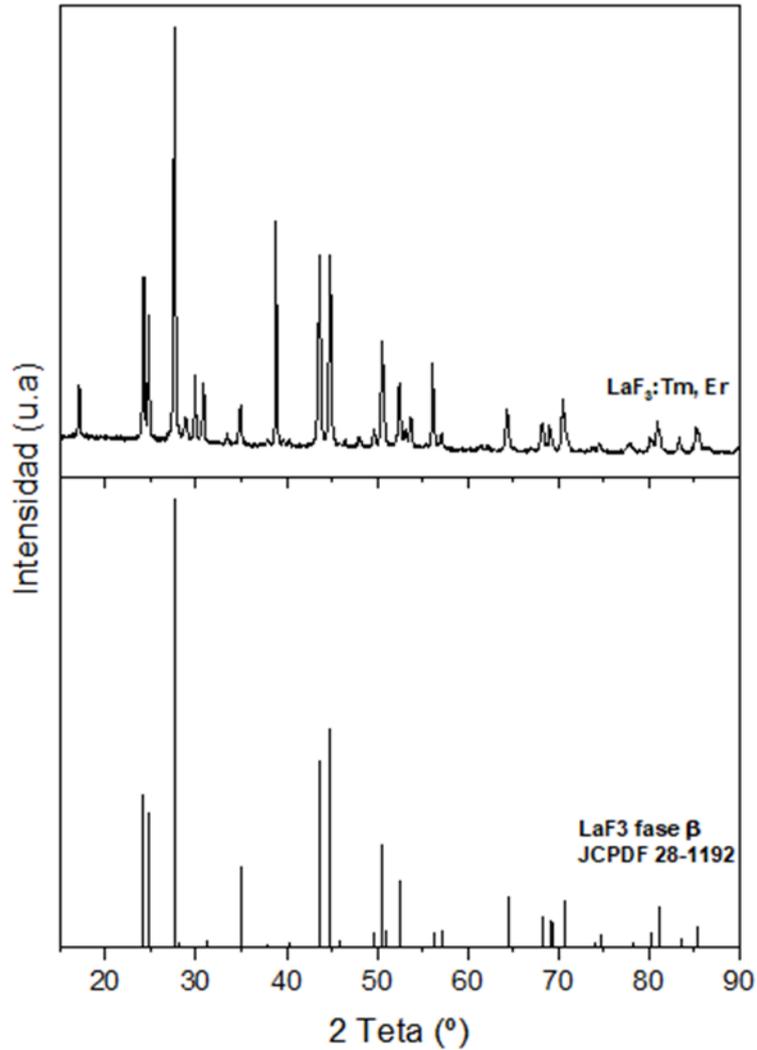


Figura 10: Valoración de la difracción de rayos X obtenida sobre la partícula LaF₃:Tm,Er sintetizada, en comparación con los picos selectivos que presenta la fase cúbica de dicha partícula y la fase hexagonal de la matriz de la que parte (LaF₃). Puntualizando los picos no correspondientes a la matriz LaF₃ hexagonal y que se corresponden con los picos característicos del compuesto NaF.

Como se puede observar, al dopar la matriz la reacción sigue siendo incompleta, sigue habiendo una elevada presencia de la fuente de fluoruro no reaccionada, además, la partícula dopada que se consigue, no llega a la fase hexagonal, se mantiene en la fase cúbica, quedando parte de la matriz sin dopar, lo que también contribuirá negativamente a la luminiscencia.

Por último, vamos a observar la luminiscencia de la matriz dopada en la **Figura 11**. Como se esperaba según la bibliografía (Sri Sivakumar, 2012), esta partícula presenta una emisión en la región del rojo bajo excitación de 980 nm.

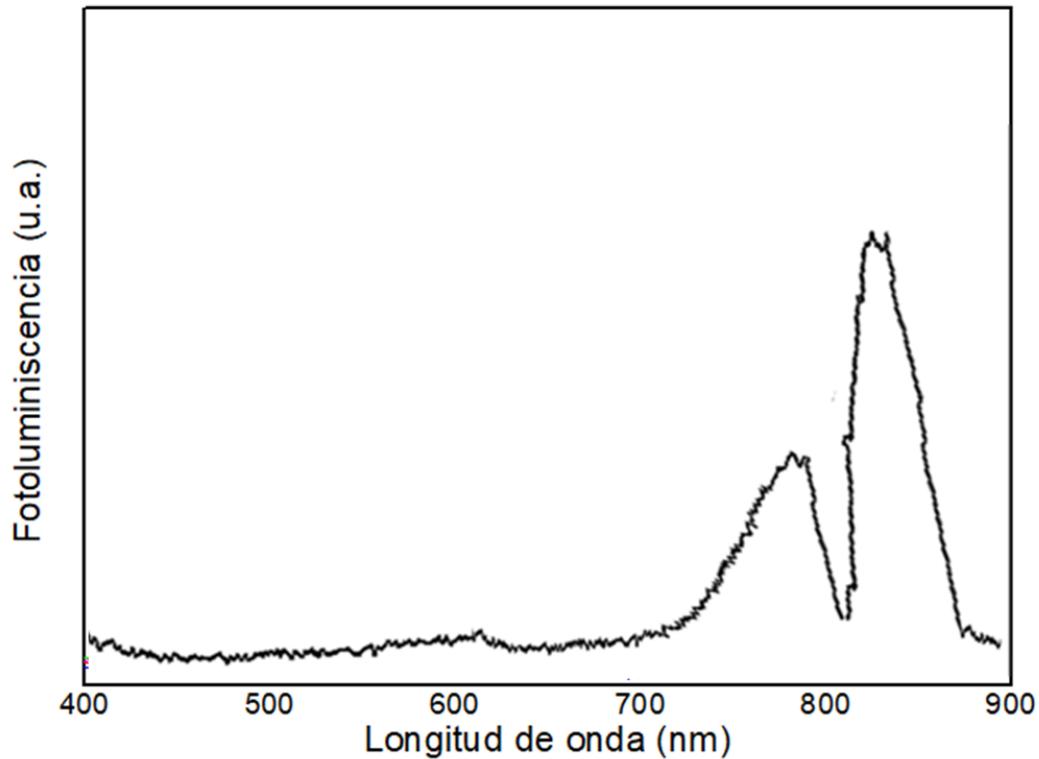


Figura 11: Espectro de fluorescencia de la partícula $LaF_3:Yb,Tm$ bajo excitación con radiación infrarroja de 980 nm.

Como se puede observar en la **Figura 11**, la intensidad de emisión del pico de 850nm considerado en la región del infrarrojo cercano (no detectable a simple vista), es superior a la del pico de 750 nm de la región del rojo de la sección visible del espectro electromagnético, lo que da lugar a que la intensidad de emisión de esta partícula sea muy tenue por la única contribución del pico de 750 nm a la intensidad de emisión.

Para mostrar que la mayor contribución de la intensidad de esta partícula se debe a la sección del infrarrojo, se capturó una imagen de su fluorescencia, debido a que los detectores CCD integrados en cualquier cámara digital convencional, son sensibles tanto a la radiación visible como a la infrarroja y la ultravioleta (Magnan, 2003), (Sngsik Park, 2002).

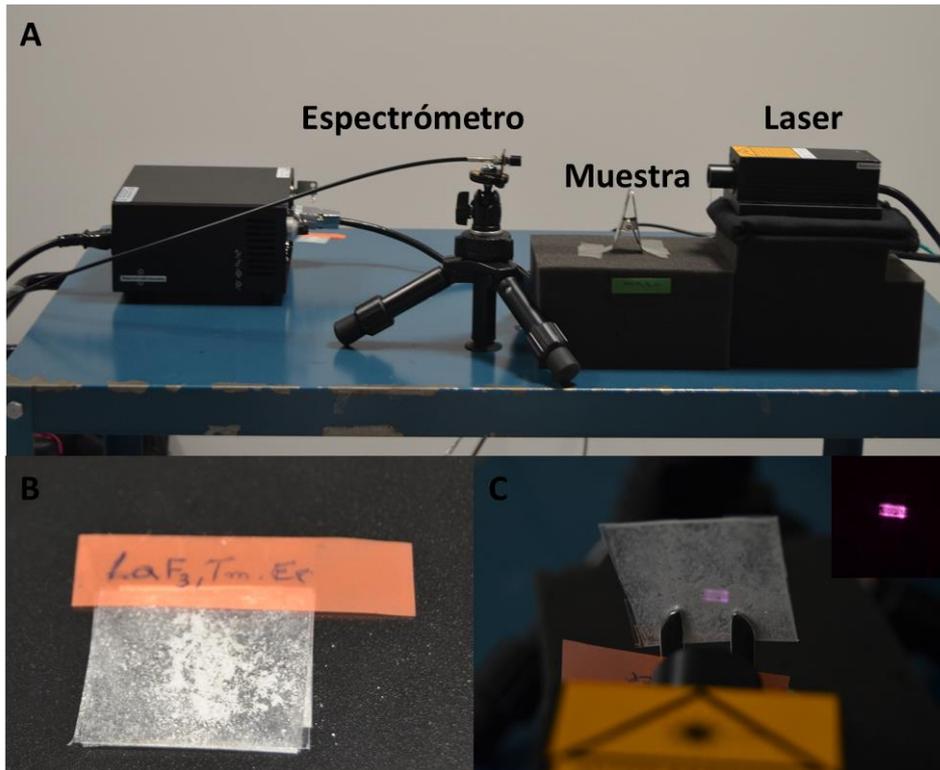


Figura 12: Captura de la luminiscencia de la partícula $\text{LaF}_3:\text{Tm,Er}$ con una cámara digital con detectores CCD. A. Montaje de experimento para la detección de la longitud de onda mediante un espectrómetro y la detección de la luminiscencia mediante una cámara digital. B. Dispersión de la muestra en polvo para su detección. C. Captura de la luminiscencia de la partícula $\text{LaF}_3:\text{Tm,Er}$ tanto con iluminación como en completa oscuridad.

En la **Figura 12A**, se puede observar el montaje preparado para la toma de la señal de fluorescencia, en este montaje se enfrentaron el espectrómetro para captar la señal de la partícula y el láser de excitación, de esta señal posteriormente fue eliminado el pico de 980 nm introducido por el láser. Para tomar la imagen de la luminiscencia sin efecto de la señal infrarroja del láser, que la cámara captaría, se tomó la misma desde la parte posterior del láser como se puede observar en la **Figura 12C**. La muestra se dispersó entre dos superficies de absorción nula como se ve en la **Figura 12B**.

A simple vista, se detectaba una fluorescencia roja de baja intensidad, sin embargo, al captar la señal con una cámara con CCD integrados, se observaba una fluorescencia morada de mayor intensidad como se observa en la **Figura 12C**. Con ello se demuestra que la matriz y el dopaje seleccionadas aumentaban la luminiscencia en la región del infrarrojo cercano.

Con todo el estudio de la matriz, se pueden determinar una serie de características que la hacen carente de estabilidad frente a nuestro objetivo, que son:

1. **Combinación de diferentes composiciones químicas.** Como la reacción no es completa, en la partícula final se combinan la presencia de LaF_3 y $\text{LaF}_3:\text{Tm,Er}$ junto con NaF . La principal objeción es que el fluoruro de sodio presenta un tamaño muy superior al del fluoruro de lantano, que frente a un posible dopaje y luminiscencia puede contribuir negativamente al proceso.
2. **Combinación de fases cristalinas,** al dopar la matriz, se observa que la partícula dopada obtenida no alcanza la fase cristalina hexagonal, lo que determina que sería necesaria una contribución mayor de temperatura para que la reacción pudiera ser completa.
3. **La disposición electrónica de la matriz** junto con la ausencia de una reacción completa y la estructura cristalina predominante, conducen a una intensidad relativa mayor de los picos de emisión cercanos al infrarrojo que no son de utilidad para la detección de imagen hiperespectral buscada en este trabajo.

4.2. Desarrollo de UC basados en la matriz Y_2O_3 .

Dado que la matriz $\text{LaF}_3:\text{Tm,Er}$, no proporcionó la intensidad de emisión requerida en la región del rojo, se decidió el estudio de la matriz Y_2O_3 .

Al igual que para el resto de matrices y por el objetivo buscado en este estudio se buscó la posibilidad de la excitación en la región infrarroja.

Esta matriz, al igual que la mayoría de las partículas denominadas upconversion, presenta excitación en torno a 980 nm por su dopaje con Yterbio. A su vez, es ampliamente conocido que su codopaje con Erblio favorece picos de emisión entre el verde y el rojo de la región visible del espectro electromagnético (Fiorenzo Vetrone J.-C. B., 2003).

Sin embargo, es conocido que el tamaño nanométrico de la matriz favorece la excitación en la región del rojo mediante el pico de emisión 660 nm correspondiente a la transición $^4\text{F}_{9/2} \rightarrow ^4\text{I}_{15/2}$ presente en la combinación en su dopaje entre el Yterbio y el Erblio (Fiorenzo Vetrone J. C., 2003)

Tal y como se ha detallado en el **Capítulo 3** en la sección de **Síntesis**, todas las partículas fueron sintetizadas mediante el método solvotermal. En este método todos los reactivos utilizados eran analíticamente puros y no fue usado ningún tipo de purificación.

Todas las síntesis tuvieron una sección común, basada en la obtención de la disolución madre, disolución en la que se encuentran los iones trivalentes de los lantánidos que permitirán la luminiscencia de las partículas. En el caso de las matrices, los iones de lantánidos presentes en la disolución madre se reducen al lantánido perteneciente en la matriz, en este caso formado únicamente por el Ytrio.

Debido a que el Y_2O_3 es un reactivo común, presente en el resto de síntesis, no tuvo que ser sintetizado, por ello para el estudio de esta matriz se consideró directamente el dopaje de la misma con Yterbio y Erblio, para conocer su comportamiento frente a las condiciones de reacción seleccionada. Por ello, en este caso se preparó la disolución madre con los iones trivalentes de los lantánidos presentes en el sistema $Y_2O_3:Yb,Er$. Por lo que la disolución madre fue preparada a partir de una solución del nitrato del Ytrio, nitrato de Yterbio y nitrato de Erblio ($Y(NO_3)_3$, $Yb(NO_3)_3$, $Er(NO_3)_3$) al 0,5 M. Para su preparación será disuelto los correspondientes óxidos metálicos (Y_2O_3 , Yb_2O_3 , Er_2O_3) en ácido Nítrico (HNO_3) A 40 – 50 °C bajo fuerte agitación.

Tras la preparación de la disolución madre, se debe proporcionar el medio en el que se dará la reacción, el cual se da gracias a la combinación de etanol y ácido oléico, como se describe en la sección de **Síntesis**, que es a lo que se le denomina disolución A, que se unirá con la disolución madre bajo agitación durante 15 min, sin necesidad de temperatura.

A la unión de la disolución madre y la disolución A, se le debe proporcionar el agente precipitante que permite la obtención de la partícula buscada, en este caso el agente precipitante fue el hidróxido de sodio NaOH, a lo que se le denomina disolución B. Ambas se unen durante 30 min bajo fuerte agitación sin presencia de temperatura.

Tras ello la mezcla final será introducida en un autoclave para la formación de la partícula. En este caso al igual que para la matriz LaF_3 y para poder llevar a cabo una comparativa de los resultados, se utilizó un horno convencional a 230°C durante 24 horas de reacción.

Tras ello, se sacó la muestra del autoclave, que en este caso no formó una deposición, si no que las partículas se encontraban en suspensión, y se lavó sucesivas veces con etanol y agua mediante agitación centrífuga, con lo que se consiguió la deposición de la partícula.

Como ya se ha comentado previamente, el Y_2O_3 es un reactivo común en nuestro estudio, por lo que su caracterización para la comparación con el resto de matrices sintetizadas no sería de utilidad, ya que su síntesis no es igual al resto y por lo tanto no proporcionaría unos resultados comparativos correctos.

Por ello, se lleva a cabo la caracterización de la partícula ya dopada, debido a que para conseguir el dopaje seleccionado, sí se han utilizado las características de síntesis de 230°C durante 24 horas con el medio de reacción seleccionado en este estudio.

En el caso de las matrices, se hizo un estudio de imagen superficial mediante la utilización del SEM, como se predijo teóricamente, la matriz Y_2O_3 proporciona estructuras nanométricas ~1

nm, que con este equipo no consiguieron proporcionar una visión nítida de la misma como se muestra en la **Figura 13**.

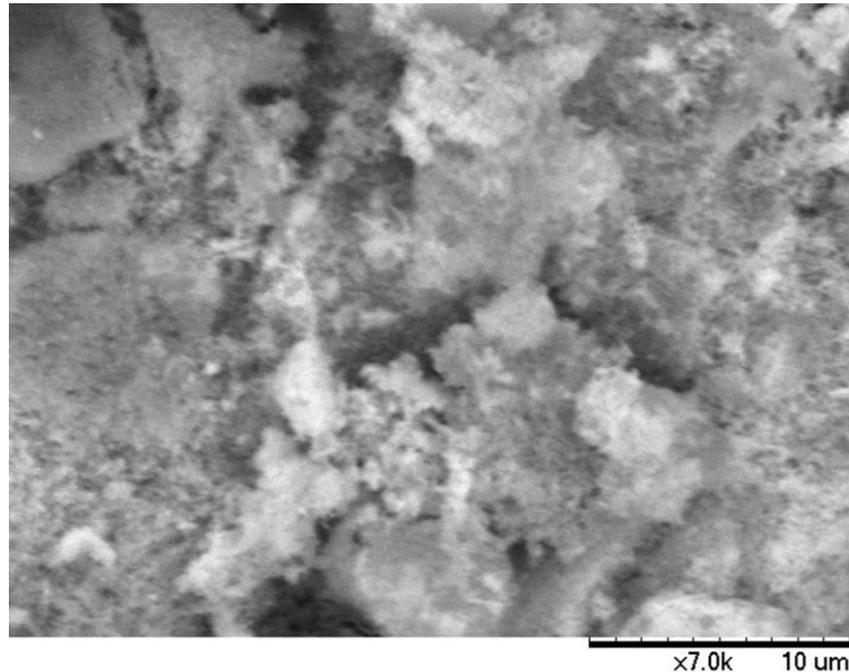


Figura 13: : Imagen SEM de la matriz Y_2O_3

No obstante, lo que sí podemos apreciar es la fuerte aglomeración que existe, pese a que la muestra fue secada y molturada para eliminar las posibles aglomeraciones físicas procedentes del lavado.

Para conocer si la reacción fue completa y en la mezcla existe homogeneidad en cuanto a la estructura cristalina y la composición, se optó por la realización de una difracción de rayos X.

Es de gran interés los resultados XRD obtenidos y la importancia de haber estudiado directamente el dopaje sobre la matriz se determina que al doparla la síntesis no es completa para la luminiscencia buscada, ya que es de recordar que los parámetros de síntesis son seleccionados para la obtención de la estructura hexagonal de las matrices seleccionadas, debido a la amplia gama de picos de luminiscencia que esta estructura cristalina proporciona. Sin embargo, para poder obtener una estructura hexagonal en la matriz Y_2O_3 es necesaria una calcinación posterior con una temperatura muy superior, en torno a 900 °C (Ying Tian, 2015)

Los picos de la difracción nos muestran una elevada presencia de la matriz Y_2O_3 en su forma cúbica, con una leve apreciación de picos relativos a la matriz en su estructura hexagonal, la teoría nos indica que para las partículas sintetizadas con la matriz Y_2O_3 , los picos característicos

son los proporcionados por la misma sin presentar diferenciación entre la esta con y sin dopaje (Jing Leng, 2018), (Qipeng Lu, 2014).

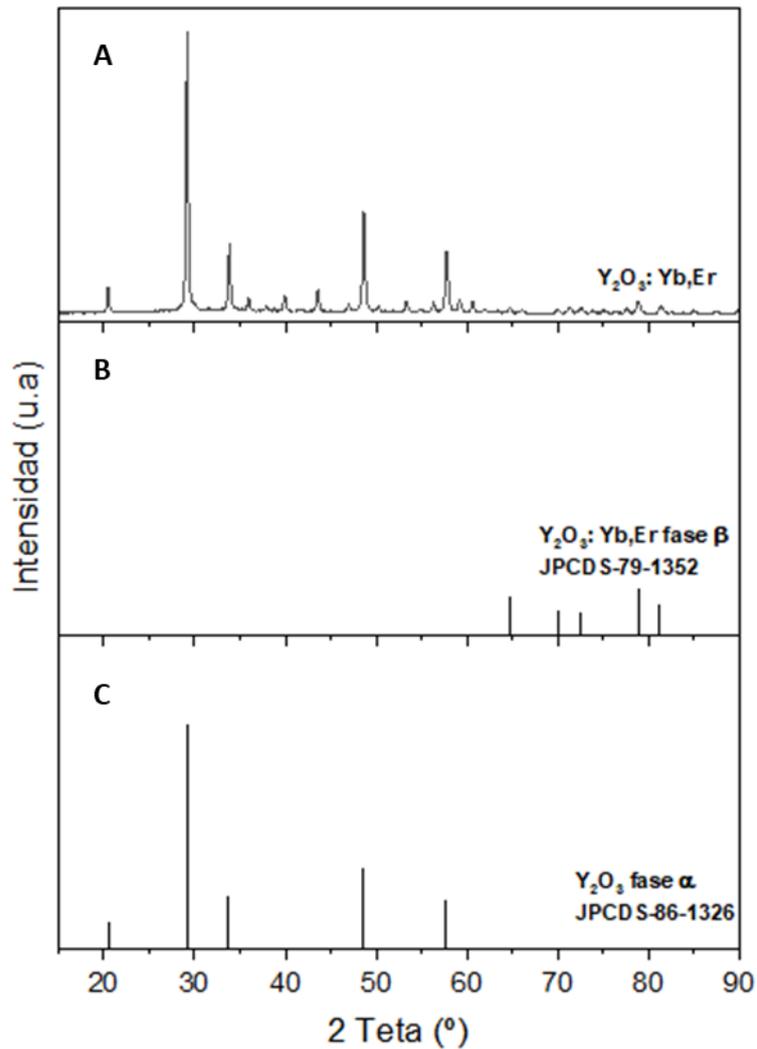


Figura 14: A) Patrón de difracción de rayos X de la muestra $Y_2O_3:Yb,Er$, B) Ficha JPCDS del sistema, C) Ficha JPCDS de la matriz.

Lo que determina el patrón de difracción de la **Figura 14** es que las condiciones de reacción seleccionadas, buscaban la obtención de la estructura hexagonal de la matriz, debido a que se proporciona un exceso de temperatura para su transformación al igual que para el resto de las matrices obtenidas, no obstante, en este caso, solo se obtuvo la presencia de una fase cristalina cúbica, ya que para esta matriz es necesaria una posterior calcinación que permita el cambio de fase de las partículas a temperaturas muy superiores, en torno a 900°C (Ying Tian, 2015).

Por otro lado, se obtiene que no existen picos característicos de intermedios de reacción, únicamente está presente la matriz Y_2O_3 , lo que en su parte se debe a que no necesita ninguna fuente adicional de elementos, como es el caso del flúor en la matriz LaF_3 , que contribuye a

ensuciar la muestra, ya que por sí solo, el Y_2O_3 es un reactivo purificado utilizado en el resto de reacciones lo que le da una gran ventaja frente al resto de matrices.

Como se ha determinado anteriormente, el propósito inicial en la síntesis de la matriz Y_2O_3 era la obtención de la estructura cristalina en fase hexagonal, que proporcionaría una gama de picos de luminiscencia entre el verde y el rojo gracias a su dopaje con Yterbio y Erblio, no obstante, es seleccionada por su mayor tendencia al tamaño nanométrico que proporcionaría un entorno estructural y morfológico más específico para el incremento de la emisión en la región del rojo (Hong Wang, 2015), (Qipeng Lu, 2014).

En el caso que se presenta, la estructura cristalina obtenida es básicamente cúbica, ya que la aportación de la fase hexagonal se puede considerar nula, si se observan los picos específicos de esta fase en comparación con los de la fase cúbica presentados por difracción de rayos X en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Figura 14**. La estructura cúbica, favorece la luminiscencia en la región del rojo por la disposición de los iones trivalentes de Erblio en la matriz, ya que el Erblio es el encargado de la luminiscencia del compuesto. Si se observa la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Figura 15** las emisiones de 545 nm y 660 nm son emisiones competitivas, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre el sistema, se dará o bien una transferencia radiativa en la que desde el nivel $^4S_{3/2}$ se produce la fluorescencia en la región del verde en 545 nm o bien una transferencia no radiativa que conduce al descenso de nivel de energía en el $^4F_{9/2}$, donde la caída al estado neutro da lugar a una transferencia radiativa y una luminiscencia en la región del rojo en 660 nm (Qipeng Lu, 2014), (Jing Leng, 2018). En este caso, la estructura cúbica da lugar a una mayor distancia entre los iones de interés, Yb, Er, lo que genera que la menor disponibilidad de energía en el entorno de los mismos genere un mayor tiempo de vida de los electrones excitados en los diferentes estados, favoreciendo la entrada en resonancia de los mismos con la red, que favorece los caminos no radiativos y con ello la fluorescencia en la región del rojo (Conbing Tan, 2011), (Hong Wang, 2015).

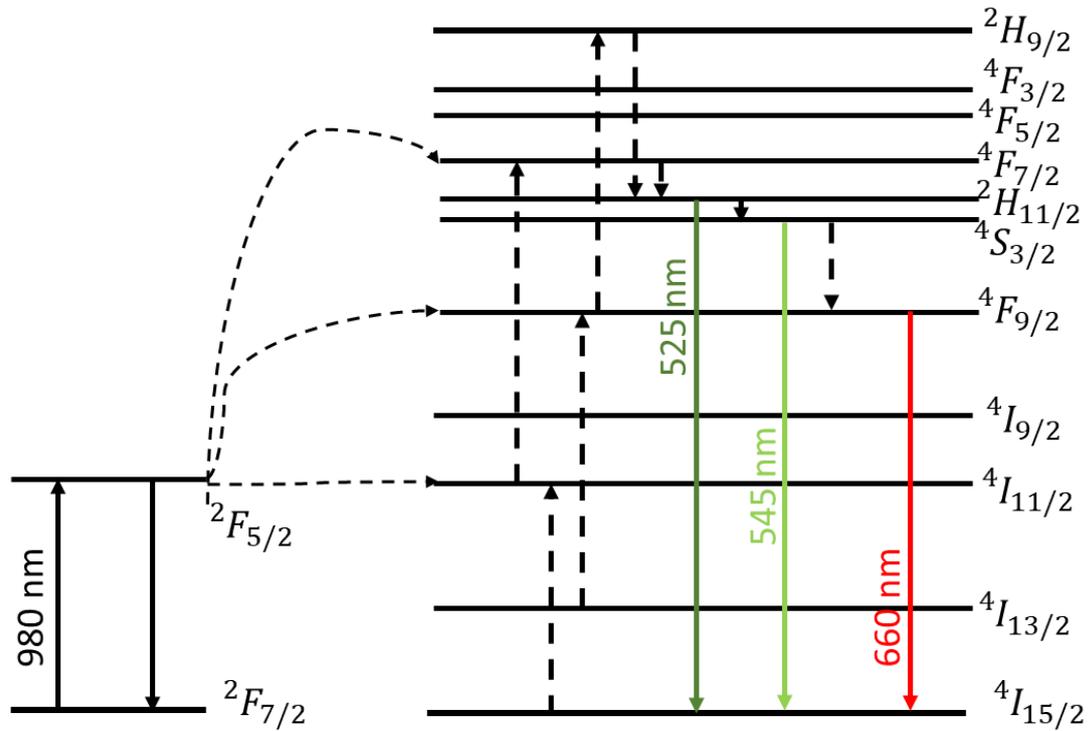


Figura 15: Esquema de transferencia de energía del Erblio, donde se presentan sus líneas de emisión principales en combinación con el Yterbio como sensibilizador y los diferentes caminos luminiscentes y no luminiscentes que dicha energía puede tomar en la vuelta de los electrones excitados a su estado neutro.

Es por ello que en la partícula $Y_2O_3:Yb,Er$ sintetizada en este capítulo, obtiene una fluorescencia en la región del rojo, como se observa en el espectro de fluorescencia de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Figura 16.**

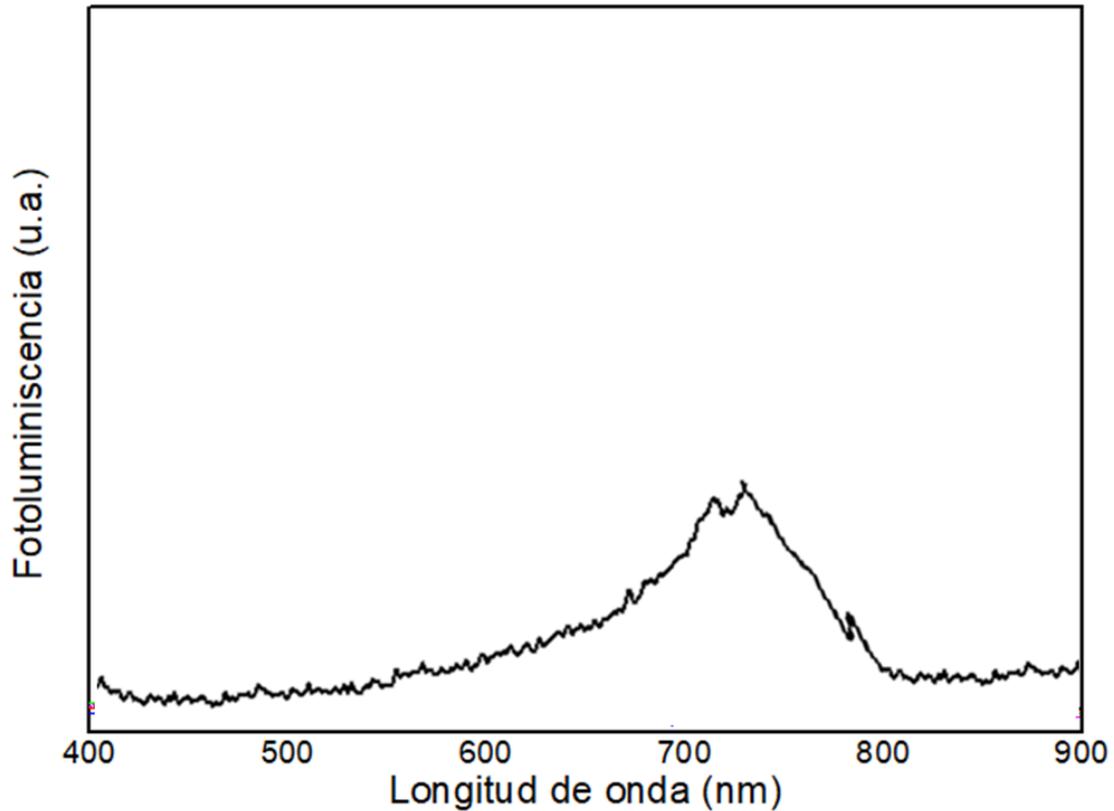


Figura 16: Espectro de fluorescencia de la partícula $Y_2O_3:Yb,Er$ bajo excitación infrarroja a 980 nm.

La intensidad de luminiscencia observada en la partícula es muy baja debido a que como ya se determinó en la sección anterior a través de la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Figura 13**, la partícula presenta una elevada aglomeración. El nivel de aglomeración supondría que pese a su tamaño nanométrico la relación superficie volumen se ve minimizada, afectando así a la luminiscencia de la partícula, ya que gran cantidad de emisores quedarían a la sombra sin llegar a ser excitados.

La matriz Y_2O_3 se consideró no apta para el fin buscado por las siguientes razones:

1. **La obtención de la fase cristalina buscada** (fase hexagonal) necesita de unas condiciones de reacción críticas en cuanto a la temperatura.
2. **La fase cúbica obtenida** con las condiciones medias seleccionadas, proporciona luminiscencia únicamente en la región del rojo.
3. **Su tamaño y composición** le confieren una aglomeración que afecta a la intensidad de luminiscencia.

4.3. Desarrollo de UC basados en la matriz NaYF₄.

Tras la carencia de un rango de fluorescencia que cubriera desde la región del verde al rojo del espectro electromagnético, se recurrió a la matriz NaYF₄. Esta matriz está ampliamente estudiada y es la principal matriz utilizada en trabajos destinados a aplicaciones biomédicas (Min Lin Y. Z., 2012) (Men Wang, 2009) (Guangshun Yi, 2004), (Yan Ma, 2015)

Por otro lado, presenta una elevada estabilidad y una amplia variabilidad de características morfológicas, estructurales y luminiscentes mediante el control de las condiciones de síntesis, mediante condiciones no críticas de presión y temperatura (Li L. W., 2007), (Chunxia Li Z. Q., 2007), (Chenghui Liu, 2009) (Jung-Hui Zeng, 2005), (John-Christopher Boyer, 2006).

Por último, se trata de una matriz que al utilizar el Iterbio como sensibilizador para dar lugar a una excitación de 980, puede ser dopado con diferentes iones trivalentes de lantánidos que le confieren fluorescencia desde el rango del azul al rojo del espectro electromagnético (Masoume Kaviani Darni, 2015), (Karl W. Kramer, 2004).

Tal y como se ha detallado en el **Capítulo 3**, en la sección de **Síntesis** todas las partículas fueron sintetizadas mediante el método solvotermal. En este método todos los reactivos utilizados eran analíticamente puros y no fue usado ningún tipo de purificación.

Todas las síntesis tuvieron una sección común, basada en la obtención de la disolución madre, disolución en la que se encuentran los iones trivalentes de los lantánidos que permitirán la luminiscencia de las partículas. En el caso de las matrices los iones de lantánidos presentes en la disolución madre se reducen al lantánido perteneciente a la matriz, en este caso el Itrio.

Por ello la disolución madre será preparada a partir de una solución del nitrato del lantánido utilizado Y(NO₃)₃ al 0,5 M. Para su preparación será disuelto el correspondiente óxido metálico (Y₂O₃) en ácido nítrico (HNO₃) a 40 – 50 °C bajo fuerte agitación.

Tras la preparación de la disolución madre, se debe proporcionar el medio en el que se dará la reacción, el cual se da gracias a la combinación de etanol y ácido oleico como se describe en la sección de técnicas experimentales, que es a lo que se le denomina disolución A, que se unirá con la disolución madre bajo agitación durante 15 min, sin necesidad de temperatura.

A la unión de la disolución madre y la disolución A, se le debe proporcionar la fuente de flúor que complete la matriz, esta fue obtenida a partir de fluoruro de sodio (NaF), unida a su vez con un agente precipitante que permite la obtención de la partícula buscada, en este caso el agente

precipitante fue el hidróxido de sodio (NaOH), a lo que se le denomina disolución B. Ambas se unen durante 30 min bajo fuerte agitación sin presencia de temperatura.

Una vez tenemos la mezcla elaborada se debe someter a la temperatura que permita la unión de los reactivos, para ello se introduce en un autoclave y para este caso concreto fue utilizado un horno convencional bajo una temperatura de 230°C durante un periodo de 24 horas.

Tras ello, se consigue una deposición blanca en el fondo del autoclave que corresponde a la matriz buscada, esta será lavada sucesivas veces con etanol y agua con la utilización de una centrífuga

Al igual que para las matrices previamente estudiadas, el estudio de la matriz NaYF_4 con una visión general de la morfología, dispersión y composición obtenida en la muestra mediante una imagen de microscopía de barrido o SEM que se puede observar en la **Figura 17**, en ella se puede determinar que no existe a primera vista una variabilidad apreciable en la composición de la muestra debido a que no existen diferentes morfologías con diferentes tipos de absorción que dieran lugar a una gama de grises en la imagen.

Se trata de una muestra muy dispersa, sin aglomeración, habiendo sido sometida al mismo secado y molturado que el resto de las matrices estudiadas a lo largo de este capítulo.

Por último, se puede observar una homogeneidad en la morfología, una morfología dendrítica y alargada que en algunas secciones tiende a bastones con las aristas más marcadas, lo que se puede deber a diferencias en la estructura cristalina, lo que se observará mediante el estudio de los picos característicos obtenidos en la difracción de rayos X.

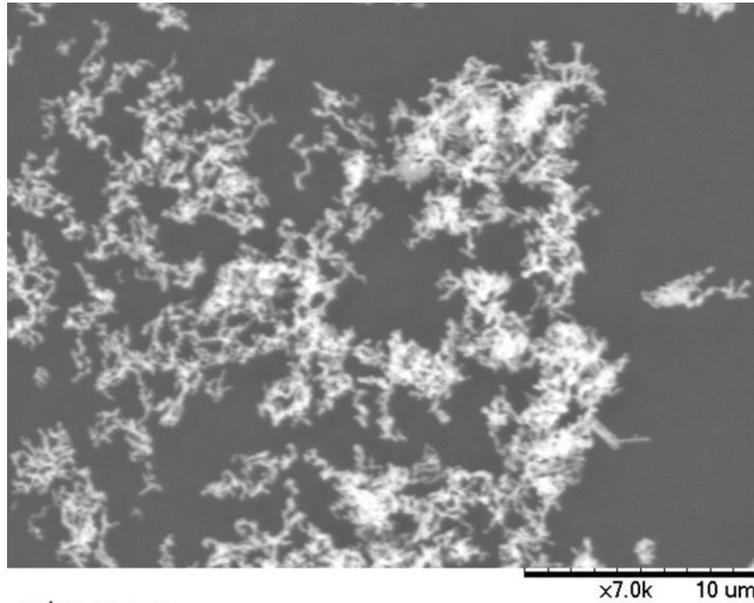


Figura 17: Imagen de SEM de la matriz NaYF_4 con un aumento de 7K. Representación de una región general en la que se observa la homogeneidad de la morfología de la muestra, la aparente homogeneidad de composición y la dispersión de la misma.

Para poder comparar la matriz con los resultados obtenidos en las matrices LaF_3 y Y_2O_3 se produjo el dopaje de la misma con yterbio como sensibilizador y Erblio como activador, para comprobar y al dopar se producía una conversión completa del compuesto a diferencia que en el resto de matrices estudiadas.

En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa la comparación de los picos de difracción característicos de la fase hexagonal de la partícula $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er y de su matriz NaYF_4 , se puede determinar que el dopaje de la matriz es considerado completo debido a que los picos característicos de la misma no tienen presencia en el gráfico de difracción.

Por otra parte, hay una correlación directa de los picos de la fase hexagonal de la partícula $\text{NaYF}_4:\text{Yb}$, Er con la matriz NaYF_4 sintetizada y dopada con Yterbio y Erblio lo que nos determina que la relación es completa y que los parámetros de reacción determinados son suficientes para obtener los parámetros buscados en la partícula.

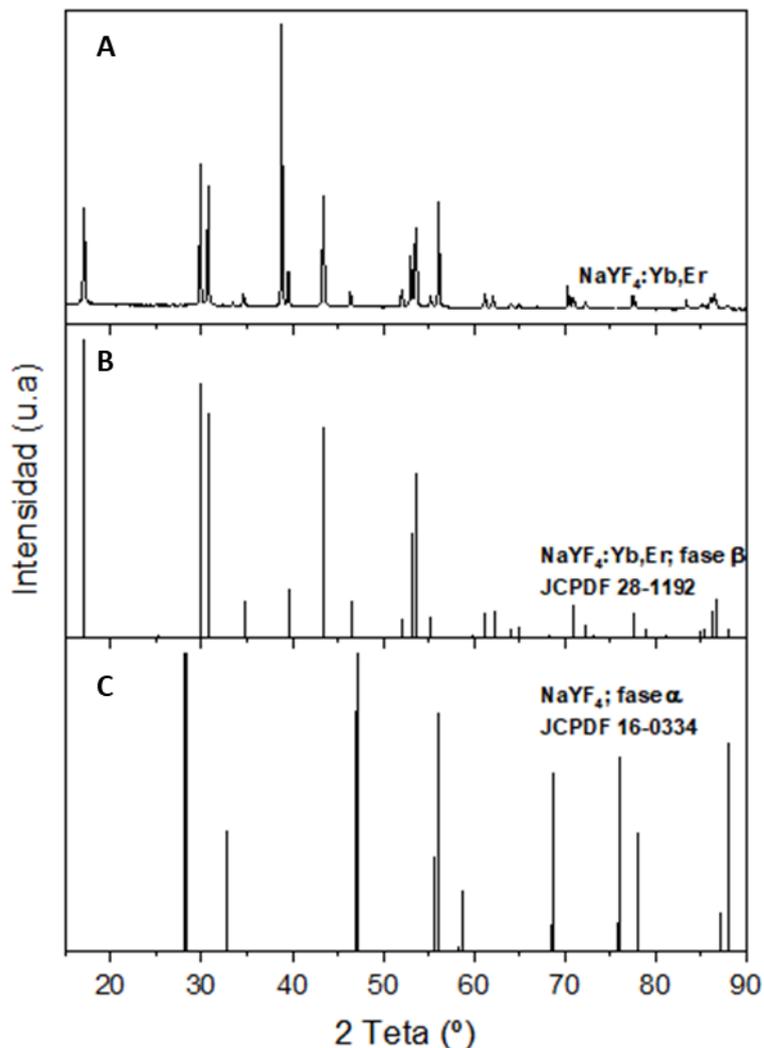


Figura 18: A) Patrón de difracción de rayos X de la muestra NaYF₄:Yb,Er, B) Ficha JPCDS del sistema, C) Ficha JPCDS de la matriz NaYF₄.

Como se ha determinado previamente, se obtuvo la matriz NaYF₄ en fase cristalina hexagonal, con una morfología dendrítica alargada con una buena dispersión, sin obtención de intermedios de reacción ni combinación de estructuras cristalinas.

Teóricamente, se estableció que la matriz NaYF₄ con la utilización del Yterbio como intermedio para la excitación de la partícula en 980 nm, y el dopaje de los múltiples iones trivalentes de lantánidos, podría obtener una luminiscencia que abarcara desde en azul hasta el rojo, incluso infrarrojo, del espectro electromagnético.

Previamente se ha observado que el dopaje de la matriz no modifica sus características morfológicas y estructurales, lo que determina su estabilidad.

Para poder observar su luminiscencia, se recurrió al dopaje de la matriz principal con yterbio como sensibilizador y una combinación de dos activadores: Erbio y Tulio.

Frente a dicha combinación la fluorescencia obtenida fue la que se muestra en la **Figura 19**, tal y como se esperaba según la bibliografía anteriormente expuesta, se obtiene un espectro de fluorescencia que abarca desde el azul al infrarrojo cercano.

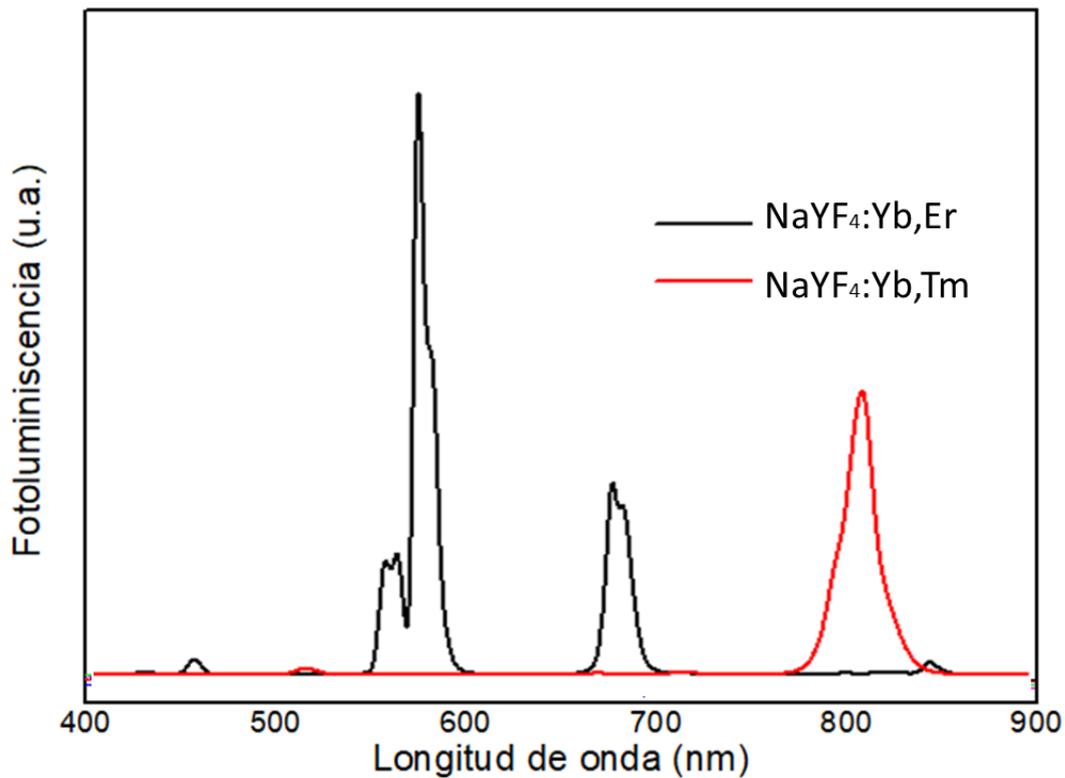


Figura 19: Espectro de luminiscencia de las partículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ mediante la síntesis con los parámetros genéricos seleccionados para el estudio de la matriz.

Las características de la matriz que la hacen idónea para el objetivo de la presente Tesis Doctoral fueron:

1. **Estabilidad de la matriz:** no presenta intermedios de reacción con parámetros de síntesis medios (sin parámetros críticos, considerando críticos, temperatura por encima de 500°C) y su dopaje no modifica las condiciones de estructura cristalina, morfología y dispersión de la misma.
2. **Luminiscencia** que abarca el espectro electromagnético desde el azul al infrarrojo cercano, lo que permite llevar a cabo el estudio de tumores mediante la generación de una imagen hiperespectral, siendo este el objetivo final buscado en el presente estudio.

4.4. Desarrollo de Sistemas de Emisión Hiperespectral basados en $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$

El sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ fue seleccionado por su eficiencia a luminiscencia. Este sistema ha sido ampliamente estudiado desde la década de 1970, donde se estudiaba como una eficiente fuente de luz visible frente a la excitación con infrarrojo (N.Menyuk, 1972), (Bril, 1974)

Se trata de un sistema ampliamente estudiado debido a su facilidad de uso, en cuanto a estabilidad y dispersión (Chow G. S., 2006) ,que le confiere una elevada aplicabilidad en múltiples campos entre los que se encuentra su uso como biomarcador médico (Guangshun Yi, 2004) (Men Wang, 2009), (Min Lin Y. Z., 2012), (Yan Ma, 2015).

El dopaje de la matriz NaYF_4 con Yterbio, se debe a que el Yterbio permite la absorción y excitación del material activador con una fuente infrarroja en este caso el rango ampliamente extendido de 980 nm, el que se encuentra dentro del infrarrojo cercano (Sri Sivakumar, 2012).

En cuanto al uso de Erblio como activador, se debe a la amplia respuesta en cuanto a luminiscencia que este tiene frente a una excitación con 980 nm como vimos en la **Figura 15** de secciones previas.

Además, una búsqueda bibliográfica, demostró que dependiendo de las características estructurales y morfológicas de la matriz NaYF_4 dopada con Yterbio y Erblio, se modificaban las características luminiscentes de la partícula, debido a que la intensidad relativa de los picos de emisión puede ser modificada a través de la misma, modificando la coloración e intensidad de la señal luminiscente (Chenghui Liu, 2009) (Chow G. S., 2006) (Chunxia Li Z. Q., 2007) (Guangshun Yi, 2004) (John-Christopher Boyer, 2006) (Jung-Hui Zeng, 2005) (Karl W. Kramer, 2004) (Li L. W., 2007) (Masoume Kaviani Darni, 2015) (Men Wang, 2009) (Min Lin Y. Z., 2012) (Yan Ma, 2015).

En cuanto a la síntesis de los SEH, al igual que para la síntesis de las matrices, todas las partículas fueron sintetizadas mediante el método solvotermal. En este método todos los reactivos utilizados eran analíticamente puros y no fue usado ningún tipo de purificación.

Todas las síntesis tuvieron una sección común, basada en la obtención de la disolución madre, disolución en la que se encuentran los iones trivalentes de los lantánidos que permitirán la luminiscencia de las partículas.

Centrados principalmente en la partícula ampliamente estudiada $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ cuya disolución madre será preparada a partir de una solución de nitratos de las tierras raras utilizadas ($\text{Y}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Er}(\text{NO}_3)_3$) al 0,5 M. Para su preparación serán disueltos los correspondientes óxidos metálicos (Y_2O_3 , Yb_2O_3 , Er_2O_3) en ácido Nítrico (HNO_3) A 40 – 50 °C bajo fuerte agitación.

Para asegurar el intercambio y consiguiente acumulación de energía en las partículas, debe existir una relación determinada entre estabilizador, activador y sensibilizador. La relación utilizada debe proporcionar un exceso de estabilizador frente a activador y sensibilizador y un exceso de sensibilizador frente al activador, para que así se produzca la donación de energía. La relación utilizada fue:

Ecuación 1: Relación estabilizador, sensibilizador y activador.

Las temperaturas con las que se trabajó durante la síntesis dependieron del equipo de síntesis, estos fueron:

- **Horno convencional:** Debido a que la transmisión del calor se da por la transferencia de los puntos de mayor temperatura a los de menor temperatura, fueron necesarias temperaturas más elevadas para conseguir cierta homogeneidad dentro del tanque de reacción, aunque no se pudo evitar la presencia de puntos calientes. La temperatura utilizada fue 230°C. Las partículas obtenidas se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1: Set de partículas NaYF₄:Yb,Er obtenidas a 230 °C en el horno convencional.

UC _i (i)	Precursores	Valor de pH	Tiempo de reacción (h)	Tratamiento térmico (400°C)	Proporción de fase β (%)
1	NH ₄ F	5	12	Sí	25
2	NH ₄ F	5	24	Sí	100
3	NH ₄ F	5	24	No	100
4	NH ₄ F	6	24	No	100
5	NH ₄ F	7	12	Sí	100
6	NH ₄ F	7	24	Sí	100
7	NaF	7	24	No	100
8	NH ₄ F	8	24	No	100
9	NH ₄ F	10	24	No	100
10	NH ₄ F	10	24	Sí	100

- **Horno microondas:** En este caso, el calor es transmitido por microondas lo que da la posibilidad de tomar un rango de temperaturas más amplio y poder observar las modificaciones de crecimiento. Las temperaturas utilizadas fueron 90 °C; 180 °C y 190 °C. Las partículas obtenidas se encuentran registradas en la Tabla 2.

Tabla 2: Set de partículas $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ en el horno microondas a diferentes temperaturas las diferentes escalas de gris representan las diferentes temperaturas utilizadas: amarillo 90 °C; naranja 180 °C y rojo 190°C.

UC _i (i)	Precursores	Valor de pH	Tiempo de reacción (h)	Tratamiento térmico (400°C)	Proporción de fase β (%)
11	NaF	7	4	No	100
12	NH ₄ F	10	4	No	100
13	NH ₄ F	10	4	No	87,6
14	NH ₄ F	10	4	No	88,8
15	NH ₄ F	5	4	No	92,75
16	NH ₄ F	5	4	No	93
17	NH ₄ F	10	12	No	94,7
18	NH ₄ F	5	12	No	96,1
19	NH ₄ F	5	4	Sí	99,3
20	NH ₄ F	7	4	Sí	99,8
21	NH ₄ F	10	4	Sí	99,9

Tras la obtención de las partículas del horno de reacción, se obtuvo un depósito blanco que fue lavado en múltiples ocasiones con una combinación de etanol y agua mediante acción de fuerza centrífuga, como se muestran en los pasos de la **Figura 20**

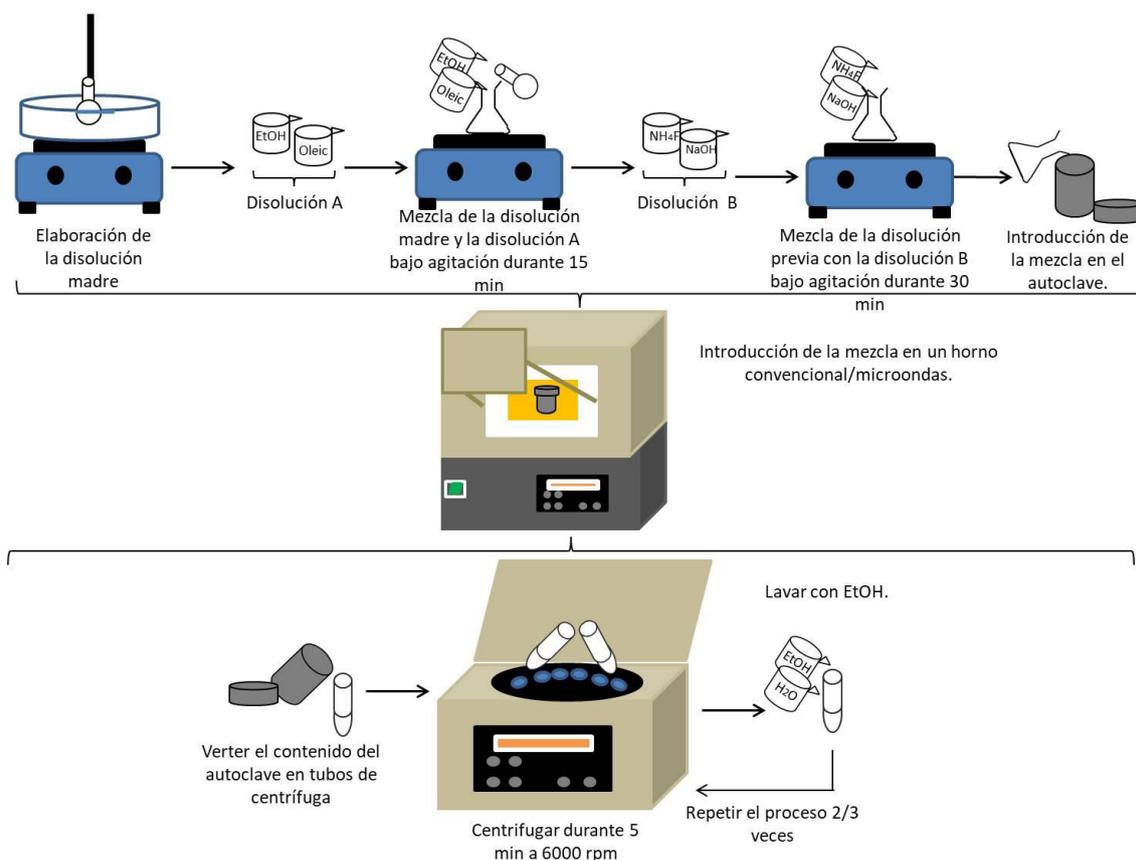


Figura 20: Esquema de las diferentes etapas del proceso de síntesis del sistema NaYF₄:Yb,Er.

Como se ha determinado en la introducción del sistema NaYF₄:Yb,Er la modificación de los parámetros estructurales y morfológicos determina una modificación de sus características luminiscentes.

La modificación de los parámetros morfológicos y estructurales fue conseguida gracias a la modificación de los parámetros en las distintas etapas de síntesis, por ello fueron registrados un abanico de SEH en la Tabla 1 y en la Tabla 2. Donde los parámetros modificados fueron: temperatura, precursores de reacción, tiempo de reacción, pH y procesos térmicos posteriores a la síntesis.

Comencemos por la variabilidad morfológica obtenida, que fue muy amplia en función de los parámetros de síntesis modificados.

Para hacer un barrido general de la morfología obtenida, comenzaremos por el pH de reacción, este parámetro es el que con menor modificación, muestra una mayor afectación a la morfología. Se tomaron pH que iban desde la acidez a la basicidad, de pH5 a pH10, este set de sistemas, se encuentran registrados en la Tabla 1. Para centrarnos únicamente en la afectación

del pH a la morfología, se seleccionarán aquellas partículas donde el resto de parámetros de síntesis se mantienen estables, las cuales son: UC₃, UC₄, UC₇, UC₈ y UC₉.

La modificación del pH fue conseguida a través de la modificación del agente precipitante, al tratarse este de una base fuerte (NaOH) (Chunxia Li J. Y., 2007) (Yunfei Shang, 2015), el pH más básico equivale a pH 5 y es el que se consigue con la relación estequiométrica del agente precipitante en el proceso de síntesis, no pudiendo por lo tanto bajar de este pH, ya que si no, no se conseguiría la precipitación de la muestra.

Para observar la variación de la morfología se han seleccionado un set de imágenes de NANO SEM con una leve modificación en los aumentos de cada partícula para poder así observar claramente las formas presentes en cada sistema sintetizado, como se puede observar en la **Figura 21**.

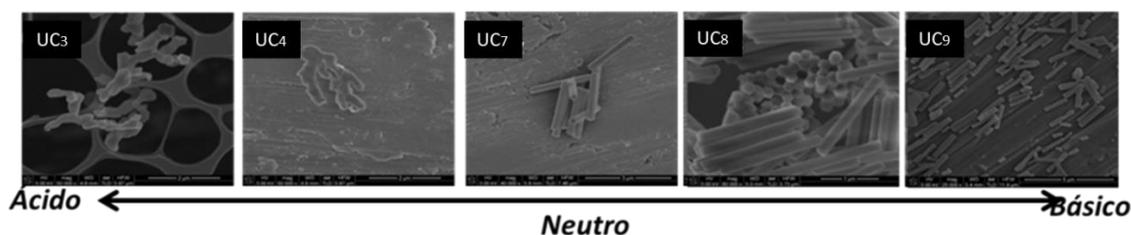


Figura 21: Evolución de la morfología de las partículas con la variación de pH: siendo UC_{3,4,7,8} y 9 a pH 5,6,7,8,10 respectivamente.

La amplia variabilidad que se da en la morfología con el cambio de pH, se debe principalmente a que el aumento de una base fuerte, como es el NaOH produce la modificación observada en la **Figura 22**, en ella se observa que el aumento de la base supone la formación de oleatos por la unión de esta con el ácido oleico, siendo los oleatos solubles en agua, lo que produce que las dos fases claramente diferenciadas que existían en el medio de reacción (cuando el NaOH está en condiciones estequiométricas) formadas por el ácido oleico y el agua, se difuminen.

El hecho de que ambas fases se difuminen, lo que viene a dar a nivel de crecimiento de la semilla del sistema y la precipitación, es que las semillas precipitarán antes, debido a que las "burbujas" de oleico (medio de reacción) en el sistema serán menores y estas precipitarán antes para comenzar su fase de crecimiento, dando así lugar a sistemas más grandes que en condiciones estequiométricas.

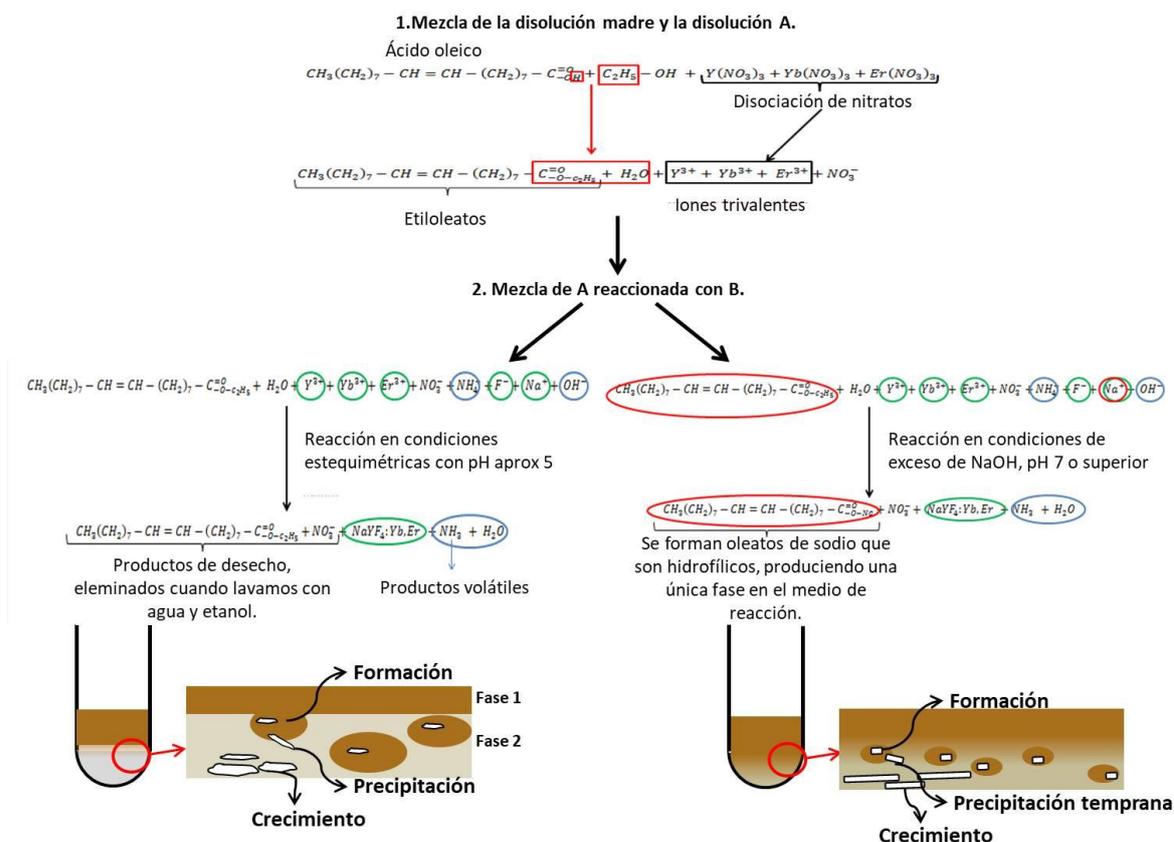


Figura 22: Modificación del medio de reacción y crecimiento de la semilla del sistema en función de la variación del NaOH como agente precipitante.

Todo esto explica la variabilidad de morfologías tan elevada presentada en la **Figura 21**, cuando el pH es ácido, el medio de reacción proporcionado, permite que la semilla crezca durante más tiempo dentro de la “burbuja” de oleico, que proporciona un medio ingravido a la misma, permitiendo esa morfología dendrítica, ya que la misma crece por igual en todas direcciones, mientras que a medida que aumentamos el pH, las “burbujas” de oleico van disminuyendo, haciendo que la semilla precipite antes y al precipitar crezca únicamente en la dirección preferente (Yunfei Shang, 2015).

Para corroborar el estudio del medio de reacción y asegurar que las partículas obtenidas se dan por el efecto del mismo y no por aglomeración de unas partículas con otras, se estudió la cristalinidad de las mismas mediante el uso de un microscopio de transmisión electrónica, denominado a partir de ahora como TEM por sus siglas en inglés, Transmission Electron Microscope.

Al analizar la cristalinidad de cada set de sistemas, se obtuvo que independientemente de la irregularidad o complejidad de la morfología, todas ellas presentaban una única orientación cristalina por partícula determinando que son monocristales y por lo tanto provienen de la

misma semilla, como podemos observar en la **Figura 23**, donde la difracción de la luz en la partícula seleccionada muestra un patrón regular haciendo referencia a la ordenación de los átomos en la misma y determinando que cada partícula diferenciada es un monocristal en sí, esto se determina por la sección D de dicha figura, pero también es de observar la sección B, donde la combinación de la difracción con el modo de visión de la partícula nos determina el objeto que nos devolvía el patrón de difracción, observando que este hace referencia a cada partícula en completo.

Además, en la sección C de cada sistema, representada de la Figura 23 el aumento es tal, que se puede observar la orientación de la sección cristalina, observando la homogeneidad de la misma.

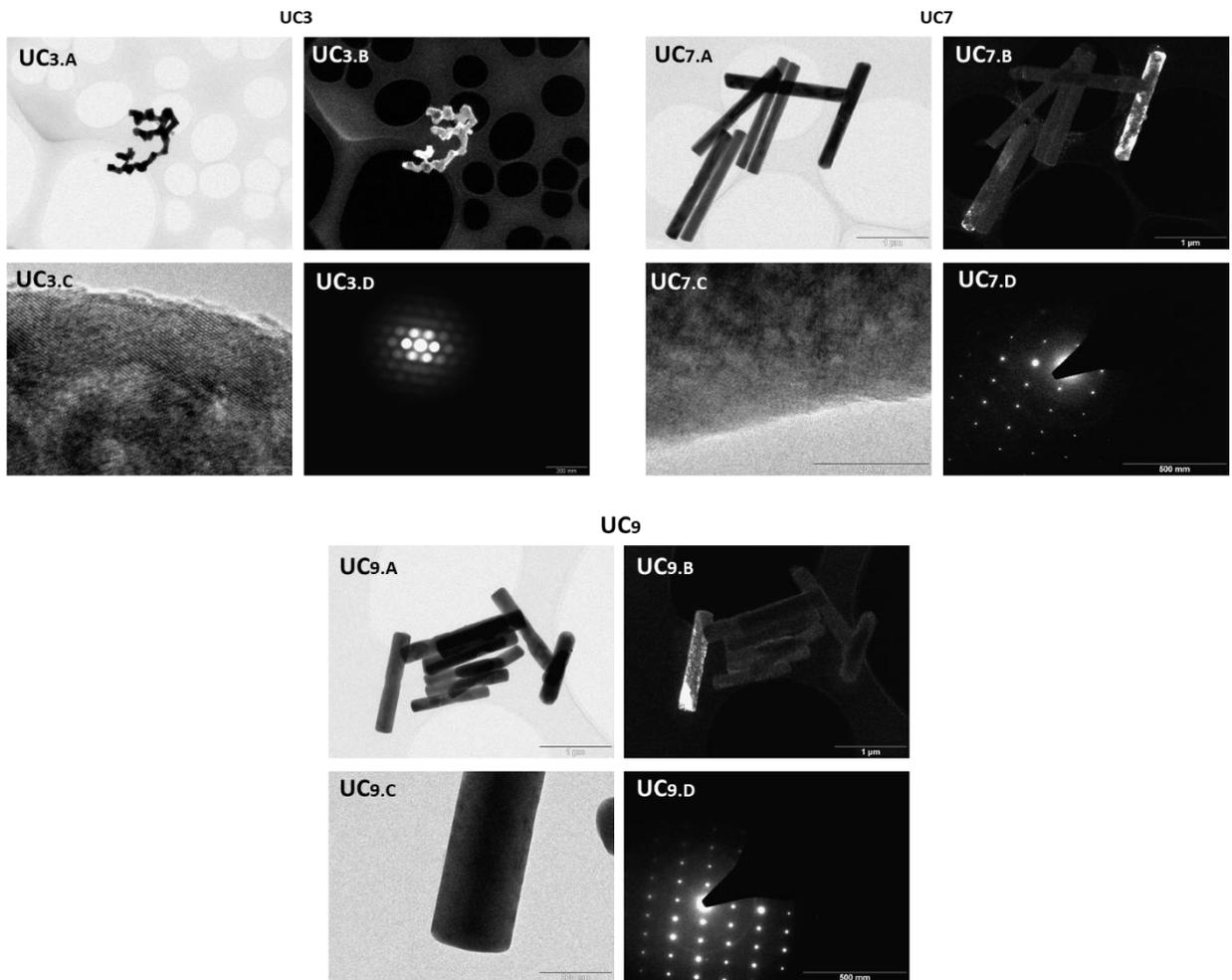


Figura 23: Determinación de monocristales de las partículas UC_{3,7} y ₉ a través de imagen de TEM por su aumento y difracción.

Se han seleccionado las partículas UC₃, UC₇ y UC₉ por ser características y claramente diferentes entre sí, debido a que UC₈ es muy similar a UC₇ y UC₄ a UC₃, se diferencian exclusivamente en su tamaño y grosor, lo que también ha sido estudiado.

Como acabamos de comentar, los diferentes sistemas, no presentan los mismos tamaños ni grosores, si no que al igual que la morfología se ve modificada con la modificación del medio de reacción por el efecto del pH, el tamaño y el grosor también lo hacen.

En la **Figura 24** se ha hecho una selección de imágenes de NANO SEM compartiendo el mismo tamaño de aumento, para poder así determinar la variabilidad de grosor y tamaño observado.

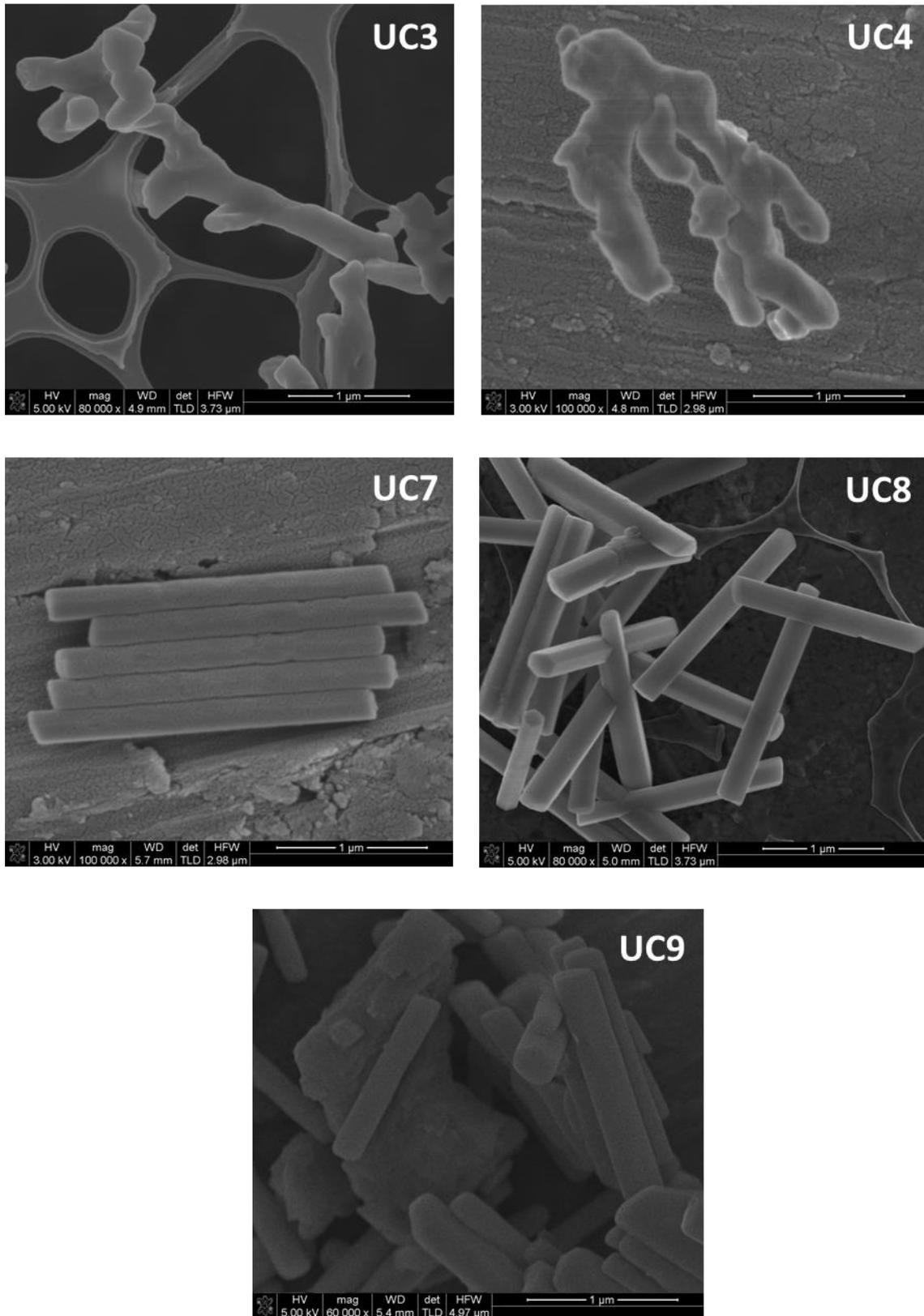


Figura 24: Imágenes de NANO SEM de las partículas UC_{3,4,7,8} y ₉ a los mismos aumentos para la comparación del grosor y el tamaño.

En la **Figura 24** se observa que a medida que aumenta el pH el grosor de las partículas es superior. La primera comparación de interés es entre UC₃ y UC₄, ambas tienen pH básico 5 y 6 respectivamente, el cambio de pH no modifica apenas la morfología, sigue observándose una estructura dendrítica, pero sí se observa un aumento en el grosor de la partícula.

A continuación, el cambio de pH ácido a neutro/básico, si se compara UC_{3/4} con UC_{7/8} determina un cambio total en la morfología, la estructura dendrítica desaparece y aparecen bastones claramente facetados con una estructura hexagonal.

La comparación entre UC₇ y UC₈ no es de gran interés debido a que en cuanto a tamaño y morfología no se aprecia apenas cambio, UC₈ muestra una estructura más marcada, se observan mejor las facetas y aristas de los bastones, pero no hay un cambio de tamaño o grosor notorio.

Por último, cuando se aumenta el pH básico en UC₉ se observa una clara afectación al grosor de las partículas y a su tamaño, desaparecen las facetas que marcaban una estructura hexagonal y se observan bastones irregulares y de un grosor y tamaño superior a los del pH neutro.

Otro parámetro que por acción indirecta modifica la morfología de la partícula es el cambio en los precursores de la síntesis, en este caso la modificación de los precursores es relativa a la fuente de flúor utilizada para la formación de la matriz, alternando para esta síntesis entre NaF y NH₄F.

- Fluoruro de sodio (NaF): El reactivo que proporciona el flúor y el sodio a la matriz será el NaF combinado con NaOH, para la estabilidad del medio de reacción. Las partículas sintetizadas con NaF, tenían morfologías semidefinidas, alargadas y hexagonales como muestra la imagen de TEM de la **Figura 25** con la representación de UC₇. Con preferencia en fase de cristalinidad β determinada por los gráficos de XRD de la misma Figura.
- Fluoruro de Amonio (NH₄F): El reactivo que proporciona el flúor a la matriz será el NH₄F, que será combinado con el NaOH para proporcionar la fuente de sodio. En este caso, las partículas obtenidas, serán irregulares, no definidas y dendríticas como muestra la **Figura 25** con la representación de UC₃. Con fase de cristalinidad β lo que se determina por los picos de difracción de la misma Figura.

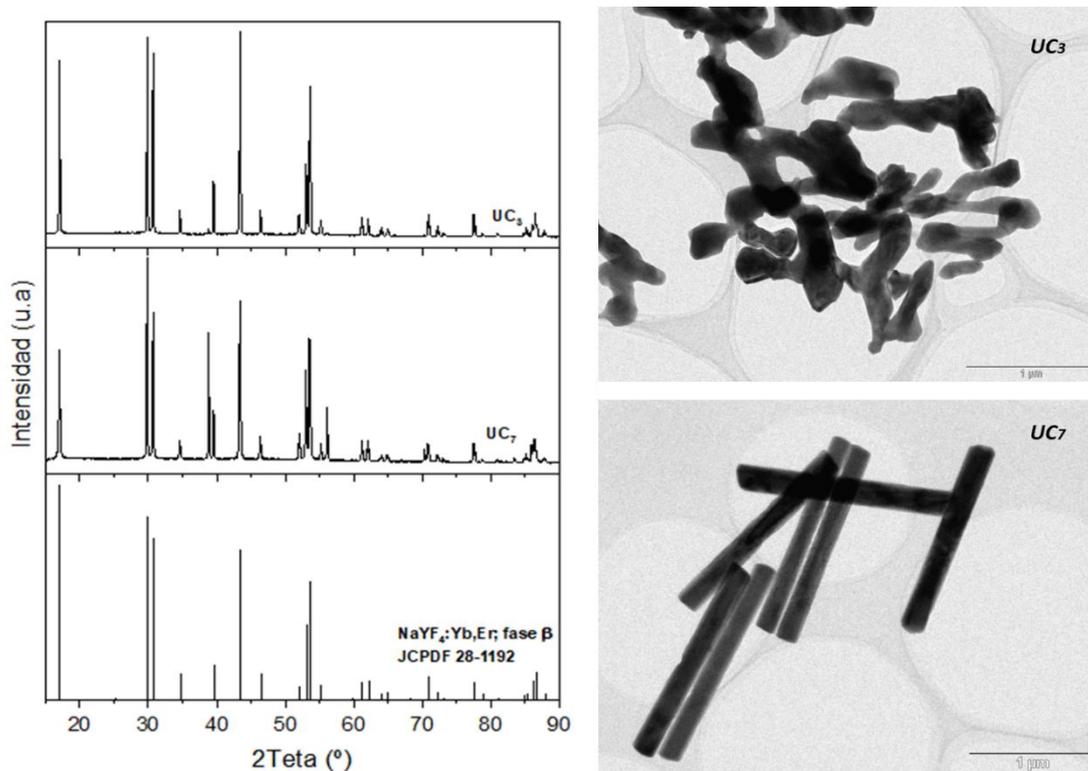


Figura 25: Imágenes de TEM y espectro de difracción de rayos X de las partículas UC_3 y UC_7 , diferenciadas entre sí por el uso de una fuente de flúor diferente en la reacción siendo esta NH_4F y NaF respectivamente.

La modificación que se observa en la morfología, se debe principalmente a que el cambio del precursor de la reacción, supone un cambio de las condiciones estequiométricas del $NaOH$ y con ello una modificación del pH, que, a su vez, como hemos detallado anteriormente, modifica el medio de reacción y con ello la precipitación y el crecimiento de la semilla del sistema, modificando así la morfología del mismo, ya que se observa que la estructura cristalina no se ve afectada.

En cuanto a la **morfología**, se ha determinado que los parámetros que mayor afectación provocan **son el pH y los precursores de la reacción**.

Por otro lado, en cuanto a la estructura cristalina, se han determinado grandes cambios con la tiempo y temperatura de reacción.

Por ser mayor su afectación comenzaremos con el tiempo de reacción. El tiempo de reacción fue modificado con la finalidad de afectar a la fase cristalina obtenida (Songjun Zeng, 2011). Para ello, se mantuvieron las condiciones de pH y temperatura modificando únicamente el tiempo de reacción, como se observa en la **Figura 26**, en la comparación de las nanopartículas denominadas UC_1 y UC_2 y UC_6 y UC_7 ; en **Figura 26** las nanopartículas UC_{18} y UC_{19} y UC_{13} y UC_{17} .

Lo que se observa de forma general en la comparación de los sistemas determinados anteriormente, es que al aumentar el tiempo de reacción, se obtienen fases cristalinas β de mayor pureza, es decir, al aumentar el tiempo de reacción la fase α se transforma en β como se observa en la **Figura 26**, donde los picos de la fase alfa aparecen únicamente en las partículas sintetizadas con menor tiempo de reacción. Esto es debido a que cuando el tiempo de reacción no es suficiente, no se alcanza una homogeneidad de temperatura en el tanque de reacción, lo que conlleva que, en los puntos de menor temperatura, esta no sea suficiente para el cambio de estructura de alfa a beta, ya que la temperatura proporcionada en la síntesis es la idónea para la fase beta (lo que se verá a continuación), por ello no se obtiene ningún sistema con pureza en fase alfa.

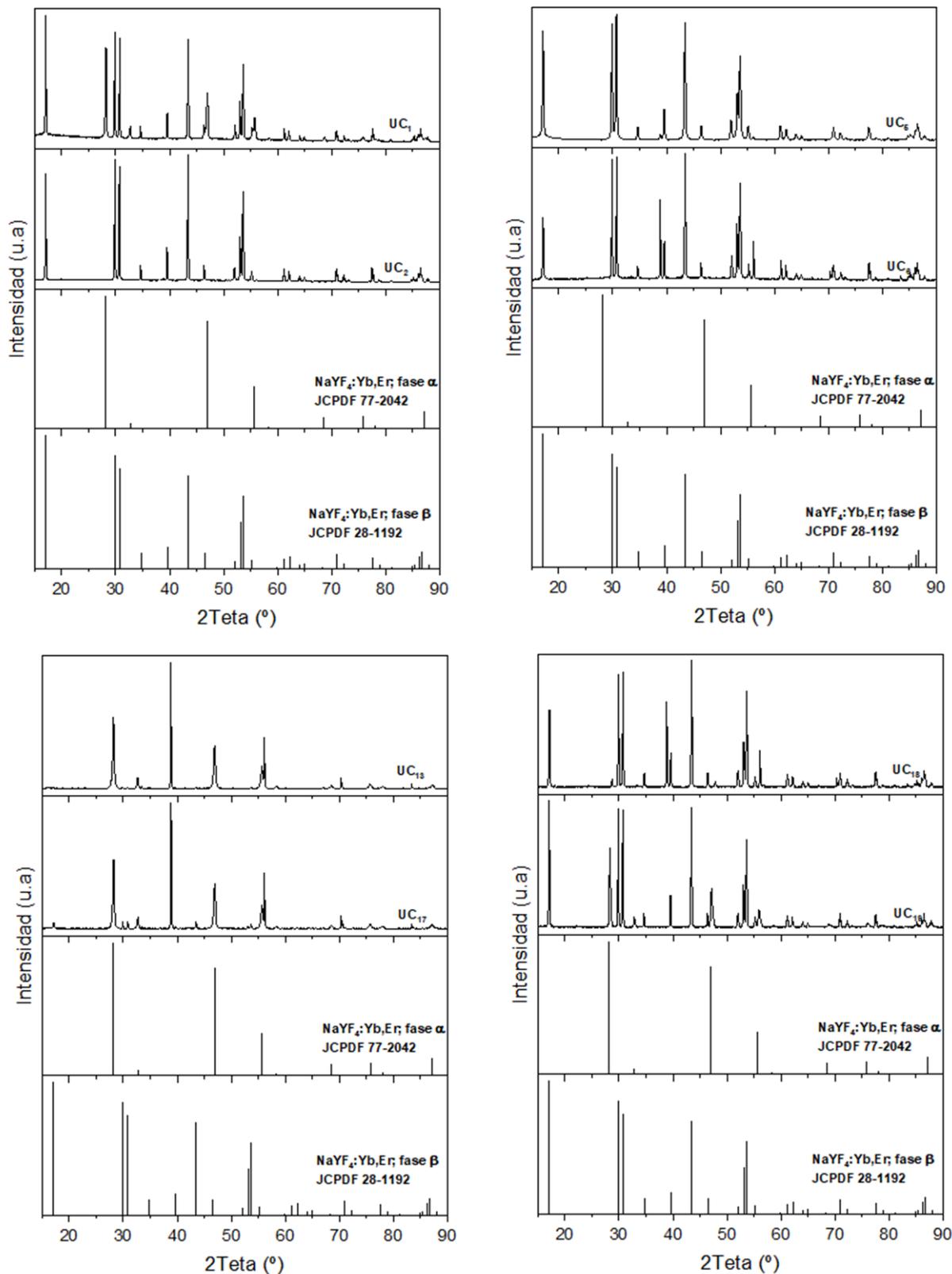


Figura 26: Perfiles de difracción de rayos X para la comparación de las fases cristalinas de las múltiples partículas sintetizadas con diferente tiempo de reacción sin modificación del resto de parámetros de síntesis.

Esto influye directamente a la morfología de las partículas, en función de la fase, la morfología varía como muestra la Figura 27, se observa que cuando existe fase β , la morfología tiende más hacia estructuras alargadas formando bastones, mientras que la fase alfa tiende a estructuras más redondeadas y cortas. La comparación es clara si se compara la columna de la izquierda de la **Figura 27**, que presenta combinaciones de ambas fases cristalinas donde se aprecia claramente una combinación de morfologías en la misma muestra, con la columna de la derecha de la **Figura 27** donde aparece una única morfología que es relativa a la estructura cristalina beta, ya que como observamos en la **Figura 26** las partículas representadas en esta columna, presentan pureza en la fase beta a excepción de la UC₁₇.

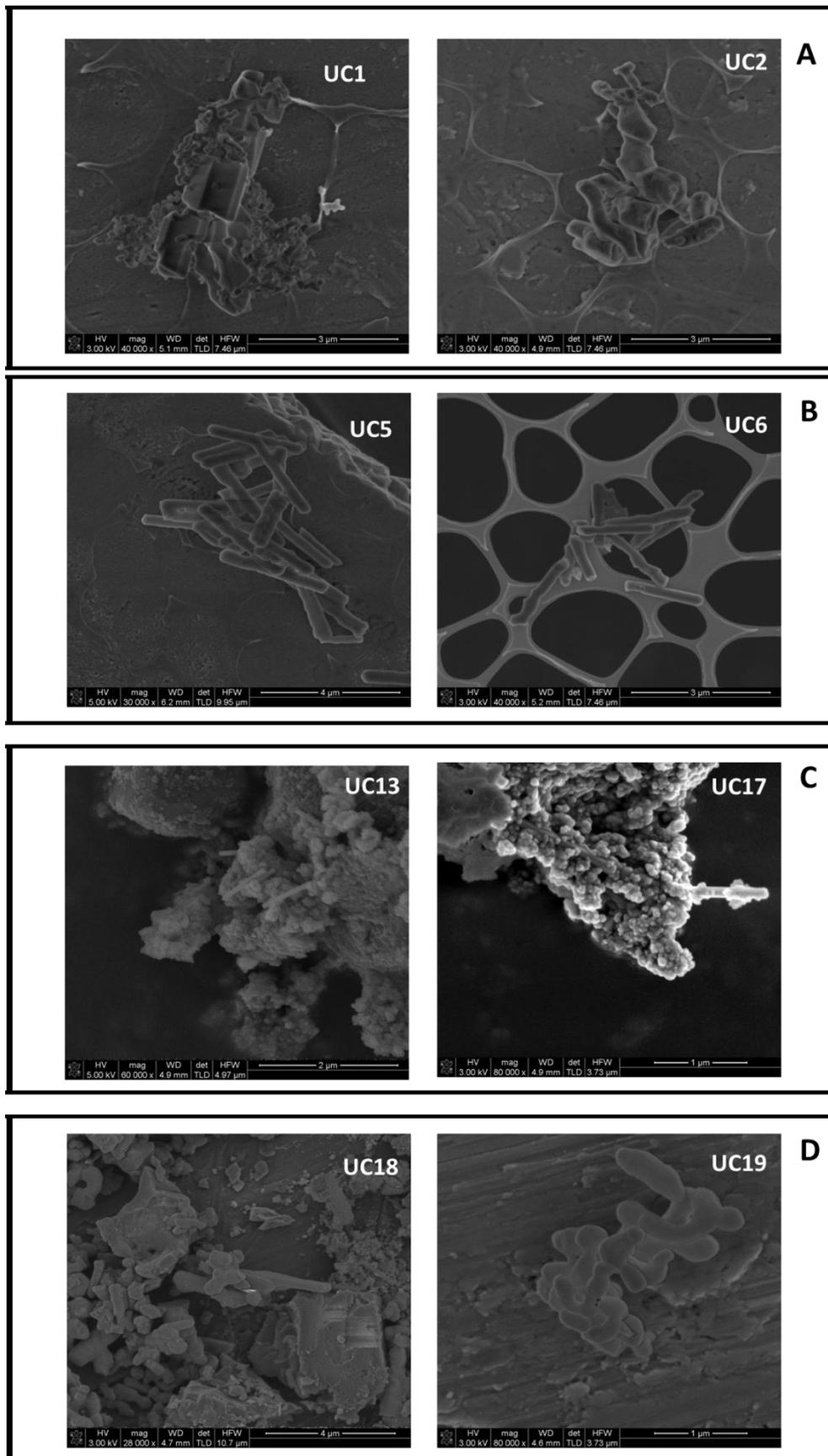


Figura 27: Imágenes de NANO SEM de los múltiples sistemas para la comparación de la morfología por el cambio del tiempo de reacción debido a la fase cristalina presente en la muestra.

A continuación, el parámetro a estudiar que influye directamente sobre la fase cristalina del sistema, es la temperatura de reacción. Es ampliamente conocido que la modificación de la temperatura de reacción provoca un cambio en la energía libre del medio, lo que influye directamente sobre el crecimiento de las partículas (Songiun Zeng, 2011).

Es necesario que haya energía libre en el medio para que se pueda llevar a cabo la recombinación de los reactivos, ya que recordamos que se trata de una reacción sólida en medio líquido (Alexandre A. Arnold V. T., 2013). Es conocido que el sistema estudiado, $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$, presenta dos fases de cristalinidad: la fase α , se basa en una estructura cúbica centrada en las caras (Datao Tu, 2013), se da cuando la energía libre es baja y en la reacción se produce un crecimiento cinético y la fase β necesita de mayor cantidad de energía libre, se trata de una hexagonal centrada en el cuerpo (Datao Tu, 2013) y se da gracias al crecimiento termodinámico como se observa en la **Figura 28**.

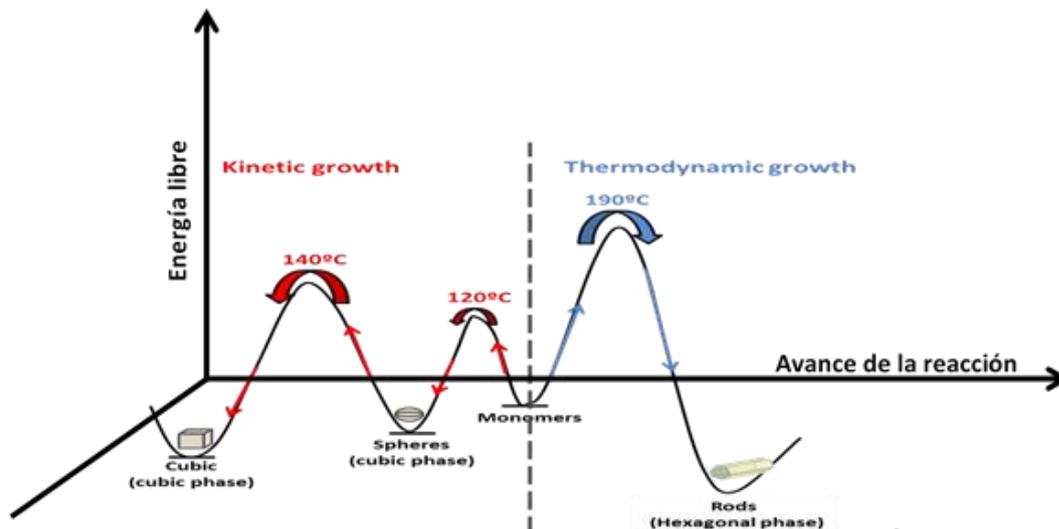


Figura 28: Cambio de la fase cristalina y por lo tanto de la morfología en función de la energía libre durante la síntesis del sistema.

Debido a que el crecimiento dependerá de la energía libre y esta a su vez de la temperatura, con la modificación de la temperatura se podrá controlar la fase de las partículas obtenidas (Songiun Zeng, 2011).

Las temperaturas con las que se trabajó durante las diferentes síntesis dependieron del equipo de síntesis, como ya se explicó en el **Capítulo 3** en la sección de **Síntesis**, las temperaturas y equipos utilizados fueron: horno convencional, hace uso únicamente de una temperatura de 230 °C, mientras que el horno microondas, hace un barrido de temperaturas de 90 °C, 180 °C y 190°C.

La modificación de la temperatura permite observar que hay una clara correlación entre la fase y la misma, debido a que se obtienen diferentes cristalinidades y mezcla de las mismas en función de la modificación de la temperatura, como se observa en la columna α/β ratio de la **Tabla 2**, siendo esta tabla la que contiene las partículas sintetizadas por el horno microondas y en la que se observa mayor variabilidad en cuanto a la fase con la temperatura, por las diferentes temperaturas estudiadas.

Para observar la variabilidad de la fase cristalina en función de la temperatura, se recurre a las partículas UC₁₂, UC₁₃ y UC₁₄, todas ellas sintetizadas con los mismos parámetros de síntesis a excepción de la temperatura que es 80°C, 180°C y 190°C respectivamente.

Los datos recogidos en la **Tabla 2** en la columna α/β ratio se tomaron gracias a los datos obtenidos por difracción de rayos X, los picos de difracción de rayos X, muestran como a medida que aumenta la temperatura de reacción, van desapareciendo los picos característicos de la fase alfa y comienzan a aparecer los picos de la fase beta, como muestra la **Figura 29**.

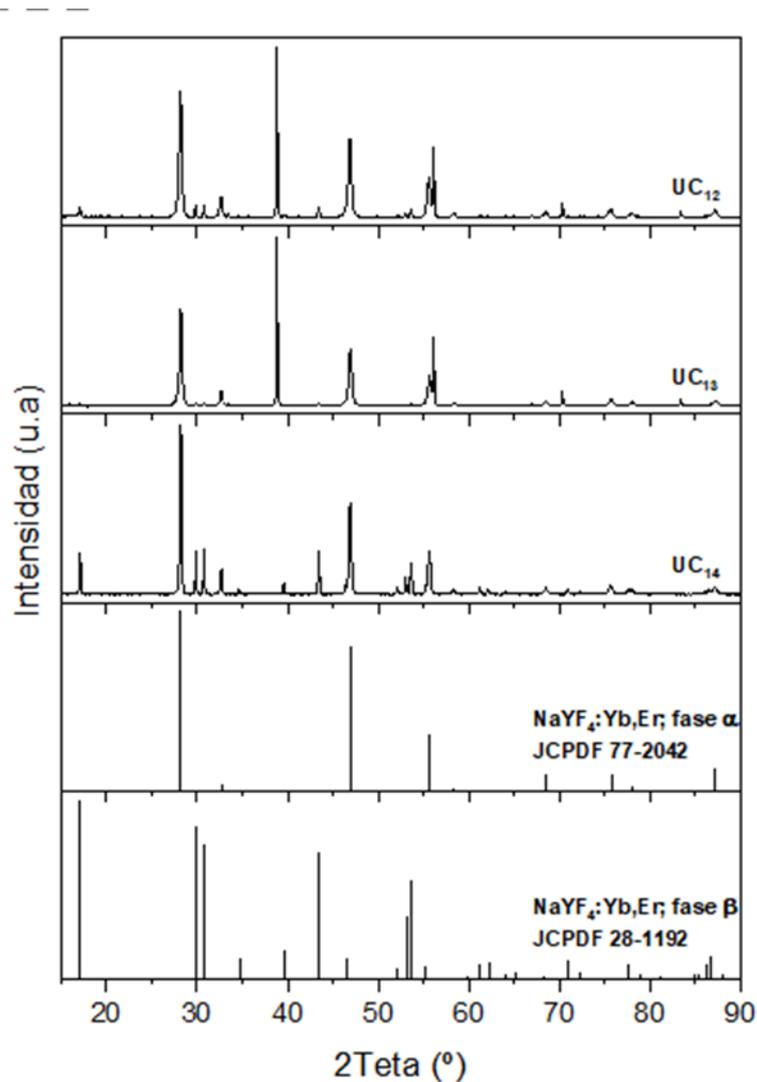


Figura 29: Picos de difracción de rayos X de las partículas UC₁₂, UC₁₃ y UC₁₄ sintetizadas con los mismos parámetros de síntesis a excepción de la temperatura de reacción que se establece en 90°C, 180°C y 190°C respectivamente.

Esta modificación en la estructura cristalina, se ve reflejada en la morfología de los sistemas, mientras que UC₁₂ y UC₁₃ muestran una estructuras redondeadas y aglomeradas en las que existen bastones hexagonales claramente definidos insertados en estas primeras morfologías, en el caso de UC₁₄, se empieza a intuir como esas estructuras redondeadas están cambiando hacia las estructuras dendríticas características de la fase beta, que se observaban en partículas como UC₃, que recordemos que es pura en fase hexagonal, cuya morfología se puede observar en la **Figura 22**. Todo esto se puede observar en la **Figura 30**.

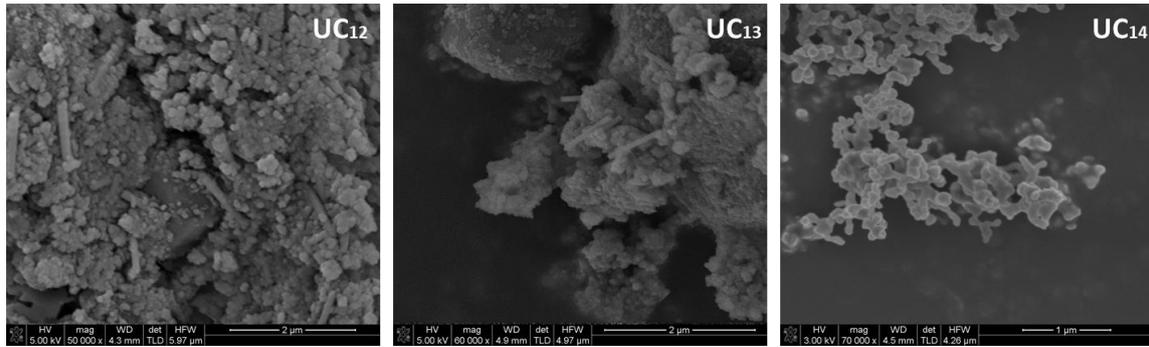


Figura 30: Imágenes de NANO SEM de las partículas UC₁₂, UC₁₃ y UC₁₄ sintetizadas con un aumento de temperatura: 90°C, 180°C y 190°C respectivamente.

Por último, en cuanto a la afectación de la fase cristalina y de la morfología, hay que hacer referencia a un postratamiento térmico. En este caso, se sometieron las partículas ya sintetizadas a 400°C durante 4 horas.

Fueron obtenidos dos resultados diferentes dependiendo de cuáles fueran los parámetros del sistema antes del tratamiento térmico. Estas diferencias se obtienen en la comparación de las nanopartículas UC₉ vs UC₁₀ (**Tabla 1**) y UC₁₃ vs UC₂₁ (**Tabla 2**), como se muestra en la Figura 31 a través de los picos de difracción de rayos X, con los que se determinan los picos característicos de cada fase cristalina. En esta figura se observa que, si la partícula presenta fase α , el tratamiento térmico provoca una evolución hacia la fase β , como determina la **Figura 31 A**, mientras que si la nanopartícula ya presenta fase β pura el tratamiento térmico no afecta a su fase cristalina como se visualiza en la **Figura 31 B**, en la que no se observa un cambio en los gráficos de difracción.

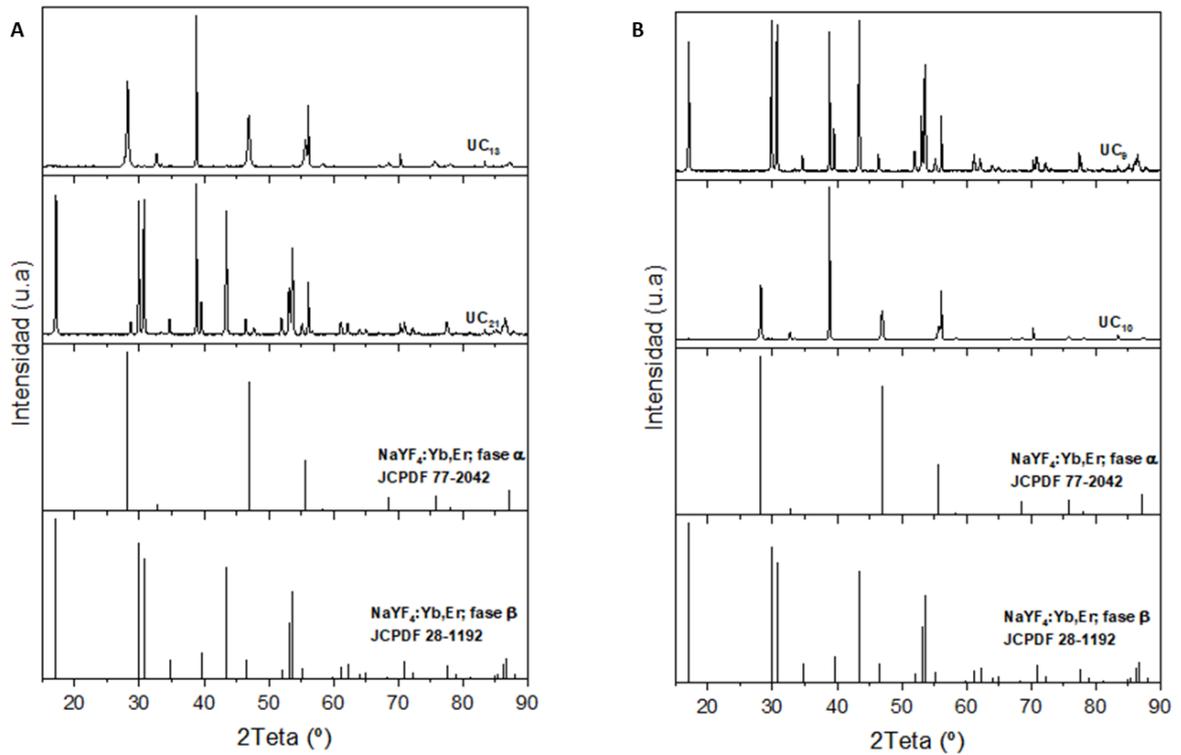


Figura 31: Espectros de difracción de rayos X de las partículas UC₉ y UC₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC₁₃ y UC₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.

Como se ha observado previamente, el cambio de fase cristalina va acompañado de un cambio en la morfología. El cambio en la morfología va a ser diferente del cambio que se produzca en la fase, cuando la fase cristalina es alfa y el tratamiento térmico hace que haya una evolución hacia la fase beta, se produce un cambio de morfología de estructuras redondeadas y aglomeradas a bastones definidos y alargados, como se observa en la **Figura 32** en la comparación de UC₁₃ y UC₂₁ sin embargo, cuando la estructura cristalina ya está en fase β , el tratamiento térmico no produce un cambio de fase, lo que genera un aumento del grosor y una aglomeración de las partículas, lo que se observa en la **Figura 32** en la comparación de UC₉ y UC₁₀, donde se observa que pasa de una morfología de bastones alargados y definidos a estructuras alargadas, aglomeradas y menos definidas, que previamente al tratamiento térmico.

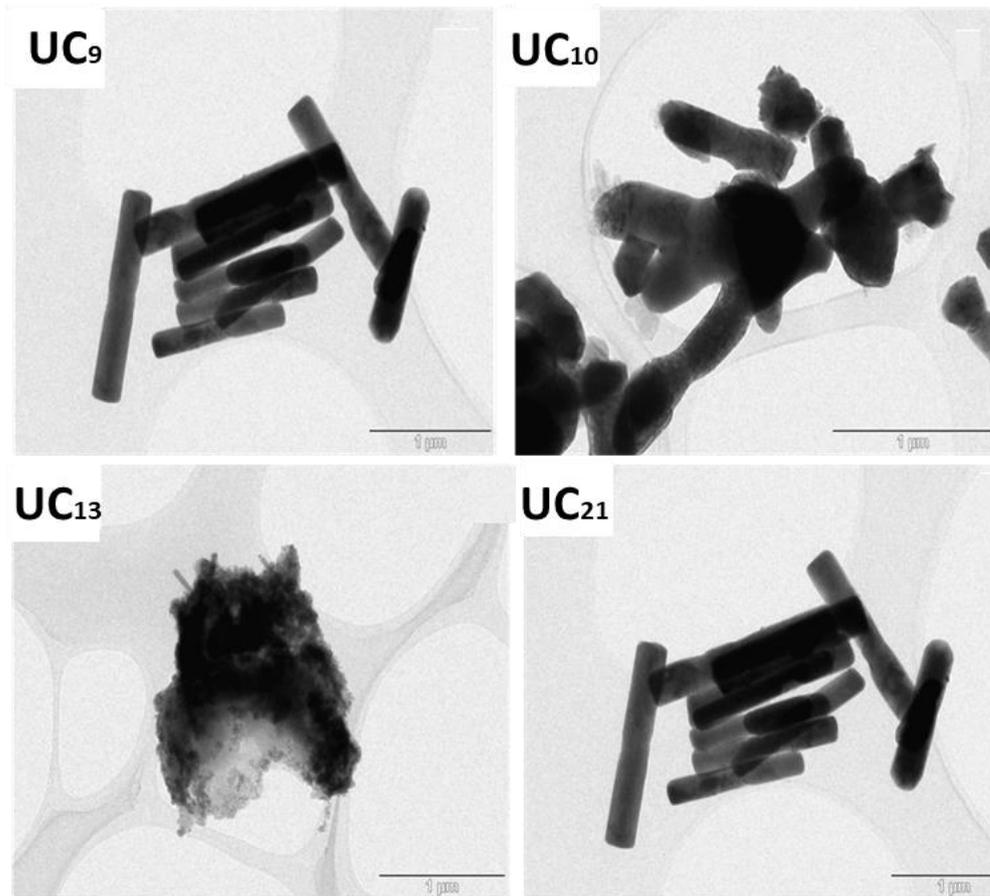


Figura 32: Imágenes de TEM de las partículas UC₉ y UC₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC₁₃ y UC₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.

Además, esta aglomeración de las partículas se determinó con fiabilidad al observar los patrones cristalinos del sistema UC₁₀, debido a que mientras todas las partículas eran monocristalinas, tras el tratamiento térmico se observó un patrón policristalino como se muestra en la **Figura 33**.

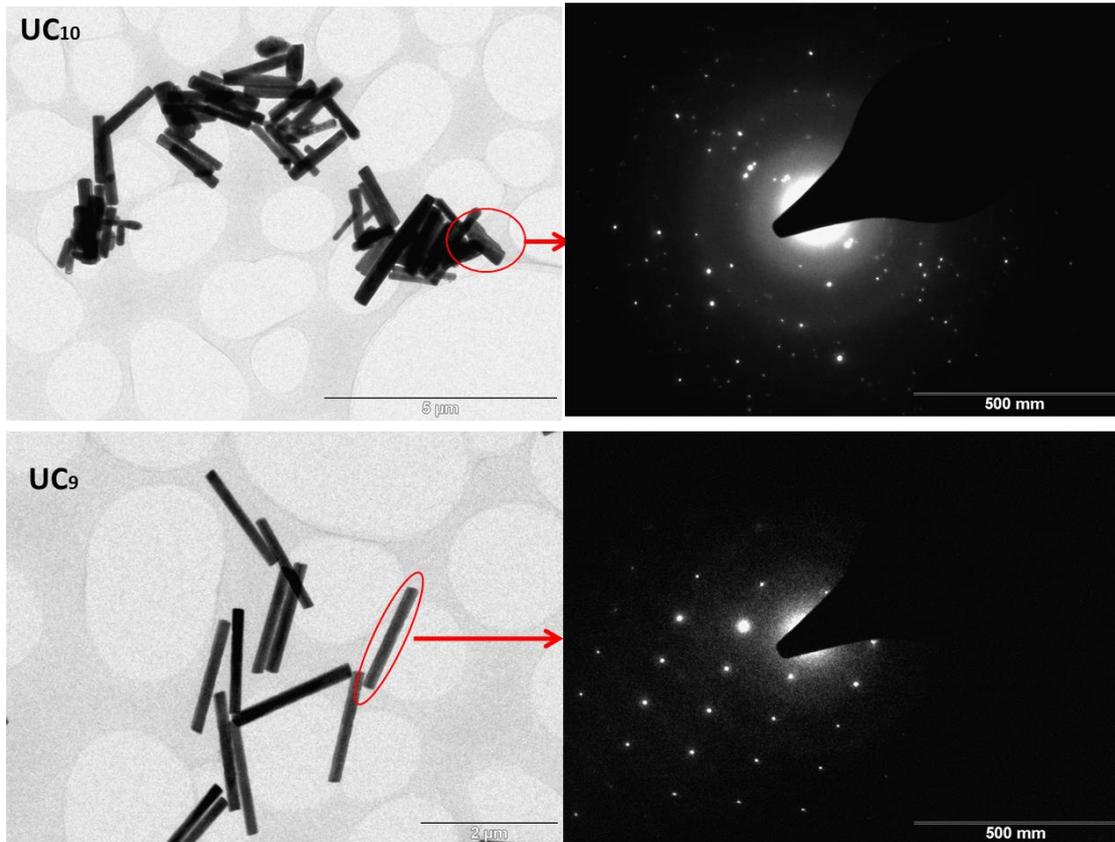


Figura 33: Imágenes de TEM y difracción en las partículas UC₁₀ y UC₉ para mostrar su poli y mono cristalinidad respectivamente.

Todos los cambios que se han detallado en en las características físicas de los sistemas, provocan modificaciones en la luminiscencia del sistema NaYF₄:Yb,Er, tanto en su coloración, debido a la modificación de la intensidad relativa de las diferentes líneas de emisión del sistema, como en la intensidad global de misma.

Se va a proceder a hacer un recorrido por los cambios de síntesis que han producido cambios morfológicos y estructurales para conocer las propiedades luminiscentes que estas modificaciones han provocado en el sistema.

Como se observaba previamente, la modificación del pH, provocaba una modificación en la morfología de las partículas sintetizadas, Este cambio en la morfología afecta directamente a la luminiscencia de los sistemas, En el caso del sistema NaYF₄:Yb,Er, se encuentra que a medida que se avanza de pH ácido a básico, se produce una inversión de la intensidad relativa de los picos verde y rojo, siendo máxima la intensidad relativa del verde en el pH ácido 5 y máxima la intensidad relativa del rojo en pH básico 8, la subida del pH, vuelve a reducir la intensidad relativa del rojo con respecto al verde, como se observa en la **Figura 34**.

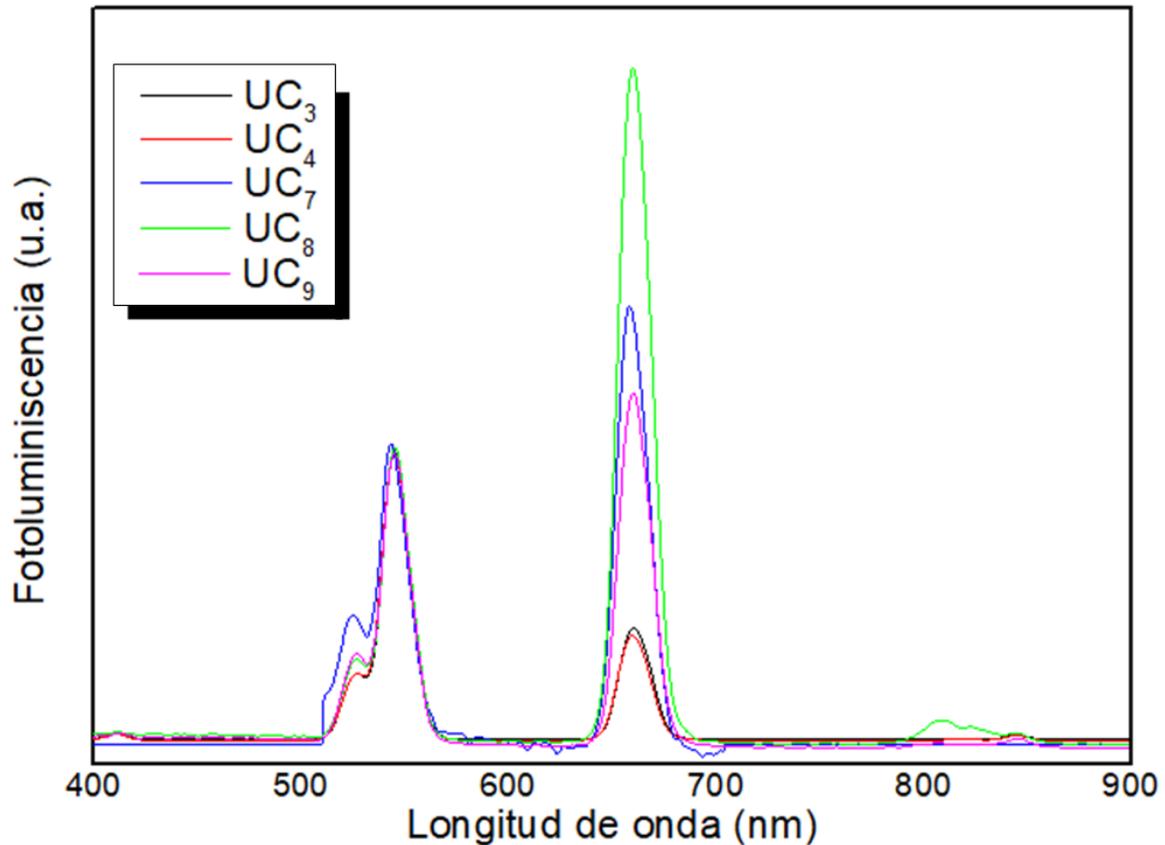


Figura 34: Espectro de fluorescencia de las partículas UC₃, UC₄, UC₇, UC₈ y UC₉ con aumento de pH 5,6,7,8 y 10 respectivamente.

Gracias a la observación de los resultados de la variación de pH, se determina que cuando el pH es ácido 5, la morfología de los sistemas es dendrítica e irregular, lo que le proporciona un aumento de la superficie activa del sistema, esto supone un aumento de la relación superficie volumen del sistema, lo que determina que mayor cantidad de emisores estarán disponibles para recibir la energía de excitación y por lo tanto mayor será la intensidad de luminiscencia de los sistemas. Esto a su vez hace que la energía acumulada sea mayor, lo que favorece la reducción del tiempo de vida de los fotones excitados y como hemos visto anteriormente en el diagrama del NaYF₄:Yb,Er de la **Figura 15** **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** eso supone una caída por energía radiativa del nivel $^4S_{3/2}$ dando lugar a una luminiscencia verde por la emisión en 545 nm.

De la misma forma, el aumento de pH supone un cambio de morfología a estructuras con menor relación superficie volumen, lo que aumenta el tiempo de vida de los fotones excitados y por lo tanto la probabilidad de que entren en resonancia con los modos fonónicos de la estructura y se produzca una transición no radiativa en el nivel $^4S_{3/2}$, que conduce a una luminiscencia en rojo.

También es observado una disminución de la intensidad relativa del pico rojo con respecto al verde tras sobrepasar el pH 8, esto se debe a que al aumentar el pH, la morfología de los sistemas pasa a ser más gruesa, lo que modifica los modos fonónicos de la misma y dificulta que los fotones excitados entren en resonancia con la misma, lo que conduce a que haya una mezcla de transiciones radiativas y no radiativas en el nivel $^4S_{3/2}$, dando lugar a ambas fluorescencias y estableciendo igualdad de intensidades relativas del rojo y el verde.

El siguiente parámetro de síntesis que provoca una modificación en la morfología es la modificación de los precursores de la reacción, como se observó previamente, esta modificación se debía principalmente a la modificación de pH, que conlleva la modificación del precursor por la acción del NaOH estequiométrico, para dar visibilidad a este parámetro, se comparó la fluorescencia del sistema UC₃ y el UC₇ por ser sintetizadas con los mismos parámetros a excepción del precursor, lo que se observa en la **Figura 35**, es una disminución de la intensidad global del sistema acompañada de una inversión de la intensidad de picos del verde al rojo para el sistema UC₇, esto es debido a que como se explicaba previamente, en la **Figura 25**, se observa un cambio de morfología de UC₃, que presenta morfología dendrítica a UC₇, que presenta bastones hexagonales claramente definidos, esto provoca una disminución de la relación superficie volumen de UC₃ a UC₇ y como se ha detallado anteriormente supone un aumento del tiempo de vida de los fotones excitados y por lo tanto un aumento de la probabilidad de que entren en resonancia con los modos fonónicos de la estructura y se produzca una transición no radiativa en el nivel $^4S_{3/2}$ (**Figura 15**), que conduce a una luminiscencia en rojo.

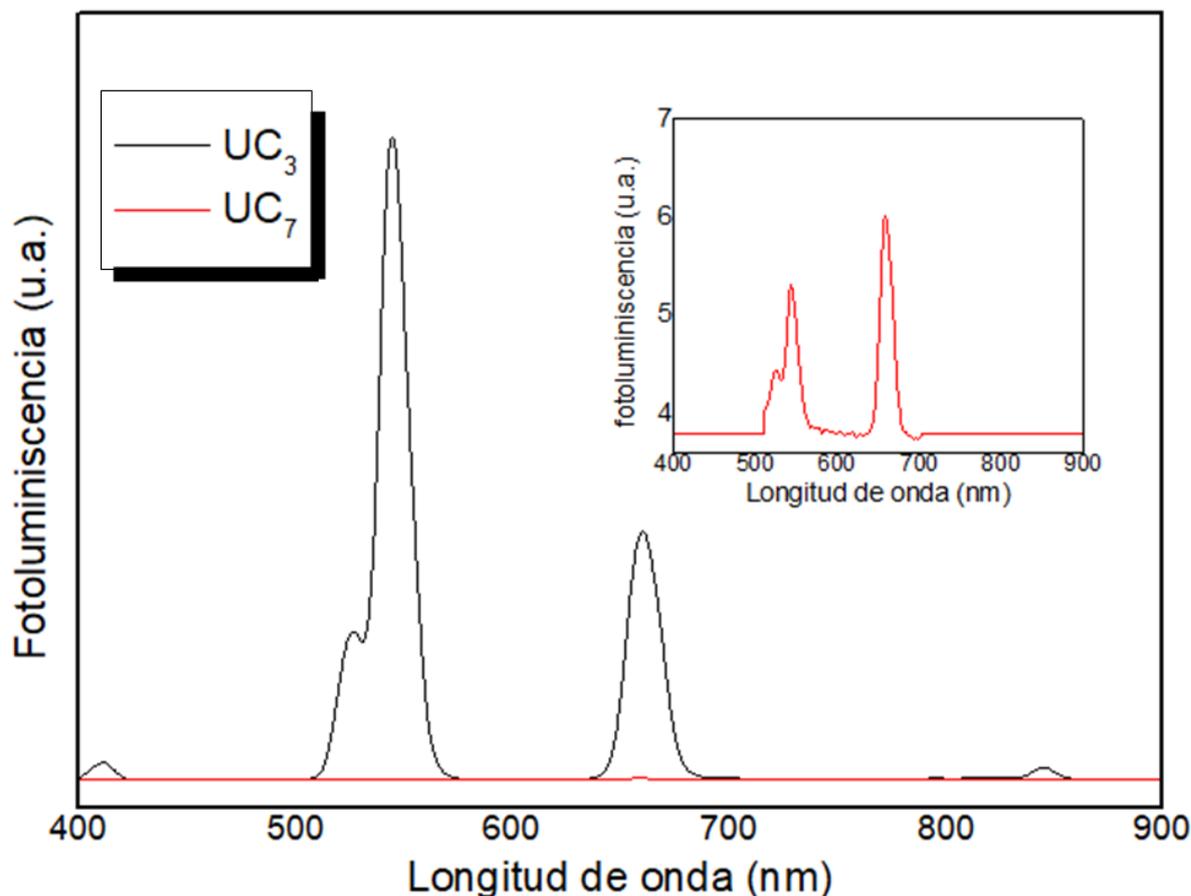


Figura 35: Espectro de fluorescencia de UC₃ y UC₇, sintetizadas respectivamente con NH₄F y NaF.

A continuación, vamos a observar cómo la modificación de los parámetros que afectan a la estructura cristalina, modifica a su vez la luminiscencia del sistema NaYF₄:Yb,Er.

Comenzando por el tiempo de reacción se observaba de manera general que cualquier cambio en la fase cristalina modificaba la morfología del sistema, los cambios en la morfología a su vez influyen sobre la luminiscencia de los sistemas, como se observa en la **Figura 36**. De forma general se determina que cuanto mayor es la pureza de la fase β , menor es la intensidad relativa entre los picos rojo y verde. No se observa un patrón general en la luminiscencia, debido a la diferencia de temperatura a la que ha sido sometida cada pareja de sistemas, por ello la morfología entre cada pareja de sistemas es muy dispar, como se evidencia en la **Figura 27**, por lo que se debe analizar cada dúo de forma individual para poder obtener un rasgo común en la variación del tiempo de reacción.

En el caso de UC₁ vs UC₂, en la **Figura 27 A**, la fase α tiene una morfología redondeada y un tamaño en torno a diez veces superior, lo que supone que tanto la fase α por su tamaño como

la β por su disposición atómica favorezcan la luminiscencia en el rango del verde, suponiendo con ello que en UC₁, que aparecen ambas fases, por haber sido sintetizada con menor tiempo de reacción, tenga una luminiscencia relativa en el rango del verde superior a UC₂ que solo presenta fase β y por lo tan solo cuenta con la contribución de la misma como se observa en la **Figura 36 A**.

En el caso de UC₆ y UC₅ la temperatura y el pH utilizados generan un medio de reacción que favorece la formación de la fase β , por lo que la variación del tiempo de reacción no afecta a la fase obtenida.

En cuanto a los sistemas sintetizadas con el horno microondas, comenzando por UC₁₃ y UC₁₇, la morfología de ambas fases es muy diferente, la fase β presenta bastones hexagonales claramente definidos, mientras que la alfa presenta esferas de un tamaño muy inferior a los bastones, lo que supone al igual que en UC₁ y UC₂, que ambas fases contribuyen a la luminiscencia en el rango del verde, por ello en UC₁₇, al tener mayor cantidad de β y ser su contribución mayor se obtiene una mayor intensidad relativa como se observa en la **Figura 36 C**.

A continuación, en cuanto a UC₁₈ y UC₁₉, se observa una inversión de la tendencia debido a que a mayor tiempo de reacción, observamos una menor intensidad relativa, esto es debido a que las condiciones de pH y temperatura fomentan tamaños mayores en la fase β que implican una menor intensidad de luminiscencia y eso provoca la inversión de la tendencia con respecto a las anteriores, como se determina en la **Figura 36 D**.

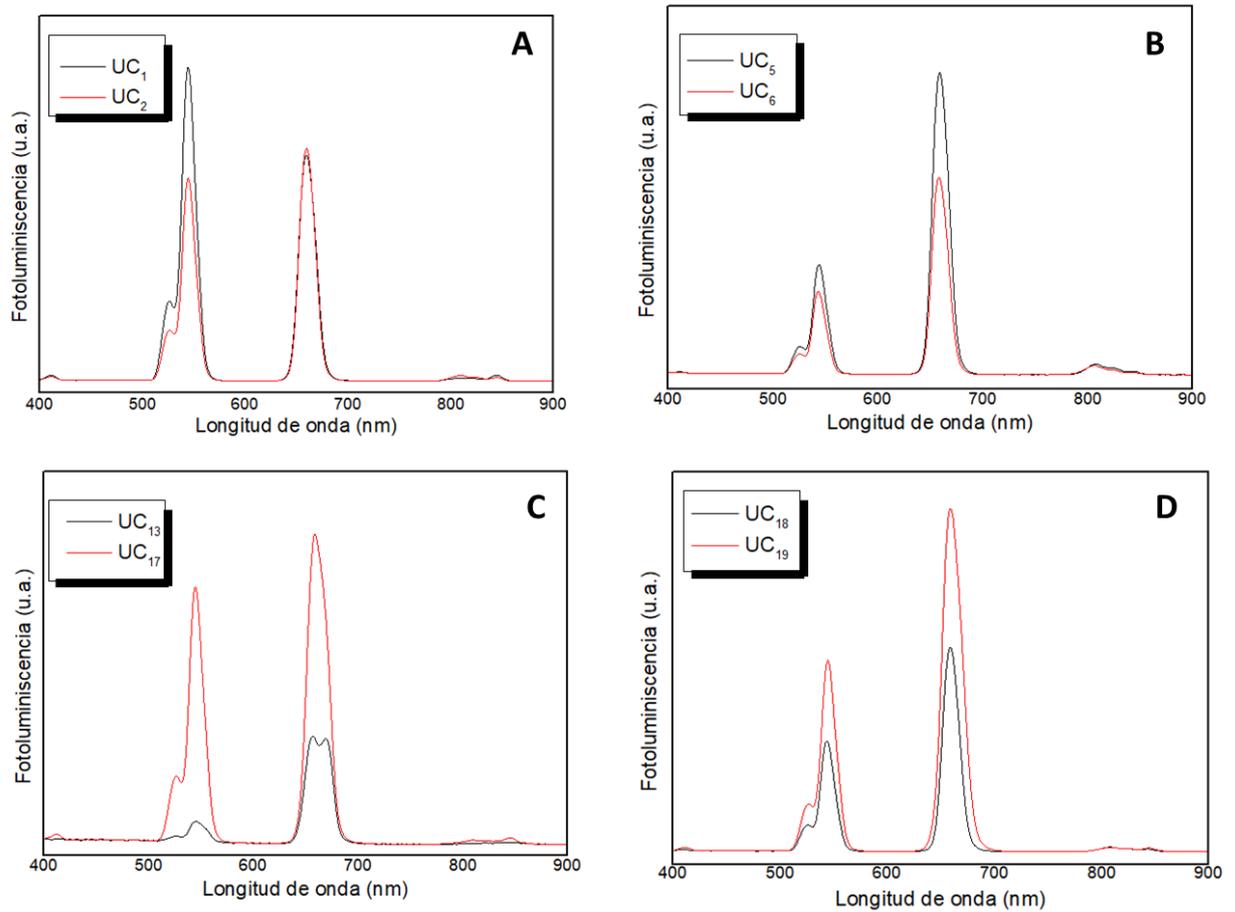


Figura 36: Espectros de fluorescencia en función del cambio de morfología que supone el cambio de estructura cristalina debido al tiempo de reacción utilizado en la síntesis.

Los cambios en la tendencia de la luminiscencia cuando se produce un cambio en el tiempo de reacción, se deben principalmente a la combinación de fases con morfologías muy dispares. La tendencia general observada es que la fase alfa presenta morfologías redondeadas y tamaños en torno a diez veces inferiores a los de las fases beta, que a su vez tienen morfologías más alargadas en forma de bastón. Esto implica que, en el caso de los sistemas sintetizadas con el activador Erblio, al tener un tamaño pequeño, aunque la disposición atómica en la fase alfa favorezca la fluorescencia en rojo por la lejanía entre los emisores, en tamaño implica que los emisores estén más cercanos reduciendo el tiempo de vida de los electrones excitados y con ello favoreciendo la transición radiativa en el nivel $^4S_{3/2}$ (Figura 15), como ya se ha explicado anteriormente. Esta fluorescencia a su vez se ve favorecida por la contribución de la fase β , con lo que se obtiene que aquellos sistemas que tienen una combinación de las fases, tienen intensidades superiores a las que presentan aquellas con fase β pura.

El siguiente parámetro que se observó con afección en la fase cristalina y por ende en la morfología lo que afectará a la luminiscencia, es la temperatura de reacción.

Nos centraremos en tres sistemas sintetizados en el horno microondas, por presentar tres temperaturas de síntesis diferentes manteniendo los mismos parámetros de reacción son UC₁₂, UC₁₃ y UC₁₄.

Como se observa en la **Figura 37**, el aumento de la temperatura de reacción y por lo tanto el cambio de la fase de α a β , supone una inversión de la intensidad de los picos de fluorescencia de la predominancia en rojo a la predominancia en verde.

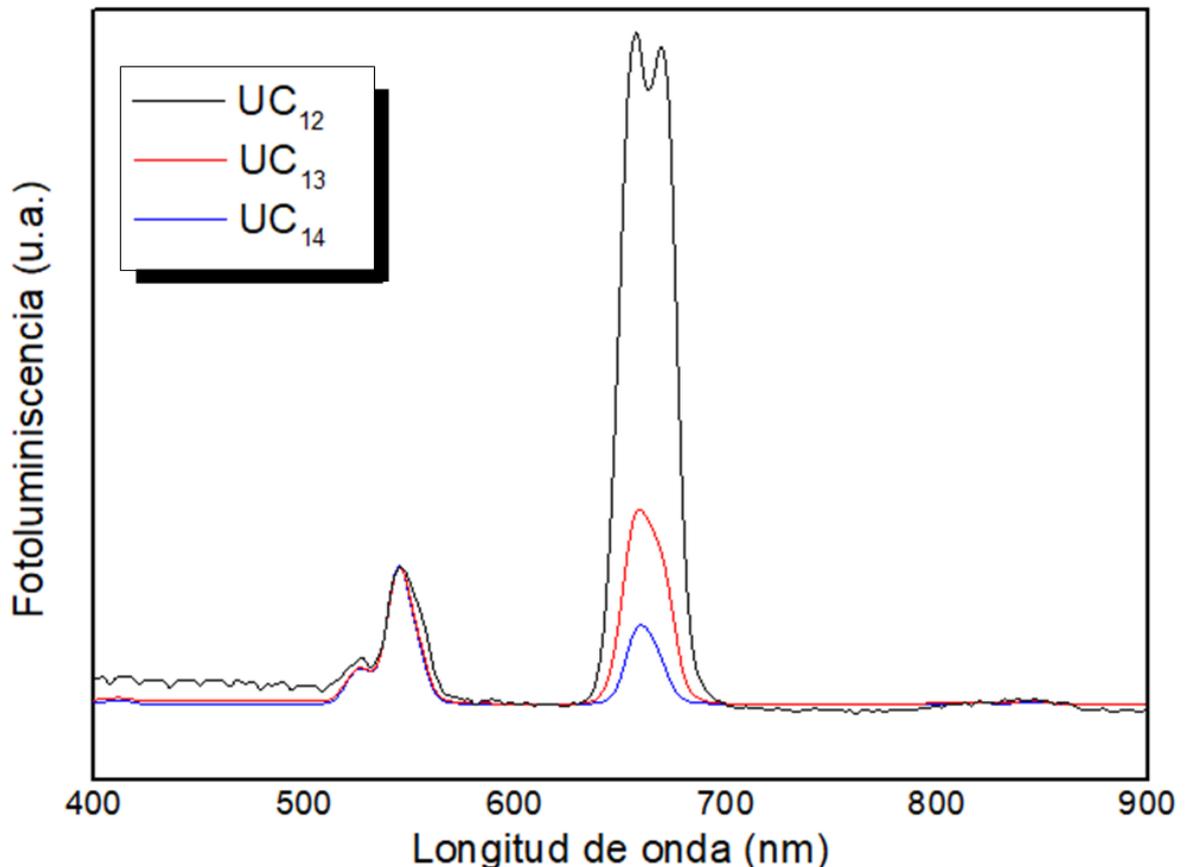


Figura 37: Espectros de fluorescencia de UC₁₂, UC₁₃ Y UC₁₄, partículas sintetizadas con los mismos parámetros de reacción a excepción de la temperatura 90°C, 180 °C y 190°C respectivamente.

Gracias a la temperatura de reacción se puede determinar que a medida que aumenta la temperatura, se produce una modificación de la energía libre en el medio de reacción, lo que conduce a un aumento de la probabilidad de obtención de fase cristalina β pura.

Esto a su vez influye directamente en la luminiscencia de las partículas obtenidas. A medida que las partículas son más puras en fase β se produce una inversión de los picos de intensidad relativa, de predominancia en rojo a predominancia en verde, esto es debido a la matriz catiónica de la red, es decir a la disposición de los cationes (iones positivos) en la red (Xian Chen, 2014). Se determina que en la fase β los emisores (cationes trivalente de los lantánidos) están

más cercanos entre sí, lo que reduce el tiempo de vida de los fotones excitados y eso a su vez conduce a una transmisión radiativa (Xian Chen, 2014), como se observa en el esquema de radiación del $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ que se muestra en la **Figura 15**, en el nivel $^4\text{S}_{3/2}$ (Xiaji Xie, 2013). En el caso de la fase alfa, los emisores están más distantes, lo que supone un mayor tiempo de vida, que conduce a que los fotones excitados entren en resonancia con la red y se produzca una transmisión no radiativa entre los niveles $^4\text{S}_{3/2}$ y $^4\text{F}_{9/2}$, lo que da lugar a una caída mediante la transferencia radiativa produciendo la luminiscencia en el rango del rojo. Además, la morfología que se adquiere con el cambio de fase también contribuye a este fenómeno debido a que en la evolución hacia la fase beta pura, se obtienen estructuras dendríticas que aumentan la relación superficie volumen y como ya se ha especificado, esto contribuye a una mayor luminiscencia en el rango del verde.

Por último, se observó la utilización del tratamiento térmico como herramienta para el cambio de fase de alfa a beta. El tratamiento térmico contribuye a favorecer la fase β , lo que se ve reflejado en un aumento de la intensidad de luminiscencia en el caso de que se haya producido una transformación de fase α a β , debido a que en la fase β , la disposición de los átomos en la red favorece la excitación y por lo tanto la intensidad de luminiscencia del sistema, pero esto no se ve transformado en un aumento de la intensidad de luminiscencia en todos los casos, debido a que también supone una aglomeración de las partículas y por ello una reducción de la relación superficie volumen, en aquellas partículas, que previo al tratamiento térmico, ya presentaban una fase cristalina β pura, lo que supone una reducción de los emisores en la superficie de la partícula, por lo tanto menos emisores son excitados y la luminiscencia del conjunto de la partícula decrece, como se observa en los espectros de fluorescencia de la **Figura 38**. Recordemos que UC_9 , no está sometida a tratamiento térmico, pero posee una fase cristalina beta pura, por ello al aplicarle el tratamiento térmico y convertirla en UC_{10} , la luminiscencia decrece por la aglomeración de las partículas, el caso de UC_{13} era diferente, debido a que se trata de una mezcla de fase alfa y fase beta, por ello al someterla a tratamiento térmico y transformarla en UC_{21} , se obtiene un aumento de la intensidad de luminiscencia, por el cambio de fase cristalina.

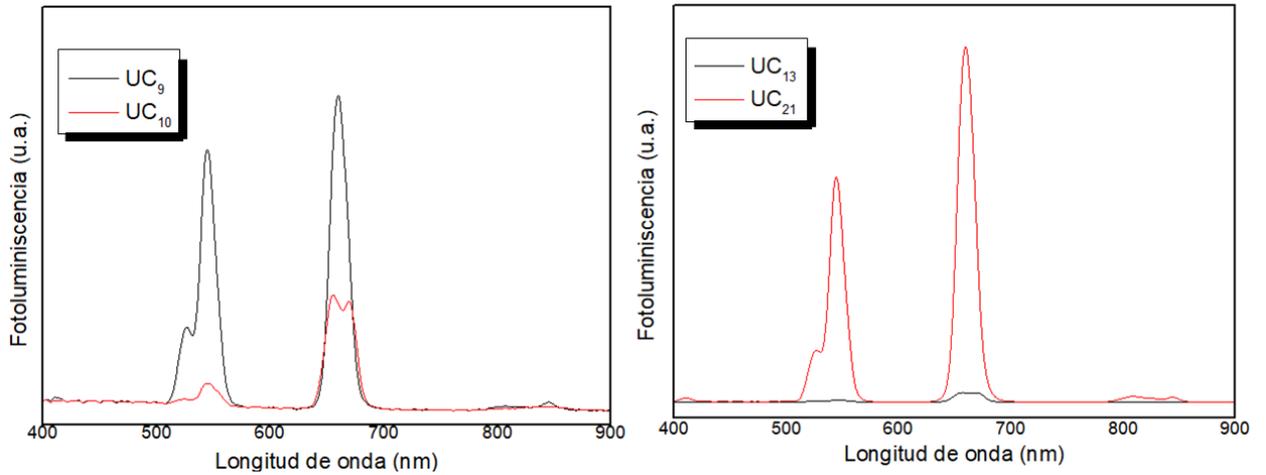


Figura 38: Espectros de fluorescencia de las partículas UC₉ y UC₁₀ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente y UC₁₃ y UC₂₁ no sometida y sometida a tratamiento térmico respectivamente.

Una vez caracterizados todos los cambios físicos y luminiscentes del sistema NaYF₄:Yb, Er, se continúa con su optimización. Para la optimización del sistema, lo principal es la optimización del proceso de síntesis, la variación de los parámetros de síntesis, junto con su valoración en los parámetros estructurales y morfológicos y las propiedades luminiscentes, ha permitido establecer una interconexión entre todos que en función de la partícula buscada nos permite seguir un camino determinado, como se muestra en la **Figura 39**.

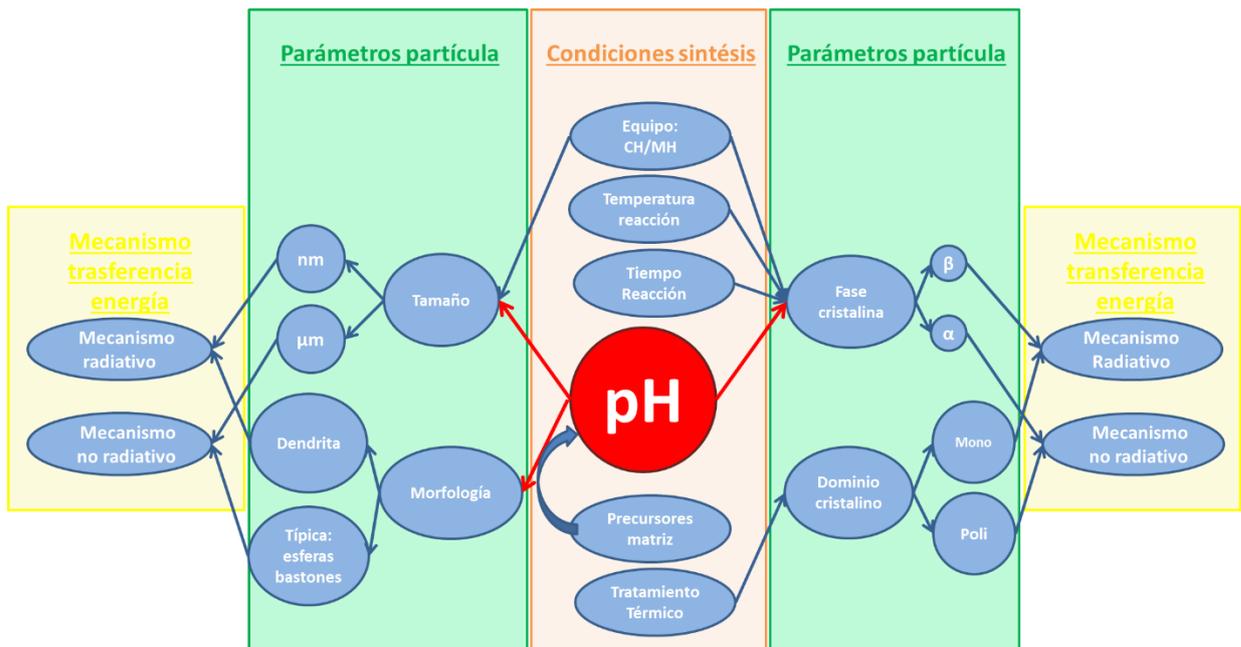


Figura 39: Esquema del proceso de selección de los parámetros de síntesis en función de las propiedades estructurales, morfológicas y luminiscentes del sistema buscado.

Este esquema permite que, conociendo cuáles son las propiedades luminiscentes buscadas en un sistema, en cuanto a su cromaticidad, teniendo en cuenta que como ya se ha observado a lo

largo del estudio del sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$, el mecanismo radiativo favorece al pico 545 nm, mientras que el no radiativo al de 660 nm, se pueda establecer un determinado camino de síntesis. Pero para ello, se tiene que conocer la cromaticidad buscada.

El objetivo final del estudio, recordemos que es la formación de una imagen hiperespectral para la detección de tumores subdérmicos. Debido al estudio del tejido, que se observará más adelante, se conoce que a medida que avanzamos en el espectro electromagnético hacia longitudes de onda de la región del rojo, mayor es la penetración de la luz visible en el tejido, por lo que el objetivo es tomar aquellos sistemas de mayor intensidad de luminiscencia en tres posiciones: verde, en la que la intensidad relativa del pico de 545 nm es superior al pico de 660nm; amarilla, en la que ambos picos presentan la misma intensidad relativa y roja, donde el pico de 660 nm presenta una intensidad relativa superior al de 545 nm. En los diagramas de Gamut de la **Figura 40** determinan, cuales son los sistemas que presentan los rangos de luminiscencia de mayor interés, tener en cuenta que estos diagramas son también denominados diagramas de cromaticidad CIE 1931 y representan los colores que puede ver el ojo humano, únicamente colores, no hace referencia a intensidades.

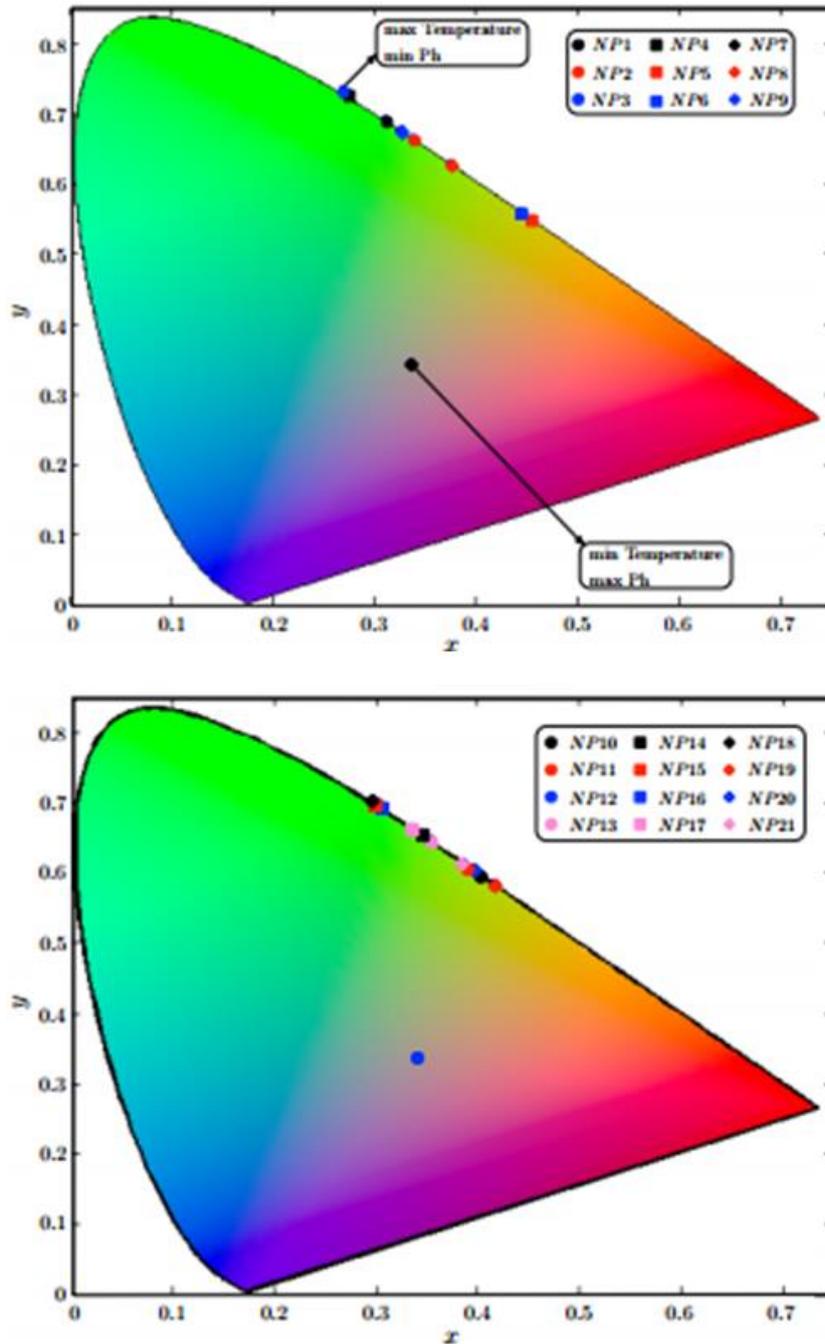


Figura 40: Diagrama de Gamut en representación de la tonalidad cromática de todas las partículas sintetizadas con la composición $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$.

Si el sistema se guía únicamente por los colores que determinan los diagramas Gamut, elegiríamos tres sistemas de cada uno, en la región del verde, amarillo y rojo que serían:

Verde: UC₃ y UC₁₈.

Amarillo: UC₈ y UC₁₉.

Rojo: UC₇ y UC₁₂.

Para poder decantarnos por cada uno de ellos, se representará la intensidad de cada uno de sus picos en un diagrama de comparación, que se puede observar en la Figura 41

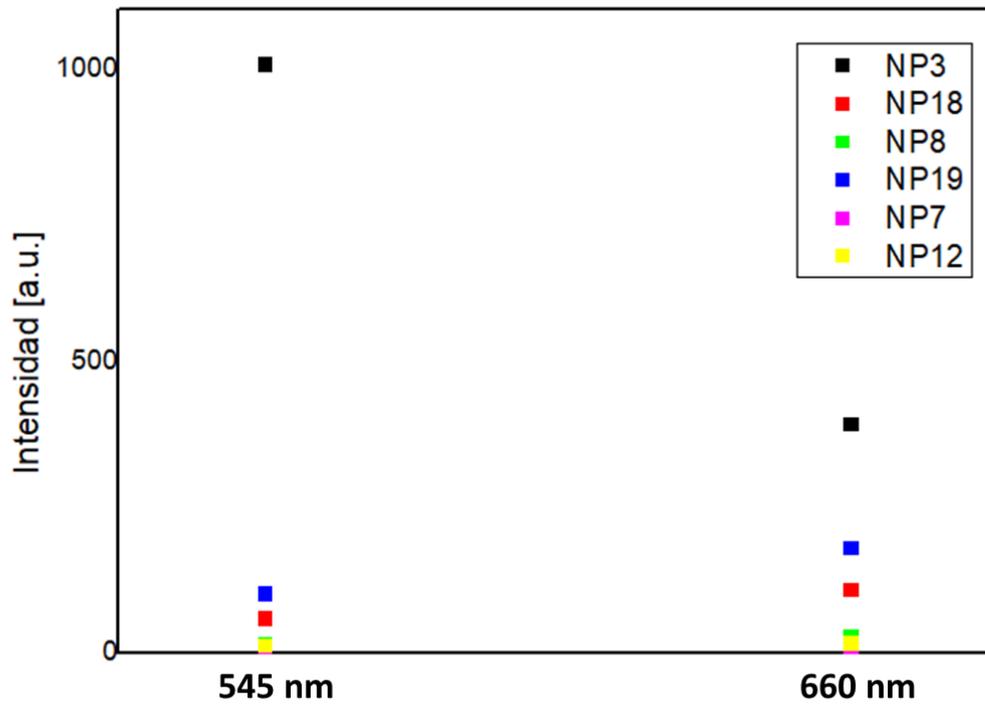


Figura 41: Diagrama de comparación de la intensidad de luminiscencia de los picos 545 nm y 660 nm de las partículas seleccionadas mediante el diagrama de Gamut.

Lo que se observa, es que a pesar de que UC₃ presenta una luminiscencia en verde, porque el pico de 545 nm es muy superior al de 660nm, la intensidad de este último pico es muy superior en UC₃ que en el resto de partículas, aunque en el resto sí se observe una luminiscencia roja. Por lo que la partícula que presenta mayor intensidad tanto en el pico verde como en el rojo es UC₃, con lo que se puede considerar el sistema más optimizado y sus parámetros de síntesis serán los de mayor interés para obtener sistemas para el objetivo buscado que son:

Horno de síntesis: Convencional.

Temperatura de reacción: 230 °C

Tiempo de reacción: 24 horas.

Precursor de la matriz: NH₄F

pH: 5

Tratamiento térmico: No

4.5. Desarrollo de Sistemas de Emisión Hiperespectral basados en $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ El sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ fue seleccionado por su eficiencia a luminiscencia y por su luminiscencia en el rango azul y rojo. Igual que su homólogo con Erblio, este sistema ha sido ampliamente estudiado desde la década de 1970, donde se estudiaba como una eficiente fuente de luz visible frente a la excitación con infrarrojo (N.Menyuk, 1972), (Bril, 1974).

Es un sistema con una elevada facilidad de uso, en cuanto a estabilidad y dispersión (Chow G. S., 2006) que le confiere una elevada aplicabilidad en múltiples campos entre los que se encuentra su uso como biomarcadores médicos (Guangshun Yi, 2004) (Men Wang, 2009), (Min Lin Y. Z., 2012), (Yan Ma, 2015).

Al igual que en el sistema anteriormente estudiado el dopaje de la matriz NaYF_4 con Yterbio, se debe a que el Yterbio permite la absorción y excitación del material activador con una fuente infrarroja en este caso el rango ampliamente extendido de 980 nm, el que se encuentra dentro del infrarrojo cercano (Sri Sivakumar, 2012), lo que le suma utilidad al objetivo final del presente trabajo.

Como ya adelantábamos, el dopaje con Tulio como activador fue seleccionado por los rangos de emisión que este presenta que se encuentran entre el azul y el rojo/infrarrojo, al presentar un pico en 800 nm, lo que completaría el barrido de la región visible junto con el $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ como se mostraba en la sección de estudio de la estabilidad y de las propiedades luminiscentes de la matriz NaYF_4 en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.Figura 19.**

La síntesis será exactamente igual que para el sistema anterior, modificando la fuente de Erblio por la de Tulio.

Tal y como se ha detallado en el **Capítulo 3** en la sección de **síntesis** todas los sistemas fueron sintetizados mediante el método solvotermal. En este método todos los reactivos utilizados eran analíticamente puros y no fue usado ningún tipo de purificación.

Todas las síntesis tuvieron una sección común, basada en la obtención de la disolución madre, disolución en la que se encuentran los iones trivalentes de los lantánidos que permitirán la luminiscencia de las partículas.

Centrados principalmente en la partícula ampliamente estudiada $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ cuya disolución madre será preparada a partir de una solución de nitratos de las tierras raras utilizadas ($\text{Y}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Yb}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Tm}(\text{NO}_3)_3$) al 0,5 M. Para su preparación serán disueltos los correspondientes óxidos metálicos (Y_2O_3 , Yb_2O_3 , Tm_2O_3) en ácido nítrico (HNO_3) a 40 – 50 °C bajo fuerte agitación.

Para asegurar el intercambio y consiguiente acumulación de energía en los sistemas, debe existir una relación determinada entre estabilizador, activador y sensibilizador. La relación utilizada debe proporcionar un exceso de estabilizador frente a activador y sensibilizador y un exceso de sensibilizador frente al activador, para que así se produzca la donación de energía. La relación utilizada fue:

Ecuación 2: Referencia estabilizador, sensibilizador y activador.

En este caso, para la síntesis y la obtención de la temperatura requerida solo fue utilizado el horno convencional.

Tras la obtención de los sistemas del horno de reacción, se obtuvo un depósito blanco que fue lavado en múltiples ocasiones con una combinación de etanol y agua mediante acción de fuerza centrífuga.

El set de sistemas sintetizados con el Tulio como activador se encuentra en la **Tabla 3**

Tabla 3: Set de partículas de NaYF₄:Yb,Tm obtenidas en horno convencional a 230°C

UC _i (i)	Precursores	Valor de pH	Tiempo de reacción (h)	Tratamiento térmico (400°C)	Proporción de fase β (%)
22	NH ₄ F	5	12	Sí	56,9
23	NH ₄ F	5	24	Sí	100
24	NH ₄ F	5	24	No	100
25	NH ₄ F	6	24	No	100
26	NaF	7	24	No	100
27	NH ₄ F	8	24	No	100
28	NH ₄ F	10	24	No	100

Al igual que en el sistema NaYF₄:Yb,Er la modificación de los parámetros estructurales y morfológicos, determina una modificación de sus características luminiscentes.

La modificación de los parámetros morfológicos y estructurales fue conseguida gracias a la modificación de los parámetros en las distintas etapas de síntesis, por ello fueron registrados un abanico de sistemas en la **Tabla 3**. Donde los parámetros modificados fueron: precursores de reacción, tiempo de reacción, pH y procesos térmicos posteriores a la síntesis.

Comencemos por la variabilidad morfológica obtenida, al tratarse de la misma matriz que en homólogo con Er, la mayoría de las modificaciones llevadas a cabo sobre la síntesis del sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ afectan de igual forma que afectaron al sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$.

La mayor variabilidad morfológica se observa al introducir una modificación del pH en el proceso de síntesis, esta modificación del pH se obtiene gracias a la modificación del NaOH fuera de sus valores estequiométricos, como ya conocemos, al tratarse de una base fuerte produce una modificación del medio. Recordemos que la modificación del NaOH, produce oleatos de sodio en el medio, siendo estos solubles en agua a diferencia del ácido oleico, esa solubilidad en el medio, reduce las dos fases inmiscibles del medio de reacción por lo que, bajo agitación, lo que se genera es que las burbujas de oleico en las que se forman las partículas del sistema sean menores, lo que provoca su precipitación más temprana y su mayor tiempo de crecimiento. Este proceso, es el que va a definir la morfología presentada por el sistema, ya que a menores pH la cantidad de NaOH será menor, el medio será más inmiscible, las burbujas de oleico que generan un medio antigrávido para la formación del sistema serán más grandes, por lo que la sistema tardará más en precipitar, creciendo durante este tiempo en todas direcciones y dando lugar a estructuras dendríticas y alargadas, mientras que en pH superior, a partir de 7, el contenido de NaOH en el medio será superior, el medio se hará menos inmiscible, las burbujas de oleico decrecerán, lo que provocará que la partícula precipite antes y crezca únicamente en una dirección preferente, formando bastones alargados, como se observa en la **Figura 42**

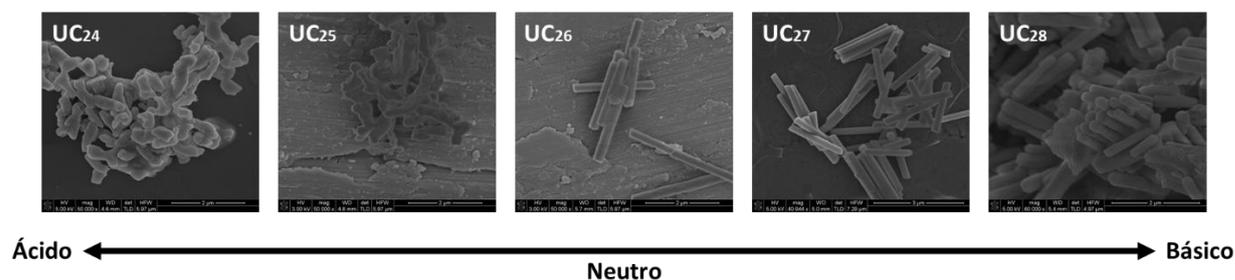


Figura 42: Evolución de la morfología de las partículas con la variación de pH: siendo UC_{24,25,26,27} y UC₂₈ A pH 5,6,7,8,10 respectivamente.

Otro parámetro que de forma indirecta provoca una modificación de la morfología por la acción del pH, son los precursores de la reacción, en este caso los precursores de la reacción son las

fuentes de flúor para la matriz, la modificación del medio por la acción de los precursores de la reacción, se debe a que las condiciones estequiométricas del NaOH son diferentes con cada uno de ellos, provocando que en condiciones estequiométricas el pH sea 5 en presencia del NH_4F y 7 en presencia del NaF. Esto conlleva que cuando la fuente de flúor es el NH_4F , se obtengan morfologías dendríticas, mientras que si la fuente de flúor de la matriz es el NaF, se obtendrán bastones alargados, como se observa en la **Figura 43**, además se puede determinar la presencia del pico de NaF cuando la síntesis se lleva a cabo con este precursor de la reacción.

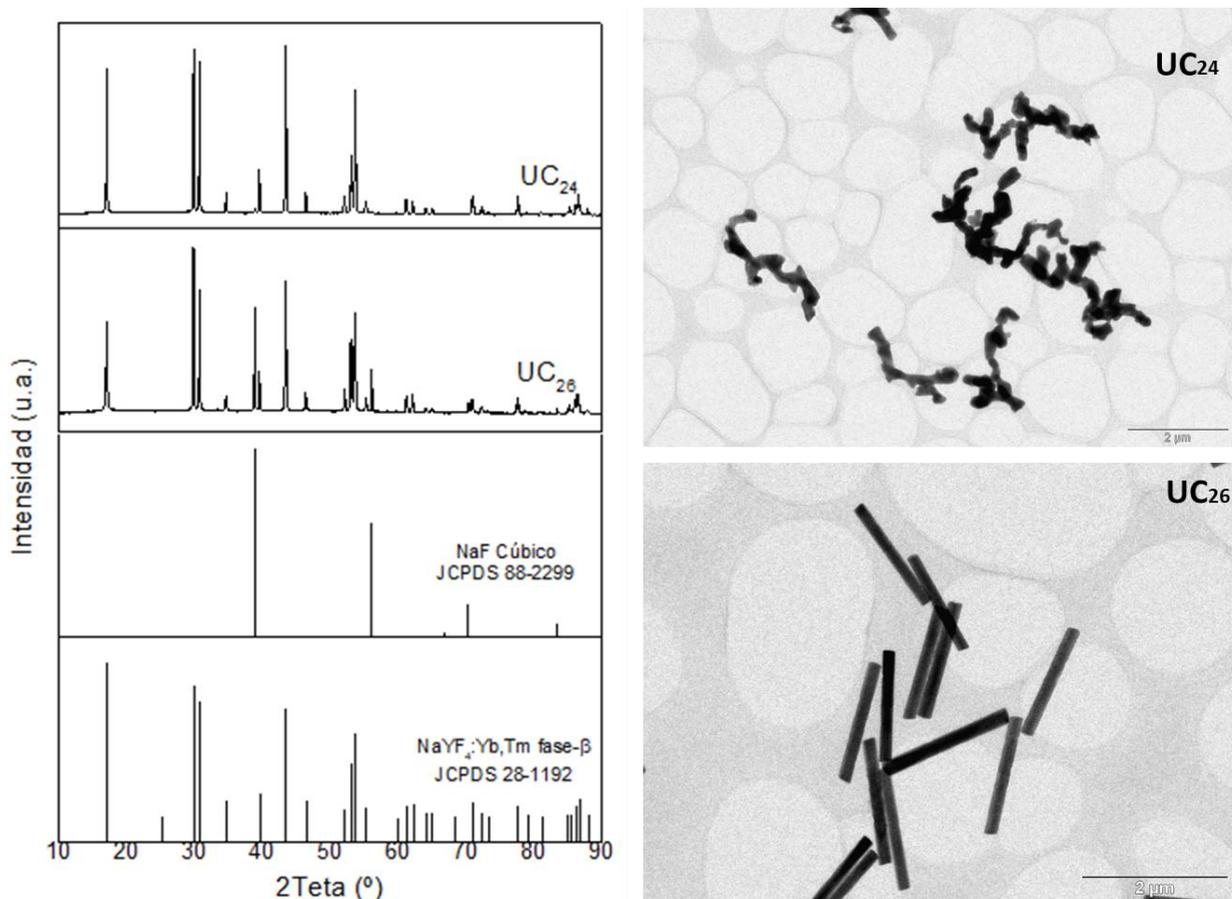


Figura 43: Diagrama XRD de las partículas UC₂₄ y UC₂₆ junto con sus imágenes de TEM.

A continuación, nos centraremos en los parámetros que provocan cambio en la estructura cristalina del sistema, que son el tiempo de reacción y el tratamiento térmico.

En cuanto al tiempo de reacción, Para ello, se mantuvieron las condiciones de pH y temperatura modificando únicamente el tiempo de reacción, en este caso las partículas que pueden ser comparadas son UC₂₂ y UC₂₃ de la **Tabla 3**. Al igual que para el caso del sistema previo con Erblio, al modificar el activador, pero mantener la matriz del sistema como ya adelantamos, los parámetros de síntesis tienen la misma afeción sobre los parámetros de la partícula, lo que se

observa es que un aumento en el tiempo de reacción conduce a un aumento de la pureza de la fase cristalina beta, como determina la Figura 44.

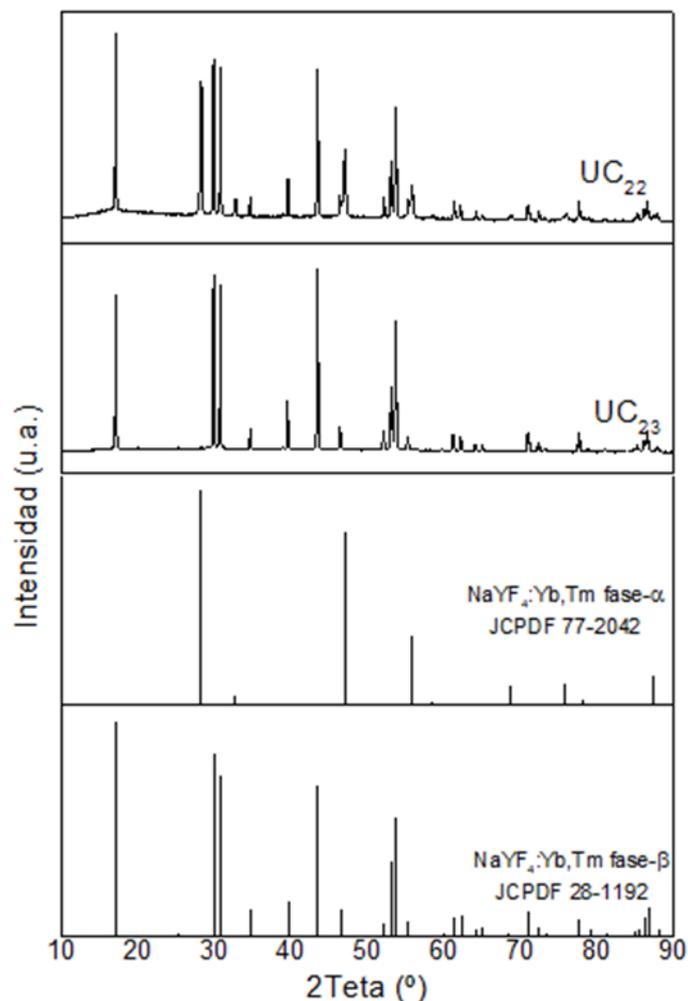


Figura 44: Diagrama XRD de las partículas UC_{22} y UC_{23} sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo constantes el resto de parámetros de reacción.

La modificación de la fase cristalina trae consigo la modificación de la morfología, lo que se observa en este caso, es que en UC_{22} existe una combinación de estructuras, aquellas partículas que han pasado a fase beta han tendido a formar estructuras alargadas de un tamaño 10 veces superior a las partículas que se han mantenido en fase alfa, lo que ocurre es que como el tiempo no ha sido suficiente, la transformación no se da por completo y no se observan bastones hexagonales completos. Sin embargo, cuando el tiempo es suficiente como en el caso de UC_{23} , no se produce esa transformación incompleta y se observan las estructuras dendríticas de la fase beta, propiciadas por los parámetros de síntesis seleccionados.

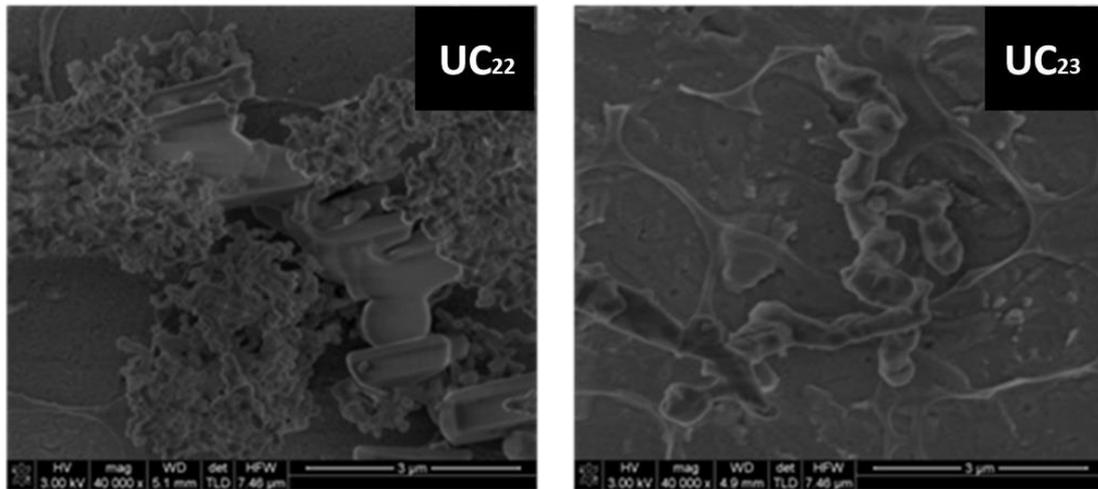


Figura 45: Imágenes NANO SEM de las partículas UC₂₂ y UC₂₃ sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de reacción.

Por último, el parámetro modificado en la síntesis del sistema NaYF₄:Yb,Tm, es el tratamiento térmico, tras la síntesis hubo sistemas sometidos a una temperatura de 400 °C durante 4 horas.

En este sistema, el tratamiento térmico supone únicamente la aglomeración del sistema, ya que las dos partículas a comparar son UC₂₃ y UC₂₄. UC₂₄ gracias a los parámetros de síntesis, presenta fase cristalina beta previamente al tratamiento térmico, por lo que este no produce una mejora en su fase, si no que provoca la aglomeración del sistema, como muestra la **Figura 46**, donde se muestra que la morfología de ambas partículas es muy similar, pero comparando dos imágenes de TEM con el mismo aumento, se aprecia una clara aglomeración en UC₂₃, siendo esta la partícula sometida a un tratamiento térmico, el grosor de las partículas es mayor y hay un claro descenso de la dispersión de las partículas.

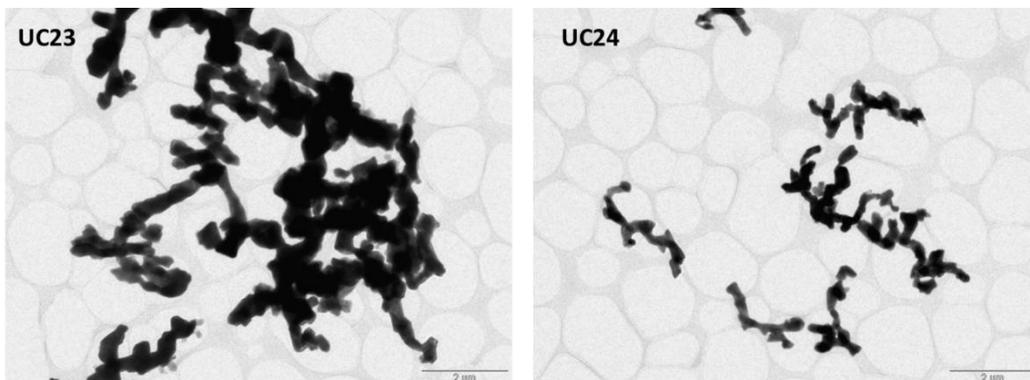


Figura 46: Imágenes de TEM de las partículas UC₂₃ y UC₂₄ sometida y no sometida a tratamiento térmico respectivamente.

Una vez conocidos la afección de los parámetros de síntesis a las características físicas de los sistemas, se estudian sus propiedades luminiscentes.

En cuanto a las propiedades luminiscentes, se va a llevar a cabo un repaso de cada parámetro de síntesis para establecer una unión entre estos, los parámetros físicos del sistema y las propiedades luminiscentes.

En el caso del sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$, los picos de emisión no son competitivos entre sí, como ocurría en el sistema cuyo activador era el Erblio, en el caso del Tulio, las vías de emisión no compiten como se observa en la **Figura 47**, por lo que los parámetros del sistema modifican la intensidad relativa de los picos entre sí, si no que modifican la intensidad del sistema de forma global.

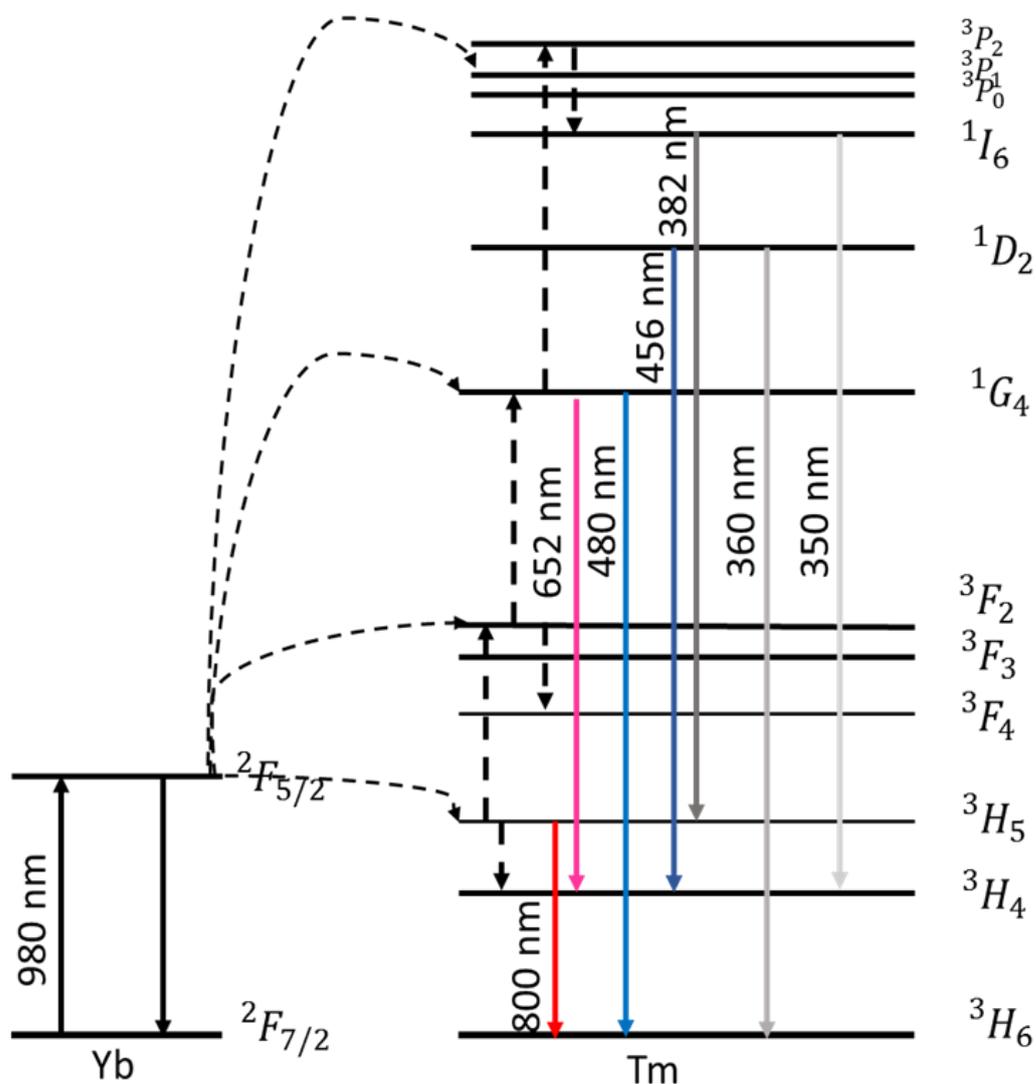


Figura 47: Diagrama de energía del sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$.

Si seguimos el mismo camino que con el sistema anterior, comenzaremos por la modificación que produce sobre la luminiscencia del $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Tm}$ el cambio del pH. Como se observa en la **Figura 48**, el aumento del pH supone una disminución de la luminiscencia, ya que como se observaba en la **Figura 42**, al aumentar el pH, se modifica la morfología de estructuras dendríticas y dispersas a bastones alargados y aglomerados, lo que ocurre por lo tanto es que se avanza desde estructuras con elevada relación superficie volumen a estructuras con baja relación superficie volumen. El aumento de la relación superficie volumen, supone un aumento de emisores disponibles en la superficie, lo que se traduce en un aumento general de la intensidad de emisión global del sistema en pH ácidos, viéndose modificada a medida que se pasa hacia el pH básico, por el cambio en la morfología del sistema y la disminución de la relación de la superficie volumen, que disminuye los emisores disponibles para excitación, lo que se traduce en una disminución de la intensidad de emisión.

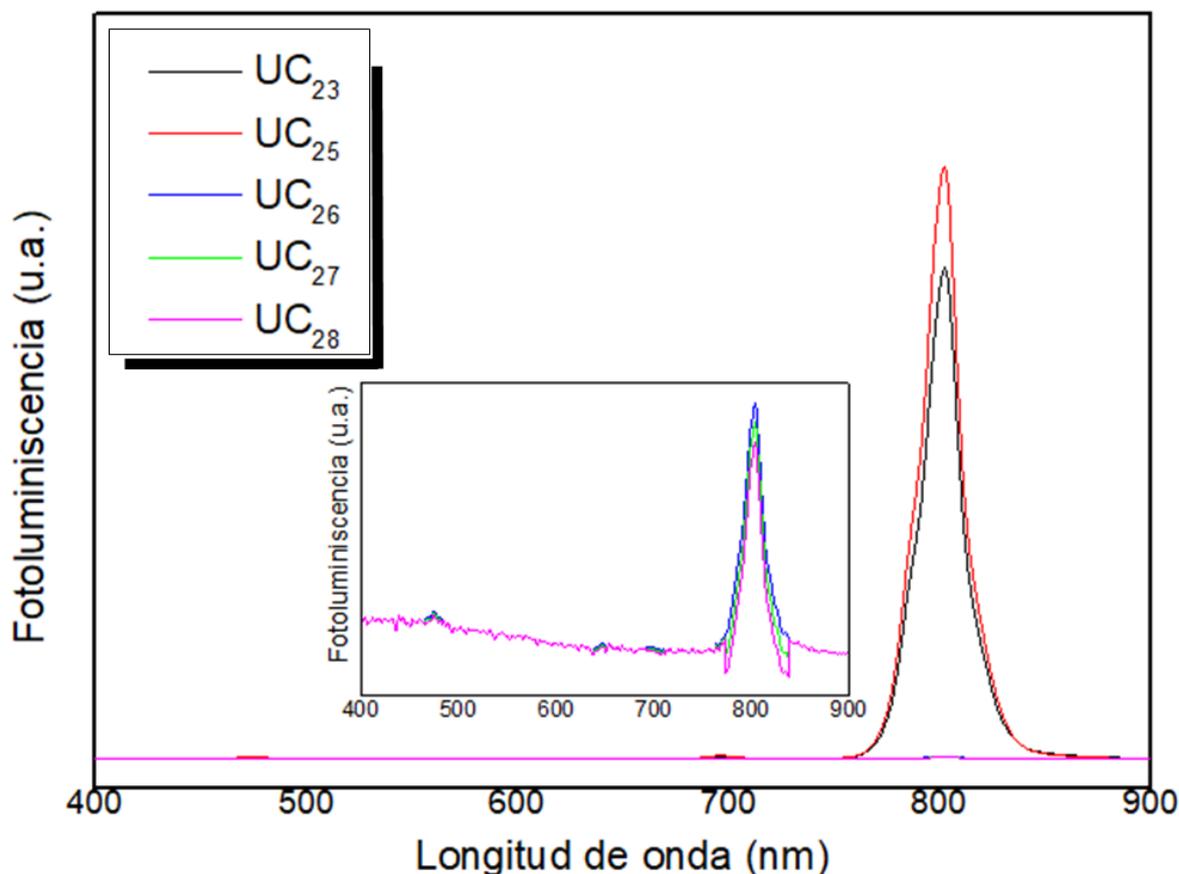


Figura 48: Espectros de fluorescencia de las partículas UC_{23,25,26,27} Y₂₈ sintetizadas con pH 5,6,7,8,10 respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.

En cuanto a los precursores de la matriz, no se observa una modificación reseñable, como ya se estudió previamente, la modificación del precursor supone una modificación del pH, lo que a su

vez, modifica la morfología del sistema, el precursor NH_4F , da lugar a un pH de 5 por su relación estequiométrica con el NaOH , mientras que el precursor NaF , da lugar a un pH 7 por su relación estequiométrica con el NaOH , por lo que pasaríamos de morfologías dendríticas y dispersas a bastones alargados y aglomerados, se disminuiría la relación superficie volumen, que daría lugar a una disminución de emisores disponibles en la superficie para ser excitados y generar luminiscencia y se reduciría la intensidad global del sistema, la comparación de precursores se puede observar en la **Figura 48**, comparando el espectro de fluorescencia del sistema UC_{23} y el UC_{26} .

A continuación, se observó el cambio luminiscente que supone el cambio del tiempo de reacción. Recordemos que el tiempo de reacción provoca un cambio en la fase cristalina de la partícula, que va acompañado de un cambio en su morfología. El cambio en la luminiscencia se puede observar en la **Figura 49**, se determina que un aumento en el tiempo de reacción supone un aumento en la intensidad de luminiscencia del sistema, este cambio se debe exclusivamente al cambio en la morfología, en el caso de UC_{22} existe una mezcla de fases con tamaños superiores a los de UC_{23} . El aumento del tamaño de las partículas supone una reducción de la relación superficie volumen, lo que a su vez supone una disminución de los emisores disponibles para ser excitados y ello se traduce en una disminución global de la intensidad de emisión.

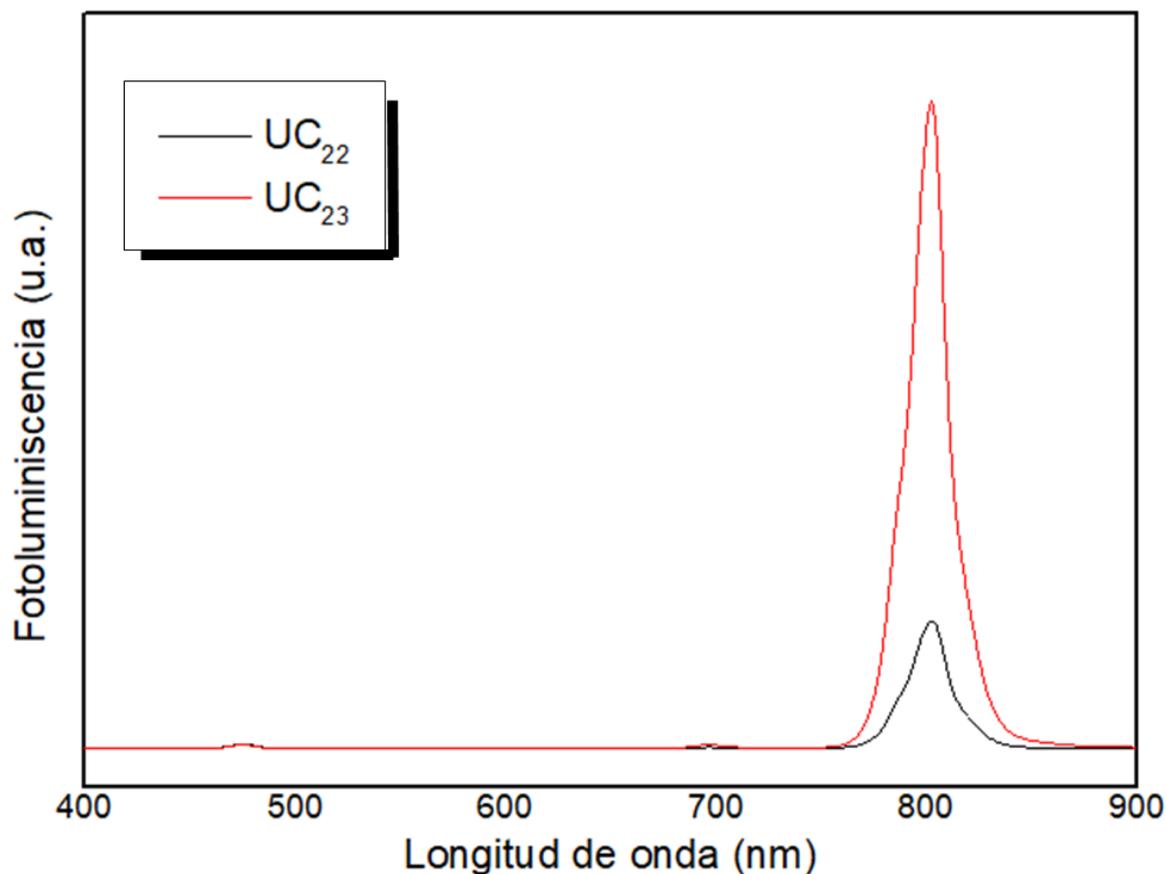


Figura 49: Espectro de fluorescencia de las partículas UC₂₂ y UC₂₃ sintetizadas con 12 horas y 24 horas de reacción respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.

Por último, se va a observar el cambio en la luminiscencia que supone un posterior tratamiento térmico a los sistemas, recordemos que, en este caso, se observó que el tratamiento térmico provocaba una aglomeración del sistema, debido a que la misma ya se encontraba en fase cristalina beta, por lo que la energía del tratamiento térmico no se utilizaba en un cambio de fase cristalina, si no en la aglomeración de la misma. En la **Figura 50**, se observa que la aplicación de tratamiento térmico, supone una disminución de la intensidad de luminiscencia, como ya se ha determinado, los sistemas sometidos a tratamiento térmico, sufren una aglomeración que supone una disminución de la relación superficie volumen, y como ya se ha mostrado en los parámetros previos, esa disminución va acompañada de una disminución de la intensidad global de la luminiscencia del sistema.

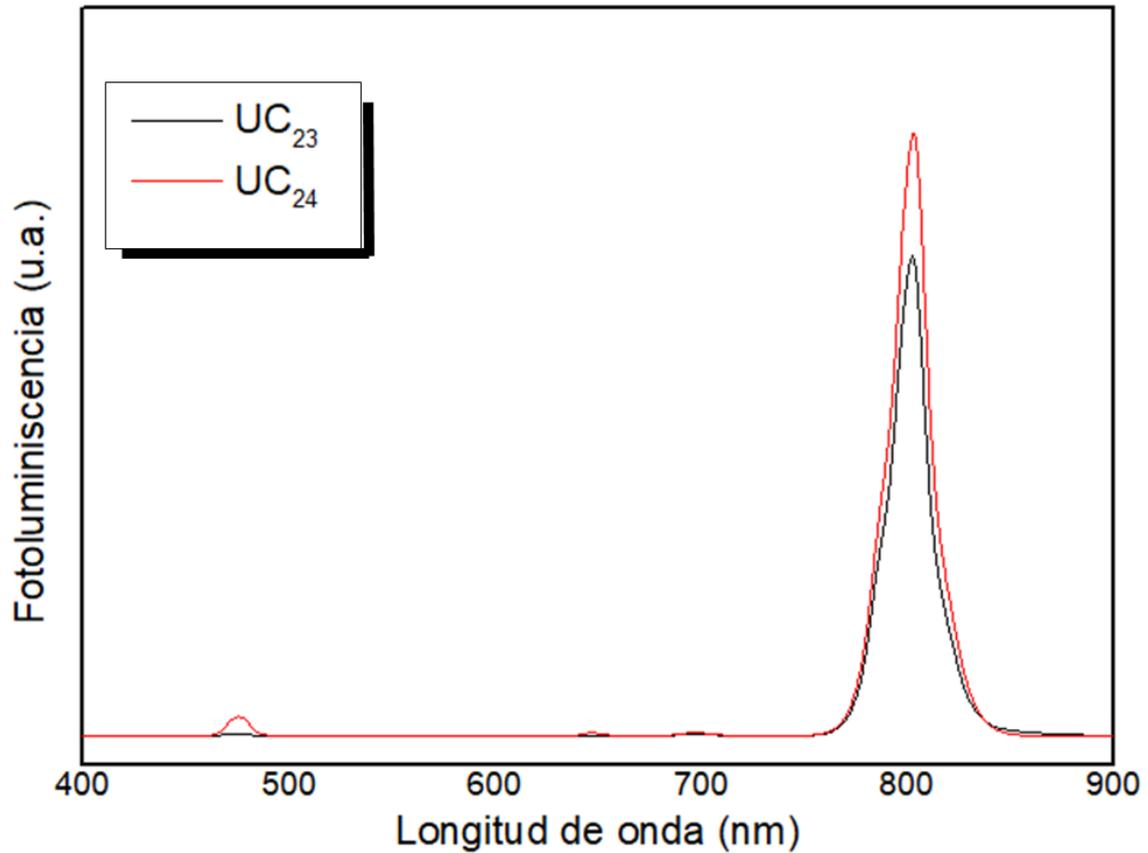


Figura 50: Espectro de fluorescencia de las partículas UC₂₃ y UC₂₄ sintetizadas con tratamiento y sin tratamiento térmico respectivamente, manteniendo el resto de parámetros de síntesis.

En el caso del sistema NaYF₄:Yb,Tm la optimización es más sencilla que para su homólogo con Erbio, debido a que en este caso, como ya se ha determinado en las secciones anteriores (**Figura 47**), no existe competitividad entre las líneas de emisión, por lo que no se produce una modificación del color presente en la luminiscencia si no que se modifica únicamente la intensidad de luminiscencia global del sistema.

Para poder conocer los parámetros que optimizan la intensidad de luminiscencia del sistema, se van a comparar las intensidades de ambos picos de los siete sistemas sintetizados con Tulio.

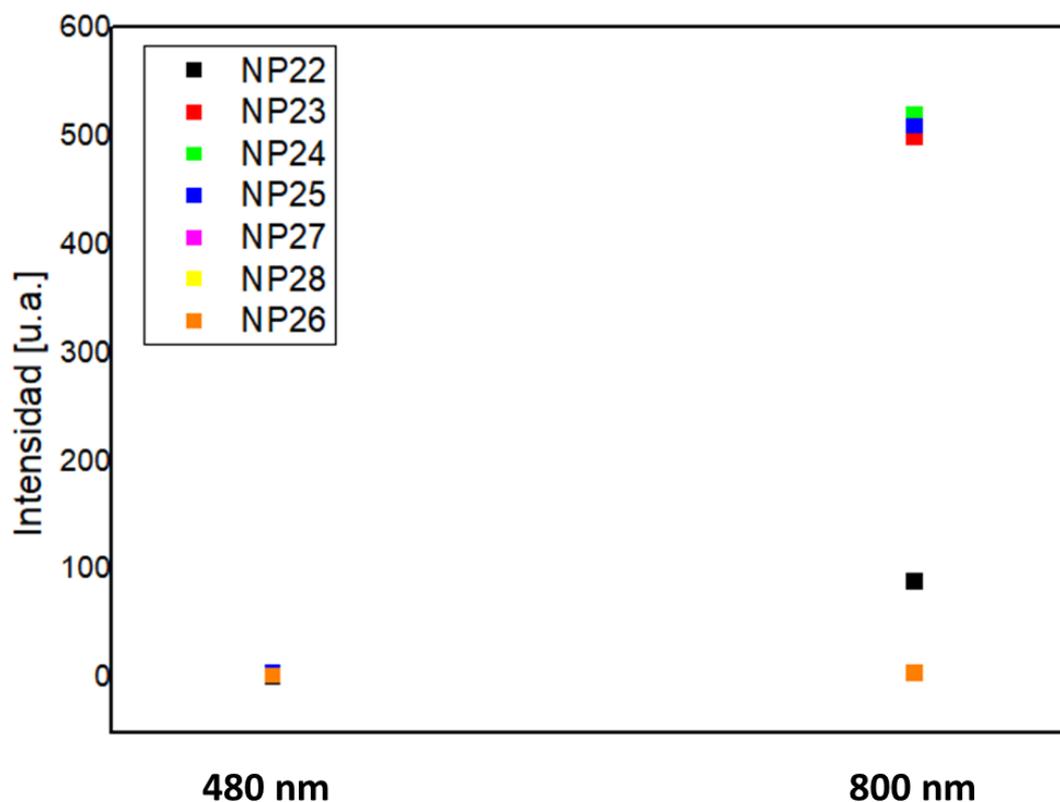


Figura 51: Comparación de la intensidad de picos del Tulio para las partículas sintetizadas con diferentes parámetros de síntesis.

En la **Figura 51**, se observa que la partícula con mayor intensidad es UC₂₄, por lo que se seleccionarán los parámetros de síntesis de UC₂₄ como los óptimos para la luminiscencia de el sistema sintetizado con Tulio. Recordemos además, que estos parámetros son los que proporcionan una fase cristalina beta y una morfología dendrítica dispersa.

Los parámetros óptimos serán:

Horno de síntesis: Convencional.

Temperatura de reacción: 230 °C

Tiempo de reacción: 24 horas.

Precursor de la matriz: NH₄F

pH: 5

Tratamiento térmico: No

Se puede observar que los parámetros óptimos para el Tulio, son los mismo que para el Erblio, como se predijo al inicio de esta sección, al compartir la misma matriz, los cambios en los

parámetros de síntesis, provocarían cambios muy similares en los sistemas, aunque estas presenten diferente dopaje.

Capítulo 5: Evaluación de Sistemas de Emisión Hiperespectral en la liberación específica de fármacos en terapias contra tumores

5.1. Selección de la diana terapéutica contra el proceso tumoral.

La selección del fármaco y profármaco utilizado será condicionante de la diana del mismo y a su vez se seleccionará un SEH con una fotoluminiscencia de emisión coincidente (parcial o total) con el espectro de absorción del fármaco y profármaco seleccionado para el estudio.

El uso de la liberación de fármacos presenta dos dianas de actuación:

1. **Incremento de la localización:** El uso de fármacos para el tratamiento de tumores es comúnmente dosificado por vía oral o sanguínea, este proceso supone la movilización del fármaco por el torrente sanguíneo, llegando tanto a células cancerosas como a células sanas (Liangliang Dai, 2016), (Vikas Jain, 2015), (David Böhme, 2015). Además, la eliminación de estos fármacos es mayor y más rápida si no son localizados en la diana, lo que supone una menor disponibilidad para el consumo por parte de las células afectadas por la lesión (Liangliang Dai, 2016).
2. **Incremento de la efectividad:** El cuerpo humano para asegurar su supervivencia, presenta una resistencia selectiva a ciertos fármacos a través de los microorganismos con lo colonizan. En el uso de la quimioterapia, esta herramienta de supervivencia supone una desventaja, debido a que los microorganismos presentes en el entorno tumoral consumen los fármacos utilizados en la quimioterapia y reducen la actuación de los mismos sobre la célula tumoral (Ravid Straussman, 2012). Es por ello, que una de las dianas utilizadas en los tratamientos tumorales mediante liberación de fármacos son los microorganismos del entorno celular del tumor (Leore T. Geller M. B.-R., 2017).

La presente Tesis Doctoral se centró en el aumento de la efectividad mediante la reducción de los microorganismos del entorno celular gracias al uso del fármaco ciprofloxacina como antibacteriano..

Concretamente, es conocido que las bacterias del entorno tumoral presentan una elevada resistencia a la gemcitabina. La gemcitabina es considerada un citotóxico clasificado como antimetabolito, muy utilizado en los procesos de quimioterapia. Se trata de un fármaco que afecta a las células en fases específicas del ciclo celular, en el caso de la gemcitabina, esta interfiere con la pirimidina en la división celular (Chemocare, 2021), (Reese, 2014). Las bacterias del entorno tumoral, son capaces de digerir la gemcitabina, reduciendo así la efectividad de los procesos quimioterapéuticos (Leore T. Geller M. B.-R., 2017).

Para incrementar la efectividad de los tratamientos quimioterapéuticos, se seleccionó un fármaco capaz de eliminar o reducir las bacterias del entorno tumoral, la ciprofoxacina. La ciprofoxacina es un antibiótico que pertenece a la familia de las quinolonas y es ampliamente utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas (Jain, 2008). El problema que presenta la ciprofoxacina es que está comúnmente presente en biofluidos como sangre y orina, puesto que es un fármaco soluble en agua, lo que reduce su efectividad en el entorno celular por su solubilización previa a su llegada a la diana. Para evitar este problema, se encapsula en su correspondiente oxima-éster, debido a que este profármaco no es soluble (Yang. R., 2003).

5.2 Estudio del espectro de absorción de la ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-Éster.

Metodología de medida:

Los disolventes de calidad HPLC se adquirieron de Sigma-aldrich. Se utilizó agua Milli-Q® para la preparación de la muestra. Las soluciones madre de ciprofoxacina (CF) y Oxima-éster de ciprofoxacina (CF-OE) se ajustaron a 300 µg / mL en CH₂Cl₂. En el caso de CF-OE, se añadieron

soluciones que contenían 10% (v / v) de ácido fórmico (FA) para protonar toda la oxima. A esta concentración de FA, el espectro de absorbancia CF-OE sufre un cambio batocrómico.

Los espectros UV-visible para muestras líquidas de CF o CF-OE se registraron a temperatura ambiente usando celdas de cuarzo de 10 x 10 mm² con un espectrofotómetro modelo Perkin Elmer Lambda 1050 UV / Vis / NIR. Los experimentos de fluorescencia en estado estacionario para muestras líquidas de CF o CF-OE se llevaron a cabo con un Espectrómetro de Fluorescencia Perkin Elmer LS 55, con una longitud de onda de excitación de 330 nm y usando un filtro de corte a 350 nm. La fluorescencia resuelta en el tiempo (TR) para las mediciones de las disoluciones de CF o CF-OE se registró en un sistema Mini Tau provisto de un filtro de paso de banda de 450 nm, utilizando un diodo láser con longitud de onda de excitación a 372 nm y 61 ps de duración de pulso láser (ambos de Edinburgh Instruments). Para monitorear la fluorescencia TR del sólido en polvo UC-UC, la muestra de polvo se irradió con un láser de 980 nm (Potencia 1kW) en modo frontal, detectando las trazas cinéticas con un filtro de paso de banda de 450 o 650 nm.

Técnicas de medida de las líneas de absorción de CF y CF-OE.

Espectroscopía de absorción transitoria (TAS, Transient Absorption Spectroscopy).

Las mediciones de fotólisis de destello láser se realizaron con un equipo LP980 de Edinburgh Instruments (LP980), basado en un oscilador paramétrico óptico (OPO) bombeado por el tercer armónico de un láser Nd: YAG (EKSPLA). La longitud de onda de excitación seleccionada para las mediciones fue de 355 nm con pulsos únicos de baja energía de 1 mJ / pulso de aprox. 5 ns de duración, mientras que se empleó una lámpara de flash de xenón pulsado (150 W) como fuente de luz de detección. La luz de la sonda se dispersa a través de un monocromador (TMS302-A, rejilla 150 líneas / mm) después de que ha pasado la muestra y luego llega a un detector de tubo fotomultiplicador (Hamamatsu Photonics) para obtener el perfil temporal. La absorbancia de la CF de las muestras de las disoluciones de CF-OE se mantuvo a $\sim 0,3$ a $\lambda_{exc} = 355$ nm en diclorometano. Todos los espectros transitorios se registraron a temperatura ambiente utilizando cubetas de cuarzo de 10 x 10 mm², que se burbujearon durante 15 min con N₂ antes de la adquisición. Las señales TAS para UC-UC se controlaron a $\lambda_{exc} = 980$ nm, el modo de oscilador paramétrico óptico en soluciones dispersas orgánicas purgadas.

Espectro de absorción de Ciprofloxacina y su correspondiente Oxima-Éster.

Para la obtención de las líneas de absorción del fármaco y el profármaco, se elaboraron dos nuevas díadas derivadas de CF que contienen el cromóforo de fluoroquinolona. La estrategia sintética desarrollada consiste en proteger el grupo amina secundaria en la unidad piperazina de CF con un grupo Boc, para evitar posibles reacciones secundarias de la amina en los siguientes pasos. Luego, se preparó el cloruro de acilo a partir de CF. Empleando cloruro de oxalilo con DMF. Finalmente, el cloruro de acilo combinado con una oxima da lugar a el correspondiente éster de oxima CF-OE.

Tanto las díadas CF como CF-OE mostraron una banda de absorción en el rango de 325-340 nm (**Figura 52**), que en el caso de CF-OE sufre un desplazamiento batocrómico hasta 500 nm en presencia de medios ácidos debido a su protonación, con un máximo en torno a 425 nm.

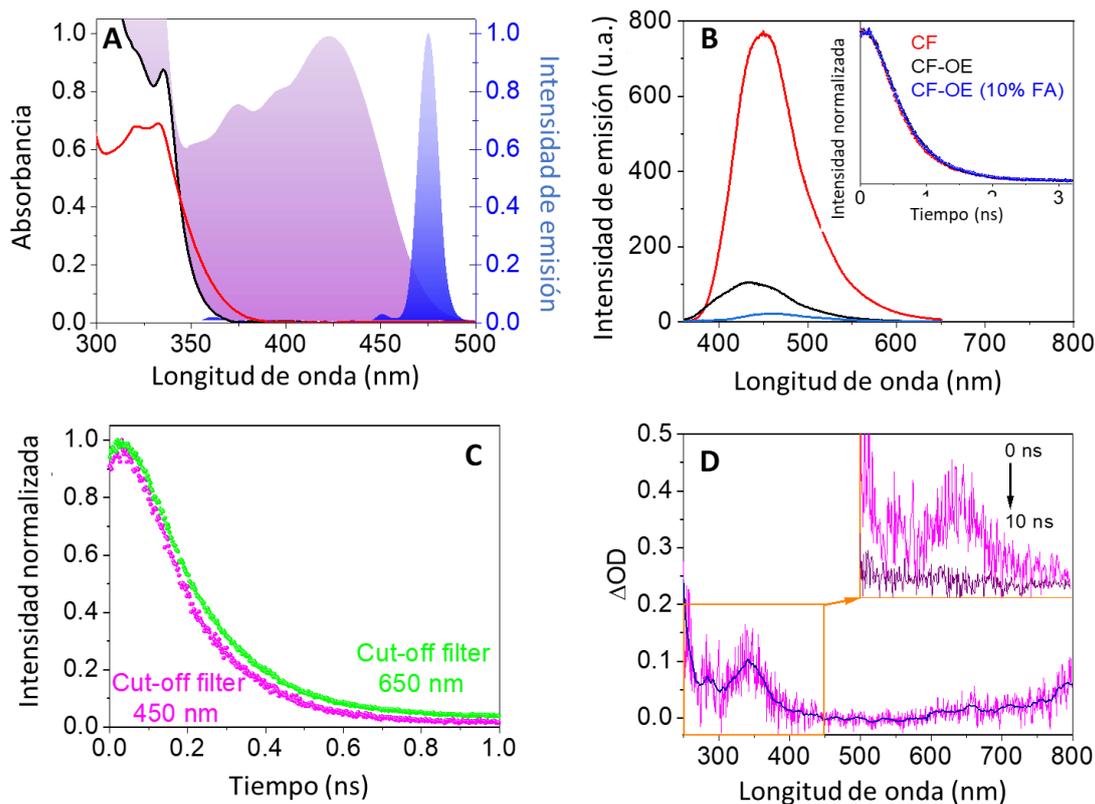


Figura 52: A) Espectros de absorción normalizados de derivados de ciprofloxacina (CF o CF-OE, 20 μ M) en CH_2Cl_2 (trazas negras y rojas para CF o CF-OE, respectivamente) y en medios ácidos (sombra violeta para CF-OE). El espectro de fotoluminiscencia normalizado de UC3 en sólido (traza azul) se incluye para comparación. B) Fluorescencia en estado estacionario para CF (rojo), CF-OE (negro) y CF-OE un medio ácido (azul) en diclorometano. Recuadro: trazas de desaparición normalizadas. C) Tiempos de vida de fluorescencia normalizados para UC3 en estado sólido. D) Espectro de absorción transitorio (TAS, $\lambda_{\text{exc}} = 980$ nm) para UC3 en una solución de suspensión de diclorometano en atmósfera inerte. El trazo azul corresponde al suavizado de la señal.

Con respecto a las propiedades de fotoluminiscencia, mientras que CF exhibió una alta fluorescencia con un máximo en ca. 450 nm, el correspondiente éster de oxima resultó en una intensidad pobre, acompañada de un desplazamiento hacia el azul del máximo de emisión (**Figura 52B**). Para el CF-OE protonado (10% FA), la fluorescencia fue aún menor, acompañada de un corrimiento al rojo del máximo hasta 460 nm, como se reporta en la literatura para ciprofloxacina comercial (Yang R., 2003).

5.3. Selección del Sistema upconversion de Emisión Hiperespectral idóneo para la liberación de la ciprofloxacina.

Gracias al diseño y la optimización de los SEH realizada en el **Capítulo 4**, es conocido que el SEH $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ presenta una línea de emisión en 450 nm, lo que coincide con las líneas de absorción evaluadas tanto para la CF como para su correspondiente Oxima-Éster, es por ello que se procede a la evaluación de la liberación de fármacos con este sistema.

Para explorar el rendimiento de $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ como materiales fotoactivos en reacciones de fotosensibilización de ciprofloxacina, se seleccionó UC₂₄ como material óptimo, debido a que sus propiedades morfológicas y estructurales le confieren mayor intensidad de fluorescencia y estabilidad. El espectro de emisión de $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Tm}$ (UC₂₄) ilustra una clara señal superpuesta con los espectros de absorción de CF-OE protonados en el amplio rango de 460-500 nm (**Figura 52A**), indicación de que es un excelente candidato para fármaco fotosensibilización.

5.4. Evaluación del NaYF₄:Yb,Tm en la liberación de ciprofoxacina.

El proceso de liberación de fármaco controlado a través de la escisión del enlace N-O fotosensibilizado en CF-OE se investigó mediante la irradiación selectiva de UC-UC (UC₂₄, $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$), en presencia de CF-OE en medios ácidos orgánicos y se controló mediante un sistema de HPLC (**Figura 53A**).

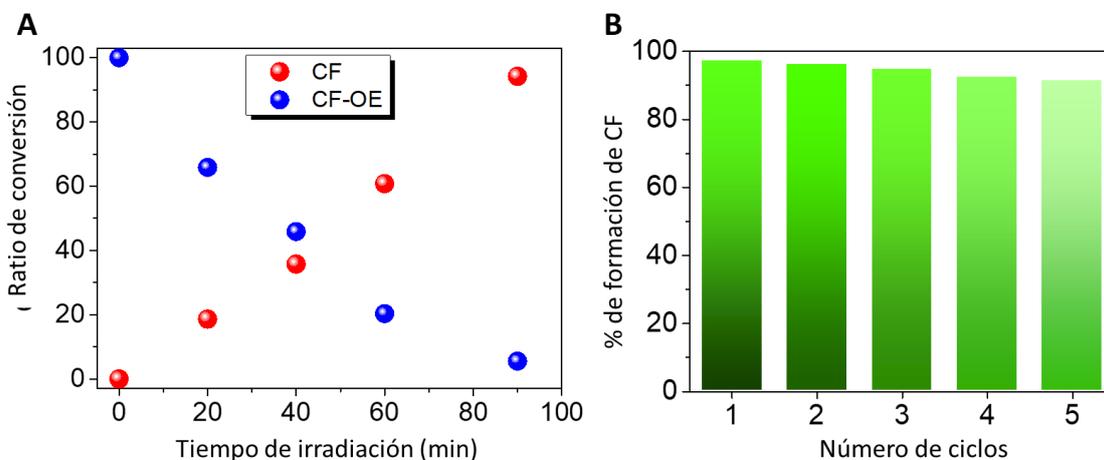


Figura 53: A) Tasa de conversión de CF (rojo) o CF-OE (azul) usando UC3 al aumentar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$), a 0.5 M de CF-OE en CH₂Cl₂ en atmósfera inerte (10% FA v / v); B) Reutilización de UC3 mediante el seguimiento de la tasa de conversión de la formación de CF al aumentar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) durante cinco ciclos consecutivos. El gráfico muestra el porcentaje máximo de formación de CF después de 90 min bajo irradiación.

Se observa un aumento notable en la formación de CF en las primeras etapas de la reacción acompañado de la correspondiente disminución en la señal del cromatograma CF-OE (Figura 54).

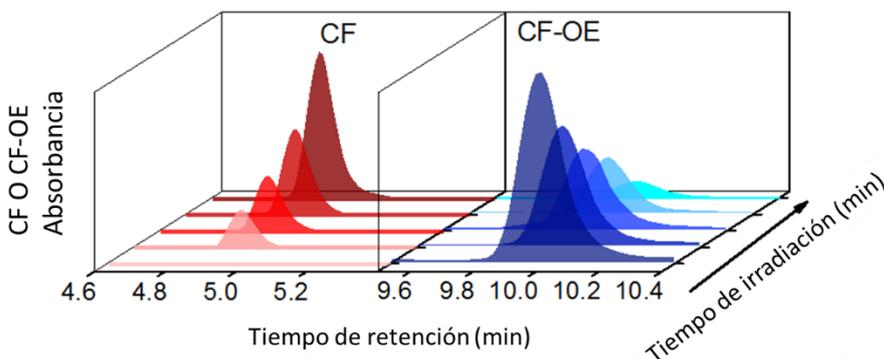


Figura 54: Cromatogramas de HPLC de la desaparición de CF libre (rojo) y desaparición del compuesto CF-OE (azul) al aumentar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$), a 0,5 M de CF-OE en cloruro de metileno en atmósfera inerte (10% FA v / v). La fase móvil utilizada en el análisis de HPLC fue 70:50 H₂O: CH₃CN, que contenía 0,1% de FA.

Este comportamiento podría atribuirse a la formación de CF libre a partir del derivado de oxima-éster tras la rotura del enlace N-O del compuesto CF-OE. Como se observa en la **Figura 53 B**, la tasa de conversión fue prácticamente cuantitativa, probablemente debido a la reacción fotosensibilizada concomitante. Como se esperaba, no se observaron cambios en ausencia de UC-UC, porque CF-OE no puede absorber la luz infrarroja cercana (no se muestran datos). Además, los experimentos de TAS se realizaron in situ mientras se realiza la reacción fotocatalítica para monitorear las propiedades fotofísicas tanto de UC₂₄ como de CF-liberado.

Específicamente, las propiedades ópticas se detectaron analizando la mezcla de reacción sobre una fuente de excitación láser de 355 y 980 nm. Al pulso de 980 nm, la absorción debida a UC24 a 350 nm se mantuvo inalterada mientras transcurría el tiempo de reacción (**Figura 56 A**) en comparación con la Figura 53, lo que demuestra el papel principal de esta transición para el SEH emisor. En cuanto a los productos liberados, además del CF libre, la ruptura del enlace N-O provoca la aparición de un compuesto imina que inmediatamente se hidroliza para dar la correspondiente cetona. Específicamente, el subcompuesto que se libera es benzofenona (BP, **Figura 56 B**). La fotólisis de BP por TAS ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$) genera la aparición de $^3BP^*$ con una banda característica centrada a 520 nm, que se corroboró en la mezcla de reacción (**Figura 56 C**).

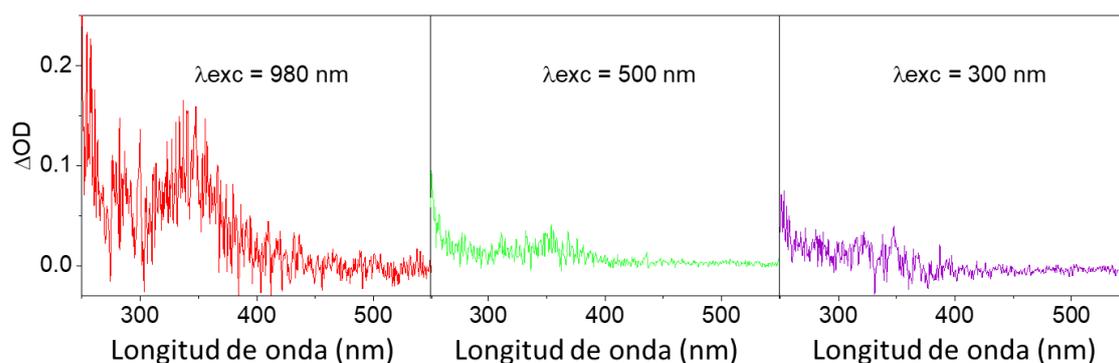


Figura 55: Espectro de absorción transitoria (TAS) para UC₂₄ en solución en suspensión de diclorometano en atmósfera inerte irradiada bajo A) $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$, B) $\lambda_{exc} = 500 \text{ nm}$ y C) $\lambda_{exc} = 300 \text{ nm}$.

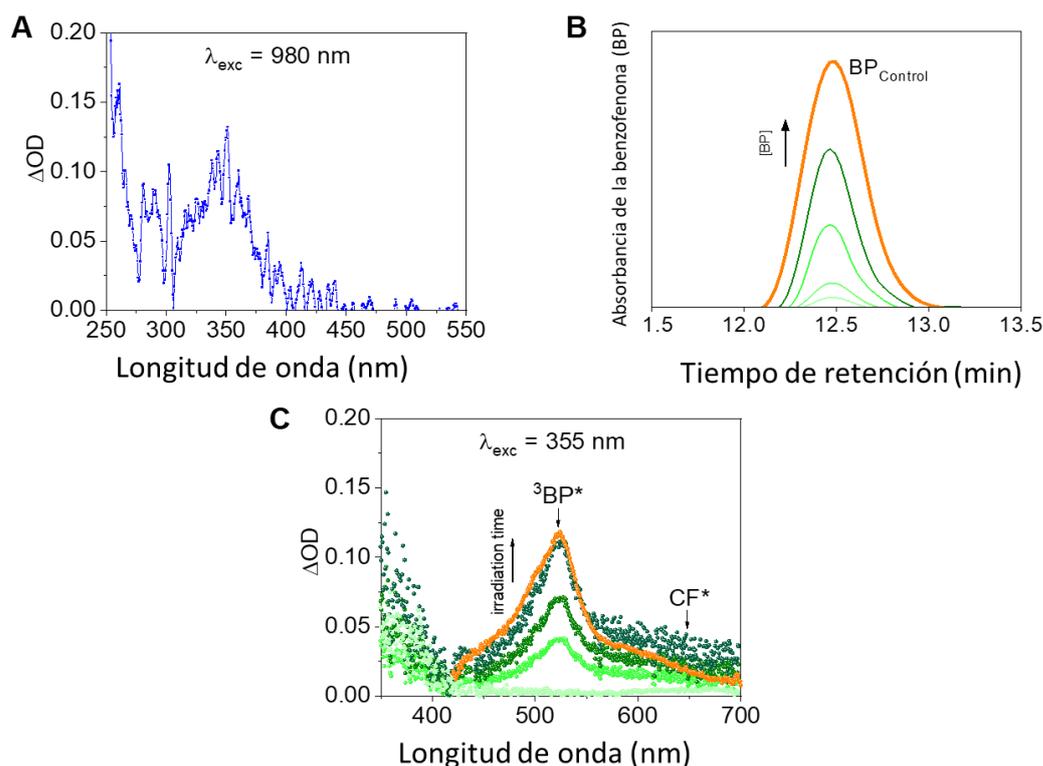


Figura 56: A) Espectro de absorción transitoria (TAS, $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) para UC₃ en solución de suspensión de diclorometano desaireado medido simultáneamente con la reacción fotocatalítica después de 60 minutos. B) Cromatogramas de HPLC de la formación de la benzofenona (BP) como segundo producto al aumentar los tiempos

de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$), a $0,5 \text{ mM}$ de CF-OE en cloruro de metileno desaireado (10% FA v/v). La fase móvil utilizada en el análisis de HPLC fue 70:50 H₂O: CH₃CN, que contenía 0,1% de FA. El trazo naranja corresponde a la referencia comercial de BP. C) Espectros de absorción transitoria ($\lambda_{exc} = 355 \text{ nm}$) para mezcla de la reacción en cloruro de metileno en atmosfera inerte (10% FA v/v) tras los tiempos de irradiación. El trazo naranja corresponde a la referencia comercial de BP.

La estabilidad del catalizador se evaluó con una muestra de UC₂₄, que se lavó y reutilizó durante cinco ciclos consecutivos (**Figura 53 B**). Para evitar la pérdida de material por filtración, se retiró el sobrenadante de la solución mezcla del vial, lavando el SEH con CH₂Cl₂ varias veces. Después del lavado, se analizó una pequeña alícuota del último sobrenadante mediante espectroscopía UV-vis para comprobar la ausencia completa del fármaco CF o CF-OE. Como se puede ver en la **Figura 53 B** y **Figura 58**, UC₂₄ mantiene su actividad durante todos los ciclos, con solo un 3% de pérdida de eficiencia. Estos resultados son indicativos de que los SEH de UC₂₄ son muy estables, de fácil recuperación y pueden utilizarse en varios ciclos de reacción. Además, los experimentos de TAS después de cada ciclo de reacción revelaron las propiedades transitorias inalteradas (**Figura 58**).

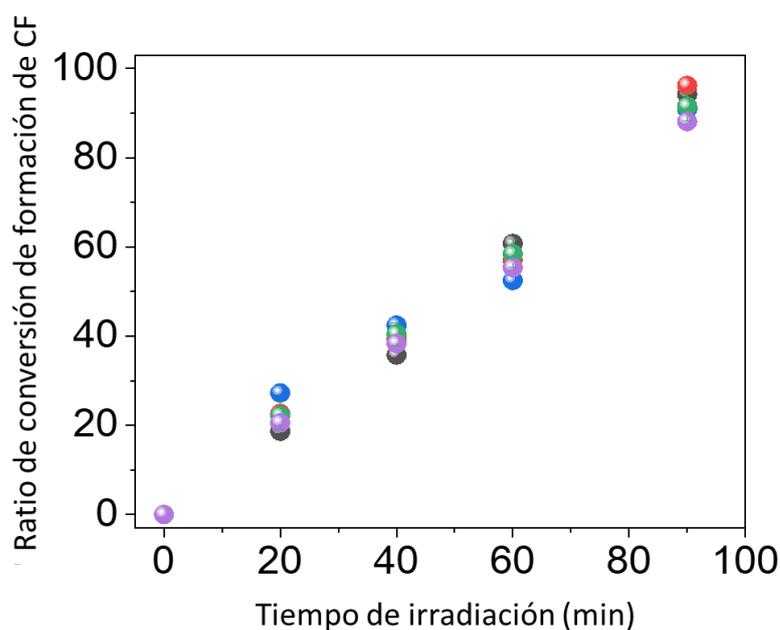


Figura 57: Reutilización de UC₂₄ mediante el seguimiento de la tasa de conversión de la formación de CF al aumentar los tiempos de irradiación ($\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) durante cinco ciclos consecutivos. Ciclo 1 a 5: negro, rojo, azul, verde y morado, respectivamente.

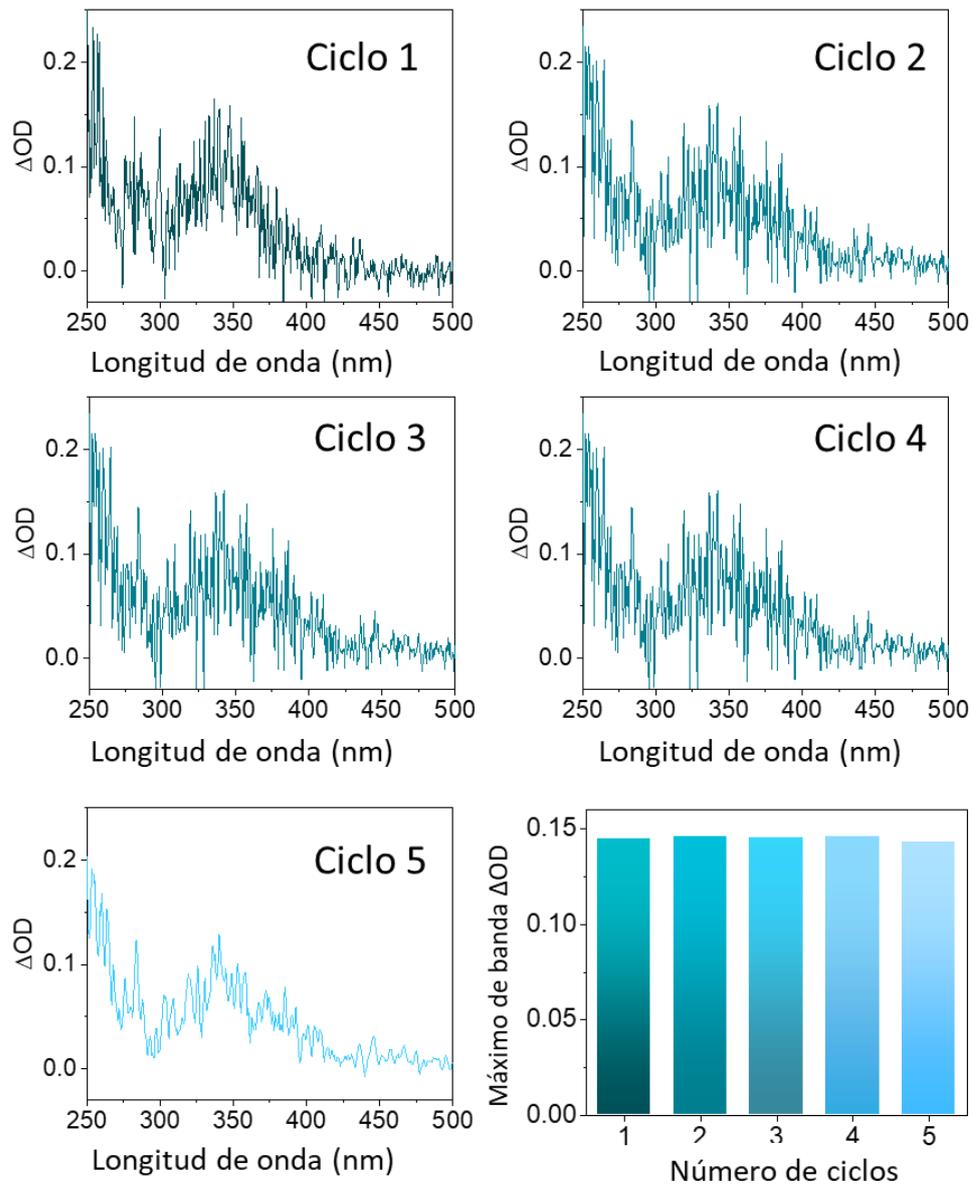


Figura 58: A-E) Espectro de absorción transitorio (TAS, $\lambda_{exc} = 980 \text{ nm}$) para UC_{24} en solución de suspensión de diclorometano en atmósfera inerte después de cinco ciclos consecutivos. F) Comparación de ΔOD para cada repetición.

Capítulo 6: Desarrollo de
un sistema de simulación
de tumores dérmicos para
la prueba de Sistemas
Upconversion de Emisión
Hiperespectral

6.1. Selección de SEH según sus líneas de fluorescencia, diseño invertido de SEH.

El objetivo final del diseño de los SEH en esta Tesis Doctoral es la obtención de materiales idóneos para la detección, segmentación y tratamiento de tumores dérmicos.

Es bien conocido que el tejido humano se determina como medio anisotrópico, lo que conduce a que las diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético se absorban en diferente medida en función de la profundidad a la que se encuentre la lesión a detectar, como muestra la **Figura 59**, en la que se determina que a medida que se avanza en la región visible del espectro electromagnético del azul al rojo, se va aumentando la profundidad de penetración de la radiación.

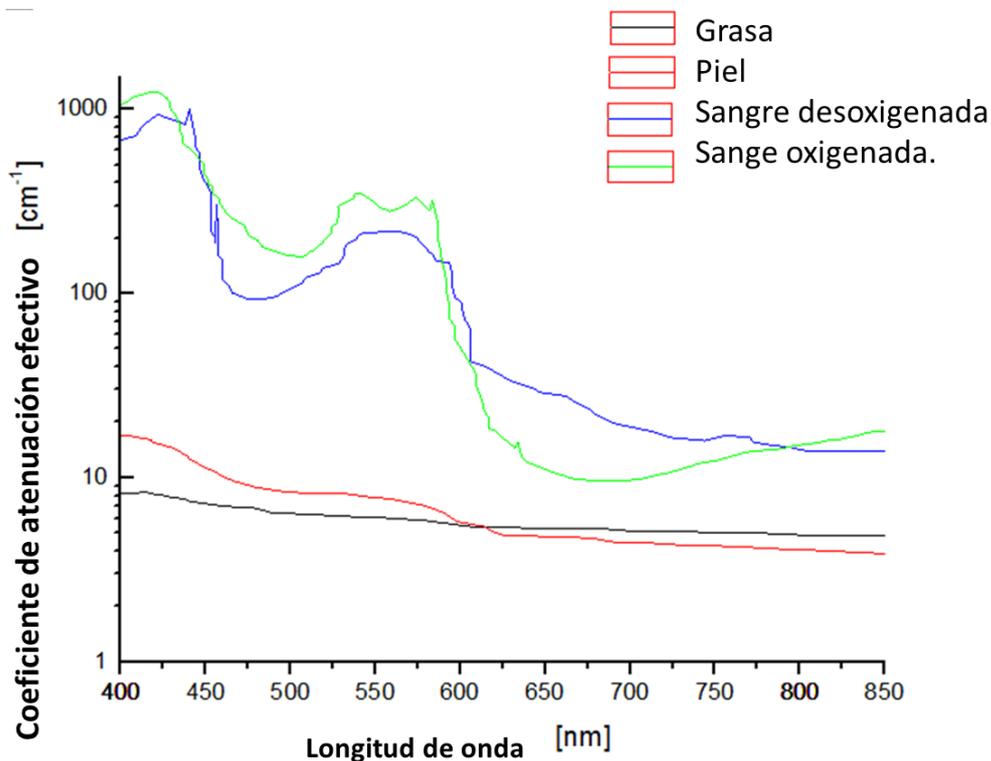


Figura 59: Representación de la atenuación de la radiación a través del tejido biológico en función de la longitud de onda.

Debido a ello, el sistema a utilizar tendrá que emitir en un rango que dependa de la lesión a detectar. Para poder realizar un estudio generalizado, independiente de la profundidad del tumor y el fármaco utilizado para el tratamiento del mismo,, se realizó una búsqueda

bibliográfica, para la elaboración de una base de datos que permita el diseño invertido de los sistemas requeridos en función de su uso final.

De esta manera, se determinará la cromaticidad de luminiscencia idónea para la lesión a detectar y en función de la misma, se buscarán los parámetros de reacción idóneos para poder obtener el sistema requerido.

La base de datos permitió establecer un patrón común entre condiciones de reacción, parámetros estructurales de los sistemas y parámetros luminiscentes. Pudiendo así, encasillar los sistemas en rangos de aplicabilidad en función de la profundidad a la que se quiera establecer la detección o la segmentación de la lesión, como se observa en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Resumen de la base de datos en el que se segmentan las nanopartículas en función de rango de aplicabilidad, características estructurales, luminiscencia y proceso de síntesis.

Profundidad de Lesión	Líneas de emisión principal [nm]	Partícula	Tamaño [μm]	Fase cristalina	Morfología	Tipo de síntesis
Epidermis [0 – 0.04] mm	450 475 480	NaYF ₄ : Yb,Tm (Zhang., 2008) (Cunhai Dong, 2012) (Guanying Chen T. Y., 2010) (Liu., 2008) (asoume, 2015) (Xun Chen, 2009) (Na Niu, 2012) NaYF ₄ : Yb,Ho (Lili Wang, 2011) NaYF ₄ : Yb,Tm,Er,Gd (Feng Wang, 2010) NaYF ₄ : Yb,Tm,Gd	10 – 30	Beta-hexagonal	Esferas Cubos	Solvotérmica

		BaYF ₅ : Yb,Tm (Fiorenzo Vetrone V. M., 2009) (Hailong Qiu, 2011)				
		NaYF ₄ : Yb,Er (Li L. W., 2007) (Meng He, 2011) (Qian Liu, 2011) (Jing Zhou, 2012) (Dongmei Yang, 2011) (Songjun Zeng M.-K. T.-F.-L., 2012) (Artur Podhorodecki, 2012) (Songjun Zeng J. X., 2012) (Yongsheng Liu D. T., 2013) (Yongsheng Liu D. T., 2010) (Hon-Tung Wong, 2011) (Juan Wang, 2011) LaF ₃ :Yb,Er (Sri Sivakumar, 2012) (Xiaofeng Yang, 2009) (Gejihu De, 2005) NaGdF ₄ : Yb,Ho (Li L. W., 2007) (Meng He, 2011) NaLuF ₄ : Yb,Gd,Er (Qian Liu, 2011) (Jing Zhou, 2012)				10 - 150
Dermis [0.04 – 4] mm	520 525 530 539 545 550					

		BaGdF ₅ : Yb,Er (Dongmei Yang, 2011) (Songjun Zeng M.-K. T.-F.-L., 2012)				
		NaYF ₄ : Eu (Artur Podhorodecki, 2012)				
		NaLuF ₄ : Yb,Gd (Artur Podhorodecki, 2012) (Songjun Zeng J. X., 2012)				
		NaLuF ₄ : Yb,Gd,Tm (Artur Podhorodecki, 2012) (Songjun Zeng J. X., 2012)				
Subdermis [4 – 60] mm	596 616 654 668 698 700 800	NaScF ₄ : Yb,Er,Tm (Yongsheng Liu D. T., 2013)	10 - 40	Beta- Hexagonal	Esferas	Coprecipitación Solvotérmica Descomposición térmica.
		NaGdF ₄ : Yb,Tm,Eu (Yongsheng Liu D. T., 2010)				
		KGdF ₄ : Yb,Tm (Hon-Tung Wong, 2011)				
		KMnF ₃ : Yb,Er (Juan Wang, 2011)				
		KMnF ₃ : Yb,Tm (Feng Wang, 2010)				
		KMnF ₃ : Yb,Ho (Feng Wang, 2010)				

NaGdF ₄ : Eu (Li L. W., 2007) (Meng He, 2011)
--

Estos datos, permitieron realizar simulaciones en las que se observa una posible detección y segmentación de una lesión en función de su profundidad en el tejido. Además, permitieron la combinación de varios sistemas para establecer un patrón de colores que determine la posición de la lesión en función del mismo.

6.2. Software de simulación de SEH para tumores dérmicos

Dentro del tejido la radiación puede sufrir dos efectos: absorción y dispersión, a la probabilidad de que un fotón sea absorbido por el tejido por unidad de longitud se denomina μ_a , mientras que a la probabilidad de dispersión se le denomina μ_s (Lihong V. Wang and Hsin-I W, 2007).

Para considerar la anisotropía del tejido biológico se lleva a cabo un parámetro equivalente al coeficiente de dispersión, el cual sigue la siguiente ecuación:

Ecuación 3: Determinación del coeficiente de dispersión de la radiación en un medio anisotrópico.

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g)$$

Donde μ'_s es el coeficiente de dispersión teniendo en cuenta el medio anisotrópico y g es el coseno del ángulo medio de dispersión.

La difusión de la radiación dentro del tejido, se ha simulado usando la ley de Fick, definida como:

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + \mu'_s)}$$

Ecuación 4: Difusión de la radiación dentro del tejido según la ley de Fick.

Por otro lado, tenemos que conocer la ley exponencial de extinción que dicta la reducción de intensidad de un haz de radiación en un medio anisotrópico en función de una longitud determinada como z y un coeficiente de atenuación efectivo denominado μ_e .

Ecuación 5: Definición de la extinción de la intensidad de un fotón en medio anisotrópico en función de la distancia recorrida.

$$I = I_0 e^{-\mu_e z}$$

Donde I e I_0 representan la intensidad final e inicial respectivamente.

A su vez, el coeficiente de atenuación efectivo, se podrá determinar en función de la difusión de la radiación en el medio y de su absorción.

Ecuación 6: Definición del coeficiente de atenuación efectiva de un medio anisotrópico.

$$\mu_e = \sqrt{\frac{\mu_a}{D}}$$

Este coeficiente también es definido como la profundidad a la que la intensidad de la radiación que atraviesa el medio decrece a $1/e$ o lo que es lo mismo:

$$I \sim 36\% I_0$$

Gracias al coeficiente de atenuación efectivo, se conoce como se transfiere la radiación a través de los diferentes extractos biológicos que se pueden encontrar en el tejido (Andrew M. Smith M. C., 2009), como muestra la **Figura 59**

Gracias al coeficiente de atenuación se puede definir un modelo por el que se va a regir el comportamiento de la radiación emitida en el tejido, lo que nos permitió simular mediante el software Matlab a que profundidad se encuentra una determinada lesión cancerígena en función de la atenuación que haya sufrido la radiación emitida por nuestras partículas. Determinando que las partículas han sido previamente introducidas en el cuerpo y depositadas sobre la superficie del tumor, de forma que la emisión de radiación será posible siguiendo el esquema de la **Figura 60**.

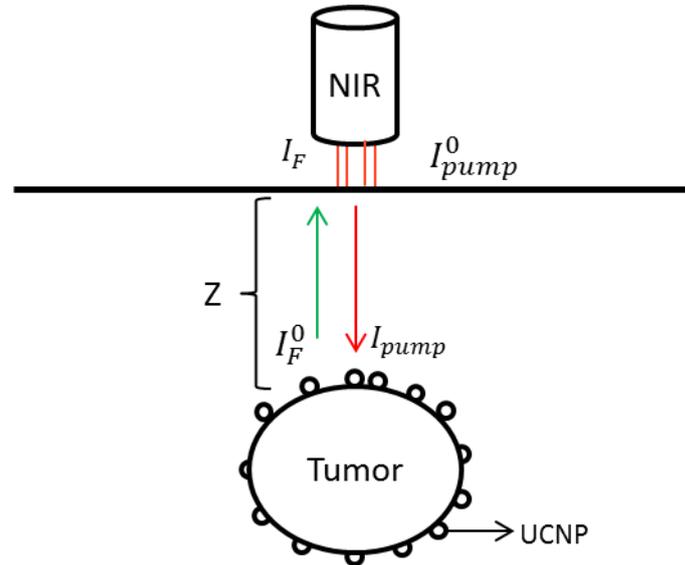


Figura 60: Esquema de emisión de radiación a través de las partículas depositadas sobre el tumor.

A través de la ventana biológica que se encuentra entre [400 – 1000 nm] se asegura la transmisión de la radiación a través del mismo, tanto de la radiación de excitación de las partículas, denominada I_{pump} conocida en 980 nm como la de emisión de las mismas.

La radiación emitida por las partículas, podrá ser determinada a través de la intensidad de excitación (R. Dapoor, 2000).

Ecuación 7: Determinación de la intensidad de radiación emitida y transferida a través del tejido biológico en función de la radiación de excitación.

$$I_F^0(\lambda, z) = \frac{K(I_{pump})^2}{1 + AI_{pump} + B(I_{pump})^2}$$

A su vez, la I_{pump} se puede determinar como $I_{pump}^0 e^{-\mu_e z}$

Para calcular el espectro emitido en la superficie del tejido, aplicamos la ley de extinción exponencial al mismo considerando una radiación emitida inicial con una longitud de onda λ_F situada a una profundidad z en el tejido con un coeficiente de atenuación efectivo $\mu_e(\lambda)$ excitada con un láser de longitud de onda λ_p .

Ecuación 8: Intensidad de radiación en la superficie del tejido en función de la longitud de excitación, el coeficiente de atenuación y la profundidad a la que se encuentra la lesión.

$$I_F(\lambda, z) = \frac{e^{-z\mu_e(\lambda_F)} K I_0^2}{e^{2z\mu_e(\lambda_p)} + A e^{2z\mu_e(\lambda_p)} I_0 + B I_0^2}$$

Donde I_0 representa la intensidad de excitación y A, B y K son constantes positivas.

Una vez definida la lesión como un elipsoide que se encuentra a una determinada profundidad de la superficie, se depositarán sobre el mismo una serie de puntos con coordenadas aleatorias definidas, donde cada punto emitirá radiación, siguiendo la radiación emitida por el espectro de las partículas sintetizadas, con una extinción a medida que atraviesa el tejido biológico que sigue la ecuación 6. Con lo que se determina un patrón de fluorescencia en función de la profundidad en el tejido como muestra la **Figura 61**, que siguiendo lo que predecía la **Figura 61**, se muestra un avance desde el azul hacia el rojo a medida que la profundidad de la lesión aumenta. Estableciendo así un patrón de profundidades, de este modo estructuras contenidas entre [0-0.02]cm muestran en superficie fluorescencia azul; entre [0.02-0.1] cm fluorescencia verde y entre [0.1-10]cm fluorescencia roja.

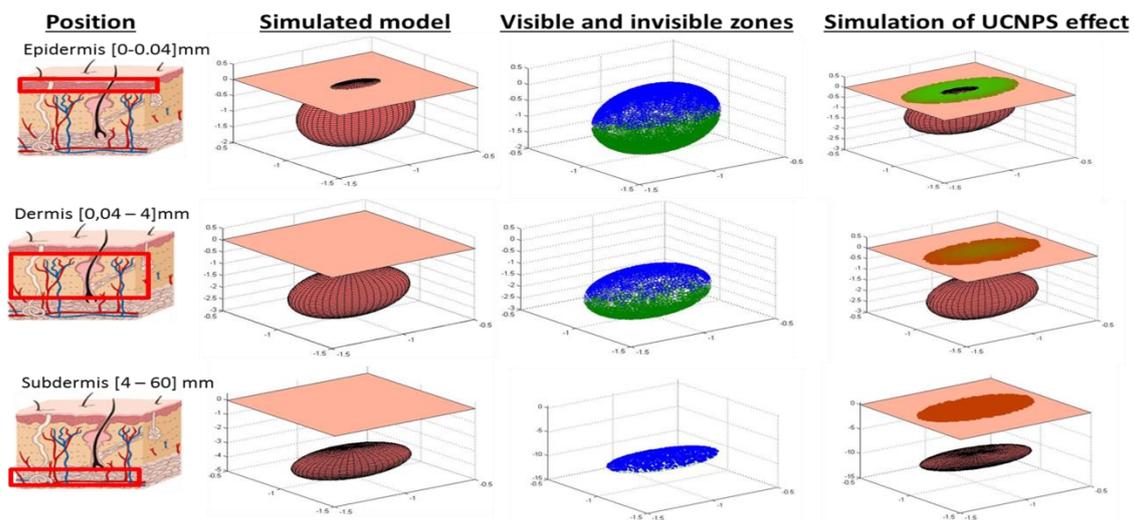


Figura 61: Deposición de partículas en la lesión, determinación de la radiación en la superficie en función de la radiación emitida y la extinción de la misma en función de la profundidad.

Capítulo 7: Conclusiones y futuras acciones

Con la presente Tesis Doctoral se consiguió desarrollar, simular y evaluar una nueva técnica de teragnosis basada en SEH de conversión ascendente. Las principales conclusiones obtenidas de la misma son:

(1) Desarrollo de los SEH mediante el estudio de las condiciones de síntesis y las características estructurales, morfológicas y luminiscentes de los mismos, logrando obtener una señal hiperespectral en el rango del visible con únicamente dos sistemas: $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$ y $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Tm}$.

Se produjo un barrido a las condiciones de síntesis que tuvieran una afeción directa a las características físicas de los sistemas y con ello a las propiedades luminiscentes. Las principales relaciones establecidas en el desarrollo de los SEH fueron:

1. Modificación de la morfología:
 - 1.1. Modificación del pH de reacción. pHs ácidos suponen obtención de morfologías globulares, irregulares y dendríticas, mientras que pHs básicos suponen la obtención de estructuras regulares y geométricas. Lo que se debe a la afeción del pH al medio de reacción por la disminución del medio antigrávido de reacción al pasar de pH ácido a básico.
 - 1.2. Modificación de los precursores de reacción: supone una afectación al pH y por lo tanto a la morfología. En el caso de los precursores se concluyó que para el conocimiento de su afectación a los sistemas sintetizados, se tiene que determinar si el pH final del medio de reacción es ácido o básico por la adición del precursor.
2. Modificación de la cristalinidad:
 - 2.1. Modificación de la temperatura de reacción. Mayores temperaturas de reacción suponen una mayor energía libre en el medio de reacción lo que favorece fases cristalinas beta, al necesitar esta fase mayor energía para su formación.
 - 2.2. Modificación del tiempo de reacción: Mayores tiempos de reacción suponen una mayor homogeneidad de temperatura en el tanque de reacción lo que favorece una mayor energía libre en el medio y por lo tanto se favorece la formación de la fase beta.
 - 2.3. Tratamiento térmico: Si la reacción no ha logrado obtener pureza de fase beta, el tratamiento térmico supone un aumento de la energía del medio y por lo tanto una evolución de los sistemas en fase alfa a fase beta.

3. Propiedades luminiscentes:

3.1. Morfología: las morfologías que suponen un aumento de la relación superficie volumen permiten una mayor disponibilidad a la excitación de los sensibilizadores y una mayor cercanía entre sensibilizadores y activadores que se traduce en una mayor intensidad luminiscente. Además, en el caso del sistema $\text{NaYF}_4:\text{Yb, Er}$, esto supone un tiempo de vida de los fotones menor que, debido a los niveles energéticos del Er, supone favorecer las emisiones del pico verde o 545 nm, mientras que una reducción de la relación superficie volumen supone un aumento del tiempo de vida de los electrones excitados que favorece su concordancia con los modos fonónicos y de la red y la emisión del pico verde o 660 nm.

3.2. Cristalinidad: En el caso de la cristalinidad, la presencia de la fase beta, al tratarse de una red hexagonal centrada en el cuerpo, favorece la cercanía entre los elementos emisores (lantánidos sensibilizadores y activadores) lo que supone un aumento de la intensidad de luminiscencia.

Tras el conocimiento de las relaciones establecidas se determinó que para los dos sistemas estudiados NaYF₄:Yb, Er y NaYF₄:Yb, Tm, las condiciones de síntesis con las que se obtiene una mayor intensidad de luminiscencia son:

Horno de síntesis: Convencional.

Temperatura de reacción: 230 °C

Tiempo de reacción: 24 horas.

Precursor de la matriz: NH₄F

pH: 5

Tratamiento térmico: No

(2) Evaluación: Los sistemas de emisión espectral up-converters son muy eficientes y estables para la liberación de fármacos. Los resultados obtenidos con la liberación inducida con luz infrarroja (980 nm) del antibiótico Ciprofoxacina y a través de la activación de su oxima-ester como profármaco, son muy prometedores y podrían ser probados in vitro o in vivo en un futuro.

En el caso concreto estudiado, tras el desarrollo y optimización de los SEH, en la sección previa, un análisis del fármaco a utilizar y su profármaco describieron la intensidad de luminiscencia óptima para la liberación del fármaco en la diana.

En este caso la Oxima-ester de la que se liberará el fármaco Ciprofoxacina, absorbe en la región del azul, en la línea 425 nm, línea que coincide con la emisión del SEH NaYF₄:Yb, Tm. Por ello y gracias a la previa optimización de los sistemas y determinó que el sistema óptimo para la liberación del fármaco en la diana sería el sistema denominado como UC₂₄, habiendo sido sintetizado con las condiciones de síntesis consideradas óptimas.

(3) Simulación. Las simulaciones realizadas han permitido determinar las propiedades de los SEH aplicados a en un sistema tumoral dérmico simulado a diferentes profundidades, por medio de la determinación del patrón de colores que permitirá in situ la segmentación y determinación de la profundidad de una determinada lesión.

Esta simulación ha permitido determinar que el mejor STG, se formaría por la combinación de dos SEH, debido a que el sistema NaYF₄:Yb, Er, es una mejor herramienta de segmentación del tumor por su mayor cantidad de líneas de emisión y su mayor intensidad, mientras que el sistema NaYF₄:Yb, Tm supondría una mejor herramienta de tratamiento al contener la línea de emisión que absorbe el profármaco que permite liberar el fármaco ciprofoxacina en la diana concreta.

Como futuras acciones a la presente Tesis Doctoral se encuentran:

- (1) Ensayo ex vivo de los SEH,** prueba en tejido ex vivo de la simulación elaborada en la presente Tesis Doctoral, mediante el uso de tejido ex vivo a las profundidades equivalentes a dermis, epidermis y subdermis.
- (2) Ensayo ex vivo de la liberación de fármacos en una diana.** Prueba en tejido ex vivo de la liberación del fármaco ciprofoxacina, en una diana simulada, en función de los resultados

obtenidos en laboratorio, relativos a la liberación de la CP de su Oxima-éster, mediante la unión al SEH (UC₂₄) y su irradiación con luz infrarroja a 980 nm.

(3) Ampliación de la diana en la liberación de fármacos. En la presente Tesis doctoral, se estudió únicamente el fármaco ciprofoxacina, por ser un potente antibacteriano, que combate los microorganismos situados sobre los procesos tumorales, que consumen la gemcitabina un fármaco muy utilizado en quimioterapia, y por contener las características de absorción y emisión de radiación idóneas para la conjugación con los SEH estudiados. Se propone la ampliación del estudio de fármacos, para ello se deben cumplir los objetivos:

1. Elaborar una base de datos de fármacos que cumplan los requisitos:
 - 1.1. Aumentar la efectividad de los tratamientos contra procesos tumorales.
 - 1.2. Aumentar la disponibilidad del fármaco del tratamiento tumoral en la diana.
 - 1.3. Contener líneas de absorción y emisión en el rango espectral de luminiscencia de los SEH.
 - 1.4. Provenir de un profármaco, derivado del propio fármaco que no sea soluble en fluidos biológicos.
2. Desarrollar y optimizar SEH relativos a los fármacos estudiados, en función de sus espectros de emisión.

(4) Ampliación del proceso tumoral de estudio. En el presente trabajo se optó por el estudio de procesos tumorales dérmicos. En el caso de ampliar el espectro de estudio a procesos tumorales con otras localizaciones, habría que cumplir con los objetivos:

1. Elaborar un patrón de absorción de las líneas de emisión de los SEH teniendo en cuenta músculo y hueso.
2. Desarrollar y optimizar SEH en función del patrón de absorción del hueso y el músculo.
3. Simular la segmentación y localización, de los nuevos procesos tumorales añadidos, en función de los SEH seleccionados y el patrón de absorción de músculo y hueso.

(5) Bioconjugación de los SEH para la deposición selectiva en los procesos tumorales. Es conocido que cada proceso tumoral va acompañado de una relación característica de antígenos, por lo que la bioconjugación del marcador con relaciones específicas de anticuerpos relativos a los antígenos definidos en función del proceso tumoral permitirían descartar o determinar la presencia de un determinado proceso tumoral. Esto permitiría la ampliación de la presente técnica a procesos tumorales diferentes a los dérmicos.

Para ello serán necesarios completar los hitos:

1. Elaborar una base de datos de registro de los antígenos característicos de cada proceso tumoral, con una segmentación de proporciones de antígenos según la zona a estudiar.
2. Sintetizar el bioconjugado SEH-anticuerpo.
3. Simular la señal obtenida en superficie según la localización del proceso tumoral y el SEH seleccionado.
4. Procesar la señal simulada para obtener un diagnóstico por imagen entendible por un profesional médico.

Anexo I

Código de simulación SEH optimizados sobre proceso tumoral dérmico.

Simulación para un tumor situado en epidermis, dermis y subdermis.

Los parámetros de distancia a la superficie varían en función de la colocación del tumor en el tejido.

%Generamos las partículas adheridas al tumor

xyz;

%Cargamos mu y longitudes de onda

Lambdamu;

%Parámetros

I0 = 1;

k = 1;

A = 1;

B = 1;

up = 3.271; %Bomba

% Fórmula de la intensidad

If = @(z,u) (exp(-z.*u).*k.*I0.^2)./(exp(2.*z.*up)+A.*exp(2.*z.*up).*I0+B.*I0^2);

% Fórmulas de RGB

rojo = @(x) 0.3642.*exp(-((x-446.8)/28.07).^2)+1.062.*exp(-((x-596.4)/47.57).^2);

verde = @(x) 1.019.*exp(-((x-559.1)/59.19).^2);

azul = @(x) 1.864.*exp(-((x-450.9)/31.99).^2);

% Nos quedamos con los puntos por debajo de la piel y los ponemos en Ms

Ms = M(M(:,3) > 0,:);

%La matriz de salida tiene tantas filas como partículas y tantas columnas

%como longitudes de onda

Ip = zeros(length(Ms),length(skin_mu));

```
%Color RGB
```

```
C1 = zeros(length(Ms),3);
```

```
C = C1;
```

```
%Primero: calculamos los vectores de densidad espectral de potencia
```

```
for i = 1:length(skin_mu) %Mira que fácil... un solo for
```

```
    Ip(:,i) = If(Ms(:,3),skin_mu(i,2));
```

```
end
```

```
%% prueba
```

```
Lambdav=load('NP3.txt');%habrá que meter el espectro de cada compuesto.
```

```
figure,
```

```
plot(Lambdav(:,1),Lambdav(:,2))
```

```
axis([380 800 0 100])
```

```
Lambda=Lambdav(61:901,:);
```

```
lambdax=380:0.5:800;
```

```
lambdax=lambdax';
```

```
lambday=interp1(Lambda(:,1),Lambda(:,2),lambdax);
```

```
Lambda2i=lambday/norm(lambday);
```

```
Lambda2=zeros(size(lambdax));
```

```
[x2,y2]=find(Lambda2i<=0.03);
```

```
Lambda2(x2,y2)=0;
```

```
[x1,y1]=find(Lambda2i>0.03);
```

```
Lambda2(x1,y1)=1;
```

```
lambdax=lambdax.*Lambda2;
```

```
%Segundo: Producto escalar y normalización;
```

```
for i = 1:length(Ms)
```

```
    C1(i,1) = sum(Ip(i,:).*(rojo(lambdax)'.*Lambda2i'));)
```

```
    C1(i,2) = sum(Ip(i,:).*(verde(lambdax)'.*Lambda2i'));)
```

```

C1(i,3) = sum(Ip(i,:).*(azul(lambdax)'.*Lambda2i'));
% C1(i,1) = sum(Ip(i,:).*rojo(Lambda(:,1))');
% C1(i,2) = sum(Ip(i,:).*verde(Lambda(:,1))');
% C1(i,3) = sum(Ip(i,:).*azul(Lambda(:,1))');

C(i,1) = C1(i,1)./(C1(i,1)+C1(i,2)+C1(i,3));
C(i,2) = C1(i,2)./(C1(i,1)+C1(i,2)+C1(i,3));
C(i,3) = C1(i,3)./(C1(i,1)+C1(i,2)+C1(i,3));
end

%Tercero: Montamos matriz X Y Z R G B
M_RGB = [Ms, C];

%Pintamos un scatter plot tal como se vería en una habitación oscura
%(esperaba colores brillantes, algo está mal)
fig = figure;
axes1 = axes('Parent',fig,'Color',[0 0 0]);
hold(axes1,'on')
scatter(M_RGB(:,1),M_RGB(:,2),25,M_RGB(:,4:6),'filled');

%% figure,
s=50;
n = 50;
z0=0;
while z0<1
z0 = z0-0.01;
[Xe,Ye,Ze]=ellipsoid(-1,-1,-z0,0.4,0.2,1,n);
figure
S=surf(Xe, Ye, Ze);
set(S,'Facecolor',[1,0.4,0.4]);
%rotate(S,[1 1 0],45)

```

```
%, 'EdgeColor', 'none'  
hold on  
xp = [-1.5 -0.5; -1.5 -0.5];  
yp = [-1.5 -1.5; -0.5 -0.5];  
zp = [ 0 0; 0 0];  
p=surf(xp,yp,zp);  
set(p,'Facecolor',[1,0.7,0.6]);  
set(gca,'YLim',[-1.5,-.5],'XLim',[-1.5,-0.5],'ZLim',[-3,0.5]);  
hold on  
scatter(M_RGB(:,1),M_RGB(:,2),100,M_RGB(:,4:6),'filled');  
end
```

Bibliografía

- a. K. (2015). An experimental desing approach for hydrothermal synthesis of NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ upconversion microcrystal: UV emission optimization. *Optical Materials*, 255-256.
- A. M. Pires, O. A. (2005). Morphological and luminescent studies on nanosized Er, Yb-Yttrium oxide up-converter prepared from different precursors. *Journal of luminescence*, 174-182.
- A. Yanes, A. S.-A.-R.-C. (2009). Yb³⁺, Er³⁺ co-doped sol-gel transparent nano-glass-ceramics containing NaYF₄ nanocrystals for tuneable up-conversion phosphors. *Journal of alloys and compounds*, 706-710.
- Abel., M. (2014). Matlab: Lenguaje de programación. *Createspace Independent Pub*.
- Alexandre A. Arnold, V. T. (2013). Structure of NaYF₄ upconverting nanoparticles: A multinuclear solid-state NMR and DFT computational study. *Physical Chemistri*, 25733-25741.
- Alexandre A. Arnold, V. T. (2013). Structure of Nayf₄ upconversion nanoparticles: a multinuclear solid-state NMR and DFT computational study. *The journal of physical chemistry*, 25733-25741.
- Andrew M. Smith, M. C. (2009). Second window for in vivo imaging. *Nature Nanotechmology*, 710-711.
- Andrew M. Smith, M. C. (2009). Second window for in vivo imaging. *Nature nanotechnology*, 710-711.
- Arsenault, G. A. (n.d.). *Nanochemistry. A chemical approach to nanomaterials*. 2005: RSC. Publishing.
- Artur Podhorodecki, M. B. (2012). Multicolor light emitters base don energy exchange between Tb and Eu ions co-doped into ultrasmall beta NaYF₄ nanocrystals. *Journal of Materials Chemistry*, 5356.
- Atul P Sherje, M. J. (n.d.).
- Atul P Sherje, M. J. (2018). Dendrimers: A versatile nanocarrier for drug delivery and targeting. *International Journal of pharmaceutics*.
- Bril, J. S. (1974). Phosphors for the conversion of infrared radiation into visible light. *Philips Tech. Rev.*, 1-32.
- C A Lipinski, F. L. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv drug delivery Review*, 3-26.
- C. Dong, A. K. (2012). Cation exchange: a facile method to make NaYF₄:Yb, Tm-NaGdF₄ core shell nanoparticles with a thim, tunable and uniform shell. *Chemistry of materials*, 1297-1305.

- C.Ameta, R. M. (2018). Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment. *Academic Press*, 135-175.
- Chemocare. (2021, 11 10). *Chemocare*. Retrieved from <https://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/gemcitabina.aspx>
- Chenghui Liu, H. W. (2009). Monodisperse, size-tunable and highly efficient beta NaYF₄:Yb,Er upconversion luminescent nanospheres: controllable synthesis and their surface modifications. *Journal of Materials chemistry*, 3546-3555.
- Chow, G. S. (2006). Synthesis of Hexagonal-phase NaYF₄:Yb,Er and NaYF₄:Yb,Tm nanocrystals with efficient upconversion fluorescence. *Advanced functional materials*, 2324-2329.
- Chow, G. S. (2006). Synthesis of Hexagonal-Phase NaYF₄:Yb,Er and NaYF₄:Yb,Tm nanocrystals with efficient up-conversion fluorescence. *Advanced functional materials*, 2324-2329.
- Christopher J. H. Porter, N. L. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews*, 231-248.
- Chunxia Li, J. Y. (2007). Different microstructures of beta-NaYF₄ fabricated by hydrothermal process: Effects of pH values and fluoride sources. *Chemical Materials*, 4933-4942.
- Chunxia Li, Z. Q. (2007). Highly uniform and monodisperse beta-NaYF₄:Ln³⁺ (Ln=Eu,Tb, Yb/Er and Yb/Tm) hexagonal microprisms crystal: Hydrothermal synthesis and luminescent properties. *Inorganic Chemistry*, 6329-6337.
- Conbing Tan, Y. L. (2011). Influence of carbon templates and Yb³⁺ concentration on red and green luminescence of uniform Y₂O₃:Yb,Er hollow microspheres. *Journal of luminescence*, 1198-1202.
- Costantino Del Gaudio, V. C. (n.d.).
- Costantino Del Gaudio, V. C. (2017). Natural polymeric microspheres for modulated drug delivery. *Materials Science and engineering*, 408-417.
- Cotton, S. (2006). *Lanthanide and Actinide Chemistry*. John Wiley & Sons.
- Cunhai Dong, A. K. (2012). Cation Exchange: A facile method to make NaYF₄:Yb, Tm- NaGdF₄ core shell nanoparticles with a thin tunable and uniform shell. *chemistry of materials*, 1297-1.
- D. Yang, C. L. (2011). Coloidal synthesis and remarkable enhancement of the upconversion luminescence of BaGdF₅:Yb³⁺/Er³⁺ nanoparticles by active-shell modification. *Journal of materials chemistry*, 5923-5927.
- Datao Tu, Y. L. (2013). Breakdown of crystallographic site symmetry in lanthanide-doped NaYF₄ crystals. *Angewandte Communications*, 1128-1133.
- David Böhme, A. G.-S. (2015). Drug delivery and release systems for targeted tumor therapy. *Journal of peptide science*, 186-200.
- David Brian Williams, D. B. (1996). *Transmission electron microscopy: A textbook for materials science*. Springer.
- David J. Brenner, a. E. (2007). Computed tomography an increasing source of radiation exposure. *New England Journal of Medicine*, 2277-2283.

- Demazeau, G. (1999). Solvothermal processes: a route to the stabilization of new materials. *Journal of Material Chemistry*, 5-18.
- Dongmei Yang, C. L. (2011). Colloidal synthesis and remarkable enhancement of the upconversion luminescence of BaGdF₅:Yb³⁺/Er³⁺ nanoparticles by active-shell modification. *Journal of materials chemistry*, 5932.
- f. Wang, R. D. (2011). Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles. *Nature materials*, 968-973.
- F. Wang, R. D. (2011). Tuning upconversion through energy migration in core-shell nanoparticles. *Nature Materials*, 968-973.
- F. Wang, X. L. (2008). Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near-infrared emission from lanthanide-doped NaYF₄ nanoparticles. *Journal of the american chemical society*, 5642-5643.
- F. Wang, Y. H. (2010). Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping. *Nature*, 1061-1065.
- Feng Duan, Y. C. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 1551-1561.
- Feng Wang, Y. H. (2010). Simultaneous phase and size control of upconversion nanocrystals through lanthanide doping. *Nature*.
- Fernando Echeverri L., J. J. (2019, abril-junio). Los lantánidos: ni tierras ni raras. Medellín, Colombia.
- Fiorenzo Vetrone, J. C. (2003). Effect of Yb³⁺ Codoping on the upconversion emission in nanocrystalline Y₂O₃:Er³⁺. *The journal of physical chemistry*, 1107-1112.
- Fiorenzo Vetrone, J.-C. B. (2003). Concentration-dependent near-infrared to visible upconversion in nanocrystalline and bulk Y₂O₃:Er³⁺. *Chemical Materials*, 2737-2743.
- Fiorenzo Vetrone, V. M. (2009). Near-infrared-to-blue upconversion in colloidal NaYF₅:Tm³⁺,Yb³⁺ nanocrystals. *Chemical Materials*, 1847-1851.
- G. Yi, H. L. (2004). Synthesis, characterization and biological application of size controlled nanocrystalline NaYF₄:Yb,Er infrared-to-visible up-conversion phosphors. *Nano letters*, 2191-2196.
- Gejihu De, W. Q. (2005). Bright-green upconversion emission of hexagonal LaF₃:Yb,Er nanocrystals. *Chemistry Letters*, 914-915.
- Gilat, A. (2006). *Matlab: Introducción con ejemplos prácticos*. Reberté.
- Gogotsi, Y. (2006). *Nanomaterials Handbook*. Taylor & Francis Group.
- Gomez-Mendoza M., M. M. (2012). Dansyl-labeled cholic acid as a tool to build speciation diagrams for the aggregation of bile acids. *J. Phys. Chem*, 14776-14780.
- Gomez-Mendoza, M. M. (2011). Dansyl derivatives of cholic acid as tools to build speciation diagrams for sodium cholate aggregation. *J. Phys. Chem*, 782-785.

- Gomez-Mendoza, M. M. (2016). Photoactive bile salts with critical micellar concentration in the micromolar range. *Phys. Chem*, 12976-12982.
- Gomez-Mendoza, M. N. (2012). Photophysical probes to assess the potential of cholic acid aggregates as drug carriers. *Journal Phys. Chem*, 10213-10218.
- Guangshun Yi, H. L.-H. (2004). Synthesis, characterization and biological application of size-controlled nanocrystalline beta NaYF₄:Yb,Er infrared-to-visible upconversion phosphor. *Nano letters*, 2191-2196.
- Guanying Chen, H. Q. (2014). Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry and applications in theranostics. *Chemical Reviews*, 5161-5214.
- Guanying Chen, H. Q. (2015). Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry and applications in theranostics. *Chemical reviews*, 5161-5214.
- Guanying Chen, T. Y. (2010). Ultrasmall monodisperse NaYF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ nanocrystals with enhanced near-infrared to near-infrared upconversion photoluminescence. *ACS NANO*, 3163-3168.
- Guarav Tiwari, R. T. (2012). Drug delivery systems: An update review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2-11.
- Guerra, S. M. (n.d.). *Microscopía electrónica de transmisión y difracción de electrones de polímeros*. Universidad politécnica de Cataluña.
- Hailong Qiu, G. C. (2011). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-controlled synthesis of multicolor lanthanide doped BaYF₅ upconversion nanocrystals. *Journal of Materials Chemistry*.
- Haisheng He, Y. L. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 36-48.
- Heidenreich, R. D. (1964). *Fundamentals of transmission electron microscopy*.
- Hong Wang, T. J. (2015). Up-conversion luminescence of Y₂O₃:Yb,Er under 1.55 micrometros excitation. *Ceramics international*, 259-263.
- Hon-Tung Wong, F. V. (2011). Water dispersible ultrasmall multifunctional KGdF₄:Tm³⁺,Yb³⁺ nanoparticles with near-infrared to near-infrared upconversion. *Journal of materials Chemistry*.
- J. Chen, J. X. (2012). Upconversion nanomaterials: synthesis, mechanisms, and applications in sensing. *Sensors*, 2414-2435.
- J. Wang, F. Wang, C. Wang, Z. Liu, X. Liu. (2011). Single-band upconversion emission in lanthanide-doped KMnF₃ nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition*, 10369-10372.
- J. Zhuang, L. L. (2007). Controlled hydrothermal growth and up-conversion emission of NaLnF₄ (Ln= Y, Dy-Yb). *Inorganic chemistry*, 5404-5410.
- Jain, D. &. (2008). Comparison of ciprofloxacin hydrochloride-loaded protein, lipid and chitosan nanoparticles for drug delivery. *Journal Biomedical Materials*, 105-112.

- James P. B. O'Connor, E. O. (2016). Imaging biomarker roadmap for cancer studies. *Nature Reviews. Clinical oncology*, 169-185.
- Jan Sobczykński, B. C.-R. (2018). Chapter 9 - Mixed micelles as drug delivery nanocarriers. *Design and development of new nanocarriers*, 331-364.
- Jayanta Kumar Patra, G. D.-T.-T.-T. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of nanobiotechnology*.
- Jiaojiao Din, Y. S. (2017). Enhanced blood-brain barrier transport of vincapocetine by oral delivery of mixed micelles in combination with a message guider. *Journal Drug Target*, 532-540.
- Jing Leng, J. T. (2018). Impact of pH and urea content on size and luminescence of upconverting Y₂O₃:Yb,Er nanophosphors. *Materials research bulletin*, 171-177.
- Jing Li, Z. H. (2013). Hydrothermal synthesis and upconversion luminescence properties of beta-NaGdF₄:Yb³⁺/Tm³⁺ and beta-NaGdF₄:Yb³⁺/Ho³⁺ submicron crystals with regular morphologies. *Journal of Colloidal and interface science*, 206-212.
- Jing Zhou, X. Z. (2012). Water-stable NaLuF₄ based upconversion nanophosphors with long-term validity for multimodal lymphatic imaging. *Biomaterials*, 6201-6210.
- Joaquín Costa Subías, J. A. (2021). *Resonancia Magnética dirigida a técnicos superiores en imagen para el diagnóstico*. El sevier.
- John-Christopher Boyer, F. V. (2006). Synthesis of colloidal upconverting NaYF₄ nanocrystals doped with Er³⁺, Yb³⁺ and Tm³⁺, Yb³⁺ via thermal decomposition of lanthanide trifluoroacetate precursors. *JACS communications*, 7444-7445.
- Joseph I. Goldstein, D. E. (n.d.). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer.
- Juan Wang, F. W. (2011). Single-band upconversion emission lanthanide-doped KMnF₃ nanocrystals. *Angew Chemical.*, 10369-10372.
- Juayan Liao, Z. Y. (2015). Preparation and upconversion emission modification of Crystalline colloidal arrays and rare earth fluoride microcrystals composites. *Scientific Reports*.
- Jung-Hui Zeng, J. S.-H.-u.-D. (2005). Synthesis and upconversion luminescence of Hexagonal-phase beta NaYF₄:Yb,Er phosphors of controlled size and morphology. *Advanced Materials*, 2119-2123.
- Karl W. Kramer, D. B. (2004). Hexagonal sodium yttrium fluoride based green and blue emitting upconversion phosphors. 1244-1251.
- Keith L. Moore, A. F. (2006). *Anatomía con orientación clínica*. Panamericana.
- Keith L. Moore, A. M. (2003). *Fundamentos de anatomía con orientación clínica*. Panamericana.
- Lakowicz, J. R. (1999). *Introduction to fluorescence*. Springer.
- Laura Martínez Maestro, E. C.-G.-O.-B. (2014). Gold nanorods for optimized photothermal therapy: the influence of irradiating in the first and second biological windows. *Royal Society of Chemistry*, 54122-54129.

- Laura Martínez Maestro, P. H.-G.-R. (2013). Heating efficiency of multi-walled carbon nanotubes in the first and second biological windows. *Nanoscale*.
- Le-le Li, R. Z. (n.d.). Biomimetic surface engineering of lanthanide-doped upconversion nanoparticles as versatile vioprobes.
- Leore T. Geller, M. B.-R. (n.d.).
- Leore T. Geller, M. B.-R. (2017). Potential role of intratumor bacteria in mediating tumor resistance to the chemotherapeutic drug gemcitabine. *Science*, 1156-1160.
- Li, L. W. (2007). Controlled synthesis and luminescence of lanthanide doped NaYF₄ nanocrystals. , 727-734.
- Li, L. W. (2007). Controlled Synthesis and Luminescence of Lanthanide Doped NaYF₄ nanocrystals. *Chemical Materials*, 727-734.
- Liang Cheng, A. K. (2016). Dual-Modality Positron Emission Tomography/Optical Image-Guided Photodynamic Cancer Therapy with Chlorin e6-Containing Nanomicelles. *ACS NANO*, 7721-7730.
- Liangliang Dai, J. L. (2016). Tumor therapy: targeted drug delivery systems. *Journal of materials chemistry B*.
- Lihong V. Wang and Hsin-I W. (2007). *Biomedical Optics: Principles and imagin*. Wiley and Sons.
- Lili Wang, Z. L. (2011). Upconversion emissions from high-energy states of Eu³⁺ synthesized by Yb³⁺ and Ho³⁺ in beta NaYF₄ microcrystals under 980 nm excitation. *Optical society of America*.
- Liu., F. W. (2008). Upconversion multicolor fine-tuning: visible to near infrared emission from lanthanide-doped NaYF₄ nanoparticles. *JACS*, 5642-5643.
- M A Hammad, B. W. (1998). Increasing drug solubility by means of bile salt-phosphatidylcholine-based mixed micelles. *Eur. J. Pharm Biopharm*, 7-361.
- M, N. (n.d.).
- M. Lin, Y. Z. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 1551-1561.
- M. R. N. Soares, M. F. (2015). Upconversion luminescence and blackbody radiation in tetraona YSZ co-doped with Tm³⁺ and Yb³⁺. *Nanoscale*, 1-3.
- M. Wang, G. A. (2011). Upconversion nanoparticles: synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine*, 710-729.
- M. Wang, Y. Z. (2015). Synthesis of NIR-responsive NaYF₄:Yb,Er upconversion fluorescent nanoparticles using an optimized solvothermal method and their applications in enhanced development of latent fingerprints on various smooth substrates. *Langmuir*, 7084-7090.
- Magnan, P. (2003). Detection of visible photons in CCD and CMOS: A comparative view. *Nuclear instrumentes & methods in physics research*, 199-212.

- Mandana T. Manzari, Y. S. (2021). Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nature reviews materials*, 351-370.
- Masoume Kaviani Darni, S. B. (2015). An experimental design approach for hydrothermal synthesis of NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺ upconversion microcrystal: UV emission optimization. 255-265.
- Mauricio Wilches Zúñiga, L. F. (2007). *Bioingeniería VI. Fundamentos de instrumentación para la clínica sanitaria y las radiaciones ionizantes*. Universidad de Antioquia.
- Men Wang, C.-C. M.-H.-F.-R.-B.-K. (2009). Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using NaYF₄:Yb,Er upconversion nanoparticles. *ACS NANO*, 1580-1586.
- Meng He, P. H. (2011). Dual Phase-controlled synthesis of uniform lanthanide-doped NaGdF₄ upconversion nanocrystals via an OA/ionic liquid Two-phase system for in vivo dual-modality imaging. *Advanced Functional Materials*, 4470-4477.
- Meng Wang, G. A. (2011). Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications. *Nanotechnology, biology and medicine*, 710-729.
- Meng Wang, J.-L. L.-X.-L.-K. (2009). Two-Phase solvothermal synthesis of rare-earth doped NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. *Materials letters.*, 325-327.
- Mesorana, P. D. (n.d.). *Lecciones de espectrofotometría aplicada a la medicina*. 1945.
- Michael J. Mitchell, M. M. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature reviews*, 101-124.
- Min Lin, Y. Z. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology advances*, 1551-1561.
- Min Lin, Y. Z. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology Advances*, 1551-1561.
- Min Lin, Y. Z.-F. (2012). Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications. *Biotechnology advances.*, 1551-1561.
- Mine Silindir Gunay, A. Y. (n.d.).
- Mine Silindir Gunay, A. Y. (2016). Drug delivery systems for imaging and therapy of parkinson's disease. *Curr. Neuropharmacology*, 376-391.
- Moeller, T. (1994). *Química inorgánica*. Reverté S.A.
- N.Menyuk, K. K. (1972). NaYF₄:Yb,Er - an efficient upconversion phosphor. *Applied Physics Letters*.
- Na Niu, F. H. (2012). Rapid microwave reflux process for the synthesis of pure hexagonal NaYF₄:Yb³⁺, Ln³⁺, Bi³⁺ (Ln³⁺=Er³⁺,Tm³⁺,Ho³⁺) and its enhanced UC luminescence. *Journal of materials chemistry*, 2163.

- Nuin, E. G.-M. (2013). Influence of drug encapsulation within mixed micelles on the excited state dynamics and accessibility to ionic quenchers. *Journal Physics Chemical*, 9327-9332.
- Nuin, E. G.-M. (2013). New Photoactive compounds to probe cholic Acid and Cholesterol inside Mixed micelles. *Organic Letters*, 298-301.
- Oscar Reinoso García, L. M. (n.d.). *Matlab: Conceptos básicos y descripción básica*. Universidad Miguel Hernández.
- Oxtoby, D. X. (1992). Homogeneous nucleation: Theory and experiment. *Journal of Physics*, 7627-7650.
- P. Ptacek, H. S. (2007). Crystal phase control of luminescing alfa-NaGdF₄:Eu³⁺ and Beta-NaGdF₄:Eu³⁺ nanocrystals. *Advanced functional materials*, 3845-3848.
- Pavel Zrazhevskiy, X. G. (2009). Multifunctional quantum dots for personalized medicine. *Nano Today*, 414-428.
- Pedro Antonio Carrión Pérez, J. R. (2006). *Ingeniería Biomédica. Imágenes médicas*. Ediciones de la universidad de Castilla la Mancha.
- Piguet, J.-C. G. (2005). Taking advantage of luminescent lanthanide ions. *Chemical Society Reviews*, 1048-1077.
- Q. Liu, Y. S. (2011). Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 17122-17125.
- Qian Liu, Y. S. (2011). Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging in vivo. *JACS*, 17122-17125.
- Qipeng Lu, Y. H. (2014). Controlled synthesis and defect dependent upconversion luminescence of Y₂O₃:Yb,Er nanoparticles. *Journal of Applied Physics*.
- R. Dapoor, C. F. (2000). Highly efficient infrared-to-visible energy upconversion in Er³⁺:Y₂O₃. *Optical Letters*, 338-340.
- Radiology, E. s. (2010). White paper on imaging biomarkers. *Springer*.
- Ravid Straussman, T. M.-R. (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature*, 500-504.
- Reese, H. L. (2014). *Gemcitabine*. Nova biomedical.
- Reimer, L. (1998). *Scanning Electron Microscopy: Physics of image formation and microanalysis*. Springer.
- Rianne Batelds, M. H. (2012). Niosomes, an alternative for liposomal delivery. *Plos one*, 10213-10218.
- Richard G. Abramson, K. R.-P.-L. (2014). Methods and challeges in quantitative imaging biomarkers development. *National institutes of Health*.
- Robert E. Bailey, A. M. (2004). Quantum dots in biology and medicine. *Physica E*, 1-12.

- Rodriguez- Muñiz, G. M. (2017). Snorkelling vs diving in mixed micelles probed by means of a molecular bathymeter. *Org. Biomol. Chem*, 10281-10288.
- S. G. Antimisiaris, A. M. (2021). Overcomeng barriers by local drug delivery with liposomes. *Advanced drug delivery reviews*, 53-86.
- S. Sanders, R. G. (1995). Laser diode pumped 106 mW blue upconversion fiber laser. *Applied Physics letters*, 1815-1816.
- Sallee, G. H. (1967). *Química cuantitativa*. Reberté.
- Sands, D. E. (1993). *Introducción a la cristalografía*.
- Sanjay Kumar, A. D. (2019). Functionalized gold nanostructures: promising gene delivery vehicles in cancer treatment. *RSC Advances*, 23894-23804.
- Schwarz, E. J. (1962). Organometallic compounds as possible laser materials. *Nature*, 832-833.
- Shu-Nan Shan, X.-Y. W.-Q. (n.d.). Synthesis of NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconversion nanoparticles in normal microemulsions. *Nanoscale Research Letter*.
- Sngsik Park, H. U. (2002). High-sensitivity CCD image sensor using capcitive-inverted-feedbac source-follower circuit. *Journal of the Korean Physical Society*, 547-551.
- Sonal Mazumder, R. D. (2009). Review: Biofunctionalized Quantum Dots in Biology and Medicine. *Journal of Nanomaterials*.
- Songjun Zeng, G. R. (2011). High uniformity and monodispersity of sodium rare-earth fluoride nanocrystales: conrollable synthesis, shape evolution and optical properties. *Crystal engennering communications*, 1384-1390.
- Songjun Zeng, J. X. (2012). Bi-functional NaLuF₄:Gd³⁺,Yb³⁺,Tm³⁺ nanocrystals:Structure controlled synthesis, near-infrared upconversion emission and tunable magnetic properties. *Journal of materials chemistry*, 9870.
- Songjun Zeng, M.-K. T.-F.-L. (2012). PEG modified BaGdF₅:Yb,Er nanoprobos for multi-modal upconversion fluorescent in vivo X-ray computed tomography and biomagnetic imaging. *Biomaterials.*, 9232-9238.
- Sri Sivakumar, P. R. (2012). Silica-coated Ln³⁺ doped LaF₃ nanoaprticles Robust Down and Upconverting Biolabels. *Chemistry An European Journal.*, 5878-5884.
- Torchilin, V. P. (2006). Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu Rev. Biome Eng*.
- Uéslen Rocha, K. U. (2014). Nd³⁺ doped LaF₃ nanoparticles as self-monitored photo-hermal agents. *Applied physics letters*.
- Vetrone, D. J. (2012). Luminescence nanothermometry. *Nanoscale*, 4.
- Vikas Jain, S. J. (2015). Nanomedicines based drug delivery systems for anticancer targeting and treatment. *Curr. Drug Delivery*, 91-177.
- Vollath, D. (2013). *Nanomaterials: An introduction to synthesis properties and applications*. Wiley-vch.

- Vruti Patel, C. R. (2020). Dendrimers as novel drug-delivery system and its applications. *Drug delivery systems*, 333-392.
- W. Qin, D. Z. (2010). Nearinfrared photocatalysis based on YF₃:Yb³⁺, Tm³⁺/TiO₂ cores/shell nanoparticles. *Chemical communications*, 2304-2306.
- Wormald, J. (1979). *Métodos de difracción*. Reverté.
- X. Wang, J. Z. (2005). A general strategy for nanocrystals synthesis. *Nature*, 121-124.
- Xiaji Xie, N. G.-H. (2013). Mechanistic investigation of photon upconversion in Nd³⁺ sensitized core-shell nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 12608-12611.
- Xian Chen, D. P. (2014). Photon upconversion in core-shell nanoparticles. *Chemical Society Review*.
- Xiaofeng Yang, X. D. (2009). Glycine-assisted hydrothermal synthesis of single-crystalline LaF₃:Eu³⁺. *Journal of Alloys and Compounds*, 298-303.
- Xiaohua Huang, M. A.-S. (2011). Plasmonic photo-hermal therapy(PPTT). *Alexandria journal of medicine*, 1-9.
- Xun Chen, W. W. (2009). Microwave hydrothermal synthesis and upconversion properties of NaYF₄:Yb³⁺+Tm³⁺with microtube morphology. *Materials Letters*, 1023-1026.
- Y. Liu, D. T. (2010). A strategy to achieve efficient dual-mode luminescence of EU³⁺ in lanthanides doped multifunctional NaGdF₄ nanocrystals. *Advanced Materials*, 3266-3271.
- Y. Tang, W. D. (2013). NIR-resposie photocatalytic activity and mechanism of NaYF₄:Yb, Tm/TiO₂ core-shell nanoparticles. *ACS Catalisys*, 405-412.
- Yan Ma, M. C. (2015). Hydrothermal synthesis of hydrophilic NaYF₄:Yb,Er nanopartciles with bright upconversion luminescence as biological label. 22-25.
- Yang R., F. Y.-D.-M. (2003). Medium effects on fluorescence of ciprofloxacin hydrihloride. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2723-2732.
- Yang. R., F. Y. (2003). Medium effects on fluorescence of ciprofloxacin hydrochloride. *Spectrochim* , 2723-2732.
- Ying Tian, Y. F. (2015). Upconversion Luminescence Properties of Y₂O₃:Yb,Er and Y₂O₂S:Yb,Er nanoparticles prepared by complex precipitation. *Journal of nanomaterials*, 1-7.
- Yongsheng Liu, D. T. (2010). A stratify to achieve efficient dual mode luminescence of Eu³⁺ in lanthanides doped multifunctional NaGdF₄ nanocrystals. *Advanced Materials*, 3266-3271.
- Yongsheng Liu, D. T. (2013). Lanthanide doped luminescent nanoprobos: cotroled synthesis optical spectroscopy and bioapplications. *Chemical society Review*, 6924.
- Youqing Shen, H. T. (2008). pH-responsive nanoparticles for cancer drug delivery. *Methods Mol Biol*, 183-216.

- Yuhui Wng, R. C. (2011). Controlled Synthesis of NaYF₄:Yb,Er nanocrystals with upconversion fluorescence via a facile hydrothermal procedure in aqueous solution. *The royal society of chemistry*.
- Yunfei Shang, S. H. (2015). Synthesis of upconversion beta-NaYF₄:Nd³⁺/Yb³⁺/Er³⁺ particles with enhanced luminescent intensity through control of morphology and phase. *Nanomaterials*, 2079-4991.
- Zhai B, Z. Y. (2018). Drug delivery systems for elemene, its main active ingredient β -elemene, and its derivatives in cancer therapy. *International journal nanomedicine*, 6279-6296.
- Zhang, R. A. (2008). Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. *Biomaterials*, 4122-4128.
- Zhang., H.-S. Q. (2008). Synthesis of hexagonal phase core-shell NaYF₄ nanocrystals with tunable upconversion fluorescence. *Langmuir*, 12123-12125.