



Universidad Zaragoza

ESCUELA DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA
Departamento de Ciencia y Tecnología de Materiales y
Fluidos

TRABAJO FIN DE MÁSTER

***Efecto de la agregación en las propiedades magnéticas de
nanopartículas de magnetita recubiertas con dextrano***

DAVID HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

ZARAGOZA, 2016

Índice

1. Introducción	4
2. Materiales, metodología e instrumentación	8
<u>2.1. Materiales</u>	8
<u>2.2. Metodología e instrumentación</u>	11
3. Resultados, interpretación y discusión	12
<u>3.1. Serie DANS-H</u>	12
<u>3.1.1. TEM</u>	12
<u>3.1.2. Magnetización</u>	13
<u>3.1.3. Susceptibilidad magnética AC</u>	14
<u>3.1.4. Interacciones interpartícula mediante el factor pre-exponencial τ_0</u>	16
<u>3.2. Serie DBNS-H</u>	19
<u>3.2.1. TEM</u>	19
<u>3.2.2. Magnetización</u>	20
<u>3.2.3. Susceptibilidad magnética AC</u>	21
<u>3.2.4. Interacciones interpartícula mediante el factor pre-exponencial τ_0</u>	23
<u>3.3. Serie DMSA-NP, DEXT-NP y APS-NP</u>	24
<u>3.3.1. TEM</u>	24
<u>3.3.2. Susceptibilidad magnética AC</u>	25
4. Conclusiones	28
Apéndice 1	29
Apéndice 2	33
Apéndice 3	34
Referencias	35

1. Introducción

La nanotecnología es una rama multidisciplinar de la ciencia que abarca numerosos campos, incluyendo biomedicina, farmacia, ingeniería agrícola, ciencias ambientales, ciencia de materiales, química, física, electrónica y tecnología de la información, entre otros. En biomedicina, los materiales a escala nanométrica son de gran importancia debido a su tamaño, estando en el mismo orden de magnitud que virus (20-450 nm), proteínas (5-50 nm) y genes (2 nm de ancho por 10-100 nm de largo). Los nanomateriales son suficientemente pequeños para moverse por el interior del cuerpo sin alterar las funciones fisiológicas y poder acceder a las zonas que son inaccesibles para otros materiales. Las células pueden reaccionar en presencia de nanomateriales y estas reacciones pueden inducir cambios en células, incluyendo el crecimiento celular o la muerte.¹

Uno de los nanomateriales más estudiados para aplicaciones biomédicas son las nanopartículas magnéticas (MNPs): estructuras que consisten en un núcleo magnético encapsulado con un recubrimiento orgánico o polimérico. Sin el recubrimiento, las MNPs tienen superficies con una gran relación superficie/volumen que tienden a la agregación.¹ Las MNPs exhiben una variedad de fenómenos magnéticos únicos y que son diferentes de aquellos de sus homólogos 'bulk', por ello están generando un interés significativo, ya que sus propiedades pueden ser utilizadas en una gran variedad de aplicaciones, que van desde dispositivos de memoria para el almacenamiento de la información digital a sondas y vectores utilizados en biomedicina.¹

El recubrimiento de la superficie de las MNPs proporciona abundantes sitios químicamente activos para la conjugación con biomoléculas, permitiendo de esta manera el diseño preciso para lograr las funciones que se les exija a los nanomateriales, como elevados tiempos de circulación a través del torrente sanguíneo, acumulación en un lugar específico para reparar un tejido dañado, y la liberación de fármacos de manera localizada y controlada. Sus propiedades magnéticas capacitan a las MNPs para ser utilizadas en numerosas aplicaciones relacionadas con el diagnóstico y la terapia.¹⁻⁵

Entre los muchos tipos de MNPs, las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIOs, por sus siglas en inglés), han sido investigadas intensamente para aplicaciones biomédicas.²⁻⁵ Las SPIOs han sido investigadas como agentes de contraste^{6, 7} para pruebas diagnósticas de Imagen por Resonancia Magnética (MRI), biosensores⁸ y terapia⁹ (**Figura 1**). Por ejemplo, SPIOs (como Feridex®) son rápidamente absorbidos por el sistema retículo-endotelial y son eficazmente utilizadas para detectar lesiones tumorales en el hígado. Por el contrario, las nanopartículas superparamagnéticas ultra-pequeñas de óxido de hierro (USPIOs, por sus siglas en inglés) que son más pequeñas que 50 nm pueden escapar a la fagocitosis y aumentar el tiempo de circulación por el organismo. De esta manera, son capaces de alcanzar los nodos linfáticos, los sitios de inflamación y los tumores.⁹ Las aplicaciones terapéuticas de las nanopartículas de óxido de hierro muestran nuevas posibilidades para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, las nanopartículas magnéticas generan eficientemente calor cuando externamente se aplican campos magnéticos alternos para inducir la muerte de las células cancerígenas, con un daño mínimo al tejido sano circundante. Este tipo de terapia basada en la hipertermia ya ha sido aprobado en Europa.¹⁰ Igualmente, las nanopartículas magnéticas también se pueden utilizar para la liberación de fármacos guiados mediante fuerzas magnéticas con una gran eficacia.

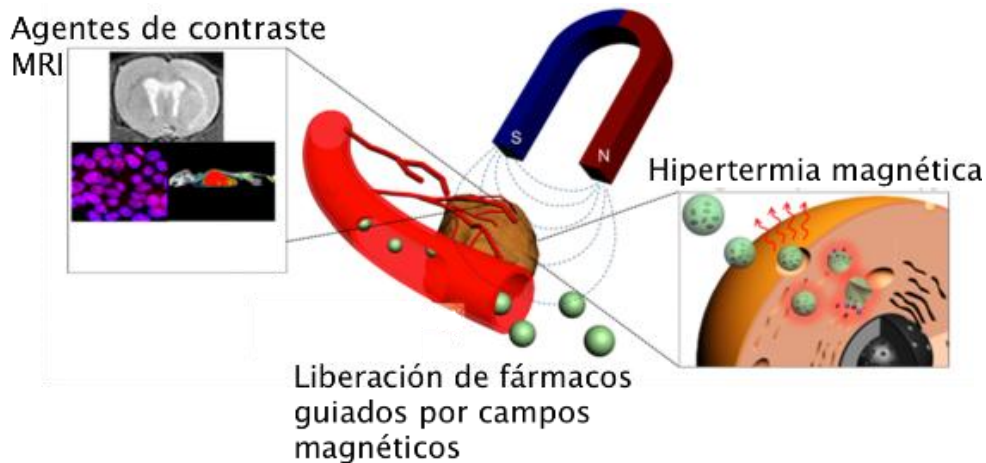


Figura 1. Las nanopartículas magnéticas son una plataforma para diagnóstico y terapia. Agentes de contraste para imagen, liberación de fármacos de manera localizada y controlada, e hipertermia son logrados gracias a las MNPs. Figura tomada de la Ref. [9].

Debido al hecho de que las MNPs pueden ser utilizadas tanto para diagnósticos como para terapia, son considerados excelentes nano-sistemas con aplicaciones teragnósticas.^{5,9}

Se está produciendo un gran desarrollo en biosensores basados en tecnologías con nanopartículas magnéticas. Son los llamados POCs,⁸ diagnóstico en el punto de atención (point-of-care, en inglés). Comparado con otras metodologías, éstos permiten el análisis de muestras “sucias”; es decir, sin purificación o muy básica. Esto es posible, porque las muestras de tejidos humanos tienen un magnetismo relativamente bajo respecto a otros materiales. Ya que las medidas pueden ser directamente hechas en, virtualmente, cualquier fluido corporal o muestra sólida, se elimina la potencial pérdida de muestra y se acelera el análisis. Combinado con las tecnologías de detección genética, como la PCR (del inglés, Polymerase Chain Reaction), las posibilidades analíticas son innumerables.⁸

Se cree que hay ciertos desarrollos futuros que podrían hacer que las tecnologías de detección magnéticas fueran incluso más potentes como son: detección temprana de enfermedades donde se pueden salvar vidas y los tratamientos son asequibles, detección de otras enfermedades aparte de cáncer e infecciones, el uso en productos de la agricultura y el agua, aplicaciones donde la separación magnética y el análisis estén integrados en un único chip, y sensores multifuncionales combinando magnetismo y otras modalidades. Serán las aplicaciones específicas las que guiarán hacia la necesidad de nuevas características de las nanopartículas magnéticas.⁸

Muchas aplicaciones biomédicas de las MNPs confían en el uso de nanopartículas de óxido de hierro, por el simple hecho de que los organismos poseen los mecanismos metabólicos necesarios para el almacenamiento de hierro, de una manera segura, para un su uso posterior.¹¹ El óxido de hierro puede existir en diferentes composiciones químicas, como por ejemplo la magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Magnetita y maghemita son, con diferencia, los materiales más frecuentemente utilizados para aplicaciones biomédicas. También se están investigando otros óxidos de hierro como las ferritas, cuya fórmula general es MFe_2O_4 ($\text{M} = \text{Mn}, \text{Zn}, \text{Co}, \text{Ni}$).¹²

Las nanopartículas magnéticas pueden ser sintetizadas mediante métodos químicos como la coprecipitación, descomposición térmica, sol-gel y reacciones hidrotermales.^{9, 12} Estos métodos permiten la síntesis de nanopartículas de tamaños uniformes. La síntesis de partículas menores de 10 nm se consigue por precipitación de sales de hierro en medio acuoso. El recubrimiento se realiza durante o después de la síntesis. La síntesis de partículas de tamaños entre 10-30 nm se consigue mediante descomposición térmica de precursores orgánicos, permitiendo la producción de nanopartículas en un amplio rango de tamaños dependiendo de los precursores, surfactantes y disolventes. Partículas de tamaños superiores a los 30 nm se consiguen obtener mediante el

método clásico de coprecipitación y controlando la proporción de sales ferrosas y férricas con hexadamina. Este método permite obtener MNPs de tamaños que van desde los 9 a los 40 nm. La nanopartículas de tamaños alrededor de 40 nm son útiles en hipertermia magnética y para la toma de imágenes tomográficas usando la respuesta no lineal de las MNPs. Se puede lograr un control más preciso del tamaño de partículas mediante la oxidación de una sal de hierro (II) con un oxidante suave como KNO_3 en una mezcla de agua/metanol. Mediante este método se han conseguido obtener partículas de 25 a 300 nm.¹²

Además del tamaño, las propiedades superficiales de las MNPs son esenciales para sus aplicaciones.^{1, 5} Los recubrimientos de las MNPs con una capa de un material diferente es un método interesante para modificar sus propiedades superficiales. Se utilizan varios grupos de materiales para modificar las propiedades físico-químicas superficiales de las MNPs:

- Polímeros orgánicos, como dextrano, quitosano, polietilenglicol (PEG), polisorbato y polianilina.
- Surfactantes orgánicos, como oleato sódico y dodecilamina.
- Metales como el oro.
- Materiales inorgánicos como el sílice y el carbono.
- Moléculas bioactivas y estructuras como liposomas, péptidos y ligandos/receptores.

Las nanopartículas encapsuladas con estos recubrimientos son más ventajosas que las nanopartículas sin encapsular por su menor citotoxicidad, menor aglomeración y agregación, mayor biocompatibilidad, mejor conjugación con otras moléculas bioactivas, y un incremento en la estabilidad térmica y química.¹⁻⁵

Para aplicaciones *in vivo*, las MNPs necesitan poseer una magnetización de saturación alta.⁵ Además, podrían ser necesarios otros requerimientos dependiendo de la aplicación específica. Por ejemplo, el uso de nanopartículas como agentes de contraste externos para MRI requiere nanopartículas con alta magnetización; pero con un tamaño de partícula pequeño si es necesario escapar del sistema fagocítico-mononuclear. Por lo tanto, las nanopartículas superparamagnéticas podrían ser la solución. Para terapia por hipertermia, las nanopartículas ferromagnéticas con una gran área encerrada en la curva de histéresis son las más efectivas.¹² El potencial para la manipulación magnética puede que sea la característica más importante de las nanopartículas utilizadas en vectores utilizados en aplicaciones biológicas, como son la liberación de fármacos.

La fuerza que puede ejercerse sobre las MNPs por un campo magnético externo esta dada por la siguiente expresión:⁵

$$\vec{F}_m = V(\vec{M}_s \cdot \nabla)\vec{B}$$

donde F_m es la fuerza magnética experimentada por una partícula, V es el volumen de la partícula y B la densidad de flujo magnético. Mediante el volumen, la fuerza depende del tamaño, así partículas más grandes experimentan fuerzas mayores. Sin embargo, las MNPs deben ser lo suficiente pequeñas para permanecer dentro de un régimen superparamagnético (ver Apéndice 1) y con estabilidad coloidal.

En ausencia de recubrimientos, las MNPs tienden a formar agregados.¹¹ Se pueden distinguir dos tipos de interacciones interpartícula: i) la aglomeración debida a interacciones físicas débiles y reversibles, ii) y los procesos más fuertes que dan lugar a la agregación de las nanopartículas y donde es muy difícil volver a dispersarlas. Además de las fuerzas que podrían aparecer cuando las nanopartículas están dispersas en un líquido inerte (por ejemplo, fuerzas de Van der Waals o electrostáticas), las MNPs podrían también presentar fuerzas magnéticas entre nanopartículas debido a las interacciones magnéticas dipolares o interacciones de intercambio si las partículas están en contacto. Las interacciones dipolares son de relativo largo alcance y su magnitud

depende, entre otros factores, del tamaño de las nanopartículas, la forma y la distancia interpartícula. Cuando las MNPs se agregan, o cuando se alcanzan concentraciones de nanopartículas relativamente altas, las propiedades magnéticas, tanto estáticas como dinámicas del sistema, se modifican debido a las interacciones magnéticas, respecto del caso en el que estas interacciones son despreciables.¹¹ Aunque las síntesis de nanopartículas conduce de forma natural a nanomateriales con diferentes grados de agregación, se ha puesto poca atención a qué método de síntesis es mejor para una determinada aplicación. Por ejemplo, las nanopartículas en forma de agregados parecen ofrecer los mejores resultados en hipertermia magnética.^{11, 12} Sin embargo, hay mucha más discusión sobre las ventajas de las nanopartículas mono-dispersas con propiedades uniformes, por ejemplo, en la liberación de fármacos en zonas localizadas; ya que el tamaño determina su comportamiento farmacocinético, y por lo tanto, su biodistribución. El uso de algunos nanomateriales para aplicaciones combinadas de diagnóstico y terapia (teragnosis) requeriría también una cuidadosa configuración de las propiedades. Además, hay algunas aplicaciones (por ejemplo, en sensores) en los cuales es esencial distinguir la aglomeración espontánea de las nanopartículas debido a las interacciones magnéticas, de la formación de “clusters” provocado por interacciones con biomoléculas o cambios en el pH. Por lo tanto, se requieren protocolos en los que se especifiquen, y posteriormente verifiquen, las propiedades magnéticas requeridas por las MNPs para su utilización en una aplicación determinada.

El estudio de la agregación de las MNPs se puede realizar mediante medidas de susceptibilidad magnética AC en función de la temperatura. Las interacciones dipolares entre partículas dan lugar a modificaciones en las dependencias térmicas de la susceptibilidad, en relación a las correspondientes a sistemas de partículas sin interacción.

En este trabajo se han realizado diferentes diluciones de nanopartículas de magnetita en agar para conocer cómo varían las propiedades magnéticas de éstos nanomateriales en función del número de partículas por unidad de volumen, y en consecuencia del grado de interacción entre las mismas. Posteriormente a la preparación de las muestras, estos nanomateriales han sido caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) para conocer el tamaño y forma de las nanopartículas. Por último, se ha realizado una caracterización magnética utilizando un magnetómetro SQUID (del inglés, superconducting quantum interference device); midiendo la susceptibilidad magnética AC a diferentes temperaturas, y la magnetización del material en función del campo magnético aplicado externamente. Las medidas magnéticas realizadas es el equipo realizadas han permitido evaluar las interacciones entre las nanopartículas como veremos a lo largo del trabajo.

El objetivo central de este trabajo es estudiar la influencia de la agregación de las nanopartículas de magnetita sobre las propiedades magnéticas de éstas. Las nanopartículas magnéticas se encuentran en diferentes grados de agregación después de su administración a un organismo, y estos estudios podrían ser la base para el desarrollo de técnicas que permitieran la detección, cuantificación, y estudio del grado de agregación de las nanopartículas una vez administradas en el organismo. El tamaño de las MNPs también influye en su comportamiento magnético; por lo que también se realizará una caracterización con nanopartículas de magnetita de mayor tamaño, revestidas con diferentes recubrimientos utilizados habitualmente para aplicaciones biológicas. Dicha caracterización se basará en la observación mediante TEM y en la adquisición de datos de susceptibilidad magnética AC en función de la temperatura.

2. Materiales, metodología e instrumentación

2.1. Materiales

En este TFM se han estudiado y caracterizado nanopartículas magnéticas con diferentes recubrimientos. Los compuestos ensayados se han denominado **DANS-H**, **DBNS-H**, **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP**. Estos materiales fueron diseñados y sintetizados por investigadores del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM), centro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).^{13, 14} **DANS-H** y **DBNS-H** están formados por nanopartículas de magnetita de unos 8-9 nm recubiertas con dextrano, ver **Figura 2**. La diferencia entre **DANS-H** y **DBNS-H** reside en el método de recubrir las nanopartículas. **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP** son nanopartículas de magnetita de mayor tamaño (12-13 nm); pero recubiertas de ácido dimercaptosuccínico (DMSA), dextrano, y (3-aminopropil)triétoxissilano (APS), respectivamente, ver **Tabla I**.

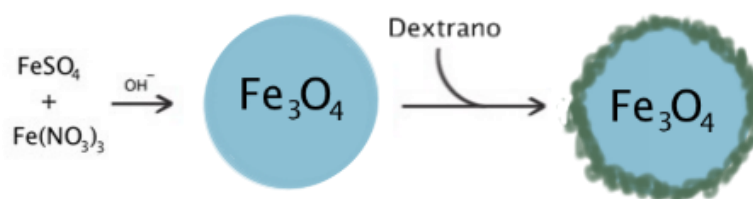
Compuesto	Tamaño (nm)	Recubrimiento
DANS-H	8.2	Dextrano
DBNS-H	9.6	Dextrano
DMSA-NP	12.1	DMSA
DEXT-NP	13.3	Dextrano
APS-NP	12.2	APS

Tabla I. Tamaños y recubrimientos de los sistemas de nanopartículas estudiados.

Las nanopartículas de magnetita de los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H** se han sintetizado mediante el método de coprecipitación.¹³ Una mezcla de 10.01 gramos de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Masa Molar = 278.02 gramos/mol) y 8.08 gramos de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Masa Molar = 404 gramos/mol) ha sido disuelta en 50 ml de agua, previamente purgada con nitrógeno gas para eliminar el oxígeno y así evitar oxidaciones, manteniendo el ratio 1:1.8 de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A continuación, la disolución salina de hierro es añadida a 400 ml de una disolución desoxigenada de NaOH (pH = 12), mantenida bajo agitación y flujo de nitrógeno durante 5 horas. El precipitado que se forma es centrifugado a 9000 rpm para eliminar impurezas y grandes clusters.

En **DBNS-H**, el dextrano (4.32 g de Masa Molar = 10000 gramos/mol) se encuentra disuelto en un medio de reacción antes de añadir las sales de hierro. En cambio, en **DANS-H**, la disolución de dextrano es añadida posteriormente cuando las nanopartículas ya están sintetizadas. En este caso la preparación ha consistido en coger 100 mg de nanopartículas de magnetita y dispersarlas en 2.5 ml de NaOH (0.5 M) mediante sonicación. En una etapa posterior se añade lentamente una disolución acuosa que contiene 100 mg de dextrano y NaOH (0.5 M). La dispersión es sonicada durante 15 minutos y centrifugada para eliminar el exceso de dextrano que se encuentra sin unir a la superficie de las nanopartículas de magnetita, ver **Figura 2**.

a) DANS-H



b) DBNS-H

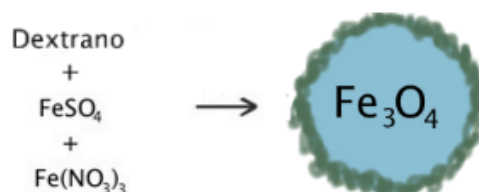


Figura 2. Esquema de la diferencia en el método de síntesis de los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**.

La preparación de las muestras para su posterior caracterización se han realizado bajo la supervisión de la Dra. Lucía Gutiérrez en los mismos laboratorios del ICMC que en el caso de la síntesis de las nanopartículas. Los dos tipos de nanopartículas han sido diluidas en agar para estudiar la influencia de la agregación en las propiedades magnéticas del material.¹⁵

Las muestras se han obtenido preparando una disolución de agar (CAS 9002-18-0, Sigma-Aldrich, Fluka®, con una pureza $\geq 95\%$) al 2% en agua, a una temperatura de 95°C, utilizando una manta calefactora. Una vez el agar se ha disuelto, se preparan diferentes diluciones de **DANS-H** y **DBNS-H**, añadiendo diferentes volúmenes de suspensión de nanopartículas (1,85 mg/ml) y completando la mezcla con agar hasta un volumen final de 1 ml, ver **Tabla II**. A la suspensión resultante se le realiza un proceso de sonicación en un baño de ultrasonidos para conseguir una mezcla homogénea. Se deja solidificar durante 30 minutos y se liofiliza durante las siguientes 24 horas en un equipo de la serie LyoQuest de la casa comercial Telstar® (temperatura de -50°C y una presión de 0.010 mbar). Posteriormente se introducen las muestras en cápsulas de gelatina (volumen = 0.21 ml, diámetro = 5.05 mm) para realizar los ensayos magnéticos.

Muestras DANS-H	Muestras DBNS-H	Volumen nanopartículas (μl)	Volumen agar 2% (μl)
DANS-H-2	DBNS-H-2	2	998
DANS-H-50	DBNS-H-50	50	950
DANS-H-100	DBNS-H-100	100	900
DANS-H-500	DBNS-H-500	500	500

Tabla II. Muestras y volumen utilizado en la preparación de las muestras de los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**.

Las nanopartículas de magnetita de los compuestos **DMSA-NP**, **DEXT-NP**, **APS-NP** han sido sintetizadas añadiendo 425 ml de una disolución acuosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.09 moles) y $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.054 moles) a 75 ml de medio alcalino. El tamaño de partícula puede ser configurado mediante la naturaleza del medio alcalino, la velocidad de adición y el tiempo de envejecimiento. Así, velocidades de adición relativamente rápidas (40 ml/s) y NH_4OH (25%) como disolución alcalina permiten sintetizar nanopartículas de 8 nm. Velocidades de adición relativamente lentas (0.2 ml/s) sobre NH_4OH (25%) seguido de un tratamiento térmico a 90 °C durante 3 horas, permite sintetizar nanopartículas de 13 nm. Después de cada proceso sintético las nanopartículas son lavadas tres veces con agua destilada y se recogen con la ayuda de un imán.¹⁶

Las **DMSA-NP**, **DEXT-NP**, **APS-NP** nanopartículas se han recubierto con ácido dimercaptosuccínico (DMSA), dextrano, y (3-aminopropil)triethoxisilano (APS) mediante los siguientes procedimientos:¹⁷

- Recubrimiento con DMSA. 5 mg (0.027 moles) de DMSA se han añadido a una suspensión de 10 ml de partículas (4.3 g Fe_2O_3 /l) a pH 3 con agitación. Después de añadir DMSA, el pH de la mezcla se aumentó hasta 11 y se realizó un proceso de sonicación durante 15 minutos.
- Recubrimiento con dextrano. La modificación superficial se ha llevado a cabo mediante la adición, gota a gota, de una dispersión de nanopartículas (228 mg Fe_2O_3 /l) en 1.6 ml de NaOH (0.8 M) sobre una disolución de 200 mg de dextrano (40 kD) en 2.5 ml de NaOH (0.5 M), a la vez que se realiza un proceso de sonicación. La mezcla se mantuvo en estas condiciones durante 6 horas.
- Recubrimiento con APS. Se ha propuesto el APS como un excelente material para estabilizar las nanopartículas magnéticas a pH 7 y proporcionar grupos cargados positivamente en la superficie de las nanopartículas que pueden ser utilizados para la unión de biomoléculas. La modificación superficial es llevada a cabo añadiendo muy lentamente (10 $\mu\text{l/s}$) 1.22 ml (0.005 moles) de (3-aminopropil)triethoxisilano (APS) a una mezcla de 10 ml de nanopartículas (28 mg Fe_2O_3 /ml) y 10 ml de metanol, manteniendo una fuerte agitación durante 12 horas. Después, el metanol es eliminado en un rotavapor.

Después de recubrir las nanopartículas, el exceso de reactivo se eliminó mediante diálisis y el pH se ajustó a 7.

La preparación de las muestras de agar para su posterior caracterización se ha realizado de la misma manera que para los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**, ver **Tabla III**.

Muestras DMSA-NP	Muestras DEXT-NP	Muestras APS-NP	Volumen nanopartículas (μl)	Volumen agar 2% (μl)
DMSA-NP-2	DEXT-NP-2	APS-NP-2	2	998
DMSA-NP-20	DEXT-NP-20	APS-NP-20	20	920
DMSA-NP-200	DEXT-NP-200	APS-NP-200	200	800

Tabla III. Muestras y volumen utilizado en la preparación de las muestras de los compuestos **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP**.

2.2. Metodología e instrumentación

La caracterización de las muestras se ha realizado con equipos instrumentales tanto de la Universidad Autónoma de Madrid como de la Universidad de Zaragoza. En concreto, se ha utilizado un microscopio electrónico de transmisión (TEM) para observar el tamaño y la forma de las nanopartículas, y un magnetómetro SQUID para calcular la susceptibilidad magnética AC y medir la magnetización en función del campo magnético.

La preparación de la muestra antes de su observación en el TEM se realiza diluyendo una cantidad muy pequeña de la suspensión de nanopartículas en agua. Para conseguir la máxima dispersión, se sumerge la disolución en un baño de ultrasonidos y posteriormente se deposita una gota sobre una rejilla de cobre recubierta con carbono. La gota se deja secar al aire.

La preparación de las muestras para las medidas magnéticas en el magnetómetro SQUID consiste en introducir el agar liofilizado en una cápsula de gelatina. La cápsula se coloca en el interior de una varilla que facilita su localización en el interior del imán superconductor generador del campo magnético.

A continuación se describen, brevemente, los distintos instrumentos utilizados para la caracterización de los materiales y la técnica instrumental utilizada.

TEM: Se ha utilizado un microscopio electrónico de transmisión de la casa comercial estadounidense JEOL S.L. modelo JEM-1010. Los rangos de voltaje de aceleración de los electrones del microscopio son de 40 a 100 kV, utilizando 100 kV durante la adquisición de las imágenes mostradas en esta memoria. Posee un cañón de electrones termoiónico de B₆La. La resolución es de 0.35 nm. Los aumentos del microscopio están entre 600x y 500000x; utilizando 100000x y 200000x para la observación y adquisición de las imágenes de las muestras. La captación de las imágenes se realiza con una cámara de alta resolución Gatan ORIUS™, controlada mediante un dispositivo de acoplamiento de carga, CCD, de alta sensibilidad. El microscopio se encuentra localizado en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y puede ser manejado por el personal docente e investigador de la Universidad.

Magnetómetro SQUID (Superconducting Quantum Interference Device): El equipo utilizado es un magnetómetro SQUID MPMS-XL. Básicamente, integra una unidad para el control de la temperatura, un imán superconductor para aplicar los campos magnéticos a la muestra y un sistema de detección de la señal basado en un detector SQUID. El equipo es controlado con un software, permitiendo la automatización completa de todos los parámetros del sistema, controlando las medidas y la adquisición de los datos. El rango de temperatura a la cual el equipo opera está entre 1,9 K y 400 K. El control de la temperatura se realiza mediante helio líquido y una resistencia eléctrica. El rango operativo del campo magnético se encuentra entre 8 A/m y $4 \cdot 10^6$ A/m. El equipo permite realizar medidas magnéticas tanto en modo de corriente continua (magnetometría DC) y corriente alterna (susceptibilidad magnética AC). La sensibilidad del momento magnético medido cuando el equipo trabaja en modo DC es 10^{-10} A·m² (0 T) y 10^{-6} A·m² (5 T). Cuando el equipo opera en modo AC la sensibilidad de la momento magnético es de 10^{-11} A·m²; el rango de frecuencias está entre 0.01 Hz y 1 kHz; y la amplitud del campo magnético puede estar comprendido entre 0.08 A/m y 350 A/m. Para caracterizar la muestras se han utilizado ambos modos operativos: magnetometría DC para obtener la magnetización en función el campo magnético aplicado a una temperatura determinada, y la susceptibilidad magnética AC para obtener los diferentes componentes de la susceptibilidad magnética en función de la temperatura a una frecuencia constante de 10 Hz. Los parámetros de los ensayos se programan mediante el software del ordenador y se automatizan las medidas.

3. Resultados, interpretación y discusión

3.1. Serie DANS-H

3.1.1. TEM

El compuesto **DANS-H** se ha caracterizado mediante TEM para estudiar el tamaño y forma de las nanopartículas. En la **Figura 3A** se muestra una fotografía tomada con el microscopio. La imagen muestra una polidispersidad relativa en el tamaño de las nanopartículas, con tamaños que van desde los 4 nm a los 16 nm y donde más del 73% de las nanopartículas poseen un diámetro entre 6 y 10 nm. Se observan una gran cantidad de nanopartículas individuales junto con algunos clusters dispersos. Éstos últimos, pueden ser debidos al propio proceso de preparación de la rejilla para la observación de la muestra en el microscopio. Respecto a la geometría de las nanopartículas, se observa que éstas presentan formas redondeadas.

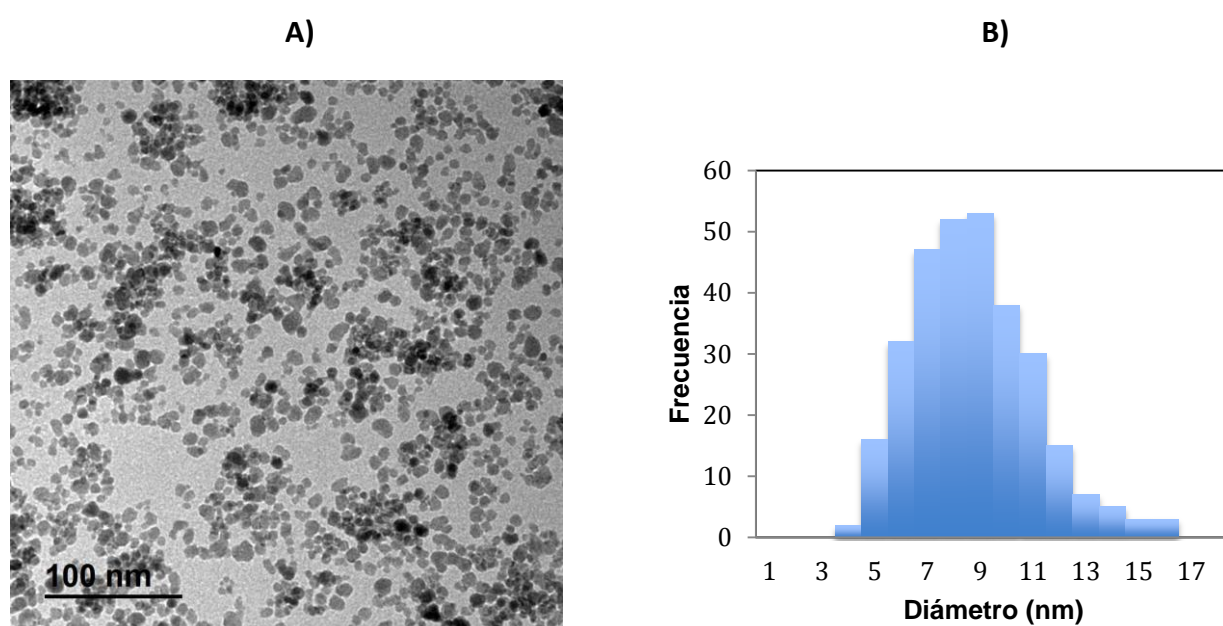


Figura 3. a) Fotografía de TEM de **DANS-H**. b) Histograma de frecuencias vs. diámetro de partícula, resultado del análisis con el software ImageJ de las diferentes fotografías obtenidas en el TEM para el compuesto **DANS-H**.

Para cuantificar el tamaño de las nanopartículas se ha utilizado el software ImageJ, obteniendo un tamaño promedio de diámetro de partícula de 8.2 nm y una desviación estándar de 2.3 nm (valores obtenidos para un tamaño de muestra de 303 medidas). En la **Figura 3B** se representa el histograma del tamaño de partícula de **DANS-H**, donde se aprecia el rango de tamaños de las nanopartículas.

En los siguientes apartados se mostrarán los resultados de la caracterización magnética del compuesto.

3.1.2. Magnetización

Para conocer el comportamiento magnético en función de la intensidad del campo magnético aplicado, se realiza la caracterización de la muestra del compuesto DANS-H-2 que presenta la menor concentración de nanopartículas para evitar en lo posible la presencia de clusters; ya que interesa estudiar el comportamiento individual de las nanopartículas. Con este propósito se realizan medidas de magnetización del material en función de la intensidad del campo magnético aplicado. Dichos resultados se pueden observar gráficamente en la **Figura 4** para la muestra DANS-H-2. La magnetización del material es función de la temperatura, observando este comportamiento en la **Figura 4** cuando a igual intensidad de campo magnético la magnetización del material cambia al variar la temperatura. Se puede comprobar cómo la magnetización de saturación disminuye conforme la temperatura es mayor, provocando una orientación aleatoria de los momentos magnéticos de los iones de hierro cuando la temperatura aumenta. Exceptuando el caso cuando la temperatura es de 50 K; el valor de la magnetización remanente (M_r) y del campo coercitivo (H_c) es 0 (dentro del error experimental, ver gráfico interior de la **Figura 4**), hecho que coincide con las propiedades magnéticas de un sistema superparamagnético a temperatura ambiente.^{18, 19} Si analizamos el valor de M_r y de M_c a la temperatura de 50 K se obtienen los aproximados de $4.7 \text{ Am}^2/\text{kg}$ y $-4.6 \cdot 10^3 \text{ A/m}$, respectivamente; produciéndose el fenómeno de histéresis como ocurre en estudios previos.²⁰ El valor de magnetización de saturación de la magnetita a temperatura ambiente del sistema de nanopartículas estudiado y de la magnetita “bulk” es de 65 y $92\text{-}100 \text{ Am}^2/\text{kg}$, respectivamente.²¹ Esta diferencia en el valor de la magnetización de saturación podría ser debida a la existencia de un desorden de los espines magnéticos en la región superficial del material, tal y como se explica en el artículo de Goya *et al* 2003. Si comparamos el valor de la magnetización de saturación a temperatura ambiente de otros estudios similares²² para nanopartículas de diámetro promedio a 10 nm, se obtiene un valor de $60 \text{ Am}^2/\text{kg}$; siendo un parámetro similar al obtenido experimentalmente.

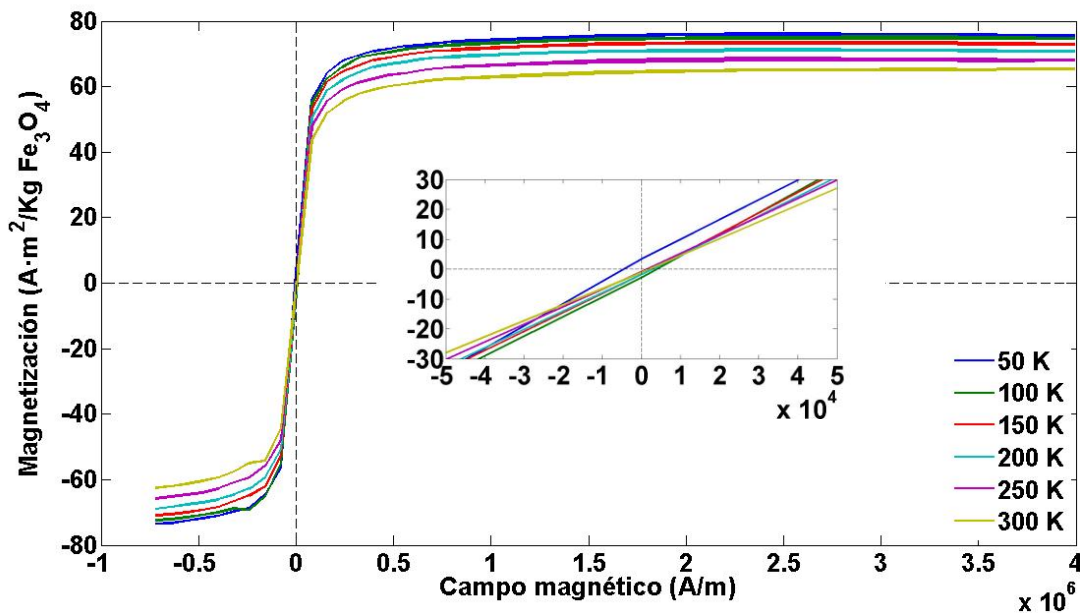


Figura 4. Magnetización vs. campo magnético para la muestra DANS-H-2 a diferentes temperaturas. En el gráfico interior se amplía la región próxima a campo magnético 0. Por encima de $0.8 \cdot 10^6 \text{ A/m}$ se ha medido primero a campo creciente y posteriormente a campo decreciente; mientras que por debajo de $0.8 \cdot 10^6 \text{ A/m}$ las medidas han sido siempre realizadas a campo magnético decreciente. La contribución diamagnética ha sido eliminada; considerando únicamente el comportamiento magnético de la magnetita.

3.1.3. Susceptibilidad magnética AC

Partiendo de una suspensión del compuesto **DANS-H** (1.85 mg/ml) se preparan diferentes diluciones en agar tal y como se muestra en la **Tabla II**. Tras un proceso de liofilización (explicado en el Capítulo 2 de la memoria) las muestras se caracterizan magnéticamente calculando la susceptibilidad magnética (χ) AC. La susceptibilidad magnética es dependiente de la temperatura, porque las oscilaciones térmicas de los átomos tienden a disminuir la magnetización del material. Esta dependencia con la temperatura del compuesto **DANS-H** se puede observar en la **Figura 5A** y **5B** en el rango de temperaturas entre 10 K y 300 K. En dicha figura se muestran las componentes de la susceptibilidad por unidad de masa de muestra en función de la temperatura para muestras de diferentes concentraciones del compuesto **DANS-H**. La curvas muestran un único máximo, indicando el bloqueo magnético de las nanopartículas y ausencia de relajación por encima de aproximadamente 270 K. La susceptibilidad en fase muestra el máximo a temperaturas ligeramente superiores a las obtenidas con el componente de la susceptibilidad fuera-de-fase (ver **Tabla IV**); lo cual evidencia un fenómeno de relajación magnética.^{20, 23} Por encima de aproximadamente 270 K, χ'' es cero dentro de la precisión de los experimentos, lo que significa que en este rango de temperatura χ' es la susceptibilidad estática y la muestra es superparamagnética. La cantidad de nanopartículas en la muestra se correlaciona con la altura de los máximos de la susceptibilidad como se puede comprobar en la **Tabla IV**.

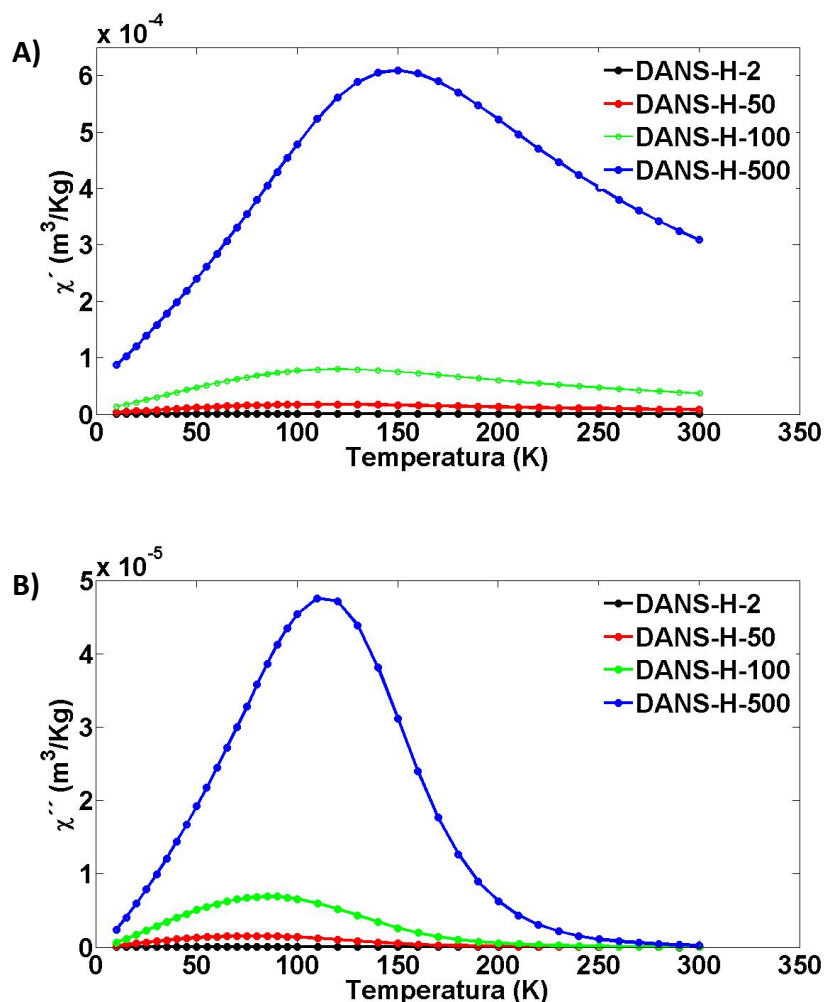


Figura 5. A) Representación gráfica de la susceptibilidad en fase por unidad de masa de muestra vs. la temperatura para diferentes grados de dilución del compuesto **DANS-H**. B) Gráfico que muestra la susceptibilidad fuera-de-fase por unidad de masa de muestra en función de la temperatura para varias concentraciones del compuesto **DANS-H**.

Muestra	$T_{\text{máx.}} \text{ (K)} \chi'$	$T_{\text{máx.}} \text{ (K)} \chi''$	$\chi'' \text{ (m}^3\text{/kg)}$
DANS-H-2	110.1	60.0	$8.8 \cdot 10^{-8}$
DANS-H-50	110.2	80.0	$1.5 \cdot 10^{-6}$
DANS-H-100	120.2	85.1	$6.9 \cdot 10^{-6}$
DANS-H-500	150.1	110.0	$4.8 \cdot 10^{-5}$

Tabla IV. Temperaturas del máximo de las curvas de ambas componentes de la susceptibilidad y el valor de la altura de χ'' en el máximo del perfil de la curva.

La dependencia con la temperatura de la susceptibilidad fuera de fase por unidad de masa de magnetita y χ'' normalizada para el compuesto **DANS-H** se representa en la **Figura 6A** y **6B**, respectivamente. Esta variable tiene la propiedad de ser insensible a la contribución diamagnética.

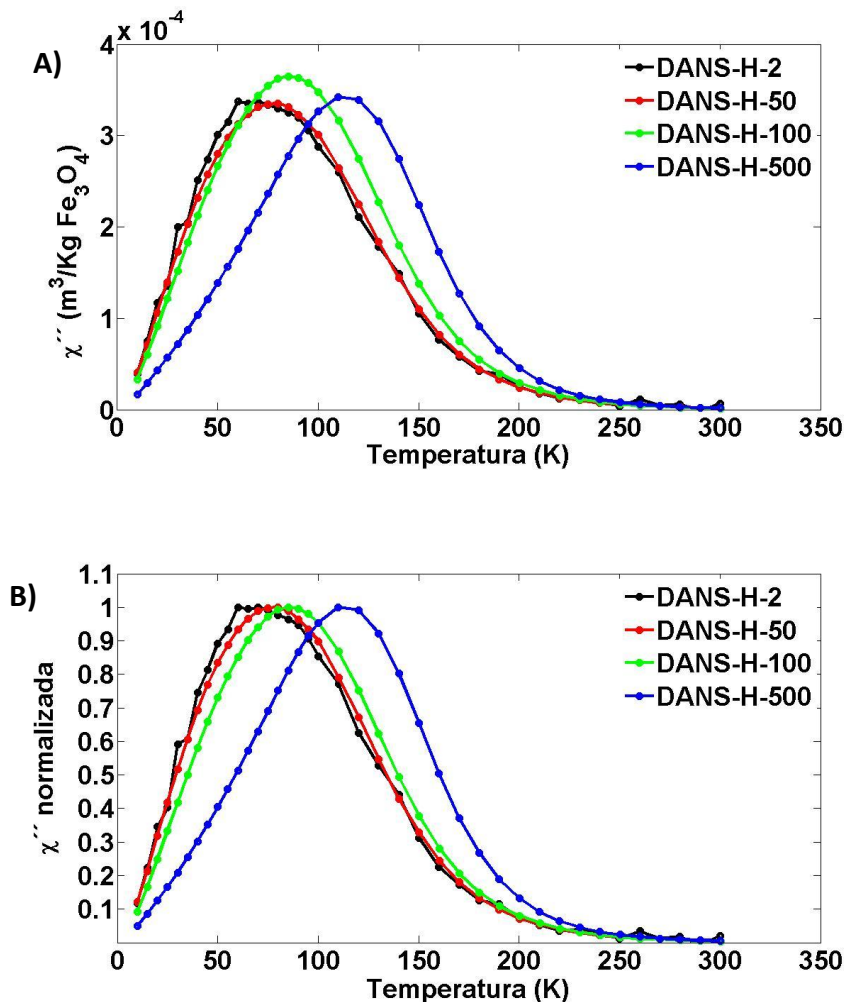


Figura 6. A) Representación gráfica de la susceptibilidad fuera-de-fase por unidad de masa de magnetita en función de la temperatura para las diferentes muestras de **DANS-H** estudiadas. B) Normalización de la susceptibilidad fuera-de-fase frente a la temperatura.

Si nos fijamos detenidamente en el primer tramo de las curvas se observa una similitud entre las diferentes muestras, excepto para la muestra DANS-H-500. También podemos comprobar que el máximo de la curva se desplaza a temperaturas más elevadas a medida que la concentración de nanopartículas aumenta. Debido a que la única diferencia entre las muestras es la concentración de nanopartículas, estas diferencias en la posición del máximo se piensa que son debidas a las interacciones dipolares entre nanopartículas, siendo este fenómeno más importante a medida que las nanopartículas están más próximas unas de otras. Este comportamiento es similar al observado en otros estudios,²⁴ en el que se observa el desplazamiento del máximo de la curva a temperaturas más elevadas a medida que aumenta la concentración de las nanopartículas de magnetita.

Si nos fijamos en las curvas de las muestras más diluidas (DANS-H-2 y DANS-H-50) de las **Figuras 6A** y **6B** se puede ver un comportamiento magnético similar, indicando que en este rango de concentraciones las partículas están suficientemente separadas unas de otras para que sea probable que no haya cambios en las interacciones interpartícula.

3.1.4. Interacciones interpartícula mediante el factor pre-exponencial τ_0

Una manera de conocer si las interacciones interpartícula son despreciables es conociendo el valor del factor pre-exponencial (τ_0) que aparece en la expresión de Arrhenius para el tiempo de relajación ($\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)$), siendo k_B la constante de Boltzmann, T la temperatura y E_a la energía de anisotropía para una única nanopartícula.^{24, 25} Su cálculo está basado en la complementariedad de la información de relajación contenida en χ' y χ'' (ver Apéndice 3 para más información). La aplicación de este método a los datos de la muestra DANS-H-50 se muestra en la **Figura 7**.

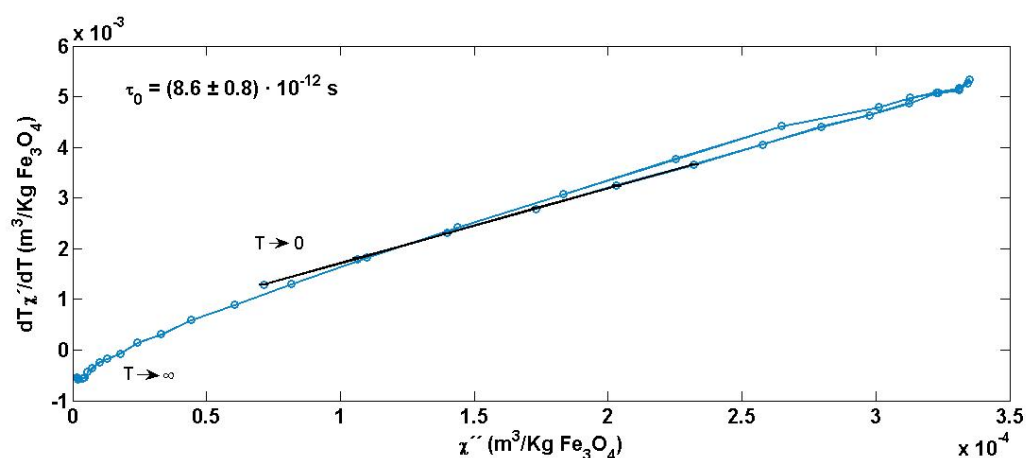


Figura 7. Representación gráfica del método para determinar el valor de τ_0 a 10 Hz para la muestra DANS-H-50. Los límites a alta y baja temperatura están explícitamente indicados.

El valor de τ_0 ha sido calculado en el límite cuando la temperatura tiende a cero utilizando la pendiente de la recta obtenida en este límite (línea de color negro en la **Figura 7**). Aunque ambos límites podrían ser utilizados para el cálculo de τ_0 , no se han realizado los cálculos en el límite cuando la temperatura tiende a infinito, porque no se han obtenido valores experimentales de χ' a temperaturas lo suficientemente elevadas para un ajuste lineal preciso (ver **Figura 5**). El valor de τ_0 obtenido es $\tau_0 = 8.6 \cdot 10^{-12}$ s. Se conoce que si los momentos magnéticos netos por nanopartícula invierten su dirección de manera independiente, τ_0 tiene valores en el rango de 10^{-9} -

10^{-12} s.^{24, 25} Por lo tanto, del valor de τ_0 calculado experimentalmente se puede deducir que, en su gran mayoría, las nanopartículas no interaccionan unas con otras debido a que el mecanismo de inversión de los momentos magnéticos atómicos se realiza de manera coherente. Calculando el valor de τ_0 para las diferentes concentraciones de las muestras de **DANS-H**, se observa cómo el sistema pasa a un régimen de no interacción al diluir la muestra (ver **Figura 8**).

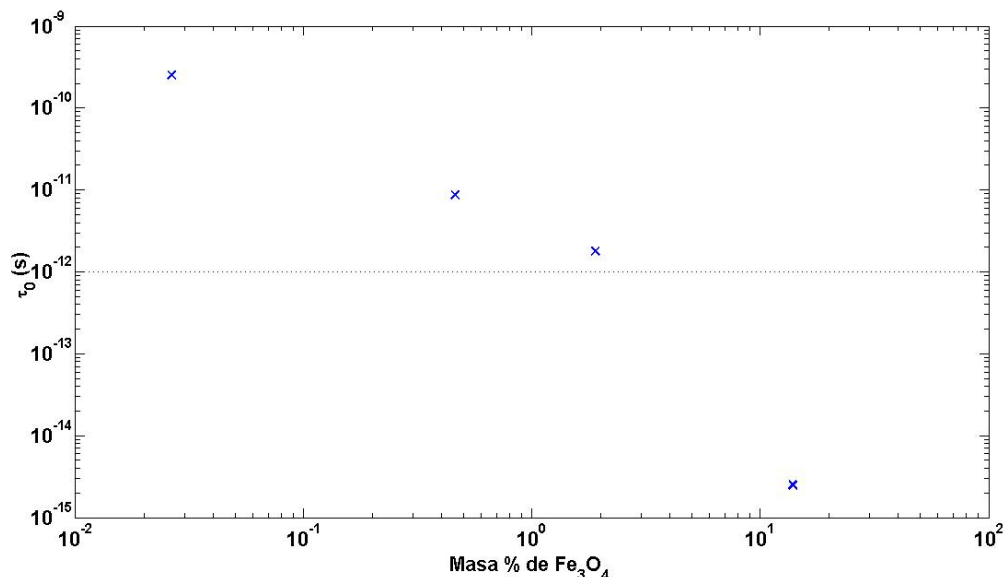


Figura 8. Representación gráfica del valor de τ_0 vs. concentración de magnetita en las muestras del compuesto **DANS-H**. Comprobar que incrementando la concentración de nanopartículas; es decir, incrementando la magnitud de las interacciones dipolo-dipolo, disminuye progresivamente el valor de τ_0 , de la misma manera a lo observado en los estudios de López et al 2007.²⁴

A temperaturas superiores a 270 K, la susceptibilidad en fase del compuesto **DANS-H** está libre de contribuciones de relajación y puede ser expresada como $\chi = \chi_{SP} + \chi_D$, donde χ_{SP} es la susceptibilidad superparamagnética de la nanopartícula y χ_D la susceptibilidad diamagnética total, la cual incluye las contribuciones del dextrano, el agar, y la cápsula de gelatina contenedora de la muestra. La dependencia con la temperatura de cada término es como se explica a continuación:²⁶ χ_{SP} seguirá la ley de Curie ($\chi_{SP} = C/T$, donde C es la constante de Curie), y χ_D es independiente de la temperatura. χ' en función de $1/T$ es una función lineal cuya pendiente es C y la intersección con el eje de ordenadas el valor de χ_D . En la **Figura 9** se puede observar dicha función para la muestra **DANS-H-50**, donde el desvío de la linealidad se debe al fenómeno de relajación magnético. La región lineal de la función se ha calculado con los 12 primeros puntos del perfil de la curva (línea negra en la figura). El valor de la susceptibilidad diamagnética obtenido para las muestras estudiadas es $-5.0 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3/\text{kg}$ de Fe, cuyo signo negativo indica el comportamiento diamagnético del resto de la muestra. Este análisis llevado a cabo para el compuesto **DANS-H** no se ha podido realizar para el compuesto **DBNS-H** porque en todo el rango de temperaturas estudiado se produce el fenómeno de relajación magnética.

El valor obtenido para la constante de Curie ha sido utilizado para determinar el momento efectivo por ion de hierro (m_{eff}). Para nanopartículas superparamagnéticas el valor esperado, calculado mediante la expresión, $C = \mu_0 N m_{eff}^2 / 3k$, siendo N el número de iones magnéticos por unidad de volumen y k la constante de Boltzmann, es generalmente mucho mayor que para el ion paramagnético (típicamente del orden de $5 \mu_B$ para el Fe^{3+} y $4 \mu_B$ para el Fe^{2+}).²⁷ El valor de m_{eff} calculado por ion de hierro se muestra en la **Tabla V**, donde el momento magnético efectivo es

significativamente mayor que el momento magnético de un único ion. Este resultado indica que la configuración de los espines intrapartícula coincide con la configuración de un sistema ferrimagnético en todo el volumen de la nanopartícula.

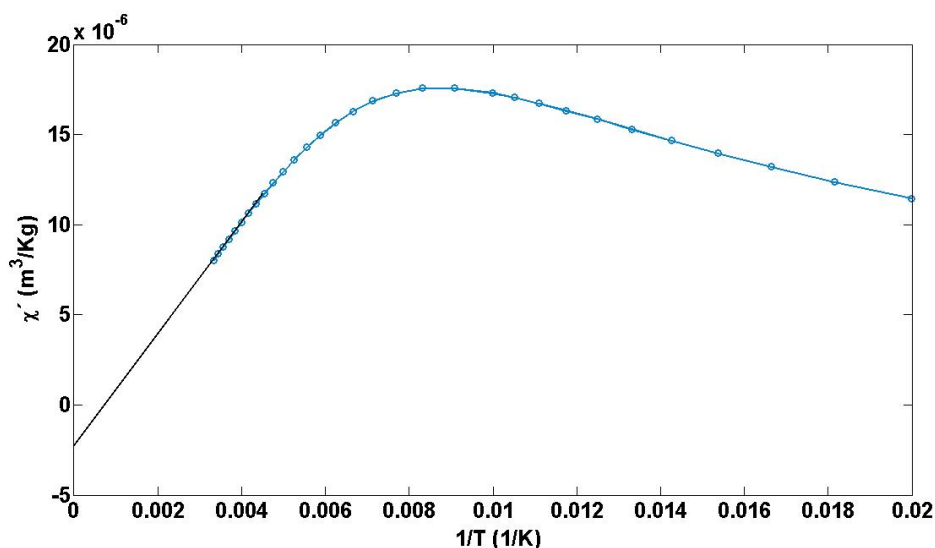


Figura 9. Representación gráfica de la susceptibilidad en fase (χ') en función del inverso de la temperatura para la muestra DANS-H-50. Se ha marcado región lineal de la función mediante una línea de color negro y se ha extrapolado hasta valor cero del inverso de la temperatura.

Muestra	Magnetones de Bohr (μ_B)
DANS-H-2	175.1
DANS-H-50	176.8
DANS-H-100	188.7
DANS-H-500	210.7

Tabla V. Valores del momento magnético efectivo por ion de hierro (m_{eff}) para las diferentes muestras del compuesto **DANS-H**.

El máximo observado en $\chi''(T)$ es el resultado del bloqueo magnético de las nanopartículas (ver Apéndice 1), lo cual es un efecto debido a la anisotropía de las partículas y cuya localización en el rango de temperaturas depende del tamaño de la partícula.²⁸ En la práctica una constante de anisotropía magnética efectiva se puede estimar a partir de la siguiente expresión:

$$K_{eff} = \frac{kT}{V} \ln\left(\frac{1}{\omega\tau_0}\right)$$

donde V es el volumen promedio de las partículas y T la temperatura del máximo en $\chi''(T)$. Si el volumen promedio de las partículas se calcula a partir del diámetro promedio de las nanopartículas determinado con el TEM, la constante de anisotropía magnética efectiva se calcula obteniendo los valores mostrados en la **Tabla VI**. Vemos que la constante aumenta a medida que disminuye el grado de dilución de las nanopartículas. Comparando con el valor de la constante de anisotropía efectiva para la magnetita obtenido en investigaciones previas ($2.7 \cdot 10^4 \text{ J/m}^3$),^{21, 24, 29} se observa que los valores obtenidos experimentalmente muestran cierta similitud.

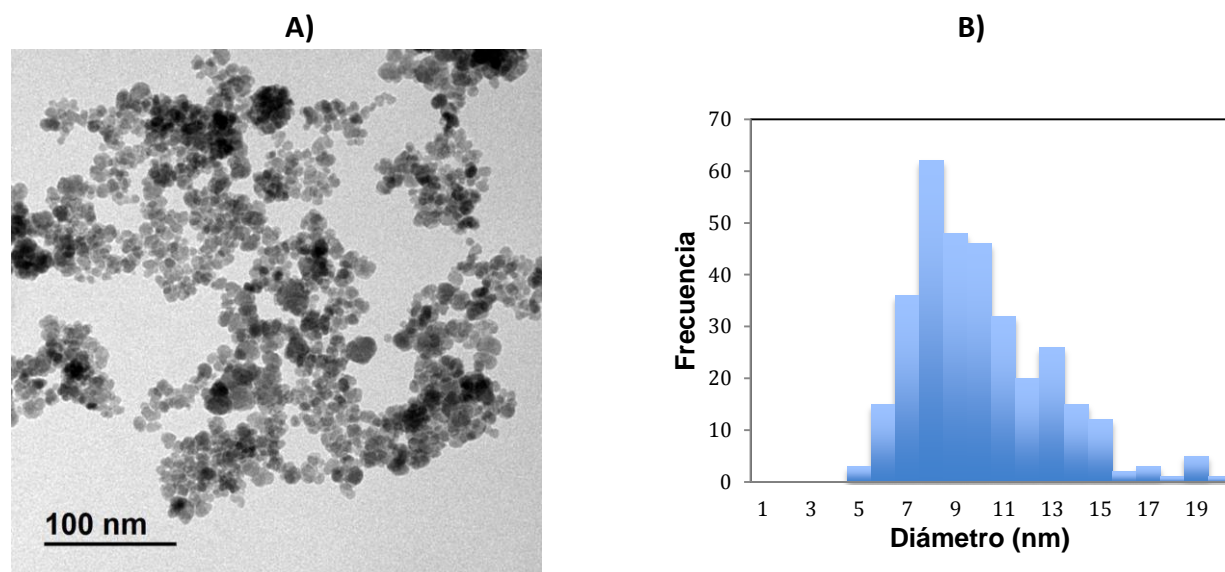
Muestra	$K_{\text{eff}} [\text{J/m}^3] \times 10^4$
DANS-H-2	5.6 ± 0.6
DANS-H-50	8.7 ± 0.9
DANS-H-100	9.9 ± 1.0
DANS-H-500	16 ± 1.6

*Tabla VI. Valores de la constante de anisotropía magnética efectiva para las diferentes muestras del compuesto **DANS-H**. El intervalo de confianza es del 95%.*

3.2. Serie DBNS-H

3.2.1. TEM

El compuesto **DBNS-H** se ha caracterizado mediante TEM de igual manera que el compuesto **DANS-H**, estudiando de esta manera sus propiedades morfológicas, y así comparar un compuesto con el otro. En la **Figura 10A** se muestra una fotografía tomada con el microscopio donde se observa el compuesto **DBNS-H**. La fotografía muestra una ligera polidispersidad en el tamaño de las nanopartículas, de geometrías redondeadas, y con una gran cantidad de nanopartículas en contacto unas con otras; indicando una mayor cantidad de clusters en comparación con el compuesto **DANS-H**. El diámetro de partícula abarca tamaños desde los 4 nm a los 20 nm, donde más del 68% de las nanopartículas poseen un diámetro entre 7 y 11 nm.



*Figura 10. A) Fotografía de TEM del compuesto **DBNS-H**. B) Histograma de frecuencias vs. diámetro de partícula, resultado del análisis con el software ImageJ de las diferentes fotografías obtenidas en el TEM para el compuesto **DBNS-H**.*

Para cuantificar el tamaño de las nanopartículas se ha utilizado el software ImageJ, obteniendo un valor promedio de diámetro de partícula de 9.6 nm y una desviación estándar de 2.8 nm (valores obtenidos para un tamaño de muestra de 327 medidas). En la **Figura 10B** se representa el histograma del tamaño de partícula de **DBNS-H**, donde se observa una ligera mayor polidispersidad en comparación con **DANS-H** en el tamaño de las nanopartículas. También se observa un mayor número de nanopartículas de **DBNS-H** con tamaños mayores a los observados

en **DANS-H**. Todas estas diferencias entre ambos compuestos se deben, exclusivamente, al método de síntesis empleado. Comparando las **Figuras 3 y 10**, se puede comprobar la obtención de partículas de un mismo material de tamaños y geometrías similares; pero con diferente grado de agregación.

El TEM ha permitido observar las diferencias morfológicas de las nanopartículas. **DBNS-H** muestra una mayor agregación, polidispersidad y tamaño de partícula que **DANS-H**. Estas diferencias entre ambos compuestos van a producir diferentes propiedades magnéticas, tal y como veremos a continuación en los siguientes apartados.

3.2.2. Magnetización

Partiendo de una suspensión del compuesto **DBNS-H** de la misma concentración que el compuesto **DANS-H** (1.85 mg/ml) se preparan diferentes diluciones en agar. Estas muestras se caracterizan magnéticamente midiendo la susceptibilidad magnética (χ) en función del campo magnético aplicado. Como ya sabemos, esta relación es dependiente de la temperatura como se observa en la **Figura 11** para la muestra DBNS-H-2. Se puede comprobar cómo la magnetización de saturación disminuye cuando la temperatura es mayor debido a las oscilaciones térmicas de los átomos del material; igual que se observaba para el compuesto **DANS-H** en la **Figura 4**. El valor de magnetización de saturación del compuesto **DBNS-H** a la temperatura de 50 y 100 K es de 100 y 98 Am²/kg, respectivamente. Si nos fijamos en el gráfico interior de la **Figura 11**, donde se amplía la región cercana al origen de coordenadas, se observa la existencia de valores no nulos para la magnetización remanente y el campo coercitivo; a diferencia de los resultados obtenidos con el compuesto **DANS-H**, ver **Tabla VII**. Estos resultados experimentales no coinciden con los esperados para un sistema superparamagnético,^{18, 19} lo que lleva a suponer que esta variación en las propiedades magnéticas pueden ser debidas a la agregación de las nanopartículas; ya que un aumento de las interacciones dipolares interpartícula sugieren alteraciones en la dinámica de los espines atómicos.

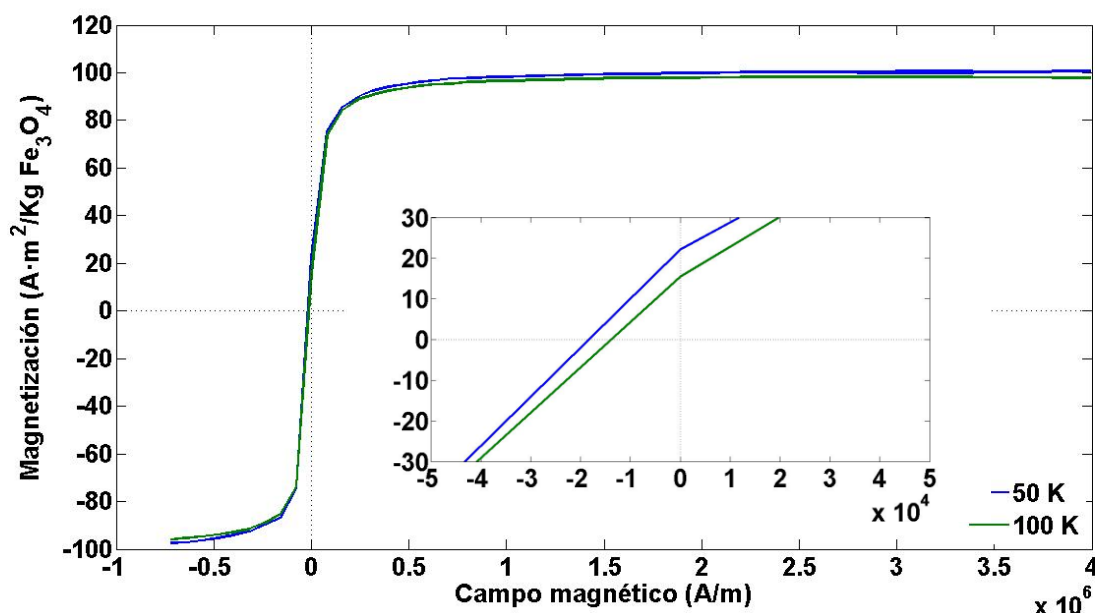


Figura 11. Curvas de histéresis para la muestra DBNS-H-2 a una temperatura de 50 K y 100K. Tal y como en el estudio del compuesto **DANS-H**, se ha eliminado la contribución diamagnética; considerando únicamente el comportamiento magnético de la magnetita. En el interior se muestra el gráfico de la región próxima al origen de coordenadas.

DBNS-H-2	50 K	100 K
M_r (Am ² /kg)	22	16
H_c (A/m)x10 ⁻⁴	-1.8	-1.4

Tabla VII. Valores de la magnetización remanente y del campo coercitivo a 50 y 100 K para el compuesto DBNS-H-2.

3.2.3. Susceptibilidad magnética AC

Partiendo de una suspensión del compuesto **DBNS-H** (1.85 mg/ml) se preparan diferentes diluciones en agar tal y como se muestra en la **Tabla II**. Tras un proceso de liofilización las muestras se caracterizan magnéticamente para determinar la susceptibilidad magnética AC.

La dependencia de las componentes de la susceptibilidad con respecto a la temperatura para el compuesto **DBNS-H** se puede observar en la **Figura 12A** y **12B** en el rango de temperaturas entre 10 K y 300 K. En dicha figura se muestran la susceptibilidad en fase y fuera-de-fase por unidad de masa de muestra para diferentes diluciones del compuesto **DBNS-H**.

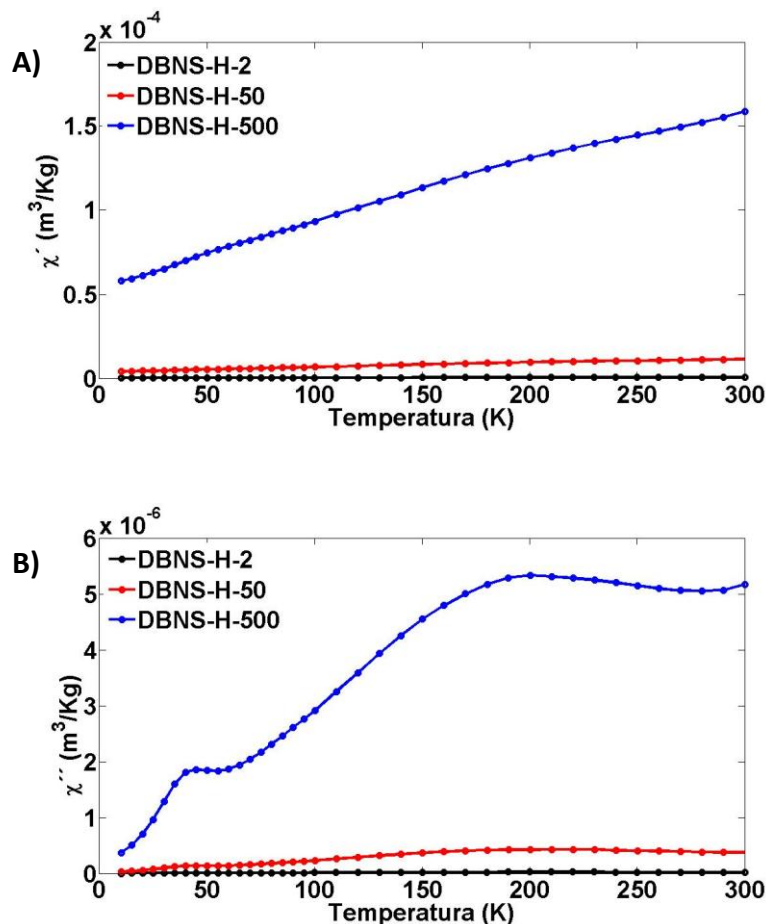


Figura 12. A) Representación gráfica de la susceptibilidad en fase por unidad de masa de muestra vs. temperatura para diferentes grados de dilución del compuesto **DBNS-H**. B) Gráfico que muestra la susceptibilidad fuera-de-fase por unidad de masa de muestra en función de la temperatura para varias concentraciones del compuesto **DBNS-H**.

En la **Figura 12A** se observa un perfil ascendente de la curva en todo el rango de temperaturas medido para todas las muestras estudiadas. Si analizamos la susceptibilidad fuera-de-fase (**Figura 12B**) observamos la presencia de dos máximos en el rango de temperaturas del experimento para todas las muestras investigadas. Este comportamiento magnético podría ser debido a la presencia de nanopartículas individuales junto con clusters de partículas donde las interacciones dipolo-dipolo tienen una importancia significativa; lo cual produciría la variación en el comportamiento magnético de los momentos magnéticos de las nanopartículas.

La dependencia con la temperatura de la susceptibilidad fuera-de-fase por unidad de masa de magnetita y χ'' normalizada para el compuesto **DBNS-H** se representan en la **Figura 13A** y **13B**, respectivamente.

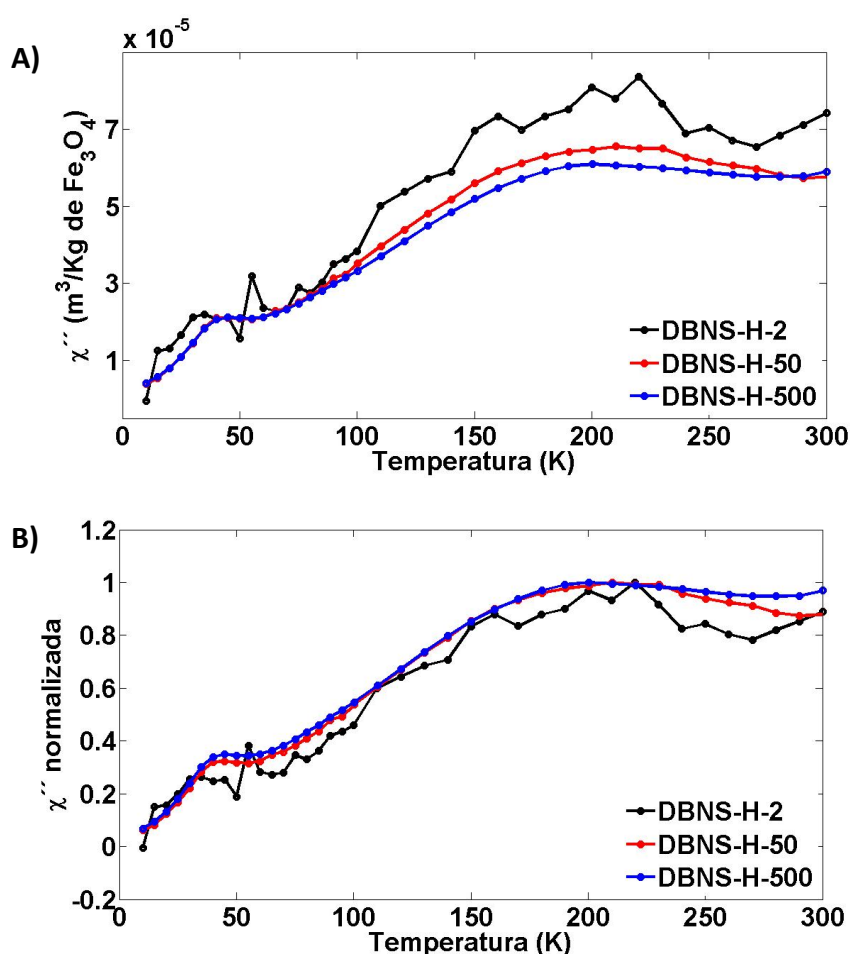


Figura 13. A) Representación gráfica de la susceptibilidad fuera-de-fase por unidad de masa de magnetita en función de la temperatura para las diferentes muestras de **DBNS-H** estudiadas. B) Normalización de la susceptibilidad fuera-de-fase frente a la temperatura.

Si nos fijamos detenidamente en los perfiles de las curvas de la **Figura 13** vemos un comportamiento magnético similar para la muestra DBNS-H-50 y DBNS-H-500, indicando que, posiblemente, un mayor o menor grado de dilución del compuesto **DBNS-H** no influye, en este caso, de manera significativa en las interacciones interpartícula. Para la muestra más diluida (DBNS-H-2), aunque posee una relación señal/ruido mayor que el resto de muestras, se observa un comportamiento magnético similar al resto de las muestras. En la **Figura 13B** se puede

observar la presencia de dos máximos locales en el rango de temperaturas ensayado. Este comportamiento se podría interpretar como la presencia de diferentes grados de agregación de las nanopartículas, habiendo nanopartículas individuales y sin interacciones interpartícula y clusters con diferente grado de interacciones interpartícula. En la **Tabla VIII** se encuentran los valores de la temperatura en los máximos de $\chi''(T)$ para las muestras del compuesto **DBNS-H**. Finalmente, se puede apreciar una tendencia ascendente de χ'' a la temperatura de 300 K, indicando que, posiblemente, no se ha alcanzado el máximo absoluto de la función a esta temperatura, existiendo el fenómeno y el bloqueo magnético en todo el rango de temperaturas estudiado.

Muestra	$T_{\text{máx.1}}$ (K) χ''	$T_{\text{máx.2}}$ (K) χ''
DANS-H-50	45.0	210.2
DANS-H-500	45.0	200.2

Tabla VIII. Temperaturas de los máximos observados en la **Figura 13**. Para la muestra **DBNS-H-2** no se han podido determinar las temperaturas en los máximos debido al ruido experimental. $T_{\text{máx.1}}$ y $T_{\text{máx.2}}$ hacen referencia, respectivamente, al primer y segundo pico del perfil de la curva.

3.2.4. Interacciones interpartícula mediante el factor pre-exponencial τ_0

Los resultados del estudio de las interacciones interpartícula del compuesto **DBNS-H** se realizan mediante el método del factor pre-exponencial τ_0 explicado previamente. En la **Figura 14** se representa el método de cálculo del factor τ_0 para la muestra **DBNS-H-50**. El valor de τ_0 ha sido calculado en el límite cuando la temperatura tiende a cero (línea de color negro en la **Figura 14**); del mismo modo que el método utilizado para el compuesto **DANS-H**. No se han realizado los cálculos en el límite cuando la temperatura tiende a infinito, porque las temperaturas experimentales no han permitido obtener la curva completa de χ' y χ'' en función de la temperatura; tal y como se observan en otros estudios de magnetismo similares.³⁰⁻³² Para la muestra **DBNS-H-50** el valor de τ_0 es $4 \cdot 10^{-13}$ s; y $7 \cdot 10^{-14}$ s para la muestra de mayor concentración de nanopartículas (**DBNS-H-500**). Se puede comprobar cuantitativamente que el valor de τ_0 disminuye conforme aumenta la concentración de nanopartículas en la muestra. Esta tendencia es la misma que la observada para el compuesto **DANS-H**. Estos valores experimentales sugieren que la dinámica de inversión de los espines atómicos no es independiente unos de otros, posiblemente debido a las interacciones interpartícula de tipo dipolo-dipolo.

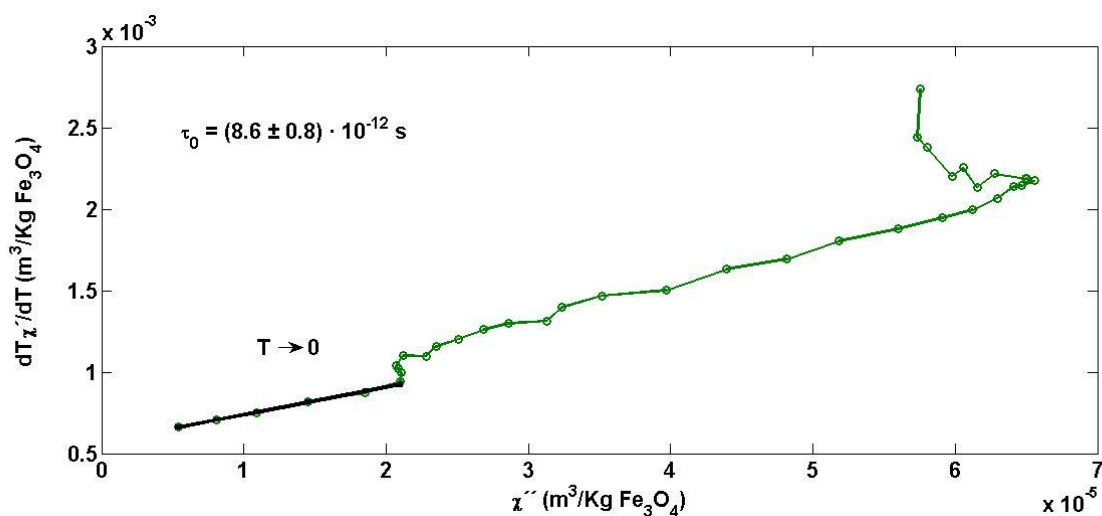


Figura 14. Representación gráfica del método para determinar el valor de τ_0 a 10 Hz para la muestra **DBNS-H-50**.

3.3. Serie DMSA-NP, DEXT-NP y APS-NP

3.3.1. TEM

De forma similar a **DANS-H** y **DBNS-H**, se han sintetizado y preparado muestras en agar con nanopartículas de magnetita de mayor tamaño y con diferentes recubrimientos. Tal y como se explica en el capítulo 2, los recubrimientos empleados han sido: ácido dimercaptosuccínico (DMSA), dextrano y (3-aminopropil)trietoxisilano (APS). Los tamaños y las formas de **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP** se pueden observar en la **Figura 15**, donde se muestran fotografías tomadas con el microscopio de transmisión. La morfología que presentan las nanopartículas es de geometrías redondeadas (ligeramente elípticas).

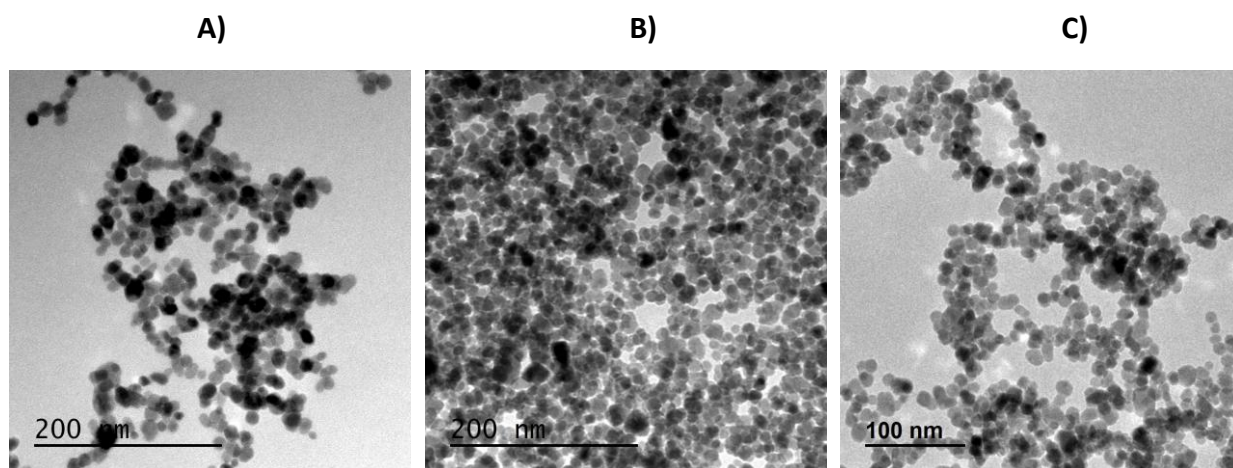


Figura 15. TEM de las nanopartículas magnetita recubiertas con A) DMSA-NP, B) DEXT-NP, y C) APS-NP.

En la **Figura 15** se observa la presencia de agregaciones de nanopartículas o “clusters” para todas las muestras con los diferentes recubrimientos, tal y como se analiza en la revisión de Bashar Issa.⁵ La medida del tamaño de las nanopartículas ha sido más complicado que para **DANS-H** debido a la agregación de las nanopartículas; pero se ha conseguido obtener suficientes medidas para realizar un estudio estadístico del diámetro de las mismas, ver **Figura 16**.

Si se analizan los histogramas se observa, ligeramente, una mayor polidispersidad de tamaños en comparación con los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**. Los diámetros promedio, la desviación estándar y la polidispersidad de las nanopartículas son, respectivamente:

- DMSA-NP. 12.1 nm, 2.8 nm con más del 74% de las nanopartículas entre 11 y 16 nm.
- Dextrano-NP. 13.3 nm, 3.4 nm con más del 65% de las nanopartículas entre 11 y 16 nm.
- APS-NP. 12.2 nm, 2.9 nm con más del 66% de las nanopartículas entre 10 y 14 nm.

Las nanopartículas son en todos los casos de mayor tamaño que los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**, observando la presencia de nanopartículas de más de 20 para todos los recubrimientos.

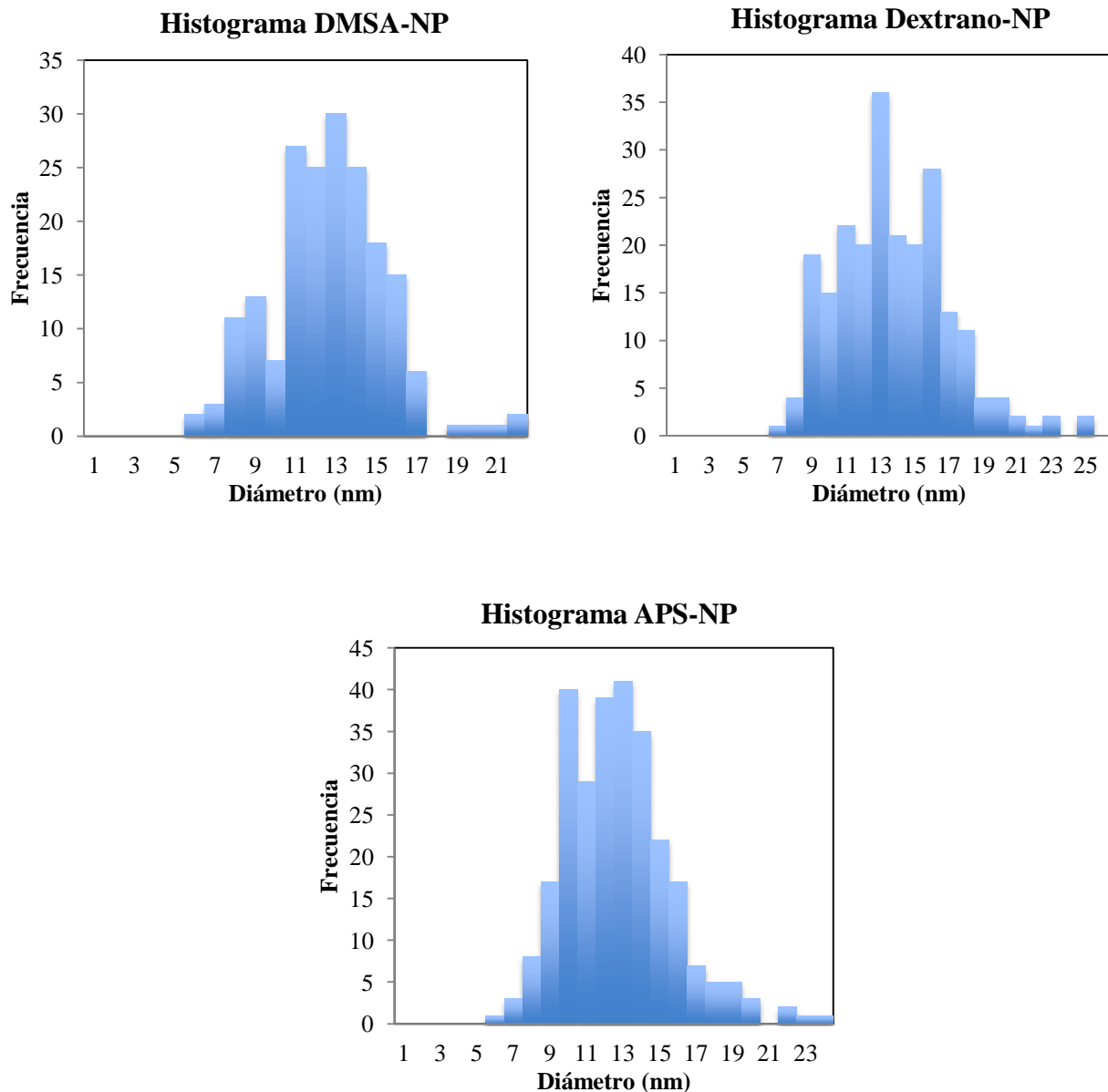


Figura 16. Histogramas del diámetro de las nanopartículas recubiertas con los diferentes recubrimientos. Los tamaños de muestra utilizados para el estudio estadístico son: 187(DMSA-NP), 225 (DEXT-NP) y 276 (APS-NP).

Utilizando el software Minitab® se ha realizado un análisis estadístico utilizando la prueba ANOVA. Se puede concluir que existen diferencias significativas entre las medias con un nivel de significancia del 0.05. Si nos fijamos en la **Figura 17** podemos comprobar como los intervalos de confianza del diámetro de partícula de **DMSA-NP** y **APS-NP** difieren del intervalo de confianza de **DEXT-NP**. Estos resultados pueden ser debidos a procesos de disolución de las capas superficiales de las nanopartículas durante el proceso de recubrimiento; ya que el procedimiento de encapsulación es diferente para cada recubrimiento. Otra posible interpretación de los resultados podría ser la imprecisión en la medición del diámetro de las nanopartículas debido a la gran aglomeración de nanopartículas en la muestra de **DEXT-NP**, como se puede observar en la **Figura 15B**.

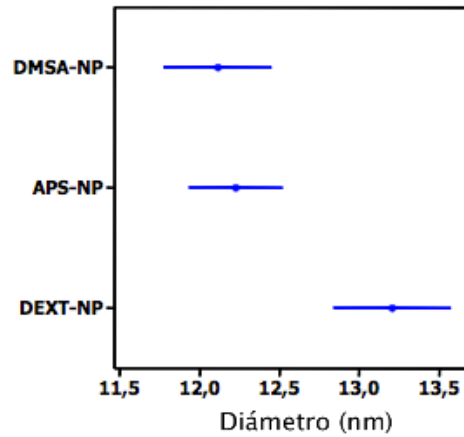


Figura 17. Gráfico de comparación de las medias del diámetro de partícula para **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP**. Los intervalos de confianza que no se superponen indican que los promedios del diámetro de partícula difieren entre sí.

3.3.2. Susceptibilidad magnética AC

Los compuestos con diferentes recubrimientos (**DMSA-NP**, **DEXT-NP**, **APS-NP**) se han caracterizado empleando la técnica de susceptibilidad magnética AC. Se ha medido la susceptibilidad magnética tanto en fase (χ') como fuera-de-fase (χ'') en función de la temperatura para las muestras **DMSA-NP-200**, **DEXT-NP-200** y **DEXT-NP-2**. Los resultados de dicha caracterización se muestran en la **Figura 18**.

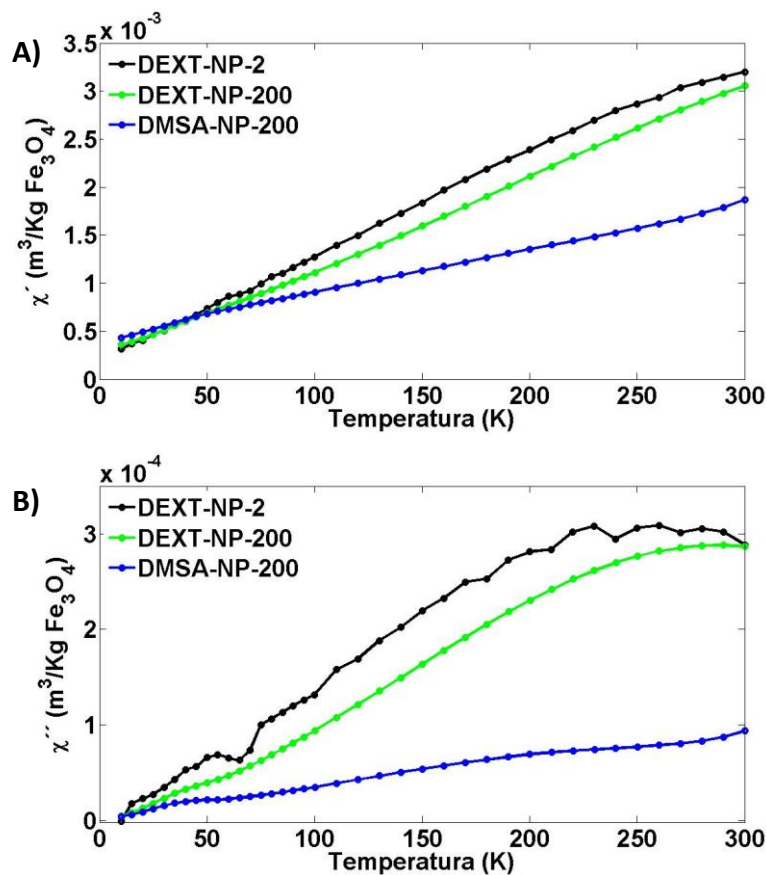


Figura 18. A) Representación gráfica de la susceptibilidad en fase (χ') por unidad de masa de magnetita en función de la temperatura; y B) Susceptibilidad fuera-de-fase (χ'') por unidad de masa de magnetita vs. la temperatura para 3 muestras representativas del comportamiento magnético de las nanopartículas de magnetita con diferentes recubrimientos.

El comportamiento magnético observado en la **Figura 18** muestra la ausencia del perfil típico con el máximo de la curva, comprobando que tanto χ' como χ'' aumenta en todo el rango de temperaturas estudiado. Estos resultados son similares a los observados para el compuesto **DBNS-H**, indicando que se produce el fenómeno de bloqueo magnético en todo el rango de temperaturas ensayado.

Realizando una comparativa con todas las nanopartículas recubiertas con dextrano, se puede estudiar si es posible utilizar dichos compuestos en ensayos de monitorización magnética de tejidos biológicos, comparando en la **Figura 19** el perfil de $\chi''(T, \omega = 10 \text{ Hz})$ normalizado junto con los resultados disponibles en la bibliografía para la ferritina*.³³ En la figura, aunque los datos originales de la Ref. [33] fueron obtenidos a 9 Hz, el perfil mostrado ha sido calculado para 10 Hz (considerando el comportamiento dependiente de la frecuencia estudiado también en dicho trabajo). Como se puede observar, el máximo de la curva $\chi''(T)$ de los compuestos **DANS-H**, **DBNS-H** y **DEXT-NP** aparecen a temperaturas más elevadas que para la ferritina, pudiendo diferenciar mediante este tipo de medidas, la señal que proviene de la ferritina respecto la señal de las nanopartículas sintéticas. Por lo tanto, las nanopartículas de magnetita encapsuladas con dextrano podrían ser utilizadas en estudios de monitorización magnética de tejidos biológicos. Estos resultados son extrapolables a compuestos nanoparticulados de magnetita del mismo tamaño y con recubrimientos diferentes, como DMSA o APS.

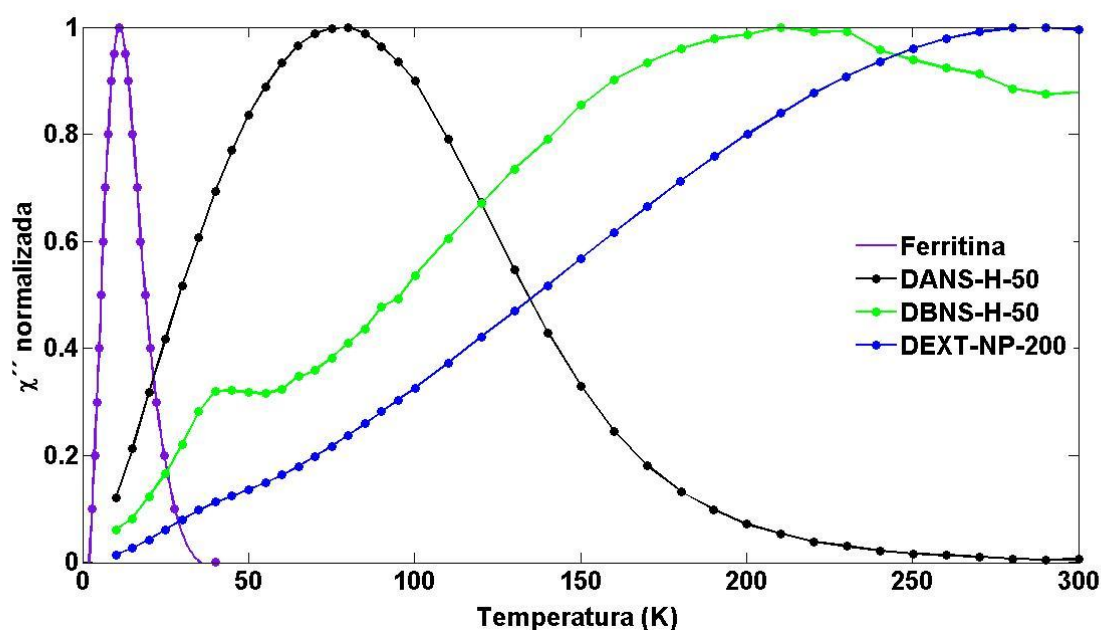


Figura 19. Representación gráfica de la susceptibilidad fuera-de-fase normalizada en función de la temperatura donde se compara el magnetismo de la ferritina con respecto a las muestras del compuesto **DANS-H**.

En los estudios biológicos que han llevado a cabo otros investigadores se observa, tanto *in vitro* como *in vivo*, que las nanopartículas magnéticas tienden a agregarse en el medio biológico, sea en plasma, células o tejido conjuntivo. Por lo tanto, los resultados de las muestras donde hay una mayor interacción interpartícula podrían estar más próximos a los que se obtendrían en un sistema biológico.^{30, 32}

*La **ferritina** es la proteína responsable del almacenamiento de hierro. Este polipéptido une el metal muy estrechamente; pero como el proceso es reversible, el elemento se encuentra disponible ante la demanda celular.

6. Conclusiones

- Los compuestos nanoparticulados **DANS-H** y **DBNS-H** de magnetita recubierta en su superficie con dextrano poseen tamaños de partícula similares con más del 70 % de las nanopartículas con diámetros comprendidos entre 7 y 11 nm. En cambio, los compuestos **DMSA-NP**, **DEXT-NP** y **APS-NP** poseen mayores tamaños de partícula, donde más del 68 % de las nanopartículas tienen un diámetro entre 11 nm y 16 nm.
- En el caso de los compuestos **DANS-H** y **DBNS-H**, modificando únicamente el método de recubrimiento se han obtenido nanopartículas con diferente grado de agregación. Esta variación en la metodología de síntesis ha sido, básicamente, el cambio en el momento en el que se añade dextrano para la estabilización de las nanopartículas: el compuesto **DANS-H** se ha obtenido añadiendo dextrano una vez que las nanopartículas ya estaban sintetizadas; mientras que **DBNS-H** se ha obtenido en presencia de dextrano en el medio desde el comienzo de la reacción química.
- La caracterización por TEM ha permitido analizar los tamaños de partícula y la morfología de los compuestos, siendo en todas las muestras nanopartículas de geometrías redondeadas.
- **DBNS-H** muestra magnetización remanente (M_R) y campo coercitivo (H_c) diferente de cero a todas las temperaturas estudiadas; mientras que **DANS-H** no muestra este mismo comportamiento; excepto a la temperatura de 50 K. El compuesto **DANS-H** muestra un comportamiento típico de un sistema nanoparticulado superparamagnético.
- Los compuestos **DBNS-H**, **DMSA-NP**, **DEXT-NP**, **APS-NP** muestra el fenómeno de bloqueo magnético en todo el rango de temperaturas ensayado; a diferencia del compuesto **DANS-H** que a partir de 270 K tiene un comportamiento superparamagnético.
- Para el compuesto **DANS-H**, el tiempo de relajación se desvía del modelo de prueba sugerido con la Ley de Arrhenius a medida que aumenta la concentración de nanopartículas en la muestra, indicando un posible efecto de una mayor interacción interpartícula.
- Las nanopartículas de todos los compuestos estudiados poseen un momento magnético efectivo por ion de hierro superior al del ion de hierro paramagnético.
- Las constantes de anisotropía calculadas para el compuesto **DANS-H** tienen valores similares a los obtenidos en estudios previos para sistemas de nanopartículas de magnetita de tamaños de partícula parecidos.
- En un principio, los sistemas de nanopartículas estudiados podrían ser utilizados en estudios con sistemas biológicos, porque sus comportamientos magnéticos difieren del de la ferritina; pudiendo caracterizar, sin interferencias, el hierro exógeno del hierro endógeno.

Apéndice 1

El superparamagnetismo es una forma de magnetismo que aparece en nanopartículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas. Normalmente, cualquier material ferromagnético o ferrimagnético experimenta una transición a un estado paramagnético por encima de su temperatura de Curie. El superparamagnetismo es diferente a esta transición; ya que éste ocurre por debajo de la temperatura de Curie del material. El superparamagnetismo se produce en nanopartículas con un único dominio magnético. Esto es posible cuando su diámetro está por debajo de los 50 nm, generalmente, aunque depende del material. En este caso, se considera que la magnetización de las nanopartículas es un único y gran momento magnético que es la suma de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos magnéticos de la nanopartícula.

Debido a la anisotropía magnética de las nanopartículas, el momento magnético tiene sólo dos direcciones estables antiparalelas una de la otra y separadas por una barrera energética. Las orientaciones estables son las llamadas “direcciones de fácil magnetización” de la nanopartícula. A una temperatura dada, existe una probabilidad finita de que la magnetización cambie de dirección. En nanopartículas suficientemente pequeñas, la magnetización puede cambiar de dirección aleatoriamente bajo la influencia de la temperatura. En un sistema de nanopartículas, el tiempo promedio transcurrido en el cambio de orientación del vector momento magnético es lo que se conoce como el tiempo de relajación de Néel (τ):

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right)$$

donde τ es el tiempo promedio para que la magnetización de la nanopartícula invierta su orientación aleatoriamente como resultado de las fluctuaciones térmicas, τ_0 es el tiempo característico del material conocido como “tiempo de intento”, K es la constante de anisotropía magnética de la nanopartícula, V es el volumen de la nanopartícula, y por tanto, KV es la barrera de energía asociada con el cambio de orientación del vector momento magnético de la nanopartícula, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura.

El tiempo de relajación de Néel puede tener valores de unos pocos nanosegundos a años o incluso periodos de tiempo mayores. Como se puede deducir de la expresión matemática, el tiempo de relajación de Néel es una función exponencial del volumen de la partícula, lo que explica que la probabilidad del cambio en la orientación del vector magnetización de la partícula se convierta rápidamente en un valor relativamente pequeño para las partículas grandes o los materiales ‘bulk’. En ausencia de un campo magnético externo, cuando el tiempo de medida de la magnetización de las nanopartículas es mucho mayor que el tiempo de relajación de Néel, la magnetización en promedio aparece como cero. Se dice en este caso que estamos en un estado superparamagnético. En este estado, un campo magnético externo es capaz de magnetizar las nanopartículas de manera similar a un material paramagnético. Sin embargo, la susceptibilidad magnética es mucho mayor que la de un paramagnético.

La determinación de la susceptibilidad AC está basada en la medida del momento magnético dependiente del tiempo después de estimular el sistema con un campo magnético alterno. Con este experimento y conociendo la masa de la muestra, los componentes en fase (χ') y fuera-de-fase (χ'') de la susceptibilidad másica AC son determinados. En la práctica, esto es posible aplicando un campo magnético AC $h_{AC} = h_0 \cos(\omega t)$, controlando la amplitud h_0 y la frecuencia ω . h_0 se

elige para lograr un compromiso entre tener suficiente sensibilidad y evitar los efectos no lineales, mientras que ω se toma en el rango donde el equipo tiene la mejor sensibilidad (para los detectores SQUID, es una buena opción valores de frecuencia en el orden de 10 Hz). El momento magnético medido es $m_{AC} = m_0 \cos(\omega t - \phi)$, que es una cantidad que varía con el tiempo con la misma frecuencia (ω) pero retardada con un desfase ϕ con respecto a le campo magnético externo. De forma técnica, para describir este comportamiento dependiente del tiempo, se emplea una notación compleja, siendo la susceptibilidad másica $\chi = \chi' - i\chi''$, de manera que $M = \rho\chi H$, donde M es el momento magnético por unidad de volumen, ρ es la densidad de la muestra y H el campo magnético aplicado.

Otra característica de un sistema superparamagnético es la temperatura de bloqueo. Se mide la magnetización de una única nanopartícula superparamagnética, definiendo τ_m como el tiempo de medida. Si $\tau_m \gg \tau$, la magnetización de las nanopartículas cambiaran de orientación varias veces durante la medida, por lo que la magnetización medida será en promedio cero. Si $\tau_m \ll \tau$, la magnetización no cambiará de orientación durante la medida, por lo que la magnetización medida será un valor no nulo. De esta manera, se define que el sistema está en el estado superparamagnético cuando $\tau_m \gg \tau$; mientras que el sistema se encuentra en un estado de bloqueo cuando $\tau_m \ll \tau$. Por lo tanto, el estado de nanopartículas (superparamagnéticas o bloqueadas) depende del tiempo de medida. La transición entre es estado superparamagnético y el bloqueo ocurre cuando $\tau_m = \tau$. En varios experimentos, el tiempo de medida se mantiene constante, siendo la temperatura la variable que cambia; de manera que la transición entre estado superparamagnético y de bloqueo es visto como una función de la temperatura. La temperatura a la cual $\tau_m = \tau$ es conocida como temperatura de bloqueo magnético (T_B):

$$T_B = \frac{KV}{k_B \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)}$$

Cuando se aplica un campo magnético externo a un sistema de nanopartículas superparamagnéticas, los momentos de las partículas tienden a alinearse a lo largo del campo aplicado, produciendo una magnetización neta, ver **Figura 1-AP**.

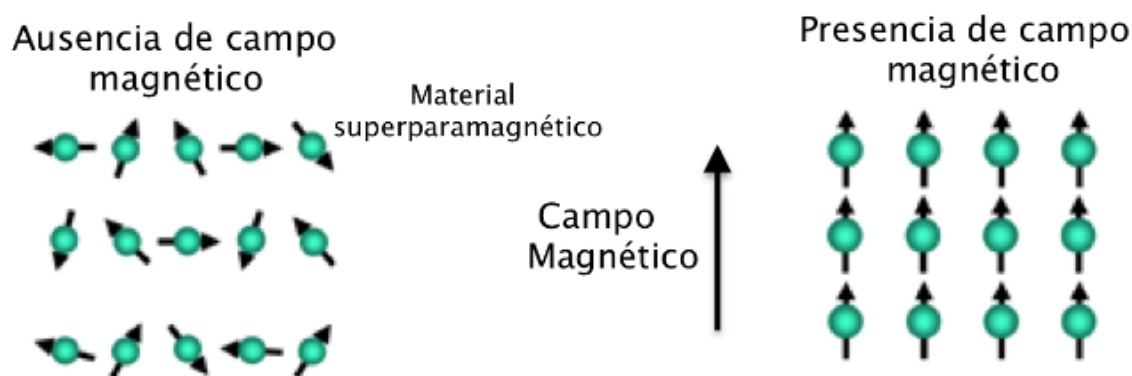


Figura 1-AP. Representación esquemática del alineamiento de los momentos magnéticos de un conjunto de nanopartículas magnéticas en ausencia y en presencia de un campo magnético.

La curva de magnetización en función del campo magnético de un sistema superparamagnético se puede comparar en la **Figura 2-AP**. Vemos que en el magnetismo de partículas pequeñas el perfil de la curva $M(H)$ es una función reversible con forma de S, que para algunos casos simples:

1. Si todas las partículas son idénticas (misma barrera de energía y mismo momento magnético), las direcciones de fácil magnetización están todas orientadas paralelas al campo magnético aplicado y si la temperatura es suficientemente baja ($T_B < T \leq \frac{KV}{10k_B}$), la magnetización del sistema es:

$$M(H) \approx n\mu \tanh\left(\frac{\mu_0 H \mu}{k_B T}\right)$$

2. Si todas las partículas son idénticas y la temperatura es lo suficientemente elevada ($T \geq \frac{KV}{k_B}$) la función será:

$$M(H) \approx n\mu L\left(\frac{\mu_0 H \mu}{k_B T}\right)$$

donde n es la densidad de nanopartículas en la muestra, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío, μ es el momento magnético de la nanopartícula, y $L(x) = \frac{1}{\tanh(x)} - \frac{1}{x}$ es la función de Langevin.

La pendiente inicial de la función $M(H)$ es la susceptibilidad magnética de la muestra (χ):

$$\chi = \frac{n\mu_0\mu^2}{k_B T} \text{ para el primer caso}$$

$\chi = \frac{n\mu_0\mu^2}{3k_B T}$ para el segundo caso. Esta susceptibilidad es también válida para todas las temperaturas mayores que la temperatura de bloqueo si las direcciones de fácil magnetización de las nanopartículas están orientadas aleatoriamente.

Se puede deducir de las ecuaciones que las nanopartículas más grandes tienen un mayor momento magnético por nanopartícula y, por lo tanto, una mayor susceptibilidad. Esto explica porque las nanopartículas superparamagnéticas tienen una susceptibilidad relativamente más grande que los materiales paramagnéticos; ya que los sistemas superparamagnéticos se comportan exactamente igual que un material paramagnético con un gran momento magnético

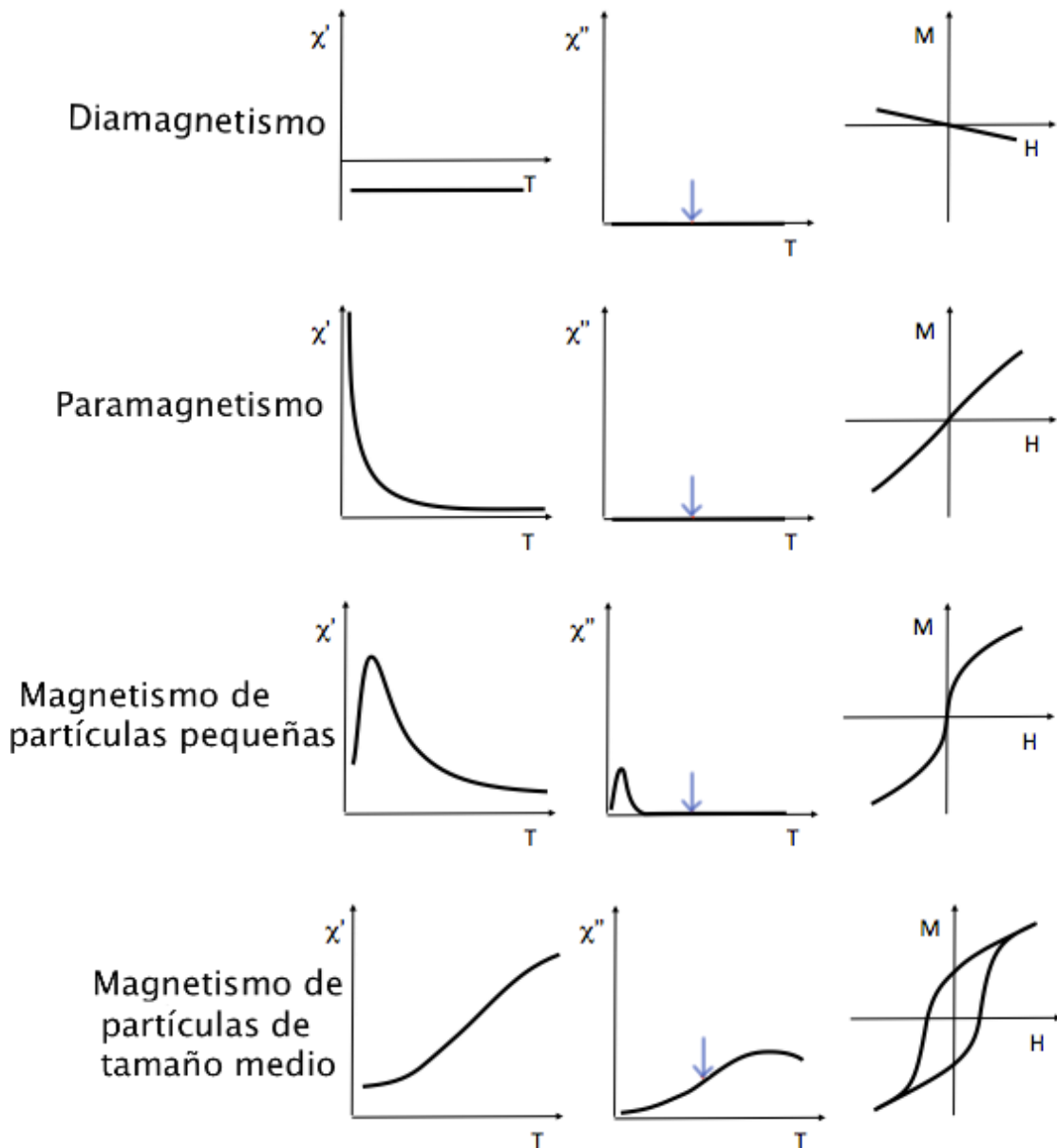


Figura 2-AP. Gráfico en el que se muestra el comportamiento magnético típico de los diferentes tipos de magnetismo. Por columnas de izquierda a derecha se representa χ' vs. temperatura (T), χ'' vs. temperatura y la magnetización (M) en función del campo magnético externo (H) a la temperatura indicada en las flechas, respectivamente. El comportamiento magnético típico de un material superparamagnético está representado en el magnetismo de partículas pequeñas por encima de cierta temperatura donde no existen fenómenos de bloqueo magnético.

Apéndice 2

Tabla resumen de conversión de unidades entre el Sistema Internacional (SI) y el Sistema Cegesimal (CGS) para diferentes parámetros magnéticos.³⁴

Parámetro magnético	Símbolo	Unidad en SI	Unidad en CGS	Factor de conversión
Densidad de flujo magnético	B	Tesla (T)	Gauss (G)	$1\text{T} = 10^4\text{ G}$
Campo magnético	H	A/m	Oersted (Oe)	$1\text{A/m} = \frac{4\pi}{10^3}\text{ Oe}$
Magnetización	M	A/m	emu/cm ³	$1\text{ A/m} = 10^{-3}\text{ emu/cm}^3$
Magnetización másica	σ	A·m ² /kg	emu/g	$1\text{ A}\cdot\text{m}^2/\text{kg} = 1\text{ emu/g}$
Momento magnético	m	A·m ²	emu	$1\text{ A}\cdot\text{m}^2 = 10^3\text{ emu}$
Susceptibilidad volumétrica	κ	Adimensional	Adimensional	$4\pi\text{ (SI)} = 1\text{ (cgs)}$
Susceptibilidad másica	χ	m ³ /kg	$\frac{\text{emu}}{\text{Oe}\cdot\text{g}}$	$1\text{ m}^3/\text{kg} = 10^3/4\pi\frac{\text{emu}}{\text{Oe}\cdot\text{g}}$
Permeabilidad del vacío	μ_0	H/m	Adimensional	$4\pi\cdot 10^{-7}\text{ H/m} = 1\text{ (cgs)}$

Apéndice 3

En este apartado se explica la metodología para calcular el factor pre-exponencial (τ_0) que aparece en la expresión de Arrhenius para el tiempo de relajación ($\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{E_a}{k_B T}\right)$) de los espines magnéticos atómicos tras un estímulo magnético. Para nanopartículas que no interactúan entre sí, la susceptibilidad fuera de fase χ'' y la derivada $d(T\chi')/dT$ están relacionadas mediante la expresión:²⁴

$$\frac{\partial T\chi'_{exp}}{\partial T} = -\frac{2}{\pi}\chi'' \ln(\omega\tau_0) + \frac{\mu_0 M_S^2}{3K} \int_{D_b}^{\infty} dDf(D) + \chi'_{diamagnética} \quad (1)$$

donde M_S es la magnetización espontánea, K es la constante de anisotropía, $f(D)dD$ la fracción volumétrica ocupada por las nanopartículas con diámetros comprendidos entre D y $D + dD$, y χ'_{dia} la contribución diamagnética debida al agar y la cápsula de gelatina. El límite inferior de la integral, D_b , es el llamado diámetro de bloqueo, definido como $D_b = -\left[\frac{6k_B T/\pi K}{\ln(\omega\tau_0)}\right]^{1/3}$, donde k_B es la constante de Boltzmann, ω es la frecuencia en el experimento y τ_0 el factor pre-exponencial que aparece en la expresión de Arrhenius para el tiempo de relajación descrito previamente.

Por definición $f(D)$ es una distribución normalizada; por lo tanto, cuando D_b tiende a cero, la integral tiende a la unidad. En los límites de baja y alta temperatura, la ecuación 1 queda de la siguiente manera:

$$\lim_{T \rightarrow 0} \frac{\partial T\chi'_{exp}}{\partial T} = -\frac{2}{\pi}\chi'' \ln(\omega\tau_0) + \frac{\mu_0 M_S^2}{3K} + \chi'_{diamagnética} \quad (2)$$

$$\lim_{T \rightarrow \infty} \frac{\partial T\chi'_{exp}}{\partial T} = -\frac{2}{\pi}\chi'' \ln(\omega\tau_0) + \chi'_{diamagnética} \quad (3)$$

De las ecuaciones anteriores se puede afirmar que representando $d(T\chi')/dT$ vs. χ'' se puede calcular τ_0 , $\chi'_{diamagnética}$, M_S y K .

Referencias

1. Esterlrich J., Escribano E., Queralt J., Busquets M. A., Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8070-8101, (2015).
2. Jun Y. W., Lee J. H., Cheon J., Chemical design of nanoparticle probes for high-performance magnetic resonance imaging. *Angewandte Chemie, International Edition*, 47, 5122-5135, (2008).
3. Yoo D., Lee J. H., Shin T. H., Cheon J., Theranostic magnetic nanoparticles. *Accounts of Chemical Research*, 44, 863-874, (2011).
4. Ling D., Hyeon T., Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. *Small*, 9, 1450-1466, (2012).
5. Issa B., Obaidat I. M., Albiss B. A., Haik Y., Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 21266-21305, (2013).
6. Lee N., Hyeon T., Designed synthesis of uniformly sized iron oxide nanoparticles for efficient magnetic resonance imaging contrast agents. *Chemical Society Reviews*, 41, 2575-2589, (2012).
7. Casula M. F., Floris P., Innocenti C., Lascialfari A., Marinone M., Corti M., Sperling R. A., Parak W. J., Sangregorio C., Magnetic resonance imaging contrast agents based on iron oxide superparamagnetic ferrofluids. *Chemistry of Materials*, 22, 1739-1748, (2010).
8. Lee H., Shin T-H., Cheon J., Weissleder R., Recent developments in magnetic diagnostic systems. *Chemical Reviews*, 115, 10690-10724, (2015).
9. Lee N., Yoo D., Ling D., Cho M. H., Hyeon T., Cheon J., Iron oxide based nanoparticles for multimodal imaging and magnetoresponsive therapy. *Chemical Reviews*, 115, 10637-10689, (2015).
10. Thiesen B., Jordan A., Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 24, 467-474, (2008).
11. Gutiérrez L., Costo R., Grüttner C., Westphal F., Gehrke N., Heinke D., Fornara A., Pankhurst Q. A., Johansson C., Veintemillas-Verdaguer S., Morales M. P., Synthesis methods to prepare single- and multi-core iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Dalton Transactions*, 44, 2943-2952, (2015).
12. Roca A. G., Costo R., Rebolledo A. F., Veintemillas-Verdaguer S., Tartaj P., González-Carreño T., Morales M. P., Serna C. J., Progress in the preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 42, 1-11, (2009).
13. Villanueva A., Cañete M., Roca A. G., Calero M., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C. J., Morales M. P., Miranda R., The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*, 20, (2009).
14. Bautista M. C., Bomati-Miguel O., Zhao X., Morales M. P., González-Carreño T., Pérez de Alejo R., Ruiz-Cabello J., Veintemillas-Verdaguer S., Comparative study of ferrofluids based dextran-coated iron oxide and metal nanoparticles for contrast agents in magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*, 15, S154-S159, (2004).
15. Pardoe H., Chua-anusorn W., St Pierre T. G., Dobson J., Detection limits for ferrimagnetic particle concentrations using magnetic resonance imaging based proton transverse relaxation rate measurements. *Physics in Medicine and Biology*, 48, N89-95, (2003).
16. De la Presa P., Luengo Y., Velasco V., Morales M. P., Iglesias M., Veintemillas-Verdaguer S., Crespo P., Hernando A., Particle interactions in liquid magnetic colloids by zero field cooled measurements: effects on heating efficiency. *The Journal of Physical Chemistry C*, 119, 11022-11030, (2015).

17. Luengo Y., Nardecchia S., Morales M. P., Serrano M. C., Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles. *Nanoescale*, 5, 11428-11437, (2013).
18. Zhang L., He R., Gu H-C., Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253, 2611-2617 (2006).
19. Morales M. P., Veintemillas-Verdaguer S., Montero M. I., Serna C. J., Roig A., Casas Ll., Martínez B., Sandiumenge F., Surface and Internal Spin Canting in γ -Fe₂O₃ Nanoparticles. *Chemistry of Materials*, 11, 3058-3064, (1999).
20. Gutiérrez L., Morales M. P., Lázaro F. J., Magnetic and structural study of the state of iron in the oral haematinic ferrimannitol ovoalbumin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 413-417, (2006).
21. Cornell R. M., Schwertmann U., The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses. Second Edition. *Wiley-VCH*. (2003).
22. Goya G. F., Berquó T. S., Fonseca F. C., Morales M. P., Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 94, 3520-3528, (2003).
23. Gutiérrez L., Morales M. P., Lázaro F. J., Magnetostructural study of iron sucrose. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 69-74, (2005).
24. López A., Gutiérrez L., Lázaro F. J., The role of dipolar interaction in the quantitative determination of particulate magnetic carriers in biological tissues. *Physics in Medicine and Biology*, 52, 5043-5056, (2007).
25. Papaefthymiou G. C., Nanoparticle magnetism. *Nano Today*, 4, 438-447, (2009).
26. Gutiérrez L., Magnetostructural characterisation of biological materials: Detection and quantification of nanometric iron-containing species. *Tesis doctoral*, Universidad de Zaragoza, España, (2008).
27. Callister W.D., Materials Science and Engineering. An Introduction. Third Edition. *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, U.S.A., (2010).
28. García-Palacios J. L., On the statics and dynamics of magnetoanisotropic nanoparticles. *Advances in Chemical Physics*, 112, 1-210, (2000).
29. Arelaro A. D., Brandl A. L., Lima E., Gamarra L. F., Brito G. E. S., Pontuschka W. M., Goya G. F., Interparticle interactions and surface contribution to the effective anisotropy in biocompatible iron oxide nanoparticles used for contrast agents. *Journal of Applied Physics* 97, 10, 3, (2005).
30. Gutiérrez L., Lázaro F. J., Abadía A. R., Romero M. S., Quintana C., Morales M. P., Patiño C., Arranz R., Bioinorganic transformations of liver iron deposits observed by tissue magnetic characterisation in a rat model. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100, 170-1799, (2006).
31. Gutiérrez L., Lázaro F. J., Comparative study of iron-containing haematinics from the point of view of their magnetic properties. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 316, 136-139, (2007).
32. Gutiérrez L., Quintana C., Patiño C., Bueno J., Coppin H., Roth M. P., Lázaro F. J., Iron speciation study in Hfe knockout mice tissues: Magnetic and ultrastructural characterisation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792, 541-547, (2009).
33. Luis F., del Barco E., Hernández J. M., Remiro E., Bartolome J., Tejada J., Resonant spin tunneling in small antiferromagnetic particles. *Physical Review B*, 59, 11837-11846, (1999).
34. Moskowitz B. M., Hitchhiker's Guide to Magnetism. *Environmental Magnetism Workshop*, Institute for Rock Magnetism, (1991).