



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**

**INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES NUCLEARES**



FACULTAD DE MEDICINA

**RELAXOMETRÍA DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE HIERRO COMO MEDIO DE
CONTRASTE EN IMÁGENES DE
RESONANCIA MAGNÉTICA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN FÍSICA MÉDICA**

PRESENTA

Eric Gutiérrez García

**Comité de Tutores: Dr. Miguel Ángel Camacho López
Dra. Silvia Sandra Hidalgo Tobón
Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas**

**Comité de Revisores: Dr. Oscar Arias Carrión
Dr. Guillermo Carbajal Franco
Dr. Benito de Celis Alonso
Dr. Eugenio Torres García**

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO 2013



Agradecimientos

Quiero agradecer primero a la institución que hizo posible que se concluyera este trabajo bajo el proyecto SEP-CONACYT (Fondo de Investigación Científica Básica) No. 154602 "Nanopartículas magnéticas para aplicaciones en terapia hipertérmica, imagenología y transporte de fármacos: Estudio de las condiciones fundamentales de control de morfología, tamaño y estabilización" (2012-2014), en la Universidad de las Américas Puebla.

A la beca otorgada por COMECYT durante un semestre, a la beca Escolaridad y a la beca Enlace de la UAEM

A la Dra. Silvia Sandra Hidalgo Tobón por darme la oportunidad de ser parte de esta investigación, por su instrucción, por ofrecerme su apoyo incondicional y por su amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas por aceptarme en su proyecto de investigación, por su instrucción, por ofrecerme su apoyo incondicional y por su amistad.

Al Dr. Miguel Ángel Camacho López, por su apoyo incondicional y por su amistad.

Al Hospital Infantil de México en la ciudad de México por facilitar el equipo médico de imagenología.

Dedicatorias

A lo más importante que tengo en mi vida, mi familia.

A mi esposa que con su amor, cariño y comprensión me ha ayudado a concluir este proyecto de vida. Por estar siempre cuando más la necesito y preocuparse.

A mis hijas que son fuente de inspiración para seguir creciendo. Por comprender que no podía estar siempre con ellas.

A mi papas por todos sus consejos y enseñanzas que me han transmitido. Por enseñarme que nada te regalan, que todo lo que obtienes es el fruto de lo que trabajas.

A mis hermanos por todo su cariño y amor que me ha brindado.

A todos mis compañeros que me han brindado su amistad incondicional.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
ABREVIATURAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS	12
ÍNDICE DE TABLAS	16
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	17
Capítulo 2 ESTADO DEL ARTE	21
Resovist®	22
GastroMARK® / Lumirem®	22
HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN	24
OBJETIVOS	24
Capítulo 3 MARCO TEÓRICO	25
Principios Básicos de la Resonancia Magnética	25
3.1 Descripción Clásica	25
3.2 Descripción mecánico cuántica	29
3.3 Magnetización Macroscópica.....	32
3.4 Excitación	36
3.5 Las ecuaciones de Bloch.....	39
3.6 Transformada de Fourier en RMN	45
3.7 Constantes de relajación	52
Relajación T_2 y espín-eco.....	59
3.8 Las propiedades magnéticas de SPIONs.....	62
3.9 Efectos de las SPION sobre el contraste de las IRM.....	64

3.10 Métodos de adquisición de imágenes por resonancia magnética para la mejor detección de las SPIONs.....	65
3.11 Importantes parámetros de diseño de las SPIONs.....	67
3.11.1 Consideraciones básicas.....	67
3.11.2 Recubrimiento de la superficie	70
3.12 Resonador IRM del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”	74
3.12.1 El imán.....	75
3.12.2 Bobinas de Radiofrecuencia.....	75
3.12.3 Gradientes	76
3.13.4 Sistema de computadora y consola	76
3.12.5 Sistema de manejo de los pacientes	76
Capítulo 4 METODOLOGÍA	77
Síntesis de nanopartículas.....	77
Reactivos	77
Materiales	78
Método de poliol utilizando TREG	79
Método de poliol utilizando PEG 6000.....	81
Cálculo de las concentraciones preparadas en los viales.....	85
Capítulo 5 RESULTADOS	90
Caracterizaciones	91
Caracterización de nanopartículas magnéticas utilizando TEM.....	92
Caracterización de nanopartículas magnéticas con DLS.....	96
Evaluación de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética nuclear	100
Capítulo 6 CONCLUSIONES.....	111
BIBLIOGRAFÍA.....	113

RESUMEN

En México no hay producción de nanopartículas que tengan las propiedades necesarias para poder usarse en la clínica como medio de contraste en la formación de imágenes por resonancia magnética, es por ello que hemos sintetizado y funcionalizado superficialmente con trietilenglicol (TREG) y Polietilenglicol (PEG), nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs). La preparación y funcionalización se realizó con la técnica de descomposición térmica de precursores inorgánicos de hierro en disolventes de alto punto de ebullición (técnica del poliol) [16], [17], probando diferentes condiciones en la síntesis, logrando así diferentes tamaños de partícula.

A partir de diluciones de concentración conocida de los dos tipos de SPIONs en Agar, se preparó un maniquí con el que se obtuvieron varias imágenes de resonancia magnética en un equipo Philips de 1.5 T en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, en la ciudad de México. Para calcular la relaxometría a las imágenes obtenidas, se empleó un algoritmo en Matlab, donde en primer lugar se calcula el decaimiento de la intensidad de señal S y se ajusta a una curva monoexponencial $S(TE)=S(0)e^{-R_2 \cdot TE}$. La magnitud de la señal spin-echo se puede utilizar para una medición precisa del tiempo de relajación T_2 (tiempo de desaparición de la magnetización transversal después de una perturbación) o la tasa $R_2=1/T_2$. Algunos estudios *in vivo* [22], [23], así como *in vitro* [24] han demostrado que existe un alto grado de correlación entre la concentración de hierro en tejido y R_2 .

Los resultados muestran que los tiempos de relajación T_2 cambian con el tamaño y concentración de las SPIONs, predominando la tendencia de que si disminuye la concentración, el tiempo T_2 también lo hace. El estudio sentará las bases para poder utilizar

las SPIONs como medio de contraste en la formación de imágenes clínicas empleando los equipos de 1.5 o 3 T disponibles en hospitales de México.

ABSTRACT

There is no production in México of nanoparticles with the desired properties required for use them in clinic applications as contrast medium in the formation of magnetic resonance images. In this work, we have synthesized and chemically functionalized the surface of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs), using for that purpose triethyleneglycol (TREG) and Polyethyleneglycol (PEG) as capping and stabilizing agents. The simultaneous preparation and functionalization was performed by the thermal decomposition of appropriate iron inorganic precursors in solvents with high boiling point temperature (the polyol technique) [16], [17]. The exploration of different synthesis conditions, allow us to achieve different particle sizes. Dilutions of known concentration of the two types of SPIONs in agar gel, were prepared into a mannequin (*phantom*) and their magnetic contrast response analyzed on a Philips 1.5 T MRI apparatus at the “Federico Gomez” Hospital Infantil de México at Mexico City. To calculate the relaxometry from the images obtained, an algorithm in Matlab was used, which first calculates the decay of signal intensity S and fit it into a mono-exponential curve defined by $S(TE)=S(0)e^{-R_2 \cdot TE}$. The magnitude of the *spin-echo* signal can be used for precise measurement of T_2 relaxation time (time of disappearance of the transverse magnetization after a disturbance) or the rate $R_2 = 1/T_2$. Some *in vivo* [22], [23] and *in vitro* [24] studies have demonstrated a high level of correlation between iron concentration in tissue and R_2 .

The results show that T_2 relaxation times change with the size and concentration of SPIONs, with a predominant trend that when decreasing concentration, time T_2 does too. The study will provide the basis to utilize these prepared SPIONs as a magnetic contrast agents in clinical image formation at 1.5 or 3 T MRI apparatus available at hospitals in Mexico.

ABREVIATURAS

- DLS.- Dynamic light scattering (dispersión dinámica de luz).
- DRX.- Difracción de rayos X.
- IR.- Infrarrojo.
- MNP's.- Magnetic Nanoparticles (nanopartículas magnéticas).
 - MRI.- Magnetic Resonance Imaging (Imágenes por resonancia magnética).
- MTT.- Bromuro de 3(4, 5-dimetil-tiazol)-2, 5-difeniltetrazólico.
- PEG.- Polietilenglicol.
- PEG-COOH.- Polietilenglicol carboxilado.
- SEM.- Scanning electron microscope (microscopio electrónico de barrido).
- SNR.- Señal a Ruido
- SPION.- Small particle of iron oxide (Partícula pequeña de óxido de hierro).
- TEM.- Transmission electron microscope (Microscopio electrónico de transmisión).
- TREG.- Trietilenglicol.
- USPION.- Ultra small particle of iron oxide (Partícula ultra pequeña de óxido de hierro).
- UV.- Ultra violeta

- FDA.- Food and Drug Administration (Administración de alimentos y medicamentos)
- FID.- Decaimiento de Inducción Libre
- FSN.- Fibrosis Sistémica Nefrogénica
- NP.- Nanopartículas
- EG.- Etilenglicol
- DEG.- Dietilenglicol
- Gd.- Gadolinio
- GRE.- Gradiente Eco
- RES.- Sistema retículo endotelial
- IRM.- Imágenes por Resonancia Magnética
- RMN.- Resonancia Magnética Nuclear
- RM.- Resonancia Magnética
- L .- Momento angular
- I .- Número cuántico del espín
- h .- Constante de Planck
- L_z .- Momento angular en la dirección z

- m .- Segundo número cuántico
- μ .- Momento magnético
- γ .- Relación giromagnética
- B_0 .- Densidad del campo magnético externo
- ΔE .- Diferencia de energía
- β .- Nivel de energía más alta del espín
- α .- Nivel de energía más bajo del espín
- T.- Tesla
- S.- Intensidad de Señal
- TE.- Tiempo eco
- T_1 .- Tiempo de relajación
- T_2 .- Tiempo de relajación
- R_2 .- Rapidez de relajación T_2
- G .- Gradiente de campo magnético
- G_x, G_y, G_z .- Componentes del gradiente G.
- h .- Constante de Planck

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1(a) La energía del espín nuclear para un núcleo con espín $-1/2$ como función de la intensidad de campo magnético externo B_0 . (b) el nivel de energía más bajo (nivel del espín α) corresponde a los momentos magnéticos paralelos con B_0 , mientras en el nivel de energía más alto (nivel del espín β) tienen un alineamiento anti paralelo a B_0 . para todos los campos magnéticos disponibles en la actualidad, la diferencia del nivel de energía entre los dos estados del espín, corresponde a la radiación electromagnética en el rango de radiofrecuencia [25]. _____ 31

Fig. 2. (A) Precesión del espín nuclear en un campo magnético externo B_0 . El momento magnético del espín μ en movimiento de precesión alrededor de B_0 , en el que la orientación ϑ y su amplitud (en la componente z) μ_z son cuantizadas. (B) En un conjunto macroscópico de spin nuclear $-1/2$, los espines se distribuyen entre dos orientaciones posibles de acuerdo con la ecuación de Boltzmann [25]. _____ 33

Fig. 3. Excitación de la magnetización en el plano estático xyz . La magnetización longitudinal \mathbf{M}_0 , alineado inicialmente con el eje z , el cual precesa alrededor del campo magnético estático \mathbf{B}_0 y la irradiación de RF del campo \mathbf{B}_1 en el plano transversal. Esto se traduce en una rotación en el plano trasversal debido a \mathbf{B}_1 y a la precesión simultánea a la frecuencia del Larmor alrededor de \mathbf{B}_0 . En este caso \mathbf{B}_1 será calibrado a la rotación de 90° de \mathbf{M}_0 a partir del eje z para dar excitación [25]. _____ 38

Fig. 4. Excitación de la magnetización en la frecuencia en el marco de referencia rotatorio x', y', z' . (A) En el equilibrio térmico la distribución de Boltzmann de espines nucleares individuales en una muestra macroscópica crea un vector de magnetización neta a lo largo de $+z'$. Dado que los espines individuales no tienen la coherencia de fase (es decir, sus fases están distribuidos al azar), no hay magnetización neta en el plano transversal. (B) Un campo magnético \mathbf{B}_1 a lo largo $-x'$ la magnetización macroscópica neta va hacia $+y'$. En el nivel microscópico esto es equivalente a la generación de la coherencia de fase entre los espines individuales. (C) Cuando el campo magnético \mathbf{B}_1 se calibra para dar excitación completa, los espines han alcanzado la coherencia de fase completa que resulta en un vector de magnetización neta a lo largo de $+y'$. La no magnetización se mantiene a lo largo de z' [25]. _____ 39

Fig. 5. Descomposición de un campo magnético oscilante lineal (A) en dos campos magnéticos en rotación (B) con frecuencias $-\omega$ y ω , respectivamente [25]. _____ 41

Fig. 6. Vectores de campo magnético se encuentran en el marco de referencia rotatorio x', y', z' durante la excitación. (A) En resonancia, el vector del campo magnético externo efectivo es igual al vector de campo magnético \mathbf{B}_1 a lo largo de x' . La magnetización longitudinal experimenta un esfuerzo de torsión y girará hacia el plano transversal a través de un ángulo ϑ . (B) fuera de resonancia, la frecuencia del campo magnético \mathbf{B}_1 ya no es igual a la frecuencia de Larmor, que resulta en un vector de campo magnético adicional $\Delta\omega / \gamma$ a lo largo de z' . El campo magnético efectivo será entonces igual a la suma vectorial de \mathbf{B}_1 y $\Delta\omega / \gamma$. La magnetización longitudinal experimentará un momento de torsión de este campo efectivo, lo que resulta en una rotación más compleja sobre Be [25]. _____ 45

Fig. 7. El decaimiento de inducción libre (FID) de la magnetización de los espines tras un pulso de excitación. El movimiento de precesión de magnetización transversal a la frecuencia de Larmor, decae con un tiempo constante característico T_2^* a medida que avanza el tiempo. El conjunto FID tridimensional puede ser completamente descrito por dos proyecciones sobre los planos (M_x, t) y (M_y, t) , correspondientes a las componentes real e imaginaria del FID, respectivamente [25]. _____ 47

Fig. 8. Principales componentes de un espectro de RMN. (A) la transformada de Fourier compleja de un FID de disminución exponencial da lugar a la absorción de Lorentziana y formas lineales de dispersión. (B) En general, la fase inicial de la FID es distinto de cero, de tal manera que se obtiene una mezcla de formas lineales de absorción y dispersión. El componente de dispersión exhibe las "colas" amplias que reduce la resolución espectral. El componente de dispersión puede eliminarse por 'eliminación' del espectro, de tal manera que sólo el componente de absorción sigue siendo como se muestra en (C). A partir del espectro por fases, la frecuencia ν , la señal de altura h y la anchura de la altura línea media $\Delta\nu_{1/2}$ se pueden medir con precisión. (D) la información de fase se elimina por completo al presentar el espectro en modo magnitud, dada por la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los componentes de absorción y dispersión [es decir, la ecuación (3.61)]. Debido a que el componente dispersivo se incluye en la resonancia es sustancialmente más amplio que la forma lineal de la absorción pura [25]. _____ 51

Fig. 9. Representación gráfica de la relación entre el ángulo óptimo nutación (ángulo de Ernst, en grados) y la proporción de tiempo de repetición TR para el tiempo de relajación T_1 de un (adquisición α°) experimento. El ángulo óptimo de nutación, es el ángulo de nutación que produce la más alta unidad de señal a ruido por unidad de tiempo para una razón dada de TR a T_1 [25]. _____ 53

Fig. 10. Los efectos de múltiples excitaciones y relajación T_1 en el establecimiento de una condición de estado estacionario longitudinal. Cuando el tiempo de repetición TR es cinco veces el tiempo de relajación T_1 (línea negra) una situación de estado estacionario se alcanza instantáneamente para que $M_{xy}(0) = M_0$. Sin embargo, cuando $TR > 5T_1$ (línea gris), el tiempo de relajación T_1 es incompleto entre excitaciones y una situación de estado estable se consigue sólo después de una serie de excitaciones [25]. _____ 54

Fig. 11. Movimientos de rotación, precesión y nutación de la tierra. _____ 56

Fig. 12. Medición del tiempo de relajación T_1 a través del uso de un método de recuperación inversión. (A) Después de la inversión de la magnetización longitudinal, la magnetización se relaja de nuevo a su valor de equilibrio térmico con una constante de tiempo de relajación T_1 . Excitación a diferentes tiempos de inversión de resultados en los espectros que representan un muestreo discreto de la curva de recuperación T_1 . (B) La constante de relajación T_1 se puede conseguir mediante el ajuste de los espectros en (A) con la ecuación (1.74). El tiempo de cruce por cero ('anulación') de la magnetización longitudinal, t_{nulo} , está dada por $T_1 \ln 2$ y puede proporcionar una estimación aproximada de T_1 [25]. _____ 59

Fig. 13. Formación espín-eco de espines desacoplados. En un experimento de espín-eco (A), los espines se excitan (B) después de lo cual se introducen desfases en el plano transversal durante la primera mitad del

tiempo de eco, debido a la falta de homogeneidad del campo magnético B_0 y desfases de frecuencias (C). Un pulso de 180° refleja la reorientación de todos los vectores de magnetización a lo largo del eje y (D) después de que la reposición de fase de los espines durante la segunda mitad del tiempo de eco debido a la misma falta de homogeneidad del campo magnético B_0 y desfases de frecuencia. En el tiempo eco TE , la reprogramación es completa y se forma un espín-eco (E). Obviamente, la señal ha decaído debido a la relajación T_2 [25]. _____ 61

Fig. 14. Medición de la relajación T_2 a través del uso del método espín-eco. (A) Los espectros de RMN obtenido a diferentes tiempos de eco. (B) la constante de tiempo de relajación T_2 se puede obtener mediante el ajuste de los datos presentados en (A) con la ecuación (3.66) [25]. _____ 62

Fig. 15. Los efectos de un campo magnético externo en el volumen de magnetita (arriba), los iones de Fe (II)(III)(centro), y las SPIONs (abajo). Antes de la aplicación del campo magnético todos los momentos magnéticos están alineados al azar. La aplicación de un campo magnético externo alinea los momentos a lo largo del eje z del campo magnético. La magnetización neta inicial de SPIONs es mayor que los iones de Fe (II)(III), pero menor que en el volumen de la magnetita. Tras la eliminación del campo magnético, los momentos del volumen de la magnetita permanecen fijos a lo largo del eje z , mientras que ambos momentos magnéticos de los iones Fe (II)(III) y las SPIONs tienen un tiempo de relajación al equilibrio [12]. _____ 64

Fig. 16. Captación de contraste negativo de las SPION _____ 65

Fig. 17. Efectos de tamaño de nanoescala de los nanocristales de óxido de hierro solubles en agua sobre el magnetismo y las señales inducidas por RM. (a) TEM imágenes de nanocristales de Fe_3O_4 de 4, 6, 9 y 12 nm. (b) Las imágenes de RM depende del tamaño y las secuencias de pulsos en T_2 de los nanocristales en solución acuosa a 1,5 T (c) Los cambios de tamaño que dependen de código de colores en las imágenes de RM basado en valores de T_2 . (d) Gráfica de valores T_2 en función del tamaño de los nanocristales. (e) Magnetización de los nanocristales medidos con un magnetómetro SQUID. Reproducido con permiso de la Sociedad Química Americana © 2005. _____ 69

Fig. 18. Estructuras de polioles. a) Etilenglicol b) Dietilenglicol c) Trietilenglicol d) Polietilenglicol _____ 74

Fig. 19. Sistema utilizado en la síntesis de MNP's funcionalizadas con TREG _____ 80

Fig. 20. Respuesta magnética del producto _____ 81

Fig. 21. Esquema de la reacción de la preparación de PEG carboxilado por oxidación directa [18]. _____ 82

Fig. 22. Solución de la reacción de carboxilación del PEG 6000 después de 8 horas de agitación. _____ 82

Fig. 23. Del lado izquierdo el sistema que se utilizó para los lavados de la fase orgánica y del lado derecho la precipitación de los cristales de PEGCOOH 6000 _____ 83

Fig. 24. Sistema montado para la síntesis de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PEGCOOH 6000 _____ 84

Fig. 25. Respuesta al campo magnético del producto de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEGCOOH 6000 _____ 85

Fig. 26. Curva de calibración _____ 89

Fig. 27. Muestra la digestión acida de las diferentes nanopartículas preparadas en las muestras E1, E3, E4, E5. _____ 90

Fig. 28. Micrografía de la muestra E1 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con TREG, con una escala de 100, 50, 20, 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica _____ 93

Fig. 29. Micrografía de la muestra E2 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEG, con una escala de 50, 20y 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica _____	94
Fig. 30. Micrografía de la muestra E3 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con TREG, con una escala de 100, 20, 10 y 2 nm donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica, En la escala de 2 nanómetros muestra algo que en las micrografías analizadas anteriormente no se puede apreciar tan fácilmente, los planos cristalográficos de las nanopartículas. ____	95
Fig. 31. Micrografía de la muestra E4 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEG, con una escala de 100, 50, 20, 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica _____	96
Fig. 32. Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E1 funcionalizada con TREG. _____	98
Fig. 33 Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E2 funcionalizada con PEG _____	98
Fig. 34. Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E3 funcionalizada con TREG _____	99
Fig. 35 Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E4 funcionalizada con PEG _____	99
Fig. 36. Maniquí y equipo Philips de 1.5 T _____	101
Fig. 37. Muestra un corte a los tiempo eco TE=0ms, 20 ms, 40 ms, 60 ms, 80 ms y 100 ms. _____	103
Fig. 38. Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E1 para diferentes concentraciones. _____	104
Fig. 39. Aumento de la constante T_2 de la muestra E1 en función de la concentración. _____	104
Fig. 40. Decaimiento de la intensidad señal de la muestra E2 para diferentes concentraciones. _____	105
Fig. 41. Aumento de la constante T_2 de la muestra E2 en función de la concentración _____	105
Fig. 42. Decaimiento de señal de la muestra E3 para diferentes concentraciones. _____	106
Fig. 43. Aumento de la constante T_2 de la muestra E3 en función de la concentración. _____	106
Fig. 44 Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E4 para diferentes concentraciones. _____	107
Fig. 45. Aumento de la constante T_2 de la muestra E4 en función de la concentración. _____	107
Fig. 46 Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E5 para diferentes concentraciones. _____	108
Fig. 47. Aumento de la constante T_2 de la muestra E5 en función de la concentración. _____	108
Fig. 48. Indica el decaimiento de señal de la muestra blanco obteniendo un $T_2=597.182ms$ _____	109

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1 Propiedades de RMN</i>	<i>36</i>
<i>Tabla 2 Datos obtenidos del espectrofotómetro</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 3.- Características de las síntesis llevadas a cabo para encontrar diferentes tamaños,.....</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 4. Calculo de la cantidad de fierro en las muestras preparadas</i>	<i>100</i>
<i>Tabla 5. Concentraciones de Hierro que tiene los tubos falcón</i>	<i>101</i>
<i>Tabla 6. Tiempos de relajación de las diferentes muestras</i>	<i>109</i>

Capítulo 1 INTRODUCCIÓN

Entre las distintas investigaciones en el campo de las nanopartículas magnéticas, las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs por sus siglas en inglés) han suscitado un gran interés debido a sus excelentes propiedades magnéticas y a su biocompatibilidad [1] y biodegradabilidad [2]. Mientras que las aplicaciones *in vivo* de muchos agentes de contraste basados en nanopartículas de otra naturaleza química se ven obstaculizadas por sus problemas de toxicidad y/o biodistribución, las SPIONs (en varias formulaciones y presentaciones) han sido aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por las siglas en inglés de *Food and Drug Administration*) como agentes de contraste en imagenología de resonancia magnética nuclear (MRI, por sus siglas en inglés). Entre las distintas formulaciones comerciales podemos encontrar el Lumiren®, empleado para obtener imágenes del intestino [3], el Feridex IV® que se usa para obtener imágenes de hígado y bazo [4], y el Combidex® que se emplea para imagenología del nodo linfático y metástasis celular [5]. Los recientes avances en este campo han mejorado aún más las propiedades magnéticas y físico-químico de las SPIONs, ampliando sus aplicaciones clínicas [6].

Las SPIONs han atraído la atención no sólo por sus propiedades superparamagnéticas sino también porque se ha demostrado que presentan una baja toxicidad en el cuerpo humano [7]. Un estudio comparativo de varias nanopartículas (NP) de óxido de hierro *in vitro* demostró que las SPIONs son seguras y no presentan citotoxicidad por debajo de concentraciones de 100 µg / ml [7]. Otro estudio realizado en células gliales normales, y en células de cáncer de mama reveló que la toxicidad de las NPs de Fe₃O₄ recubiertas con un agente tensoactivo bipolar (tetrametilamonio-11-aminoundecanoato) es dependiente de la concentración, es

decir, las partículas no son tóxicas en el intervalo de concentración de 0.1-10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ mientras que la citotoxicidad se podía observar a partir de concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ [7]. Existen numeroso reportes en la literatura científica que demuestran, para distintos tipos de SPIONs con diferentes características físico-químicas, que éstas llegan a presentar toxicidad o citotóxicidad a dosis de 100 $\mu\text{g} / \text{ml}$ o superiores.

Para poder utilizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro en aplicaciones biomédicas el producto debe tener características físicas muy particulares, tales como ser monodispersas, cristalinas y solubles en agua (hidrosolubles). Aunque existen diferentes tipos de nanopartículas y métodos de preparación, es necesario contar con una manera de producción continua y eficiente de nanopartículas de alta calidad con propiedades definidas. En el método de obtención de nanopartículas magnéticas denominado “técnica del poliol”, el poliol líquido actúa como disolvente del precursor metálico y como el agente reductor, simultáneamente. El precursor metálico debe ser altamente soluble o simplemente soluble en el poliol. La solución descrita es agitada y calentada a cierta temperatura alcanzando el punto de ebullición del poliol para metales poco reducibles. Controlando la cinética de la precipitación, se pueden obtener partículas metálicas con tamaño y forma definida, las cuales no presentan aglomeración [8].

El proceso de síntesis a partir de descomposición térmica de un precursor apropiado en un poliol ofrece ciertas ventajas en comparación de otros métodos de síntesis como los de precipitación, micro emulsión, pirolisis, mecano síntesis, entre otros. En el método del poliol, el producto obtenido se estabiliza intrínsecamente por una capa de moléculas hidrofílicas correspondientes al poliol utilizado en la reacción, con lo cual también exhiben estabilidad

coloidal a largo plazo en un medio acuoso sin la necesidad de alguna otra modificación superficial de la nanopartícula.

Una característica importante del método de descomposición térmica por medio de polioles es que no se requieren de una gran variedad de reactivos para llevar a cabo la reacción, reduciendo el costo en la producción de nanopartículas magnéticas y simplificando su preparación. En primer lugar se debe tener un precursor metálico, una sal en este caso de hierro (III), y en segundo lugar un poliol. Se puede escoger de una amplia variedad de polioles sin embargo los que se utilizan principalmente en este tipo de procesos para la síntesis de nanopartículas son el etilenglicol (EG), dietilenglicol (DEG), trietilenglicol (TREG) y polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares, entre muchos otros.

Para aplicaciones *in vivo*, el radio hidrodinámico de las partículas de óxidos de hierro es más importante que su tamaño en estado seco, debido a que el cuerpo humano es un sistema rico en agua. Por lo tanto este tipo de agentes de contraste con un tamaño hidrodinámico mayor a 40 nm son llamados SPION (*small nanoparticle of iron oxide*, por sus siglas en inglés) y aquellos que no rebasan los 40 nm son llamados USPION (*ultra-small nanoparticle of iron oxide*, por sus siglas en inglés).

Los SPIONs al ingresar a un organismo vivo, se biodistribuyen y llegan a localizarse en el sistema retículo endotelial (RES) y eventualmente se acumulan en el hígado, lugar en donde se purifica la sangre de partículas extrañas. Por esta particularidad, las partículas SPIONs se han desarrollado para detectar lesiones o inclusive tumores en órganos como el hígado, en donde tienden a bioacumularse. A diferencia de éstas, las USPIONs, gracias a su menor tamaño, no se acumulan en el RES y por lo tanto tienen un mayor tiempo de circulación en

la sangre. Se ha observado que aquellas partículas con un tamaño menor a los 10 nm aplicadas intravenosamente se acumulan en los nodos linfáticos, su principal uso es la detección de metástasis de los nodos linfáticos. Tomando como ventaja el mayor tiempo de circulación en la sangre, se ha reportado la detección *in vivo* de cáncer de mama y cáncer de colon; esto se ha logrado también gracias a que los ligandos unidos a las nanopartículas tales como proteínas, péptidos y otras pequeñas biomoléculas son capaces de reconocer selectivamente a los tumores [9].

En éste trabajo una vez obtenida la nanopartícula de óxido de hierro con diferentes tamaños y recubiertas con TREG y PEG, se diseñó un maniquí (phantoma) en el que se introdujeron dichas nanopartículas con diferentes concentraciones para obtener las imágenes de resonancia magnética en el equipo de 1.5T y poder calcular su relaxometría.

Los efectos de un campo magnético externo en el volumen de las SPION son: Antes de la aplicación del campo magnético todos los momentos magnéticos están alineados al azar, cuando se aplica el campo magnético externo alinea los momentos a lo largo del eje z del campo magnético. Tras la eliminación del campo magnético, los momentos del volumen de las SPION tienen un tiempo de relajación al equilibrio (ver Figura 14)[12]. La relajación es el proceso de retorno al equilibrio térmico de manera exponencial después de una perturbación y la relaxometría consiste en medir el tiempo de relajación de las SPION.

Capítulo 2 ESTADO DEL ARTE

En la actualidad la sustancia más utilizada como medio de contraste para imágenes de resonancia magnética es el gadolinio (Gd). El Gadolinio es un ion paramagnético tóxico por sí sólo, el cual disminuye su toxicidad al ser unido con moléculas de tipo quelante. El compuesto quelado al ser administrado de manera intravenosa tiene una excreción renal rápida siendo completamente depurado en horas, pero en pacientes con insuficiencia renal crónica el compuesto se queda en el organismo por más tiempo provocando una enfermedad llamada “Fibrosis Sistémica Nefrogénica” (FSN) la cuál fue descrita por primera vez por Cowper [13] y recientemente se identificó como una enfermedad en el año 2001. La enfermedad está caracterizada por un aumento en la formación de tejido conectivo en la piel, por lo que ésta se engrosa, se vuelve áspera y dura, pudiendo llegar a producirse contracturas incapacitantes y disminución de la movilidad de las articulaciones [13].

El mecanismo fisiopatológico es desconocido. Se piensa que el agente de contraste se queda en el organismo más tiempo en pacientes con insuficiencia renal, lo que permite que el gadolinio se separe del quelante y que, mediante un mecanismo de intercambio, se una a un ligante aniónico o neutro presente en el organismo, o se asocie a otro sustrato mediante un proceso aun no conocido, depositándose así en el intersticio de los órganos afectados, donde se piensa que produce la reacción inflamatoria que va a producir la FSN [13].

Por otro lado, los estudios realizados *in vivo* en humanos es muy limitado, pero una investigación encontró que la Ferumoxtran-10, una USPION revestida con dextrano, sólo induce efectos secundarios tales como urticaria, diarrea y náuseas, de los cuales todos fueron leves y de corta duración [14]. Se cree que esto es principalmente debido a que el hierro

liberado de las SPIONs se metaboliza en el hígado y posteriormente es utilizado en la formación de glóbulos rojos o se excreta a través de los riñones [14].

A nivel mundial ciertos organismos no gubernamentales como el *observatoryNANO* vigilan la comercialización de productos que contienen desarrollos basados en nanotecnología. Entre ellos podemos listar los siguientes medios de contraste magnéticos:

Resovist®

El Resovist® es un agente de contraste específico del hígado empleado en imagenología de resonancia magnética (MRI). Se utiliza con el fin de detectar y caracterizar las lesiones focales hepáticas, especialmente las pequeñas; se compone de SPIONs recubiertas con un carboxidextrano lo que permite a las SPIONs acumularse en las células sanas del sistema retículo endotelial (RES) del hígado [15].

La mayoría de los tumores hepáticos malignos no contienen células (RES) y por lo tanto no hay captación de las partículas de hierro. Así, la aplicación de nanopartículas recubiertas conduce a una mejora de contraste entre el tumor (brillante) y el tejido circundante (oscuro) [15].

Debido a que el Resovist® se inyecta en forma de bolo intravenoso, una imagen inmediata del hígado con un tiempo de exploración reducido puede ser realizada. En 2001, Resovist® fue aprobado para el mercado europeo. En la actualidad, Resovist® está a la venta en Japón, Australia y Europa. En los Estados Unidos se encuentra en fase III de estudios clínicos [15].

GastroMARK® / Lumirem®

GastroMARK® pertenece a los agentes de contraste oral negativo (lo mismo que Lumirem®), otro nombre de marca para el Ferumoxsil. Los materiales adecuados para los agentes de

contraste orales deben tener poca o ninguna absorción por el estómago o los intestinos, la excreción debe ser completa, sin los artefactos de movimiento, la asequibilidad, y de marcado uniforme del tracto gastrointestinal. Algunos de los beneficios de los agentes de contraste orales negativos son la reducción de artefactos fantasma causados por la falta de señal [15].

GastroMARK[®] es un agente oral de imágenes gastrointestinales fabricado por AMAG Pharmaceuticals, que se utiliza para distinguir las asas de los intestinos respecto a otras estructuras abdominales. Imágenes de resonancia magnética de los órganos abdominales y los tejidos sin agentes de contraste pueden ser muy difícil de distinguir entre ellos debido a que los órganos abdominales y los tejidos no pueden diferenciarse fácilmente de los lazos del intestino. Después de la ingestión de GastroMARK[®] el agente de contraste fluye a través del intestino y se oscurece [15].

En México no hay producción de nanopartículas que tengan las propiedades necesarias para poder usarse en la clínica como medio de contraste en la formación de imágenes por resonancia magnética, es por ello que el grupo de investigación en NanoBioInorgánica de la Universidad de las Américas de Puebla (UDLAP) está desarrollando nanopartículas ferromagnéticas del tipo de la magnetita (Fe_3O_4) y maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Una línea de trabajo es la síntesis y funcionalización superficial de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs); aunque aún es necesario optimizar las condiciones para sintetizar éstas de manera que tengan las características ideales para poder estudiar su relaxometría y poder utilizarlas como medio de contraste en la formación de imágenes clínicas empleando los equipos de 1.5 o 3 Teslas disponibles en hospitales de México.

De aquí que la pregunta de investigación de este trabajo sea:

¿Qué concentración y qué tamaño de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) son las más óptimas para poder estudiar su relaxometría y poder ser empleadas como medio de contraste en las imágenes por resonancia magnética en los equipos clínicos de 1.5 o 3T ?

HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

Existen valores óptimos de concentración y de tamaño de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) que son los apropiados para su empleo como medio de contraste en las imágenes por resonancia magnética, en equipos clínicos de 1.5 o 3 T y que permitan estudiar su relaxometría.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relaxometría de T_2 de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) considerando diferentes concentraciones y tamaños de las mismas que sentarán las bases para aplicaciones clínicas.

Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar las SPIONs, tomando como referencia la reacción propuesta por Wei-Cai para obtener nanopartículas recubiertas con trietilenglicol (TREG) y polietilenglicol (PEG) con un rango de distribución de tamaño de partícula aproximado de 9 nm [16].
- Determinar la cantidad mínima a la cual se pueden detectar las SPIONs en IRM.
- Determinar la relaxometría de las SPIONs.

Capítulo 3 MARCO TEÓRICO

Principios Básicos de la Resonancia Magnética

3.1 Descripción Clásica

La resonancia magnética nuclear (RMN) se basa en el concepto de espín nuclear. Antes de hablar de las propiedades de los espines nucleares, algunas relaciones de la física clásica se introducirán para comprender mejor futuras discusiones. Aunque la física clásica es incapaz de describir los fenómenos de la mecánica cuántica, puede ser utilizada para crear un marco de referencia familiar en la que la existencia de un momento angular del espín se pueda visualizar. La física clásica es la explicación macroscópica del mundo microscópico dictado por la mecánica cuántica.

El movimiento (lineal o de rotación) siempre tiene un momento o impulso correspondiente (lineal o angular). Para un objeto de masa m y velocidad v , el impulso p lineal está dado por:

$$p = mv \quad (3.1)$$

Conceptualmente, el momento puede ser considerado como la tendencia de un objeto a seguir su movimiento. El momento sólo cambia cuando se aplica una fuerza externa F , de acuerdo con la segunda ley de Newton:

$$F = \left(\frac{dp}{dt} \right) = ma \quad (3.2)$$

donde a es la aceleración. En ausencia de fuerzas externas, el objeto no tiene aceleración y por lo tanto, el momento lineal y la velocidad son constantes.

Consideremos ahora un objeto que gira con velocidad constante alrededor de un punto fijo a una distancia r . Este movimiento se describe con un vector de momento angular L , que se define como:

$$\mathbf{L} = \mathbf{r} \times \mathbf{p} \quad (3.3)$$

Por lo tanto, si la distancia r y el momento p son perpendiculares al momento angular, la magnitud de L es mvr . El momento angular sólo se puede cambiar cuando se aplica una torca externa, en analogía con la aplicación de la fuerza en un movimiento lineal. La torca T (o fuerza de rotación) se define como el producto vectorial de la fuerza y la distancia:

$$\mathbf{T} = \mathbf{r} \times \mathbf{F} = \mathbf{r} \times \left(\frac{d\mathbf{p}}{dt} \right) = \left(\frac{d\mathbf{L}}{dt} \right) \quad (3.4)$$

Supongamos ahora que el objeto giratorio lleva una carga eléctrica de manera que se crea un pulso de corriente. De acuerdo con la física clásica esta corriente genera un campo magnético, que se caracteriza por el momento dipolar magnético, μ , que es la cantidad fundamental del campo magnético asociado con la corriente. En general, el momento magnético μ está dado por:

$$\mu = [\text{corriente}] [\text{área}] \quad (3.5)$$

Para un objeto de masa m y carga e que gira a velocidad constante v alrededor de un punto fijo a una distancia r , el momento magnético μ está dada por:

$$\mu = \left(\frac{ev}{2\pi r} \right) \pi r^2 \quad (3.6)$$

Usando $L = mvr$, se obtiene una relación fundamental entre el momento magnético y el momento angular:

$$\boldsymbol{\mu} = \left(\frac{e}{2m} \right) L = \gamma L \quad (3.7)$$

donde γ es la constante giromagnética (clásica). Resulta que la relación (3.7) es válida para cualquier movimiento periódico, orbital, incluyendo el movimiento microscópico de las partículas elementales. En la siguiente sección se muestra que también se obtiene la relación (3.7) cuando se utilizan argumentos mecánicos cuánticos. Cuando se colocan las partículas en rotación en un campo magnético externo \mathbf{B}_0 , las partículas sufrirán un torque dado por:

$$\mathbf{T} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0 \quad (3.8)$$

Combinando las ecuaciones (3.4), (3.7) y (3.8) tenemos:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} \right) = \gamma \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}_0 \quad (3.9)$$

Como $\boldsymbol{\mu}$ es constante, la ecuación diferencial en la ecuación (3.9) expresa el hecho de que los cambios $\boldsymbol{\mu}$ son orientados con relación a \mathbf{B}_0 , es decir, $\boldsymbol{\mu}$ gira (en movimiento de precesión) sobre \mathbf{B}_0 . Alternativamente, una precesión de $\boldsymbol{\mu}$ sobre \mathbf{B}_0 puede ser descrito por:

$$\left(\frac{d\boldsymbol{\mu}}{dt} \right) = \boldsymbol{\mu} \times \boldsymbol{\omega}_0 \quad (3.10)$$

Combinando las ecuaciones (3.9) y (3.10) da lugar a la famosa ecuación de Larmor:

$$\boldsymbol{\omega}_0 = \gamma \mathbf{B}_0$$

o

$$\nu_0 = \left(\frac{\omega_0}{2\pi} \right) = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0 \quad (3.11)$$

La precesión o frecuencia de Larmor ν_0 es directamente proporcional al campo magnético aplicado B_0 y también a la constante giromagnética γ (o μ), que es característica para el núcleo. El momento magnético en un campo magnético externo también tiene una energía magnética asociada definida como:

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 = -\mu B_0 \cos \theta \quad (3.12)$$

donde θ es el ángulo entre el momento $\boldsymbol{\mu}$ magnético y el campo magnético externo B_0 .

La ecuación (3.12) indica que la energía magnética se reduce al mínimo cuando μ es paralelo con B_0 ($\theta = 0^\circ$) y es máxima cuando μ es antiparalela con B_0 ($\theta = 180^\circ$). De acuerdo con la ecuación (3.12), el momento magnético clásico puede adoptar cualquier orientación ($0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$), con la energía variando entre $+\mu B_0$ y $-\mu B_0$. Por lo tanto, a pesar de que la mecánica clásica pueden crear una imagen familiar de la relación entre el momento angular, momento magnético y la frecuencia de Larmor, no puede explicar que la condición fundamental de la energía de la resonancia, ($\Delta E = h\nu$), relaciona la energía magnética asociada con el momento magnética. Para obtener información sobre la interacción de las ondas electromagnéticas y espines nucleares, es necesario un tratamiento mecánico cuántico. En la siguiente sección se introducen los conceptos básicos de la mecánica cuántica, después de lo cual se deriva la condición de resonancia de RMN [25].

3.2 Descripción mecánico cuántica

Uno de los postulados fundamentales de la mecánica cuántica es que el momento angular de las partículas elementales (ya sea protones, neutrones o electrones) se limita a valores discretos, es decir, se cuantifica el momento angular L y su amplitud viene dada por:

$$L = \left(\frac{h}{2\pi} \right) \sqrt{I(I+1)} \quad (3.13)$$

donde I es el número cuántico del espín y h es la constante de Planck. Si el momento angular es un vector, la descripción completa de L debe involucrar a su amplitud, dada por la ecuación (3.13), y su dirección. En la mecánica cuántica la dirección del momento angular se especifica por un segundo número cuántico m , que sólo puede tener ciertas orientaciones discretas con respecto a una dirección dada. La componente del momento angular en la dirección z , L_z está dada por:

$$L_z = \left(\frac{h}{2\pi} \right) m \quad (3.14)$$

La mecánica cuántica muestra que m puede tener los valores $2I+1$, dados por:

$$m = I, I-1, I-2, \dots, -I \quad (3.15)$$

Para protones, neutrones y electrones, el número cuántico del espín I es igual a $1/2$. Para núcleos, I simplemente no puede ser calculado mediante la suma de sus componentes individuales. Sin embargo, mediante el uso de la masa atómica y el número de carga, I se puede deducir de las siguientes reglas:

1. Para núcleos con un número de masa impar, I es $(1/2, 3/2, 5/2, \dots)$, por ejemplo, ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{23}Na , ^{31}P).
2. Para los núcleos con número de masa y número de carga par, I es cero (por ejemplo, ^{12}C , ^{16}O , ^{32}S).
3. Para núcleos con masa par y número de carga impar, I es un número entero $(1, 2, \dots)$, por ejemplo, ^2H , ^{14}N).

Por analogía con la ecuación (3.7), las partículas elementales también tienen un momento magnético μ que está relacionado con el momento angular L a través de:

$$\mu = \gamma L \quad (3.16)$$

donde γ es de nuevo la constante giromagnética. Cuando el momento angular está cuantizado, también lo está el momento magnético. La componente del momento magnético a lo largo del eje longitudinal z está dado [por analogía con la ecuación (3.14)] por:

$$\mu_z = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m \quad (3.17)$$

donde m está dado por la ecuación (3.15). En un campo magnético externo \mathbf{B}_0 , la partícula adquiere una energía magnética dada por la ecuación (3.12). La combinación de esta descripción clásica de la energía magnética con la formulación de la mecánica cuántica del momento magnético da:

$$E = \mu_z B_0 = -\gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) m B_0 \quad (3.18)$$

Dado que m es un número cuántico discreto [ver ecuación (3.15)], también se cuantifican los niveles de energía. Para una partícula de spin $I = 1/2$, sólo hay dos niveles de energía ($m = -1/2$ y $1/2$) y la diferencia de energía ΔE viene dada por (ver Fig. 1):

$$\Delta E = \gamma \left(\frac{h}{2\pi} \right) B_0 \quad (3.19)$$

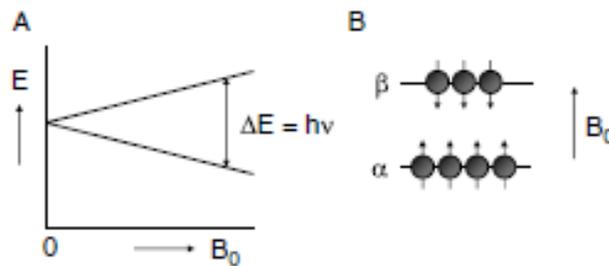


Fig. 1(a) La energía del espín nuclear para un núcleo con espín $-1/2$ como función de la intensidad de campo magnético externo B_0 . (b) el nivel de energía más bajo (nivel del espín α) corresponde a los momentos magnéticos paralelos con B_0 , mientras en el nivel de energía más alto (nivel del espín β) tienen un alineamiento anti paralelo a B_0 . para todos los campos magnéticos disponibles en la actualidad, la diferencia del nivel de energía entre los dos estados del espín, corresponde a la radiación electromagnética en el rango de radiofrecuencia [25].

El fenómeno de resonancia en RMN se logra mediante la aplicación de un campo magnético oscilante perpendicular a μ_z con una frecuencia ν_0 , de tal manera que la energía es igual a la energía magnética dada por la ecuación (3.19), que nos lleva a que, la energía de la onda electromagnética sea:

$$\Delta E = h\nu_0 \quad (3.20)$$

Combinando las ecuaciones (3.19) y (3.20) nos dará la ecuación de Larmor:

$$\nu_0 = \left(\frac{\gamma}{2\pi} \right) B_0 \quad (3.21)$$

A pesar de que las descripciones de la mecánica clásica y la mecánica cuántica de la RMN conducen al mismo resultado, juegan un papel diferente en la comprensión de la técnica. La mecánica cuántica es la única teoría que cuantitativamente puede describir el fenómeno de RMN. Los Principios clásicos se utilizan principalmente para visualizar los efectos de pulsos de RF en los vectores de magnetización macroscópica [25].

3.3 Magnetización Macroscópica

La figura 2A muestra la precesión (en la frecuencia de Larmor) de un momento magnético alrededor de un campo magnético externo de acuerdo con los principios clásicos. La cuantificación del momento magnético (y la energía magnética) puede ser fácilmente incorporada en esta imagen. Para las partículas elementales el ángulo θ entre μ y B_0 ya no puede ser arbitrario como en la sección 3.1, por lo que está dado por:

$$\cos \theta = \frac{m}{\sqrt{I(I+1)}} \quad (3.22)$$

Para un núcleo de espín $I = 1/2$, $m = 1/2$ o $-1/2$ produce un ángulo $\theta = 54.74^\circ$ en relación con el eje z o $-z$, respectivamente. Por lo tanto, los núcleos de espín $I = 1/2$ se distribuyen en la superficie de dos conos, y giran alrededor de B_0 a la frecuencia de Larmor (Figura 2B). En el caso general de un núcleo de espín I , los momentos magnéticos serán distribuidos en $2I+1$ conos en ángulos discretos θ tal como se definen en la ecuación (3.22). Para un espín de núcleo $1/2$ los dos estados del espín $m = 1/2$ (μ paralelo con B_0) y $m = -1/2$ (μ antiparalelo a B_0) se refieren a menudo como estados del espín α y β , respectivamente.

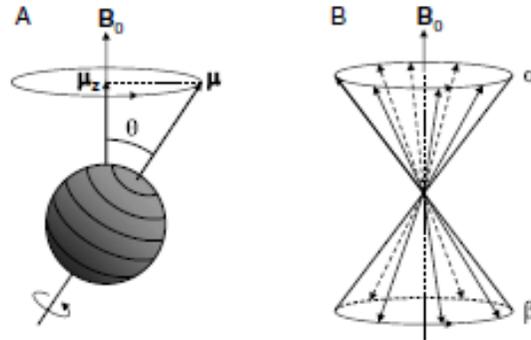


Fig. 2. (A) Precesión del espín nuclear en un campo magnético externo B_0 . El momento magnético del espín μ en movimiento de precesión alrededor de B_0 , en el que la orientación θ y su amplitud (en la componente z) μ_z son cuantizadas. (B) En un conjunto macroscópico de spin nuclear $-1/2$, los espines se distribuyen entre dos orientaciones posibles de acuerdo con la ecuación de Boltzmann [25].

Hasta el momento, sólo el comportamiento de los espines nucleares individuales ha sido considerado. Sin embargo, una muestra macroscópica contiene muchos espines, que serán distribuidos al azar en los conos. Como consecuencia de la pequeña diferencia de energía entre los estados del espín habrá una pequeña diferencia en la población de estos estados del espín. Esta diferencia de población se puede calcular utilizando la ecuación de Boltzmann. Para la situación que se muestra en la Figura 2B la diferencia de energía $\Delta E = h\nu$ da lugar a una distribución de la población dada por:

$$\left(\frac{n_\alpha}{n_\beta} \right) = e^{\Delta E/kT} = e^{h\nu/kT} \quad (3.23)$$

donde n_α es el número de espines en el estado α (baja energía), n_β es el número de espines en β (estado de alta energía), k es la constante de Boltzmann $1.3805 \times 10^{-23} \text{ J/Kelvin}$; y T es la temperatura absoluta.

Dado que a temperatura ambiente, $h\nu$ es mucho menor que la energía térmica kT , el exponente en la ecuación (3.23) se puede simplificar a través de una expansión y el truncamiento de una serie de Taylor para dar:

$$\left(\frac{n_\alpha}{n_\beta}\right) = 1 + \left(\frac{h\nu}{kT}\right) \quad (3.24)$$

Para una muestra macroscópica que contiene un millón de espines nucleares a 37°C ($T = 310.15\text{ K}$) y en un campo magnético de 9.4 T , que corresponden $\nu = 400\text{ MHz}$, la diferencia de población entre los estados α y β del espín es de sólo 31 espines (correspondiente a 0.0031%). Dado que la señal final recibida es proporcional a la diferencia de población, la RMN es una técnica bastante insensible en comparación con otras formas de espectroscopia, donde la diferencia de energía es mucho más grande.

El momento magnético total neto (es decir, “la magnetización”), \mathbf{M} , de una muestra macroscópica es la resultante de la suma sobre todos los momentos magnéticos individuales μ . Como los momentos magnéticos están distribuidos al azar en los conos, no habrá componente neta de \mathbf{M} en el plano transversal xy (ver figura 1.2B). Sin embargo, debido a la diferencia de población habrá una componente neta de \mathbf{M} paralela con \mathbf{B}_0 a lo largo del eje z . En el equilibrio térmico la magnitud de la magnetización longitudinal, \mathbf{M}_0 es:

$$M_0 = \sum_{i=1}^n \mu_i = n_\alpha \mu_z + n_\beta \mu_z = \gamma \left(\frac{h}{4\pi}\right) (n_\alpha - n_\beta) \quad (3.25)$$

Usando la ecuación (3.24), $h\nu/kT \ll 1$ y $n = n_\alpha + n_\beta$ donde n es el número total de espines nucleares en la muestra macroscópica, la diferencia de población $(n_\alpha - n_\beta)$ está dada por:

$$(n_{\alpha} - n_{\beta}) \approx \left(\frac{nh\nu}{2kT} \right) \quad (3.26)$$

Por lo tanto, en equilibrio térmico, la amplitud del vector de magnetización macroscópica \mathbf{M}_0 es:

$$M_0 = \left(\frac{\gamma h}{2\pi} \right)^2 \left(\frac{nB_0}{4kT} \right) \quad (3.27)$$

De la ecuación (3.27) se pueden deducir varias características importantes relativas a la sensibilidad de los experimentos de RMN. La dependencia cuadrática de \mathbf{M}_0 en la constante giromagnética γ implica que los núcleos de resonancia de alta frecuencia [ver ecuación (3.11)] también generan señales de RMN relativamente intensas. El hidrógeno tiene la más alta γ de los núcleos comúnmente encontrados, y por lo tanto tiene la intensidad relativa más alta. La dependencia lineal de \mathbf{M}_0 en la fuerza del campo magnético \mathbf{B}_0 implica que los campos magnéticos más altos mejoran la sensibilidad. De hecho, este argumento (y el correspondiente aumento de la dispersión del desplazamiento químico) ha causado una tendencia hacia una mayor intensidad de campo magnético que ahora típicamente varían de 1,5 T a 17.5 T (o hasta alrededor 11.7 T para aplicaciones *in vivo*). Finalmente, la proporcionalidad inversa de \mathbf{M}_0 a la temperatura T indica que la sensibilidad puede ser mejorada a temperaturas más bajas de muestra. Obviamente, esta última opción no es realista para aplicaciones *in vivo*.

La sensibilidad experimental real está determinada por muchos factores, como el volumen de la muestra, la constante giromagnética, la abundancia natural del núcleo estudiado, del ruido (muestra) y parámetros de relajación y fuerza del campo magnético. Aunque algunos

factores pueden ser predichos por la ecuación (3.27), otros (por ejemplo, ruido) necesitan un tratamiento más detallado. Las sensibilidades intrínsecas de los núcleos más relevantes encontrado en la RMN *in vivo* se resumen en la Tabla 1.1 [25].

Tabla 1.1 Propiedades de RMN

Isotopo	Espín	Razón giromagnética ($10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	Frecuencia de RMN a 2.35T (MHz)	Abundancia natural (%)	Sensibilidad relativa ^a
¹ H	1/2	26.752	100.000	99.985	1.00
² H	1	4.107	15.351	0.015	1.45×10^{-6}
³ He	1/2	-20.380	76.181	1.4×10^{-4}	5.75×10^{-7}
⁷ Li	3/2	10.398	38.866	92.58	0.272
¹³ C	1/2	6.728	25.145	1.108	1.76×10^{-4}
¹⁴ N	1	1.934	7.228	99.630	1.00×10^{-3}
¹⁵ N	1/2	-2.712	10.137	0.370	3.86×10^{-6}
¹⁷ O	5/2	-3.628	13.562	0.037	1.08×10^{-5}
¹⁹ F	1/2	25.181	94.094	100.000	0.834
²³ Na	3/2	7.080	26.466	100.000	9.27×10^{-2}
³¹ P	1/2	10.841	40.481	100.000	6.65×10^{-2}
²⁹ K	3/2	1.250	4.672	93.100	4.75×10^{-4}
¹²⁹ Xe	1/2	-7.452	27.856	26.44	5.71×10^{-3}

^aSensibilidad relativa es calculada como el producto de RMN [25]

3.4 Excitación

En experimentos de RMN, se estudian muestras macroscópicas, que contiene muchos espines individuales [15]. La figura 2B demuestra claramente cómo los momentos angulares del espín se distribuyen en un número discreto de conos. La representación de la mecánica cuántica es conveniente para ilustrar la distribución del espín, pero no es muy adecuada para ilustrar la interacción de los espines con campos magnéticos externos. Por lo tanto la imagen clásica del vector de magnetización macroscópica M_0 neta será utilizada en futuras discusiones.

Con el fin de observar la magnetización nuclear, el movimiento de precesión necesita ser detectado. Sin embargo, En el marco de referencia del laboratorio y en equilibrio térmico los

espines no tienen la coherencia de fase en el plano transversal y la magnetización longitudinal neta es un vector estático. La magnetización nuclear sólo puede ser observada mediante la rotación de la magnetización longitudinal hacia o sobre el plano transversal. Esto se puede lograr por un segundo campo magnético en el plano transversal que oscila en el rango de RF (MHz), es decir, $B_{1\max} \cos(\omega t)$, donde $B_{1\max}$ es la amplitud del campo aplicado y ω su frecuencia. En la técnica moderna de RMN con transformadas de Fourier (FT-NMR), el campo \mathbf{B}_1 se aplica como un pulso de RF (es decir, encendido durante un tiempo finito t y apagado de nuevo). Durante el pulso de RF, la magnetización tendrá un movimiento de precesión sobre \mathbf{B}_0 y \mathbf{B}_1 .

La magnetización longitudinal inicialmente experimenta una torca desde el campo aplicado \mathbf{B}_1 , lo que resulta en una rotación de \mathbf{M}_0 hacia el plano transversal (Figura 3). Debido a que dos campos magnéticos externos actúan simultáneamente en \mathbf{M}_0 , la rotación de \mathbf{M}_0 durante el campo aplicado \mathbf{B}_1 parece ser bastante compleja. Cuando el campo aplicado \mathbf{B}_1 se aplica el tiempo suficiente, \mathbf{M}_0 puede ser completamente excitado en el plano transversal o incluso se invierte para el eje-z, dando lugar a la denominada excitación 90° y 180° respectivamente, inversión de pulsos de RF. Tras el pulso, la magnetización experimenta sólo el mayor campo magnético \mathbf{B}_0 y tendrá un movimiento de precesión alrededor del campo con la frecuencia de Larmor. La figura 4 muestra un conjunto de espines individuales en equilibrio térmico, es decir, la fase de los espines es al azar de tal manera que la magnetización transversal neta es cero. La aplicación de un campo magnético perpendicular de RF tiene dos efectos en los espines. En primer lugar, los dos estados del espín se vuelven igualmente poblados conforme

se acercan a un ángulo de 90° y segundo los spines entran en un estado de coherencia de fase [15], es decir, el campo magnético externo obliga a las fases de los espines a alcanzar la coherencia de la magnetización transversal generada. La magnetización transversal gira coherentemente sobre \mathbf{B}_0 en la frecuencia de Larmor ν_0 e induce una fuerza electromotriz (fem) en la bobina receptora que rodea la muestra. La amplitud de la fem inducida es determinada por la ley de inducción electromagnética de Faraday. Después de la amplificación esta fem inducida da lugar directamente a la señal de RMN.

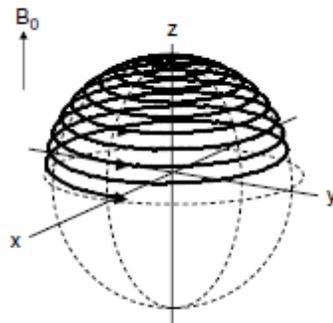


Fig. 3. Excitación de la magnetización en el plano estático xyz . La magnetización longitudinal \mathbf{M}_0 , alineado inicialmente con el eje z , el cual precesa alrededor del campo magnético estático \mathbf{B}_0 y la irradiación de RF del campo \mathbf{B}_1 en el plano transversal. Esto se traduce en una rotación en el plano trasversal debido a \mathbf{B}_1 y a la precesión simultánea a la frecuencia del Larmor alrededor de \mathbf{B}_0 . En este caso \mathbf{B}_1 será calibrado a la rotación de 90° de \mathbf{M}_0 a partir del eje z para dar excitación [25].

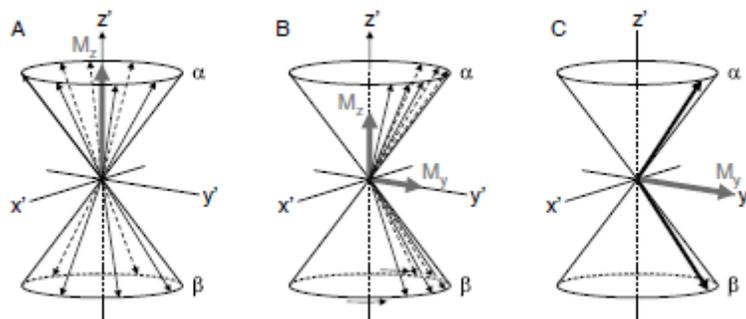


Fig. 4. Excitación de la magnetización en la frecuencia en el marco de referencia rotatorio x', y', z' . (A) En el equilibrio térmico la distribución de Boltzmann de espines nucleares individuales en una muestra macroscópica crea un vector de magnetización neta a lo largo de $+z'$. Dado que los espines individuales no tienen la coherencia de fase (es decir, sus fases están distribuidos al azar), no hay magnetización neta en el plano transversal. (B) Un campo magnético \mathbf{B}_1 a lo largo $-x'$ la magnetización macroscópica neta va hacia $+y'$. En el nivel microscópico esto es equivalente a la generación de la coherencia de fase entre los espines individuales. (C) Cuando el campo magnético \mathbf{B}_1 se calibra para dar excitación completa, los espines han alcanzado la coherencia de fase completa que resulta en un vector de magnetización neta a lo largo de $+y'$. La no magnetización se mantiene a lo largo de z' [25].

3.5 Las ecuaciones de Bloch

En la Sección 3.1 se demostró que, cuando se coloca en un campo magnético \mathbf{B} , un momento magnético μ experimenta una torca que es proporcional a la derivada del momento angular dependiente del tiempo [ecuaciones (3.4) y (3.8)]. Utilizando el hecho de que la magnetización es la suma de todos los momentos magnéticos, ecuación (3.25), la expresión de movimiento para un solo momento magnético puede ser generalizado para la magnetización total, como sigue:

$$\frac{d\mathbf{M}(t)}{dt} = \gamma \mathbf{M}(t) \times \gamma \mathbf{B}(t) \quad (3.28)$$

donde $\mathbf{B}(t)$ puede incluir variables en el tiempo, además de las componentes del campo magnético estático \mathbf{B}_0 . En el equilibrio térmico, en ausencia de (variable tiempo) los campos magnéticos, la ecuación (3.28) expresa simplemente el hecho de que la componente z de la magnetización \mathbf{M} es constante, es decir:

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = 0 \quad (3.29)$$

No existen componentes netas de x y y de la \mathbf{M} en el equilibrio térmico, y por lo tanto no hay ninguna señal que se pueda detectar en RMN. Como se ilustra cualitativamente en la figura

3, la magnetización longitudinal \mathbf{M}_z debe ser girada al plano transversal, después de lo cual la magnetización transversal que fue girada, inducirá señal en una bobina de recepción a través de la ley de inducción de Faraday. De la ecuación (3.28) se deduce que \mathbf{M}_z puede ser perturbado por un segundo campo magnético perpendicular a \mathbf{M}_z y desde este campo estar girando a la frecuencia de Larmor en el rango de radiofrecuencia del espectro electromagnético, que se conoce a menudo como un campo magnético de RF.

El componente magnético de un campo de RF que es polarizado linealmente a lo largo del eje x en el marco del laboratorio se puede escribir como:

$$\mathbf{B}_1(t) = 2B_{1\max} \cos \omega t [\mathbf{x}] \quad (3.30)$$

donde $B_{1\max}$ es la amplitud máxima del campo aplicado, ω es el transmisor angular o frecuencia que lleva el campo RF y $[\mathbf{x}]$ representa un vector unitario a lo largo del eje x . El campo de polarización lineal, se puede descomponer en dos campos polarizados circularmente que giran en dirección opuesta alrededor del eje z (Figura 5) de acuerdo con:

$$\mathbf{B}_1(t) = B_{1\max} (\cos \omega t [\mathbf{x}] + \text{sen} \omega t [\mathbf{y}]) + B_{1\max} (\cos \omega t [\mathbf{x}] - \text{sen} \omega t [\mathbf{y}]) \quad (3.31)$$

El campo giratorio influye en los espines en orden de $(B_1 / 2B_0)^2$, que es típicamente un número muy pequeño conocido como el cambio Bloch-Siegert. Dado que en la mayoría de las condiciones del campo giratorio pueden ser ignoradas, el campo de RF polarizado linealmente de la ecuación (3.31) es entonces equivalente a un campo magnético giratorio dado por:

$$\mathbf{B}_{1x}(t) = B_{1\max} (\cos \omega t [\mathbf{x}] - \text{sen} \omega t [\mathbf{y}]) = B_{1x} \cos \omega t + B_{1y} \text{sen} \omega t \quad (3.32)$$

Una expresión similar se puede derivar para $B'_{1y}(t)$.

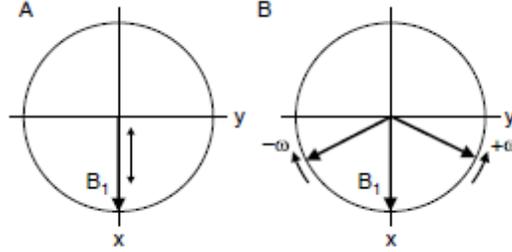


Fig. 5. Descomposición de un campo magnético oscilante lineal (A) en dos campos magnéticos en rotación (B) con frecuencias $-\omega$ y $\omega +$, respectivamente [25].

En la presencia de dos campos magnéticos \mathbf{B}_0 y \mathbf{B}_1 , la ecuación (3.28) se puede ampliar para producir las ecuaciones de Bloch en el marco de referencia del laboratorio (marco de referencia del equipo de resonancia magnética) y en ausencia de la relajación:

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma [M_y(t) B_0 - M_z(t) B_{1y}] \quad (3.33)$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma [M_z(t) B_{1x} - M_x(t) B_0] \quad (3.34)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma [M_x(t) B_{1y} - M_y(t) B_{1x}] \quad (3.35)$$

La relajación es el proceso de retorno al equilibrio térmico después de una perturbación. Las componentes de la magnetización \mathbf{M} (\mathbf{M}_x , \mathbf{M}_y y \mathbf{M}_z) regresan al equilibrio térmico de manera exponencial. Las componentes perpendiculares (es decir, \mathbf{M}_x y \mathbf{M}_y) y paralela (es

decir, \mathbf{M}_z) a \mathbf{B}_0 se relajan con diferentes tiempo. El proceso de relajación puede ser escrito como:

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = -\frac{M_x(t)}{T_2} \quad (3.36)$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = -\frac{M_y(t)}{T_2} \quad (3.37)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = -\frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \quad (3.38)$$

T_1 y T_2 son los tiempos de relajación. T_1 es el tiempo de relajación longitudinal (o tiempo de relajación espín-red) y describe el regreso de la magnetización longitudinal después de una perturbación. La relajación T_1 es, en principio, un proceso en el que la energía de los espines se transfiere a los alrededores “una red” (que puede ser sólida o líquida) para mantener un equilibrio térmico. T_2 es el tiempo de relajación transversal (o tiempo de relajación espín-espín) y describe la desaparición de la magnetización transversal. La relajación T_2 es un proceso de entropía, ya que la energía que intercambian es únicamente entre el sistema de espines (no hay transferencia de energía neta) provocando una disminución de la coherencia de fase (es decir, un aumento en el caos global o entropía). Combinando las ecuaciones (3.33) - (3.35) y las ecuaciones (3.36) - (3.38) se obtiene las ecuaciones completas Bloch en el marco del laboratorio:

$$\frac{dM_x(t)}{dt} = \gamma(M_y(t)B_0 - M_z(t)B_{1y}) - \frac{M_x(t)}{T_2} \quad (3.39)$$

$$\frac{dM_y(t)}{dt} = \gamma (M_z(t)B_{1x} - M_x(t)B_0) - \frac{M_y(t)}{T_2} \quad (3.40)$$

$$\frac{dM_z(t)}{dt} = \gamma (M_x(t)B_{1y} - M_y(t)B_{1x}) - \frac{M_z(t) - M_0}{T_1} \quad (3.41)$$

Hasta este punto, el experimento de RMN ha sido descrito en un marco cartesiano fijo con respecto al laboratorio. Resulta ser más conveniente describir RMN en un marco rotacional. Por lo tanto, se considera un nuevo conjunto de ejes cartesianos (x' , y' y z') que gira alrededor del campo magnético estático \mathbf{B}_0 con frecuencia ω . Los ejes z y z' de los marcos de laboratorio y de rotación, respectivamente, están alineados con el campo magnético externo \mathbf{B}_0 . Las componentes de la magnetización en el marco de rotación están dados por:

$$M'_x = M_x \cos \omega t + M_y \text{sen} \omega t \quad (3.42)$$

$$M'_y = M_y \cos \omega t - M_x \text{sen} \omega t \quad (3.43)$$

$$M'_z = M_z \quad (3.44)$$

Por lo tanto, usando las ecuaciones (3.42) - (3.44) las ecuaciones de Bloch se pueden describir como:

$$\frac{dM'_x(t)}{dt} = -(\omega_0 - \omega)M'_y(t) - \gamma B'_{1y}M'_z(t) - \frac{M'_x(t)}{T_2} \quad (3.45)$$

$$\frac{dM'_y(t)}{dt} = (\omega_0 - \omega)M'_x(t) - \gamma B'_{1x}M'_z(t) - \frac{M'_y(t)}{T_2} \quad (3.46)$$

$$\frac{dM'_z(t)}{dt} = \gamma B'_{1y} M'_x(t) - \gamma B'_{1x} M'_y(t) - \frac{M'_z(t) - M_0}{T_1} \quad (3.47)$$

donde las definiciones de B'_{1x} y B'_{1y} se utilizan, como se especifican en la ecuación (3.32), pero en lo que sigue del texto se omitirá ya que se supone que el vector de magnetización se desarrolla en el marco de referencia giratorio. La conversión a un marco de referencia giratorio tiene consecuencias para los vectores del campo magnético que se encuentran en ese marco. En un marco que gira con una frecuencia igual a la frecuencia de \mathbf{B}_1 , \mathbf{B}_1 parece estático. Por otra parte, el movimiento de precesión de la magnetización (es decir, $\omega_0 = -\gamma B_0$) parece ser reducido a un valor $(\omega_0 - \omega)$. La figura 6A muestra la generación de la magnetización transversal para $\omega = \omega_0$. Dado que los vectores se dibujan en el marco de referencia giratorio, la magnetización simplemente precesa sobre el campo aplicado \mathbf{B}_1 hacia el plano transversal. En comparación con la figura 3, que muestra la misma situación en el marco del laboratorio, ilustrando la claridad de un marco giratorio. Es conveniente definir un campo magnético efectivo \mathbf{B}_e , que es la suma vectorial de $(\omega_0 - \omega)/\gamma$ y \mathbf{B}_1 , ya que la magnetización precesa alrededor del campo efectivo. La magnitud de \mathbf{B}_e está dada por:

$$B_e = |\mathbf{B}_e| = \sqrt{B_1^2 + \left(\frac{\omega_0 - \omega}{\gamma}\right)^2} \quad (3.48)$$

En resonancia (es decir, cuando la frecuencia de un pulso aplicado ω de RF es igual a la frecuencia de Larmor ω_0), la ecuación (3.48) se reduce a $\mathbf{B}_e = \mathbf{B}_1$ y la magnetización simplemente gira alrededor de \mathbf{B}_1 , como se muestra en la figura 6A. En el caso de un vector

fuera de resonancia no nula (es decir, $\omega \neq \omega_0$), el campo magnético efectivo \mathbf{B}_e está inclinado con respecto al plano transversal (Figura 6B). La magnetización será un movimiento de precesión sobre \mathbf{B}_e , lo que lleva a una rotación más compleja en comparación con la situación en resonancia. Para el resto de este capítulo se supondrá que los efectos fuera de la resonancia son insignificantes [25].

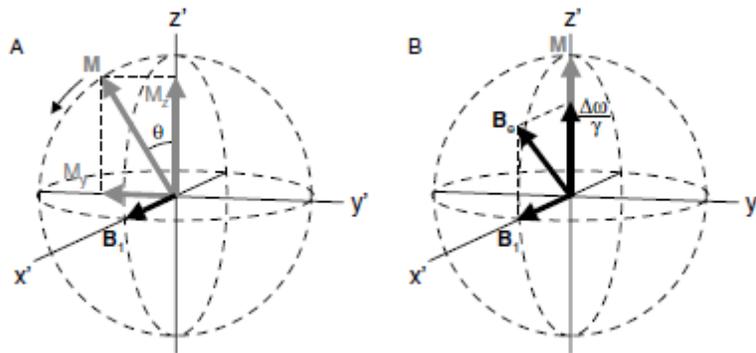


Fig. 6. Vectores de campo magnético se encuentran en el marco de referencia rotatorio x', y', z' durante la excitación. (A) En resonancia, el vector del campo magnético externo efectivo es igual al vector de campo magnético \mathbf{B}_1 a lo largo de z' . La magnetización longitudinal experimenta un esfuerzo de torsión y girará hacia el plano transversal a través de un ángulo θ . (B) fuera de resonancia, la frecuencia del campo magnético \mathbf{B}_1 ya no es igual a la frecuencia de Larmor, que resulta en un vector de campo magnético adicional $\Delta\omega / \gamma$ a lo largo de z' . El campo magnético efectivo será entonces igual a la suma vectorial de \mathbf{B}_1 y $\Delta\omega / \gamma$. La magnetización longitudinal experimentará un momento de torsión de este campo efectivo, lo que resulta en una rotación más compleja sobre \mathbf{B}_e [25].

3.6 Transformada de Fourier en RMN

Después de un pulso de RF, que está calibrado para hacer girar al \mathbf{M}_0 a 90° (es decir, una excitación completa), la magnetización se coloca en el plano transversal del plano de referencia en rotación. La magnetización precesa alrededor de \mathbf{B}_0 a la frecuencia de Larmor e induce una fem en una bobina receptora posicionada en el plano transversal. Debido a la

relajación T_2 , la magnetización transversal y por lo tanto la fem disminuirá como una función del tiempo. Sin embargo, la falta de homogeneidad macroscópica y microscópica en el principal campo magnético \mathbf{B}_0 creará una distribución local de diferentes campos magnéticos \mathbf{B}_0 a través de la muestra, lo que lleva a una distribución de frecuencias de Larmor. Cuando se considera una muestra macroscópica, esta distribución conduce a una pérdida más rápida de la magnetización transversal que es causada por la pura relajación T_2 . Para una muestra con la densidad de protones uniforme y constante de relajación T_2 , la señal adquirida en la presencia de falta de homogeneidad del campo magnético puede ser descrito por:

$$M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-t/T_2} \int_r e^{+i\gamma\Delta B_0(r)t} dr = M_{xy}(0) e^{-t/T_2^*} \quad (3.49)$$

donde ΔB_0 representa la falta de homogeneidad de B_0 y es igual a $(B_0(\mathbf{r}) - B_{0,nom})$ donde $B_0(\mathbf{r})$ es la intensidad de campo magnético en la posición \mathbf{r} y $B_{0,nom}$ representan la intensidad de campo magnético nominal. M_{xy} es el conjunto de magnetización transversal ($M_{xy} = M_x + iM_y$). Se debe tener en cuenta que a pesar de que la relajación T_2^* se presenta a menudo como un decaimiento exponencial simple, en la práctica es un decaimiento múltiple exponencial dependiendo de la falta de homogeneidad local del campo magnético \mathbf{B}_0 de espines individuales tal como se expresa en la ecuación (3.49). La dependencia del tiempo en la fuerza electromotriz (o intensidad de la señal) se llama decaimiento de inducción libre

(FID por sus siglas en ingles). El movimiento del conjunto de magnetización transversal como función del tiempo se puede representar como se muestra en la figura 7.

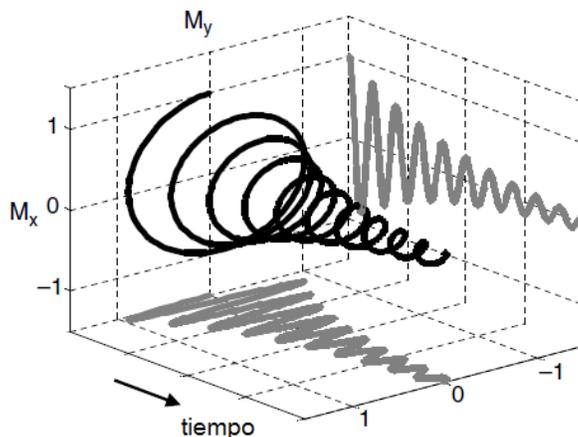


Fig. 7. El decaimiento de inducción libre (FID) de la magnetización de los espines tras un pulso de excitación. El movimiento de precesión de magnetización transversal a la frecuencia de Larmor, decae con un tiempo constante característico T_2^* a medida que avanza el tiempo. El conjunto FID tridimensional puede ser completamente descrito por dos proyecciones sobre los planos (M_x, t) y (M_y, t) , correspondientes a las componentes real e imaginaria del FID, respectivamente [25].

En los espectrómetros de RMN se detectan por separado las componentes x y y de este movimiento complejo y comúnmente las proyecciones sobre los planos xt y yt se muestran en la figura, matemáticamente se dan a través de:

$$M_x(t) = M_0 \cos[(\omega_0 - \omega)t + \phi] e^{-t/T_2^*} \quad (3.50)$$

$$M_y(t) = M_0 \text{sen}[(\omega_0 - \omega)t + \phi] e^{-t/T_2^*} \quad (3.51)$$

Donde ϕ es la fase en el instante $t=0$. $M_x(t)$ y $M_y(t)$ se conocen normalmente como la parte real e imaginaria de FID, respectivamente. Aunque los FID tienen toda la información relevante acerca de los espines nucleares, al igual que sus frecuencias de resonancia y

abundancia relativa, rara vez se utilizan directamente. Normalmente los datos que dependen del tiempo (es decir, el FID) se convierten en datos que dependen de la frecuencia (es decir, el espectro) por la transformada de Fourier. La transformada de Fourier de una señal que depende del tiempo $f(t)$ da una señal de que depende de la frecuencia $F(\omega)$ de acuerdo con:

$$F(\omega) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i\omega t} dt \quad \text{o} \quad F(\nu) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{-i2\pi\nu t} dt \quad (3.52)$$

La transformada de Fourier es una función reversible, de modo que una señal que depende del tiempo puede calcularse a partir de una señal que depende de frecuencia con una transformación de Fourier inversa dada por:

$$f(t) = \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{+\infty} F(\omega) e^{+i\omega t} d\omega \quad \text{o} \quad f(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} F(\nu) e^{+i2\pi\nu t} d\nu \quad (3.53)$$

En principio, es posible construir un espectro de uno de los componentes del complejo FID [es decir ya sea $M_x(t)$ o $M_y(t)$]. En el caso de frecuencias negativas y positivas pueden no ser objeto de discriminación con $\cos(\omega) = \cos(-\omega)$. Por lo tanto, se miden las dos componentes del complejo FID, usando la llamada detección de cuadratura. Las Transformadas de Fourier de las señales que dependen del tiempo produce señales que dependen de la frecuencia real e imaginaria (es decir, el espectro) dadas por:

$$R(\omega) = A(\omega) \cos \phi - D(\omega) \text{sen} \phi \quad (3.54)$$

$$I(\omega) = A(\omega) \text{sen} \phi - D(\omega) \cos \phi \quad (3.55)$$

donde

$$A(\omega) = \frac{M_0 T_2^*}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^{*2}} \quad (3.56)$$

$$D(\omega) = \frac{M_0 (\omega_0 - \omega) T_2^{*2}}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^{*2}} \quad (3.57)$$

$A(\omega)$ y $D(\omega)$ describen las componentes de absorción y dispersión de una forma lineal de Lorentz y se representa en la Figura 1.8A. La anchura a media altura, $\Delta\nu_{1/2}$, de la componente de absorción de una forma lineal de Lorentz es igual a $1/(\pi T_2^*)$. La componente de dispersión es sustancialmente más amplia, con una intensidad integrada neta de cero. Por lo tanto, para la mejor separación (o resolución) de varias líneas en un espectro de RMN, generalmente son deseados los modos de absorción espectral. Sin embargo, cuándo $\phi \neq 0$ se observa una mezcla de las señales de absorción y dispersión como se ha descrito por las ecuaciones (3.54) y (3.55) (Figura 8B). Los modos de absorción espectrales se puede obtener ajustando la fase observada, los espectros mixtos $R(\omega)$ y $I(\omega)$ están dados de acuerdo a:

$$A(\omega) = R(\omega) \cos \phi_c + I(\omega) \text{sen} \phi_c \quad (3.58)$$

$$D(\omega) = I(\omega) \cos \phi_c - R(\omega) \text{sen} \phi_c \quad (3.59)$$

De forma interactiva se ajusta la fase ϕ_c , el modo de absorción espectral se obtiene cuando $\phi_c \neq 0$ (Figura 8C). Debido a las imperfecciones de hardware y/o errores de sincronización de la fase ϕ puede depender de la frecuencia de resonancia ω . La corrección de fase simple

"orden cero" de las ecuaciones (3.58) y (3.59) ya no es suficiente y hay que recurrir a correcciones de fase de orden superior también. En la mayoría de los espectrómetros de RMN, la corrección de fase se lleva a cabo de acuerdo con:

$$\phi_c \neq \phi_0 + (\omega_0 - \omega)\phi_1 \quad (3.60)$$

dónde ϕ_0 y ϕ_1 son las correcciones de fase de cero y primer orden, respectivamente. La fase ajustable ϕ_c , contiene tanto contribuciones de corrección de fase constante ϕ_0 , como para todas las resonancias y corrección de fase lineal ϕ_1 , dependiente de la frecuencia.

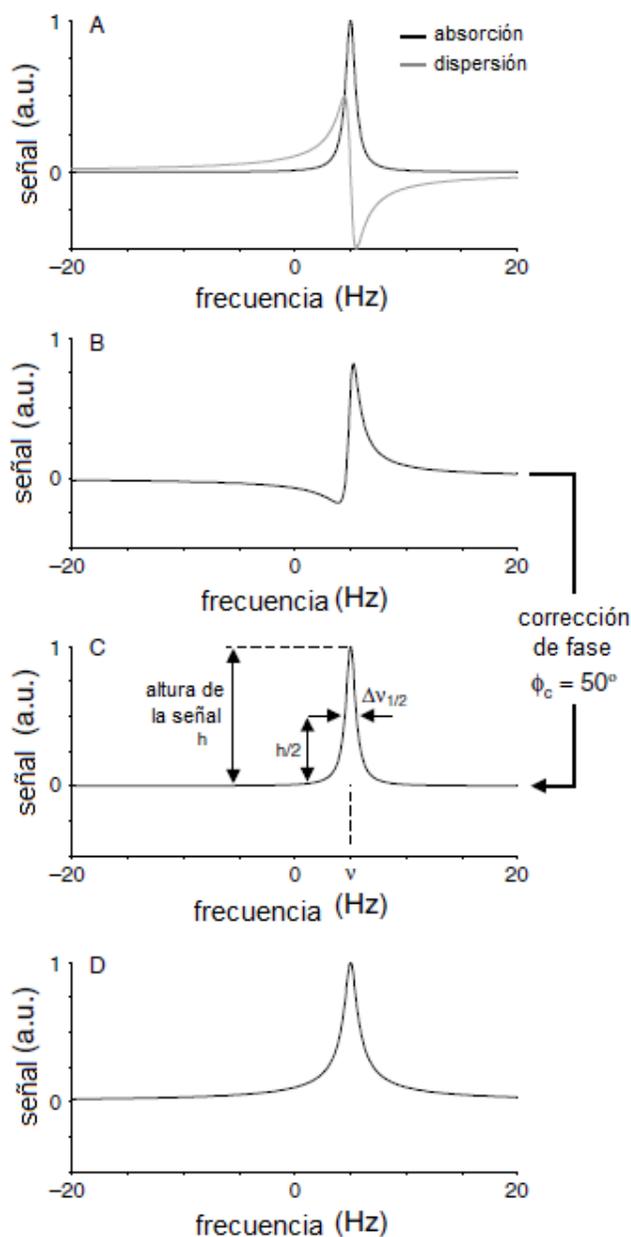


Fig. 8. Principales componentes de un espectro de RMN. (A) la transformada de Fourier compleja de un FID de disminución exponencial da lugar a la absorción de la Lorentziana y formas lineales de dispersión. (B) En general, la fase inicial de la FID es distinto de cero, de tal manera que se obtiene una mezcla de formas lineales de absorción y dispersión. El componente de dispersión exhibe las "colas" amplias que reduce la resolución espectral. El componente de dispersión puede eliminarse por 'eliminación' del espectro, de tal manera que sólo el componente de absorción sigue siendo como se muestra en (C). A partir del espectro por fases, la frecuencia ν , la señal de altura h y la anchura de la altura línea media $\Delta\nu_{1/2}$ se pueden medir con precisión. (D) la información de fase se elimina por completo al presentar el espectro en modo magnitud, dada por la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de los componentes de absorción y dispersión [es decir, la ecuación (3.61)]. Debido a que el componente dispersivo se incluye en la resonancia es sustancialmente más amplio que la forma lineal de la absorción pura [25].

Cuando la fase de la señal no es relevante, o si la fase no se puede ajustar correctamente con correcciones de fase cero y de primer orden (como en algunos experimentos bidimensionales de RMN), la señal puede ser presentada en valor absoluto (o magnitud). Una señal de valor absoluto se define como:

$$M(\omega) = \sqrt{R(\omega)^2 + I(\omega)^2} \quad (3.61)$$

La figura 8D muestra el espectro del valor absoluto de la resonancia lineal mostrada en la Figura 8A. Debido al componente dispersivo, la resonancia es mucho más amplia que en el espectro por fases correspondiente (Figura 8C) [25].

3.7 Constantes de relajación

En la sección 3.5 se introdujeron los tiempos T_1 y T_2 como el retorno de la magnetización longitudinal después de una perturbación y la desaparición de la magnetización transversal, respectivamente. Las constantes de relajación juegan un papel fundamental en la imagen por RMN. Los tejidos biológicos son una mezcla de moléculas de agua y macromoléculas compuestas fundamentalmente por moléculas de agua y carbón, como las proteínas. Cada tejido tiene sus constantes de relajación propias, que dependen de la interacción de las moléculas de agua con sus propias macromoléculas. En la imagen biológica por RMN, son los átomos de hidrógeno los que generan la señal que permite construir la imagen.

Los tiempos T_1 y T_2 son fundamentales para cualquier experimento de la RMN, por lo que se requieren conocimientos del tiempo de relajación T_1 para la cuantificación de la señal. Considerando la posibilidad de adquirir un simple pulso experimental, con pulso de

excitación α° y un tiempo de repetición TR . La figura 9 muestra la cantidad de la magnetización longitudinal en el tiempo cuando la secuencia se repite continuamente, como sería en el caso de una señal promedio. En el caso de un pulso de 90° , la magnetización longitudinal se reduce a cero después de cada pulso de 90° , después de lo cual se deja recuperar a través de relajación T_1 de acuerdo a:

$$M_z(TR) = M_0(1 - e^{-TR/T_1}) \quad (3.62)$$

lo que se reduce a $M_z(TR) = M_0$ para $TR > 5T_1$. La amplitud de la magnetización transversal está dado por $M_{xy} = M_z \text{sen}\alpha = M_0$.

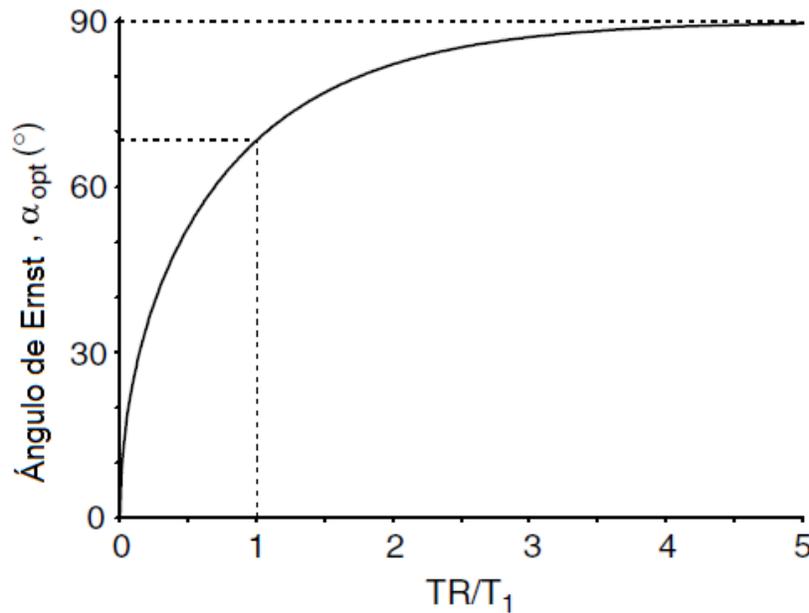


Fig. 9. Representación gráfica de la relación entre el ángulo óptimo nutación (ángulo de Ernst, en grados) y la proporción de tiempo de repetición TR para el tiempo de relajación T_1 de un (adquisición α°) experimento. El ángulo óptimo de nutación, es el ángulo de nutación que produce la más alta unidad de señal a ruido por unidad de tiempo para una razón dada de TR a T_1 [25].

Sin embargo, a pesar de que se logra plena excitación durante cada exploración, el experimento no es óptimo en términos de la señal por unidad de tiempo $[=0.2(M_0/T_1)]$ debido a que la mayoría de tiempo de exploración se utiliza para esperar a que se recupere la magnetización longitudinal por la relajación T_1 . Repitiendo el experimento con un ángulo de excitación de 60° el $TR = T_1$, la magnetización temporal M_z y las modulaciones de M_{xy} son mostrados en la Figura 10.

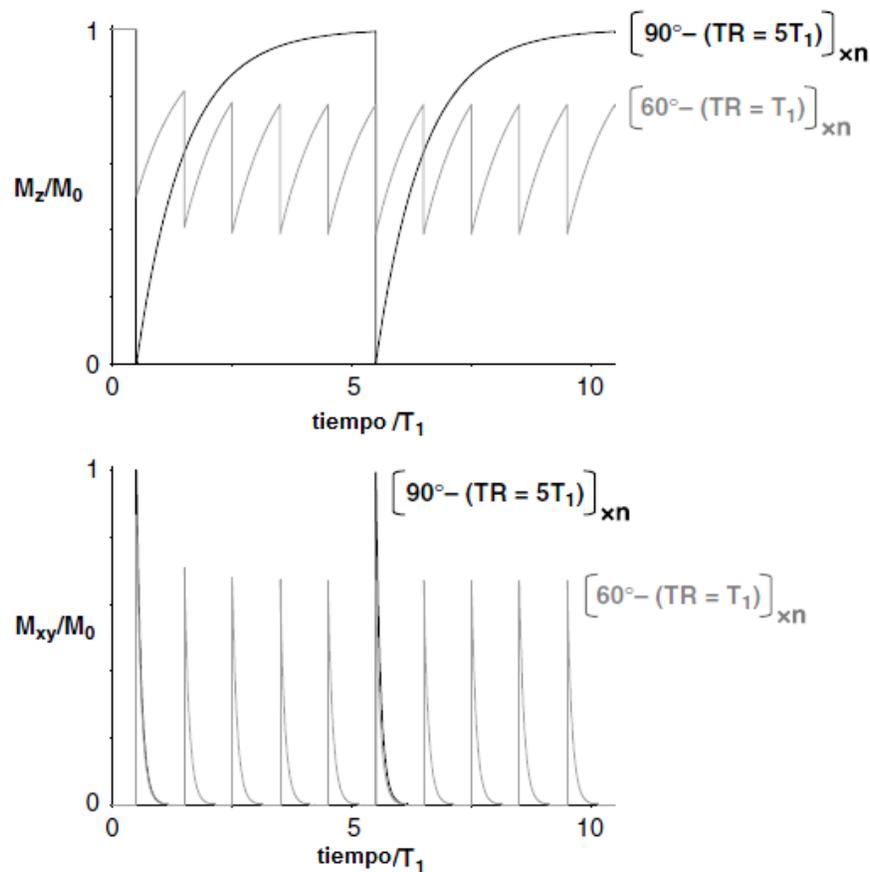


Fig. 10. Los efectos de múltiples excitaciones y relajación T_1 en el establecimiento de una condición de estado estacionario longitudinal. Cuando el tiempo de repetición TR es cinco veces el tiempo de relajación T_1 (línea negra) una situación de estado estacionario se alcanza instantáneamente para que $M_{xy}(0) = M_0$. Sin embargo, cuando $TR > 5T_1$ (línea gris), el tiempo de relajación T_1 es incompleto entre excitaciones y una situación de estado estable se consigue sólo después de una serie de excitaciones [25].

Durante la primera exploración el pulso de excitación gira la magnetización alejándola del eje longitudinal, se puede recuperar en un tiempo de relajación T_1 . Sin embargo, después de tres exploraciones la cantidad señal disminuye por la excitación y la señal se recupera en un tiempo de relajación igual T_1 , por lo que la magnetización longitudinal del estado estacionario antes de cada pulso de excitación es:

$$M_z(\alpha, T_1) = \frac{M_0(1 - e^{-TR/T_1})}{(1 - \cos \alpha e^{-TR/T_1})} \quad (3.63)$$

Note que las ecuaciones (3.62) y (3.63) son derivadas bajo el supuesto de que $M_{xy} = 0$ inmediatamente antes de la excitación. Experimentalmente, esto se puede lograr mediante el uso de $TR > 5T_2$ o aplicando un clúster de gradiente de campo magnéticos para desfazar cualquier magnetización transversal restante. Para un impulso de excitación 60° y $TR = T_1$ la señal por unidad de tiempo aumenta a $\sim 0.67(M_0 / T_1)$. A pesar de que la señal adquirida por excitación es más pequeña en comparación con $\alpha = 90^\circ$ y $TR = 5T_1$, el número de excitaciones por unidad de tiempo ha aumentado cinco veces dando lugar a una mayor cantidad de señal adquirida por unidad de tiempo. El ángulo de nutación óptimo α_{opt} para una señal máxima por unidad de tiempo está dada por:

$$\alpha_{opt} = \arccos(e^{-TR/T_1}) \quad (3.64)$$

el cual es conocido como el ángulo de Ernst. Cuando $TR > 5T_1$, el término exponencial se hace cero y el ángulo óptimo de nutación es de 90° . La tierra también tiene movimiento de nutación ver Figura 11.

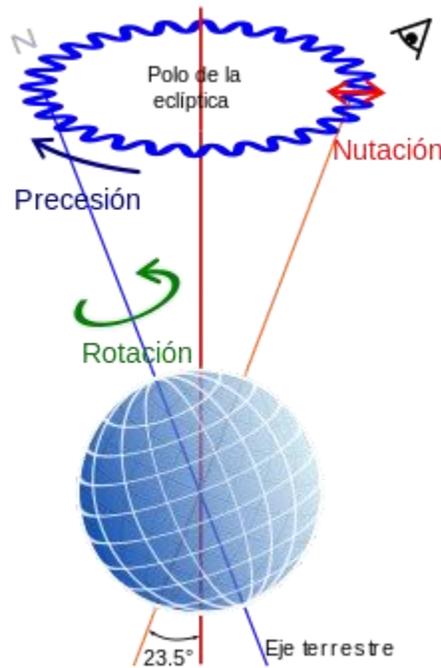


Fig. 11. Movimientos de rotación, precesión y nutación de la tierra (Wikipedia).

Para un TR corto, el ángulo de nutación se hace más pequeño con el fin de reducir la saturación de la magnetización longitudinal y para maximizar la señal adquirida. La figura 9 muestra el ángulo de Ernst como una función de TR/T_1 . Hay que tener en cuenta que la adquisición de la señal en general no debería comenzar hasta que se haya alcanzado la condición de estado estacionario de la ecuación subyacente (3.63). Experimentalmente, esto se consigue con las llamadas exploraciones ficticias que son idénticas a la exploración real, con la única diferencia de que no hay datos que se adquieran. Las exploraciones falsas ayudan a lograr la condición de estado estable, después de lo cual la adquisición de datos pueda

comenzar. Ciertamente las combinaciones de α y TR/T_1 requieren varias decenas de exploraciones ficticias antes de alcanzar la situación de estado estacionario.

La adquisición de datos con un tiempo de repetición corta y ángulo de Ernst correspondiente se utiliza con frecuencia en rápidas IRM. La secuencia de recuperación inversión es el clásico 'estándar de oro' para la determinación de los tiempos de relajación T_1 . El método de recuperación inversión consiste en dos pulsos y dos retardos. Después de la recuperación de la señal completa durante un largo tiempo de repetición TR , la magnetización longitudinal se invierte por un pulso de inversión 180° . La magnetización parcialmente se recupera durante una inversión de recuperación de retardo t , después de lo cual la magnetización longitudinal se excita en el plano transversal por un pulso de excitación de 90° . Después de la adquisición de datos, la secuencia se puede repetir, a partir de la recuperación de la magnetización longitudinal durante el tiempo de repetición TR .

La intensidad de la señal $M_z(t)$ durante el período de recuperación t después del pulso de inversión de 180° puede ser descrito por:

$$M_z(t) = M_0 - (M_0 - M_z(0))e^{-t/T_1} \quad (3.65)$$

donde $M_z(0)$ es la magnetización longitudinal al $t=0$, inmediatamente después de la inversión de pulso. Para una inversión de pulso perfecto $M_z(t) = -M_0$. El tiempo de relajación T_1 constante se puede obtener mediante la adquisición de espectros de RMN (o imágenes) a diferentes tiempos de recuperación t entre 0 y $5T_1$. Para $t=0$, la magnetización longitudinal invertida aún no se ha recuperado y es excitado al eje $-y'$ por el pulso de 90° a

lo largo del eje $-x'$, lo que resulta en una línea de resonancia negativa máxima después de la transformación de Fourier. Para $t = 5T_1$, la magnetización invertida se ha recuperado por completo al eje $+z'$ y se excita a $+y'$, lo que resulta en una línea de resonancia positiva máxima. La Figura 12A muestra los espectros típicos de recuperación inversión como una función del tiempo de recuperación t . La superposición las áreas integradas de resonancia a la ecuación (3.65) da una estimación del tiempo de relajación T_1 (Figura 12 B). En general se prefiere a un ajuste de tres parámetros [$M_0, M_z(0)$ y T_1] más que un ajuste de dos parámetros (sólo M_0 y T_1), ya que el parámetro adicional hace que la estimación de T_1 sea independiente de la exactitud de inversión o compensaciones sistemáticas en los retardos de recuperación inversión. Un método crudo de la estimación de la constante del tiempo de relajación T_1 es determinar el tiempo de cruce por cero, t_{nulo} en la curva de recuperación, después de lo cual la relajación T_1 se puede calcular como $T_1 = t_{nulo} / \ln 2$. La recuperación de la inversión es una técnica muy fiable para la medición de T_1 , con una falta de sensibilidad inherente hacia B_0 y B_1 , y falta de homogeneidad del campo magnético. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el aumento de la resolución en el tiempo es a menudo objeto de negociación para una mayor sensibilidad hacia las imperfecciones experimentales, como la falta de homogeneidad del campo magnético B_1 , la disminución de la señal a ruido (S/N) o suficiente precisión sobre un intervalo limitado de tiempos de relajación T_1 [25].

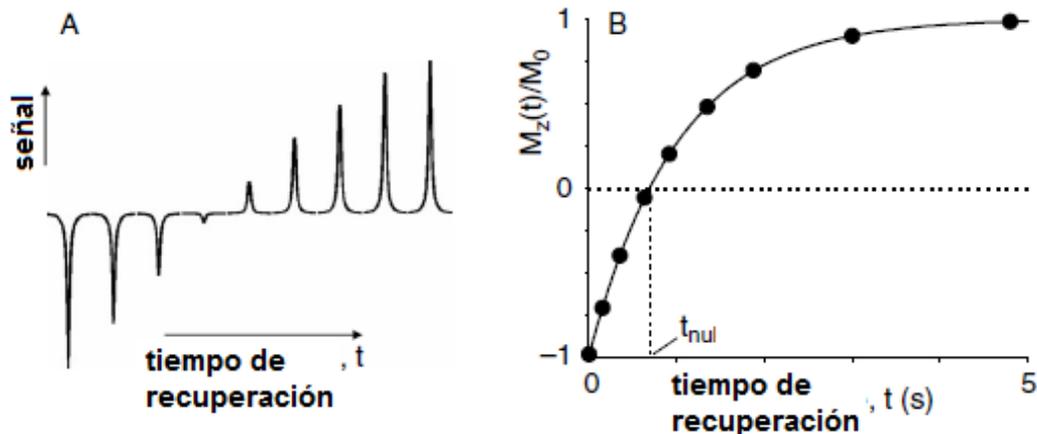


Fig. 12. Medición del tiempo de relajación T_1 a través del uso de un método de recuperación inversión. (A) Después de la inversión de la magnetización longitudinal, la magnetización se relaja de nuevo a su valor de equilibrio térmico con una constante de tiempo de relajación T_1 . Excitación a diferentes tiempos de inversión de resultados en los espectros que representan un muestreo discreto de la curva de recuperación T_1 . (B) La constante de relajación T_1 se puede conseguir mediante el ajuste de los espectros en (A) con la ecuación (1.74). El tiempo de cruce por cero ('anulación') de la magnetización longitudinal, t_{nulo} , está dada por $T_1 \ln 2$ y puede proporcionar una estimación aproximada de T_1 [25].

Relajación T_2 y espín-eco

La observación de la señal de RMN depende de la generación de coherencia de fase. La existencia de coherencia de fase es finita debido a la relajación T_2^* . De acuerdo con la ecuación (3.49), la relajación T_2^* se compone de relajación T_2 intrínseca y el desfase por falta de homogeneidad del campo magnético macroscópico y microscópico. Después de un pulso de 90° , se genera coherencia de fase, que desaparece con una constante de tiempo T_2^* , ocultando así cualquier información acerca de T_2 . Sin embargo, a través de la generación de los llamados espín-ecos [24] es posible separar la contribución de T_2 y falta de homogeneidad de campo magnético. El experimento más simple para generar espín-ecos (y obtener información sobre T_2) es la secuencia de Hahn [24] de dos pulsos de RF que se

muestran en la Figura 12A. Un pulso de RF inicial de 90° (irradiado a lo largo del eje $-x$ del sistema rotatorio, es decir, 90°_{-x}) crea magnetización transversal (coherencia de fase) a lo largo del eje y (figura 13B). Durante el retardo de la siguiente magnetización, se comienza a perder coherencia, puesto que esa es la tendencia de los espines, además de la relajación T_2 intrínseca, un rango de campos magnéticos B_0 y por lo tanto un movimiento de precesión alrededor del eje z con una variedad de frecuencias de Larmor (Figura 13C). En otras palabras, espines en diferentes posiciones espaciales adquieren diferentes fases debido a las variaciones en el campo magnético principal. La fase adquirida $\phi(r)$ por los espines en la posición r está dada por $\phi(r) = \gamma \Delta B_0(r) TE / 2$, donde $\Delta B_0(r)$ representa la falta de homogeneidad del campo magnético, siendo la diferencia entre el campo magnético en posición r , $B_0(r)$ y el campo magnético nominal a través de toda la muestra, B_{nom} . Después del decaimiento de $TE / 2$, y del pulso de RF a 180° aplicado a la muestra, todos los vectores de magnetización giran alrededor del eje y por 180° , lo que conduce a un reajuste de la fase adquirida de $+\phi(r)$ a $-\phi(r)$. Durante un segundo decaimiento $TE / 2$ los espines tienen de nuevo un movimiento de precesión a frecuencias de Larmor locales (Figura 13D) debido a que la fase se restableció por el pulso de 180° , los espines se reorientaron a lo largo del eje y al final del segundo decaimiento para formar un espín eco (Figura 13E).

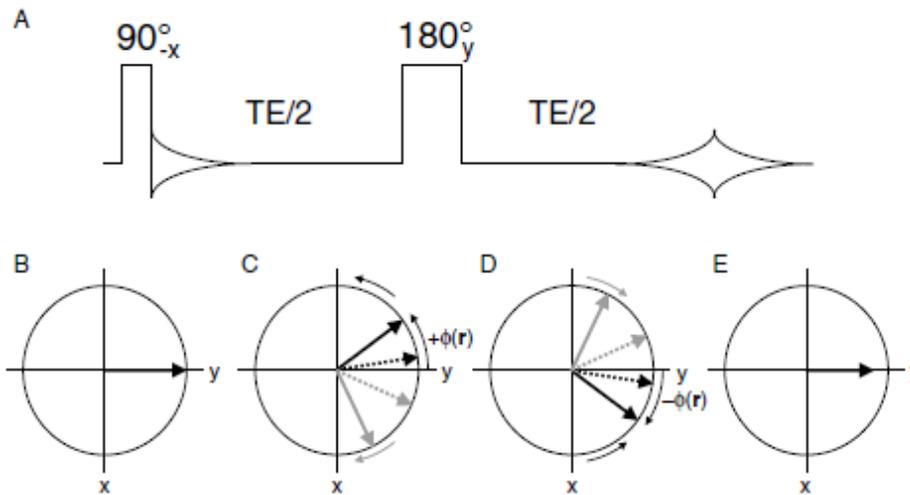


Fig. 13. Formación espín-eco de espines desacoplados. En un experimento de espín-eco (A), los espines se excitan (B) después de lo cual se introducen desfases en el plano transversal durante la primera mitad del tiempo de eco, debido a la falta de homogeneidad del campo magnético B_0 y desfases de frecuencias (C). Un pulso de 180° refleja la reorientación de todos los vectores de magnetización a lo largo del eje y (D) después de que la reposición de fase de los espines durante la segunda mitad del tiempo de eco debido a la misma falta de homogeneidad del campo magnético B_0 y desfases de frecuencia. En el tiempo eco TE , la reprogramación es completa y se forma un espín-eco (E). Obviamente, la señal ha decaído debido a la relajación T_2 [25].

El tiempo entre el pulso de 90° y la parte superior del espín-eco (es decir, cuando se produce la reorientación óptima) se conoce como el tiempo eco TE. En la parte superior del eco, los efectos de la falta de homogeneidad del campo magnético B_0 son reorientados (es decir, se elimina su efecto de fase) y la disminución de la señal es causada exclusivamente por la relajación T_2 inherente (despreciando los efectos de difusión). Los espín-eco forman la base para la localización espacial, la supresión de agua, edición espectral y una amplia gama de métodos adicionales de adquisición retardada. Las técnicas de espín-eco también se pueden utilizar para filtrar las componentes con tiempos de relajación T_2 cortos que permiten la adquisición de un FID (por ejemplo, en la segunda mitad del eco). Esto es debido a que en un simple pulso adquirido a 90° , los primeros puntos del FID, puede ser distorsionado debido

a la estrecha proximidad de un alto poder del pulso de 90° (es decir, ruptura de potencia de RF). Además, la secuencia espín-eco se puede utilizar para medir el tiempo de relajación T_2 mediante la realización de varios experimentos en los que se varía el tiempo de eco (Figura 14). El espectro correspondiente puede ajustarse a una curva exponencial, de acuerdo con:

$$M_{xy}(TE) = M_{xy}(0)e^{-TE/T_2} \quad (3.66)$$

para obtener la constante de tiempo de relajación T_2 .

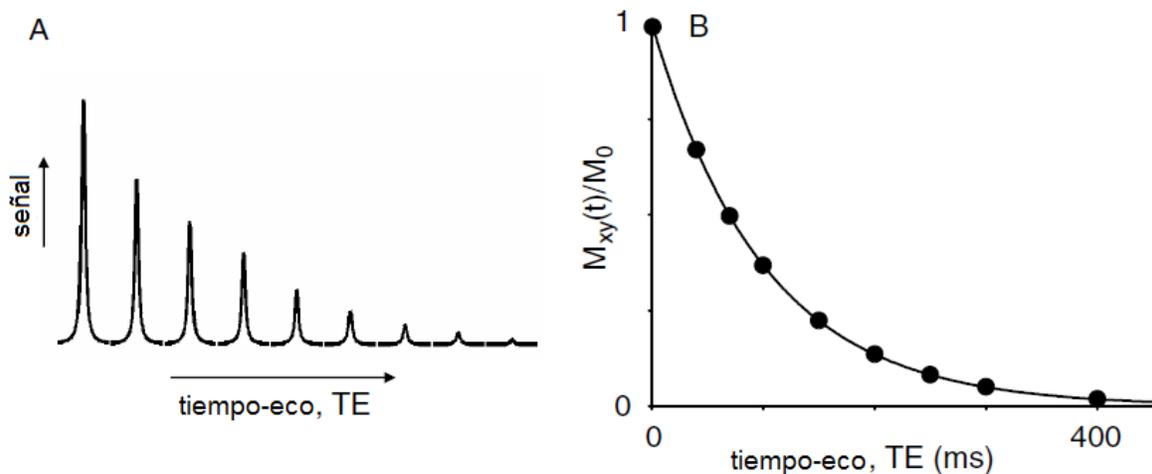


Fig. 14. Medición de la relajación T_2 a través del uso del método espín-eco. (A) Los espectros de RMN obtenidos a diferentes tiempos de eco. (B) la constante de tiempo de relajación T_2 se puede obtener mediante el ajuste de los datos presentados en (A) con la ecuación (3.66) [25].

3.8 Las propiedades magnéticas de SPIONs

Las propiedades únicas magnéticas de SPIONs surgen de una combinación de su composición atómica, estructura cristalina, y los efectos de tamaño. Un mol (6.02×10^{23} unidades) del óxido de hierro denominado magnetita (Fe_3O_4) consiste de un arreglo iónico de átomos Fe^{2+} y Fe^{3+} (en relación 2:1) y de iones O^{2-} que presentan un comportamiento

ferromagnético. Grandes cristales ferromagnéticos de Fe_3O_4 se componen de múltiples dominios magnéticos que muestran momentos magnéticos que se alinean dentro del dominio, pero entre los dominios, los momentos magnéticos están orientados en direcciones aleatorias. Las partículas ferromagnéticas por debajo de un diámetro crítico constan de un dominio magnético clave. El diámetro crítico, definido como el tamaño en el que los límites del dominio ya no son energéticamente favorables, es altamente dependiente de la anisotropía de las partículas, y varía para los diferentes materiales. Para la magnetita esférica de óxido de hierro (Fe_3O_4) el diámetro crítico es de aproximadamente 70 a 150 nm. Cuando el diámetro de las partículas de magnetita esféricas se reduce por debajo de 20 nm aproximadamente, la energía térmica disponible a la temperatura ambiente es mayor que la barrera de energía magnetostática. El dipolo magnético es libre de oscilar y como consecuencia la partícula actúa como un átomo paramagnético de tipo $\text{Fe}^{2+,3+}$.

Una nanopartícula incluye miles de átomos cuyo comportamiento global se puede describir como superparamagnético, y que combinan la magnetización alta del volumen de la magnetita con la naturaleza paramagnética de los iones de Fe (Fig. 15) [12].

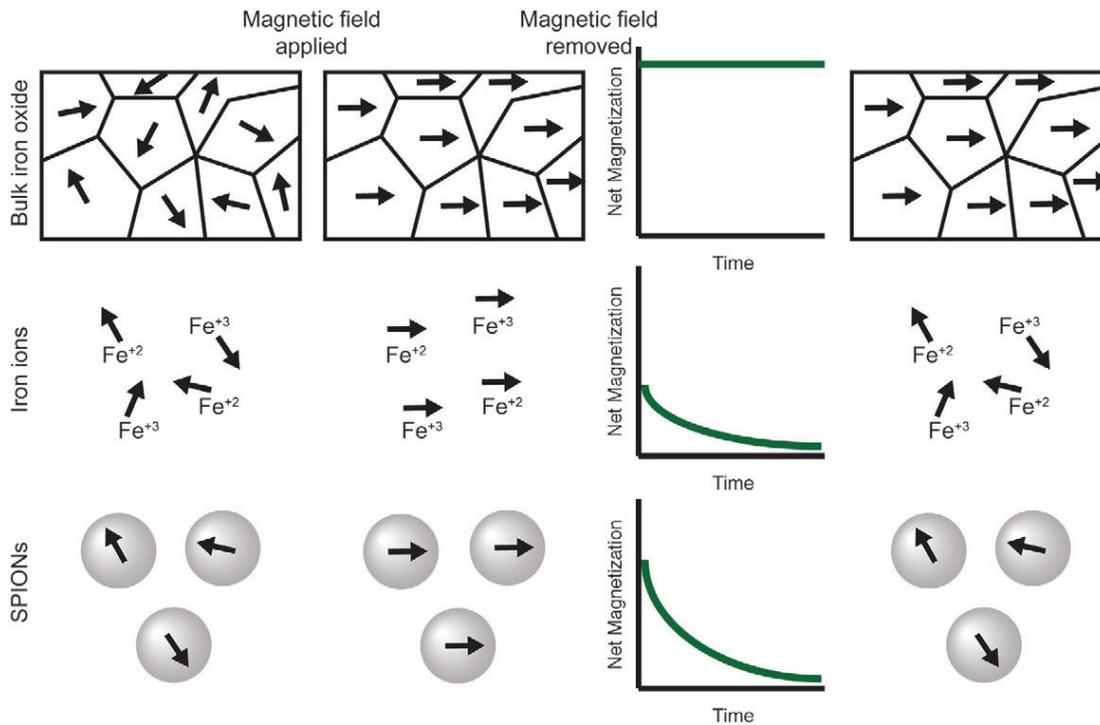


Fig. 15. Los efectos de un campo magnético externo en el volumen de magnetita (arriba), los iones de Fe (II)(III)(centro), y las SPIONS (abajo). Antes de la aplicación del campo magnético todos los momentos magnéticos están alineados al azar. La aplicación de un campo magnético externo alinea los momentos a lo largo del eje z del campo magnético. La magnetización neta inicial de SPIONS es mayor que los iones de Fe (II)(III), pero menor que en el volumen de la magnetita. Tras la eliminación del campo magnético, los momentos del volumen de la magnetita permanecen fijos a lo largo del eje z, mientras que ambos momentos magnéticos de los iones Fe (II)(III) y las SPIONS tienen un tiempo de relajación al equilibrio [12].

3.9 Efectos de las SPION sobre el contraste de las IRM

Las SPION actúan principalmente para modificar los valores T_2 de los átomos de hidrógeno de agua que rodean la partícula. Cuando las SPION presentes en los tejidos están sujetas a un campo magnético externo los momentos magnéticos de las grandes partículas se alinean para crear grandes gradientes de campo heterogéneos a través del cual se difunden los átomos de hidrógeno del agua. El acoplamiento dipolar entre los momentos magnéticos de los protones del agua y los momentos magnéticos de partículas causan desfase eficiente del espín y del tiempo de relajación T_2 que conduce a una disminución en la intensidad de la señal. El contraste proporcionado por las SPION en una imagen ponderada T_2 se

denomina captación de contraste negativo (Fig. 16), puesto que las zonas con altas concentraciones de SPIONs aparecen oscuras sobre las imágenes de RM [12].

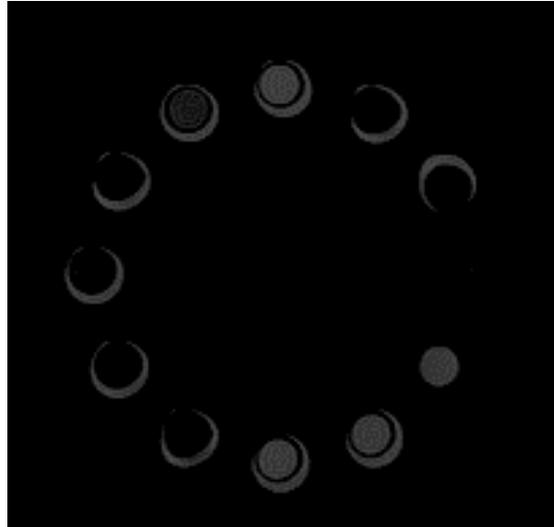


Fig. 16. Captación de contraste negativo de las SPION

3.10 Métodos de adquisición de imágenes por resonancia magnética para la mejor detección de las SPIONs

La detectabilidad de las SPIONs *in vivo* puede ser mejorada a través de técnicas de síntesis que controlan sus propiedades magnéticas, y mediante la mejora de los métodos de adquisición de resonancia magnética que incrementen la sensibilidad de detección de las SPIONs. A bajos límites de detección permitirá la administración de dosis más bajas, mientras las SPIONs mejoran el contraste. Además de los métodos que mejoran la captación de contraste negativo inherente a los métodos tradicionales ponderados en T_2 , nuevas técnicas que generen mejoras en contrastes positivos están actualmente en desarrollo.

Históricamente, los métodos de adquisición de imágenes por resonancia magnética para la detección de SPIONs se han basado en secuencias de pulsos en T_2 y T_2^* ponderada en el gradiente eco (GRE), las secuencias de pulsos dan información cuantitativa y cualitativa

sobre la ubicación de SPIONs *in vivo*, respectivamente. Recientemente, un esfuerzo por mejorar los límites de detección ha llevado a la modificación de secuencias de pulsos tradicionales de las SPIONs, así como a la aplicación de secuencias de pulsos no tradicionales de las SPIONs como el líquido que atenúa la inversión-recuperación (Fluid attenuated inversion-recovery, FLAIR).

La sensibilidad de las imágenes de RM en la detección de células individuales cargadas con SPIONs aumenta linealmente con el incremento de la resolución y aumenta con el incremento hiperbólico de la *razón de señal/ruido* (SNR, por sus siglas en inglés). Basándose en esta observación, tanto imágenes de alta resolución y alta SNR darían la capacidad de una mejor detección a las SPIONs, sin embargo, el aumento de la resolución y la SNR, incrementan el tiempo de adquisición de la imagen, es que daría lugar a tiempos de adquisición excesivamente largos.

Dado que no hay un aumento en el rendimiento de SNR, la reducción en el tamaño del *voxel* (pixel volumétrico) debe ser una preocupación primordial para mantener unos tiempos aceptables de adquisición de imagen. Con esto en mente, Hyen *et al.* utilizan la adquisición rápida de imágenes empleando un estado estacionario (*fast imaging employing a steady-state acquisition* FIESTA) de secuencia basado en una secuencia de pulsos GRE que fue capaz de detectar cantidades en el orden de femto-moles (1×10^{15} moles) de SPIONs etiquetados en células individuales *in vitro*. Con esta secuencia de pulsos, las imágenes son ponderadas por una razón de T_2 y T_1 , y los límites de detección son comparables a los de la tomografía de emisión de positrones (PET) [12].

3.11 Importantes parámetros de diseño de las SPIONs

Las propiedades magnéticas de las SPIONs se ven afectadas por la formación de diferentes cristales y el tamaño de partícula de la magnetita. Además, también pueden verse afectadas por las modificaciones superficiales, incluyendo recubrimientos de polímeros y tejidos destinados a los agentes que pueden tener un profundo efecto sobre la eficiencia de las SPIONs como agentes de contraste para imágenes de resonancia magnética. Estas modificaciones pueden aumentar las concentraciones locales de SPIONs en el tejido de interés mientras que disminuye la concentración en el tejido de fondo. La eficacia de estos agentes de contraste para aumentar la tasa de relajación de los protones circundantes puede ser expresada por la capacidad de relajación (R_1 , R_2), que se define como la pendiente del gráfico $1/T_1$ o $1/T_2$ como una función de la concentración de las SPIONs.

3.11.1 Consideraciones básicas

Los métodos de síntesis de las SPIONs tienen un efecto dramático en su cristalinidad, morfología y tamaño, entre otras características físicas y químicas. Los dos métodos más comúnmente empleados en la literatura científica son la co-precipitación y la descomposición solvotérmica. La síntesis de SPIONs por co-precipitación de iones Fe^{2+} y Fe^{3+} en soluciones acuosas ha sido tradicionalmente el método de síntesis más utilizado. Este método normalmente se traduce en una falta de control en el tamaño nanométrico bien definido (productos polidispersos), estequiometría de los óxidos, y variaciones de la intensidad de respuesta magnética. Por esta técnica, a menudo se producen varios tipos de óxidos de hierro o de fases cristalinas, tanto maghemita ($\gamma-Fe_2O_3$) como magnetita (Fe_3O_4). La magnetita es la fase preferida de entre los dos tipos de óxidos paramagnéticos, debido a sus propiedades

magnéticas superiores. El control de las condiciones de síntesis del método de co-precipitación debe ser riguroso de modo que el producto principal sea la magnetita nanocristalina y así mantener una señal aceptable de RM por efecto potenciador.

La descomposición térmica de precursores inorgánicos u organometálicos de hierro es un enfoque más reciente, que produce partículas de magnetita con estequiometría precisa, monocristalinos y con alta homogeneidad en su distribución de tamaño. Las altas temperaturas del método de descomposición térmica permiten una mayor velocidad de difusión durante la fase de crecimiento de los SPIONs resultando en la mejora de las propiedades magnéticas que presentan una relajación alta. El tamaño de partícula de las SPIONs tiene efectos significativos en las propiedades de relajación. El método de descomposición térmica produce la síntesis de SPIONs con dispersión de tamaño de partícula altamente controlable, casi monodispersas. A través de mínimas modificaciones a los parámetros de síntesis, SPIONs con diámetros medios que van desde 4 nm a 20 nm puede ser producido con una estrecha distribución de tamaños. La figura 17 ilustra la correlación entre el tamaño de partícula y la relajación T_2 debido a cambios en las propiedades magnéticas [12].

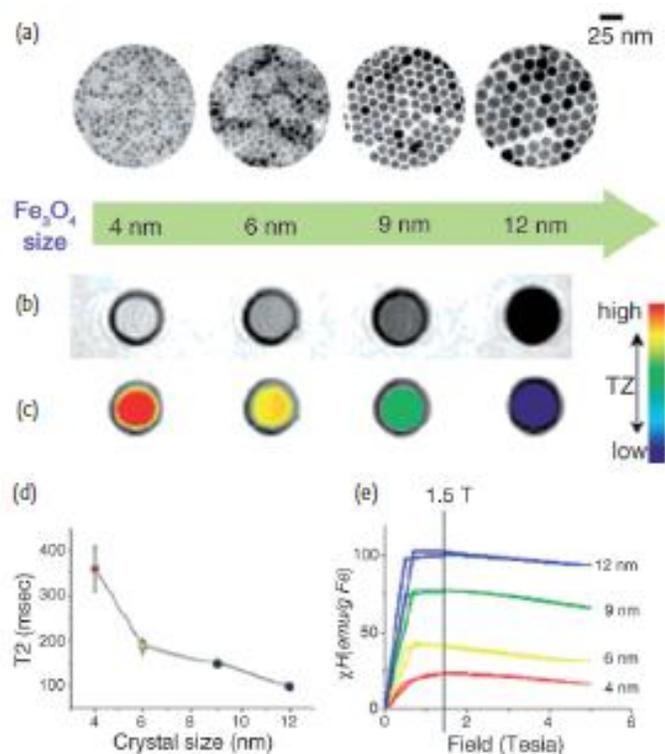


Fig. 17. Efectos de tamaño de nanoescala de los nanocristales de óxido de hierro solubles en agua sobre el magnetismo y las señales inducidas por RM. (a) TEM imágenes de nanocristales de Fe_3O_4 de 4, 6, 9 y 12 nm. (b) Las imágenes de RM depende del tamaño y las secuencias de pulsos en T2 de los nanocristales en solución acuosa a 1,5 T (c) Los cambios de tamaño que dependen de código de colores en las imágenes de RM basado en valores de T2. (d) Gráfica de valores T2 en función del tamaño de los nanocristales. (e) Magnetización de los nanocristales medidos con un magnetómetro SQUID. Reproducido con permiso de la Sociedad Química Americana © 2005.

Cuando el tamaño de partícula se reduce hay una disminución correspondiente a la saturación de la magnetización que a su vez reduce la capacidad de relajación de T_2 en las SPIONs. Este fenómeno es una consecuencia del aumento de la razón del volumen superficial debido a la disminución del diámetro de la partícula. Como el tamaño de partícula se reduce, el porcentaje de átomos encontrados en su superficie aumenta y la curvatura de la superficie de la partícula aumenta considerablemente, dando lugar a efectos de superficie significativos. Estos efectos pueden disminuir considerablemente la saturación de la magnetización de las pequeñas SPIONs mediante la reducción del número de átomos que contribuyen eficazmente al momento magnético de la partícula.

3.11.2 Recubrimiento de la superficie

El recubrimiento del núcleo de óxido de hierro es necesario para la correcta aplicación de las SPIONs *in vivo*. La alta proporción de volumen superficial de nanopartículas produce altas energías superficiales, facilitando la oxidación de la superficie que puede tener un efecto significativo sobre las propiedades magnéticas de las SPIONs. Además de la oxidación de la superficie, las elevadas energías superficiales pueden conducir a la agregación de partículas o agrupación en entornos fisiológicos. Estrategias enfocadas a la modificación del recubrimiento superficial alrededor de los núcleos de las SPIONs generalmente proporcionan una reducción en la energía superficial, así como evitan cualquier repulsión estérica o electrostática. Tras la inyección intravenosa, las SPIONs son sometidas a la absorción de proteínas, u opsonización, que constituye el primer paso en su viaje hacia el torrente sanguíneo por el sistema reticuloendotelial (RES). Al evadir el RES, la absorción y transporte de las SPIONs en el torrente sanguíneo aumenta la vida media de las SPIONs, lo que es crucial para muchas aplicaciones de resonancia magnética, ya que el aumento de circulación sanguínea maximiza el tiempo de tránsito y aumenta las probabilidades de las SPIONs de llegar a su tejido blanco. Una técnica común para evitar opsonización y despacho eventual por el RES es utilizar revestimientos hidrófilos tales como polietilenglicol (PEG) y otros polímeros zwitteriónicos que inhiben la adhesión de proteínas a la superficie.

Muchos materiales y métodos de revestimiento se han utilizado para modificar la superficie de las SPIONs. Los polímeros son los materiales de revestimiento más ampliamente utilizados y se pueden clasificar como hidrófilos o anfífilico, neutros o cargados, homopolímeros o copolímeros. Estos polímeros pueden ser anclados en la superficie de óxido de hierro por enlaces de tipo puente de hidrógeno, fuerzas electrostáticas o mediante enlaces

covalentes. En general, el recubrimiento debe proporcionar a las SPIONs con un exterior hidrófilo para aumentar la solubilidad en agua y su estabilidad.

La elección del material de recubrimiento puede tener un efecto significativo sobre la capacidad de relajación de las SPIONs. La coordinación química de la capa del ligante interior y la capa hidrofílica del revestimiento son factores importantes en la relajación de la partícula. Daou *et al.* han demostrado que el acoplamiento de los revestimientos de superficie con el núcleo de las SPIONs mediante grupos carboxilatos conduce al spin pivote y a la disminución de la magnetización neta, sin embargo, este efecto no se observa cuando el acoplamiento se realiza a través de grupos fosfonatos. Además, el uso de moléculas hidrófilas tales como la polietilenimina (PEI), que como capa de recubrimiento, permite una mayor hidratación alrededor del núcleo magnético y produce una mayor relajación de los átomos de hidrógeno que en las SPIONs recubiertas con moléculas que generan capas hidrófobas tales como el ácido oleico.

La longitud de la cadena del polímero, que corresponde al espesor del revestimiento, también tiene efectos significativos sobre la relajación. Simulaciones por computadora han demostrado que el efecto del espesor del recubrimiento en la relajación está determinado por la competencia de dos factores: la exclusión física de protones de campo magnético de las SPIONs y el tiempo de residencia para los protones dentro de la zona del revestimiento. La estructura de la capa del revestimiento es la que determina el factor dominante. LeConte *et al.* estudiaron los efectos de la longitud de la cadena en la relajación para las SPIONs con un revestimiento bicapa. En este sistema, la capa hidrofóbica interior excluye el agua, mientras que la capa exterior de PEG hidrofílica permite la difusión del agua en la zona de revestimiento. El aumento de la longitud de la cadena de PEG condujo a una reducción en

los valores de r_2 . Aquí parece que la exclusión de agua desde el núcleo por la capa hidrófoba interna compensa cualquier efecto causado por el aumento del espesor de la capa hidrófila de PEG. Estudios recientes realizados por Hu *et al.* han demostrado que cuando las moléculas de agua no están excluidas de las regiones cercanas al núcleo de las SPIONs, la relajación r_2 se incrementa con la longitud de la cadena mayor. Las SPIONs con diámetros de 3, 4, 5 y 6 nm se recubrieron con una capa de polímero único de cualquier cadena corta o larga de polietilenglicol dietileno. La modificación con este derivado de PEG conduce a un aumento de 29 a 47, 42 a 69, 48 a 86, y 61 y 119 $mM^{-1}s^{-1}$ para los cuatro diámetros de las SPIONs respectivamente. Estas diferencias se pueden atribuir a una capa de difusión más grande de agua lenta de PEG modificando las SPIONs. Las mediciones de los coeficientes de difusión del agua en soluciones de PEG de diferentes pesos moleculares indican que el agua se mueve más lentamente a altas concentraciones de PEG. Los átomos de hidrógeno en la capa de difusión de agua pasan más lentamente, en un período de tiempo más largo correspondiente a una proximidad más estrecha con el campo magnético del núcleo de las SPIONs permitiendo un desfase más eficiente de los momentos magnéticos de los núcleos de hidrógeno vecinos.

Para poder utilizar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro en aplicaciones biomédicas el producto debe tener características específicas, como por ejemplo éstas deben ser monodispersas, cristalinas e hidrosolubles; aunque existen diferentes tipos de nanopartículas y métodos de preparación es necesario contar con una manera de producción continua y eficiente de nanopartículas de alta calidad.

En el método de obtención de nanopartículas magnéticas, el poliol líquido actúa simultáneamente como solvente del precursor metálico y como el agente reductor. El precursor metálico puede ser altamente soluble o simplemente soluble en el poliol. La solución es agitada y calentada a cierta temperatura alcanzando el punto de ebullición del poliol para metales poco reducibles. Controlando la cinética de la precipitación, se pueden obtener partículas metálicas con tamaño y forma definida, las cuales no presentan aglomeración [26].

El proceso de síntesis por medio de un poliol ofrece ciertas ventajas en comparación de otros métodos de síntesis como los de precipitación, micro emulsión, u otros. En este tipo de proceso utilizando un poliol, el producto obtenido se estabiliza intrínsecamente por una capa de moléculas hidrofílicas correspondientes al poliol utilizado en la reacción, con lo cual también exhiben estabilidad coloidal a largo plazo en un medio acuoso sin la necesidad de alguna otra modificación superficial de la nanopartícula.

Una característica importante del método de descomposición térmica por medio de polioles es que no se requieren de una gran variedad de reactivos para llevar a cabo la reacción, reduciendo el costo en la producción de nanopartículas magnéticas. En primer lugar se debe tener un precursor metálico, una sal en este caso de hierro, y en segundo lugar un poliol. Se puede escoger de una variedad de polioles sin embargo los que se utilizan principalmente en este tipo de procesos para la síntesis de nanopartículas son el etilenglicol (EG), dietilenglicol (DEG), trietilenglicol (TREG) e incluso polietilenglicol (PEG) de diferentes pesos moleculares. En la figura 18 se ilustran las estructuras de los polioles anteriormente mencionados.

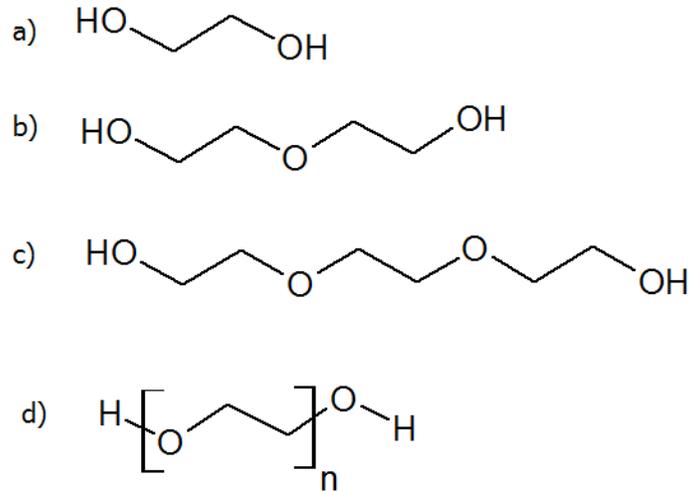


Fig. 18. Estructuras de polioles. a) Etilenglicol b) Dietilenglicol c) Trietilenglicol d) Polietilenglicol

3.12 Resonador IRM del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

El estudio fue realizado en el servicio de Resonancia Magnética en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, con un equipo de 1.5T, modelo *Achieva* del fabricante Philips mostrado en la figura 36. Para producir imágenes médicas por resonancia magnética se deben completar varios procesos. Estos procesos incluyen una alineación nuclear de los átomos de la muestra (la muestra es un paciente y en nuestro caso son las SPION), pulsos de radio frecuencia que exciten los núcleos, la recepción de la emisión de la señal por los núcleos, codificación espacial de las señales recibidas y finalmente el proceso de la formación de las imágenes de estructuras anatómicas. El sistema de RM en sí consta de [27]:

- Un imán que produce un campo magnético fuerte y constante;
- Bobinas de radiofrecuencia de transmisión y recepción, que excitan y detectan la señal de RM;

- Gradientes de campo magnético, que localizan las señales de RM;
- Un sistema informático para el control del escáner, visualización de imágenes y archivo;
- Camilla del paciente, para comodidad y ayuda al posicionamiento;
- El equipo de monitoreo fisiológico.

3.12.1 El imán

El imán es el corazón del sistema de RM. Los principales tipos de imanes utilizados en MRI son:

- Imanes superconductores - utilizado en los sistemas de campo medio y alto (0.5T y superior);
- Imanes permanentes - capaces de sostener campos de hasta 0.3T;
- Electroimanes - capaces de producir campos de hasta 0.6T.

Para nuestro estudio se utilizó un moderno imán superconductor de 1.5T, que requiere helio líquido para ser enfriado [27].

3.12.2 Bobinas de Radiofrecuencia

Las señales de RM que proporcionan información para el diagnóstico se producen dentro del tejido del paciente en respuesta a pulsos de radiofrecuencia (RF). Estos se generan por una bobina emisora que rodea la totalidad o una parte del cuerpo. Las señales de RM producidas en el cuerpo se detectan utilizando una bobina receptora [27]. Para nuestro estudio utilizamos una bobina de cabeza figura 36.

3.12.3 Gradientes

La localización de las señales de RM en el cuerpo para producir imágenes se logra mediante la generación de variaciones espaciales de corta duración en la intensidad de campo magnético a través del paciente. Estos se conocen comúnmente como gradientes. El uso de gradientes fuertes permite la visualización de características anatómicas más pequeñas, y permite una exploración más rápida. Los campos gradiente son producidos por tres conjuntos de bobinas gradiente, uno para cada dirección (x, y, z), a través de las cuales grandes corrientes eléctricas se aplican repetidamente en secuencias de pulsos cuidadosamente controladas. Las bobinas gradiente están integradas en el orificio del imán. Las bobinas gradiente generan un golpeteo fuerte, chasquido o sonido agudo durante la exploración, como un altavoz. El sonido acumulativo de los tres gradientes puede ser tan fuerte que se requiera protección para los oídos [27].

3.13.4 Sistema de computadora y consola

El sistema de RM se controla a través de la consola del operador situado en la sala de control. La estación de trabajo independiente permitir funciones de post-procesamiento que deben llevarse a cabo sin interferir con la operación del escáner. Las computadoras en red permiten al escáner y las estaciones de trabajo enviar y recibir datos a todo el hospital [27].

3.12.5 Sistema de manejo de los pacientes

La camilla del paciente (a veces llamada mesa) es parte integral del equipo de RM que permite el posicionamiento del paciente. La mesa está equipada con sistemas motorizados y tiene botones de paro de emergencia. La precisión de posicionamiento del paciente se consigue utilizando marcadores de alineación de luz, por ejemplo, con láser. Un intercomunicador que proporciona comunicación entre la consola del operador y el paciente.

También tiene una alarma de mano o “botón de pánico”. El circuito cerrado de televisión se utiliza para el monitoreo visual adicional del paciente [27].

Capítulo 4 METODOLOGÍA

Síntesis de nanopartículas

Para el estudio realizado se eligió el compuesto acetyl acetonato de hierro III, $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$, como precursor de hierro y como polioles se utilizó el trietilenglicol (TREG) y el polietilenglicol 6000 (PEG 6000). La función principal del poliol en el proceso de síntesis es la reducción de la sal metálica a partículas metálicas, sin embargo también sirven como el solvente con alto punto de ebullición y como estabilizador para controlar el crecimiento de las nanopartículas previniendo la agregación de estas. En esta investigación se utilizaron dos diferentes polioles para la funcionalización superficial de las nanopartículas magnéticas (TREG y PEG). En el caso específico del PEG se efectuó un paso previo que consiste en la carboxilación oxidativa del PEG, esto con el fin de obtener grupos carboxílicos a lo largo de la cadena polimérica y mejorar así la interacción de la misma y la superficie de la nanopartícula, mejorando así la funcionalización de la superficie de la nanopartícula magnética.

Reactivos

- Acetilacetato de Hierro (III), $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$, Aldrich CAS 14024-18-1 PM 353.18 pureza 97% Catálogo 517003.
- Trietilenglicol $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, Aldrich CAS 112-27-6 PM 150.17 pureza 99% Catálogo T59453.

- Acetato de etilo $\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$, RBM Reactivos CAS 141-78-6 PM 88.11 pureza 99.5%
- Etanol $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$, RBM Reactivos CAS 67-17-5 PM 46.07 pureza 99.5%
- Polietilenglicol 6000 $\text{HO-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-)}_n\text{-H}$, Aldrich CAS 25322-68-3 PM 6000 Catálogo P30-15.
- Agua destilada, disponible en el laboratorio de nanotecnología en la UDLAP.
- Ácido sulfúrico H_2SO_4 , solución concentrada disponible en el laboratorio de nanotecnología en la UDLAP.
- Trióxido de cromo CrO_3 , J.T. Baker CAS 1333-82-0 PM 99.99 pureza 99.99%.
- Diclorometano CH_2Cl_2 , EM SCIENCE CAS 75-09-2 PM 84.93 pureza 99.5%.
- Cloruro de sodio NaCl , Meyer CAS 7647-14-5 PM 58.44 pureza 99.0%.
- Éter etílico $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$, Meyer CAS 60-29-7 PM 74.12 pureza 99.0%.
- Acetona $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$, Fermont CAS 67-64-1 PM 58.08 pureza 99.6%.
- Glicerina $\text{HOCH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$, Meyer CAS 56-81-5 PM 92.10 pureza 99.8%.
- Agua tridestilada, disponible en el laboratorio de ingeniería civil de la UDLAP.
- Nitrógeno N_2 , disponible en el laboratorio de nanotecnología en la UDLAP.

Materiales

- Material de vidrio

- Parrilla de calentamiento con agitación magnética.
- Nido de calentamiento y reóstato
- Balanza electrónica
- Termopar

Nota: todos los materiales mencionados se ubican en los laboratorios de nanotecnología en la Universidad de las Américas Puebla.

Método de polirol utilizando TREG

Para esta síntesis se tomó como referencia la reacción propuesta por Wei Cai para obtener nanopartículas con un rango de tamaño aproximado de 9 nm. En la referencia se reporta el uso de atmósfera inerte de Ar, sin embargo en las síntesis realizadas en esta investigación no se empleó ningún tipo de atmósfera protectora inerte, llevando a cabo la preparación en atmósfera abierta [16].

Primero se monta un sistema con matraz de una boca, condensador, agitador magnético, nido de calentamiento, reóstato, termopar y parrilla de agitación. Figura 19 se representa el sistema utilizado en la síntesis.



Fig. 19. Sistema utilizado en la síntesis de MNP's funcionalizadas con TREG

La primera muestra fue etiquetada como E1; se añadieron 25 mililitros (186.4 mmol) de TREG y 1.412 gramos (4 mmol) de acetyl acetato de hierro (III) al matraz de una boca y se comenzó el calentamiento a 180°C de la solución rojiza. Al llegar a los 180°C se mantuvo por treinta minutos, a esta temperatura la solución se torna más oscura. Después del primer calentamiento se sube la temperatura rápidamente hasta los 280°C para comenzar el segundo calentamiento de nueva cuenta por treinta minutos, en este punto de la reacción la solución es completamente negra. Se retiró la suspensión y se enfrió a temperatura ambiente, el primer indicador de que se obtuvo un producto magnético se presenta revisando la respuesta magnética del producto, Figura 20.



Fig. 20. Respuesta magnética del producto

El siguiente paso fue realizar los lavados al producto para esto se utilizaron 40 ml de acetato de etilo y 10 ml de etanol, esto favorece a la floculación de las nanopartículas. La solución se dejó reposar sobre imanes por cinco días para poder hacer la decantación de las nanopartículas. En total se realizaron tres lavados con acetato de etilo y etanol, al finalizar se secó el producto y se almacenó. Esta síntesis se llevó a cabo cinco veces variando diferentes parámetros; como temperatura, concentración del precursor de hierro, concentración del recubrimiento TREG o PEG, para tener producto con diferentes tamaños, más adelante se describen.

Método de polirol utilizando PEG 6000

Para esta síntesis, se requiere un paso previo ya que debe realizarse la preparación del reactivo PEG 6000 carboxilado. Se basó en la síntesis propuesta por Zhen Li [11].

La carboxilación del PEG 6000, se logró haciendo una adaptación al método propuesto por Alexander Fishman para carboxilar PEG 3400 [12]. El esquema de la reacción se muestra en la figura 21.

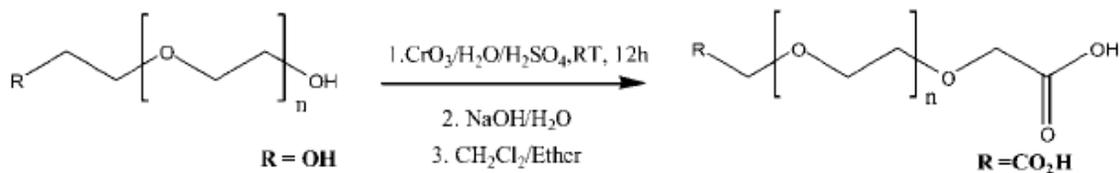


Fig. 21. Esquema de la reacción de la preparación de PEG carboxilado por oxidación directa [18].

Se prepararon dos soluciones, una con 5 gramos (0.0833 mmol) de PEG 6000 en 25 ml de agua y 8 ml de H₂SO₄ (incolora) y la segunda con 0.235 gramos (2.35 mmol) de CrO₃ en 5 ml de agua (color naranja). Al mezclar las soluciones inmediatamente tomó un color negro, se dejó en agitación magnética por 8 horas y al final el color de la solución tomó un color verde-azul. En la figura 22 se muestra la solución obtenida después de la agitación.

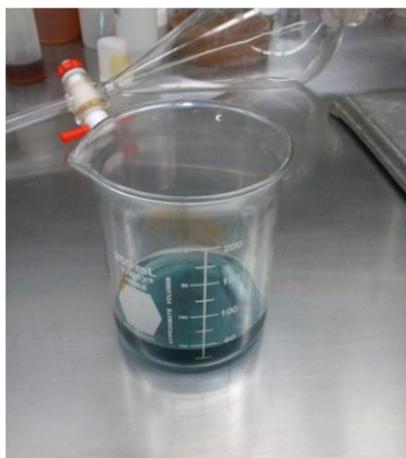


Fig. 22. Solución de la reacción de carboxilación del PEG 6000 después de 8 horas de agitación.

A la solución obtenida se agregaron 25 ml de agua y se le realizaron 3 extracciones con 100 ml de diclorometano (CH₂Cl₂) utilizando un embudo de separación de 500 ml. Al terminar

las 3 extracciones se realizaron 2 lavados con 25 ml de agua y 25 ml de una solución saturada de NaCl. Se recuperó la fase orgánica y se calentó para evaporar el diclorometano, en este punto la solución es turbia y con un ligero color amarillo, después de esto se logró apreciar la precipitación de los cristales de PEGCOOH 6000. Los cristales obtenidos se secaron con éter etílico para su recuperación, figura 23. El peso del producto final fue de 4.6 gramos, con un rendimiento de reacción de 92%.

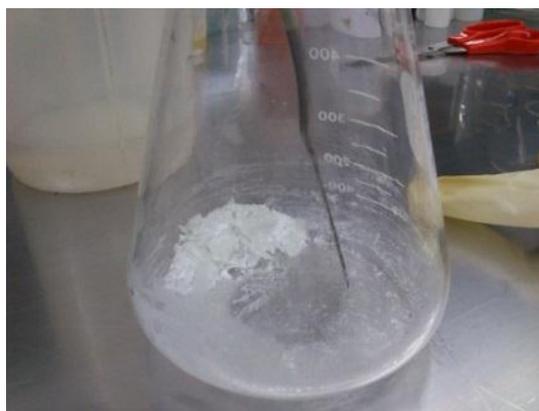


Fig. 23. Del lado izquierdo el sistema que se utilizó para los lavados de la fase orgánica y del lado derecho la precipitación de los cristales de PEGCOOH 6000

Una vez obtenido el producto carboxilado, se comenzó la síntesis de nanopartículas magnéticas tomando como referencia la publicación de Zhen Li. Se montó un sistema con una parrilla con agitación magnética, un matraz de una boca, condensador, nido de calentamiento, reóstato, termopar, agitador magnético. El sistema estaba cerrado para mantenerlo con una atmósfera de nitrógeno para evitar la oxidación del producto durante la reacción.

Aunque se tomó como referencia la publicación de Zhen Li, se cambiaron las proporciones del precursor de hierro y el PEG-COOH 6000 ya que el usado por el autor es de un peso molecular mucho más bajo. Se utilizaron 0.8 gramos (2.264 mmol) del precursor de hierro,

acetil acetato de hierro III, y 1.0 gramos (aproximadamente 0.166 mmol) de PEG-COOH 6000. La mezcla se calentó hasta 200°C y se mantuvo bajo estas condiciones por 30 minutos.



Fig. 24. Sistema montado para la síntesis de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PEGCOOH 6000

Durante el primer calentamiento el PEG-COOH se descompone por lo que se forma una solución rojiza, al terminar los 30 minutos del primer calentamiento se subió la temperatura a 260° C y se mantuvo por 40 minutos más, al comenzar el segundo calentamiento la solución adquiere un color negro. Al término de la reacción la solución es completamente negra y presenta comportamiento magnético ver Figura 20.

La solución se enfrió a temperatura ambiente ocasionando la solidificación del producto, el cual fue recuperado del matraz utilizando una solución (5:3) de éter/acetona. Después de recuperar el producto se realizaron 4 lavados con una solución (3:3) de éter/acetona, los lavados ayudan a remover residuos del precursor de hierro e impurezas en la muestra. Terminando los lavados se realizó la decantación magnética para recuperar el producto, secarlo y almacenarlo.

El producto seco es un polvo de color negro con respuesta al campo magnético (figura 25), también muestra buena solubilidad tanto en agua como en etanol.

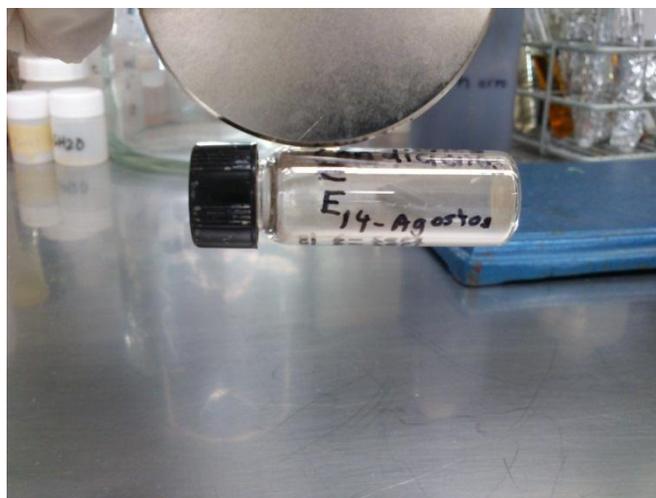


Fig. 25. Respuesta al campo magnético del producto de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEGCOOH 6000

Los resultados que se obtuvieron de las reacciones al variar temperatura, concentración del precursor de hierro y concentración del recubrimiento PEG o TREG, se describen en la tabla 2 en los resultados.

Cálculo de las concentraciones preparadas en los viales

Se utilizó una técnica espectrofotométrica para determinar la concentración de iones Fe^{2+} en la muestra, empleando 1, 10-fenantrolina (*phen*) como agente acomplejante colorimétrico; la espectrofotometría de absorción de UV-visible proporciona un método conveniente de determinación de la concentración de cualquier sustancia que puede ser tratada para formar una solución de color en el que la intensidad del color es proporcional a la concentración de la sustancia. Este experimento se basa en la formación de un complejo de coordinación entre un ligante y el ión metálico de interés que absorbe en la región visible; dicha absorción de la radiación en la región UV-VIS de las especies absorbentes se rige por la ley de Beer-Lambert

que incluye en su tratamiento al espesor del medio absorbente y la concentración de la especie absorbente.

El procedimiento general para la determinación espectrofotométrica de Fe(II) en solución consta de los siguientes pasos básicos.

- a) Tratamiento de la muestra adecuadamente preparada con un reactivo para formar una solución de color,
- b) Controlar los factores que influyen en la absorción de las especies de color, medición de la absorbancia de la solución de color en la longitud de onda apropiada,
- c) Preparación de una curva absorbancia-concentración (curva de calibración) con medidas de la absorbancia de las soluciones estándar de concentraciones conocidas, y
- d) Estimación de la concentración en la muestra desconocida correspondiente a la absorbancia medida mediante el uso de la gráfica de calibración.

Siguiendo los pasos mencionados anteriormente, se calcularon los volúmenes necesarios para la preparación de las diluciones de concentración conocida (ppm) y se determinó experimentalmente la absorbancia a una longitud de onda de 508 nm (correspondiente al máximo de absorción del complejo $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$) (Tabla 3), para la construcción de la curva de calibración. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

1. Solución ferrosa estándar (10 ppm (10 mg / dm^3)); preparó como sigue.
Pesar 0,0702 g de sulfato ferroso amónico grado analítico hexahidratado, $[\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$. Transferir cuantitativamente la muestra pesada en un matraz aforado de 1 dm^3 capacidad y añadir suficiente agua destilada para que se disuelva. Añadir 2.5 cm^3 de ácido sulfúrico concentrado y aforar.
2. 1, 10-fenantrolina; preparada por disolución de 100 mg del reactivo en 100 cm^3 de agua destilada. El reactivo puede ser almacenado en una botella.

3. Clorhidrato de hidroxilamina; preparó disolviendo 10 g de hidroxilamina clorhidrato en 100 cm³ de agua destilada.
4. Acetato de sodio (0,1 M); preparó disolviendo 10 g de acetato de sodio en 100 cm³ de agua.
5. Ácido acético (0,1 M); preparada mediante la dilución de alrededor de 6 cm³ de ácido acético glacial a 100 cm³.
6. Tampón de acetato de sodio-ácido acético (pH = 4,5); prepara mezclando 65 cm³ de 0,1 M de ácido acético y 35 cm³ de acetato de sodio 0,1 M en un matraz de 100 cm³. (Prepare el tampón cuando sea necesario).
7. Pipetear a cabo 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 cm³ de la solución estándar de ion ferroso en una serie de matraces de 100 cm³ estándar etiquetados de 1 a 7.
8. En otro matraz, etiquetados 'muestra', tome 10 cm³ de la muestra desconocida.
9. A otro matraz aforado de 100 cm³, con la etiqueta 'blanco', añadir unos 20 cm³ de agua destilada para preparar la solución blanco.
10. Para cada uno de los matraces de más arriba (muestra, y el blanco) añadir 1 cm³ de clorhidrato de hidroxilamina y 5 cm³ de 1, 10-fenantrolina.
11. Tampón cada solución mediante la adición de 8 cm³ de tampón de acetato / ácido acético de sodio.
12. Dejar reposar al menos 15 minutos después de la adición de los reactivos para el desarrollo completo del color.
13. Diluir cada solución exactamente a 100 cm³ marca con agua destilada y mezclar bien.

14. Las soluciones estándar así obtenidos corresponden a 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ppm respectivamente. Puede etiquetar los frascos en consecuencia.
15. Registre el espectro de absorción de la solución estándar de 2.0 ppm contra el blanco en el intervalo de 400-700 nm.
16. Si el instrumento es de tipo manual, medir el valor de absorción después de cada 10 nm en el rango espectral y registrar las lecturas.
17. Mida y registre la absorbancia de la 'muestra' también de la misma manera.
18. Hacer una gráfica de absorbancia en el eje Y, frente a la concentración de la norma soluciones en el eje X para obtener la curva de calibración. (La región lineal de la curva obedece a la ley de Beer-Lambert y se utiliza para la estimación de muestras desconocidas)
19. Determinar la concentración de la solución de muestra dada con la ayuda de la curva de calibración.
20. Calcular los iones férricos presentes en la solución de la muestra desconocida por la contabilidad por el factor de dilución.

Tabla 2 Datos obtenidos del espectrofotómetro

Litros	ppm	Absorbancia	Longitud de onda, λ (nm)
1	10		
0.001	0.1	0.033	508
0.003	0.3	0.0709	508
0.005	0.5	0.108	508
0.01	1	0.2057	508
0.015	1.5	0.3017	508
0.02	2	0.3995	508

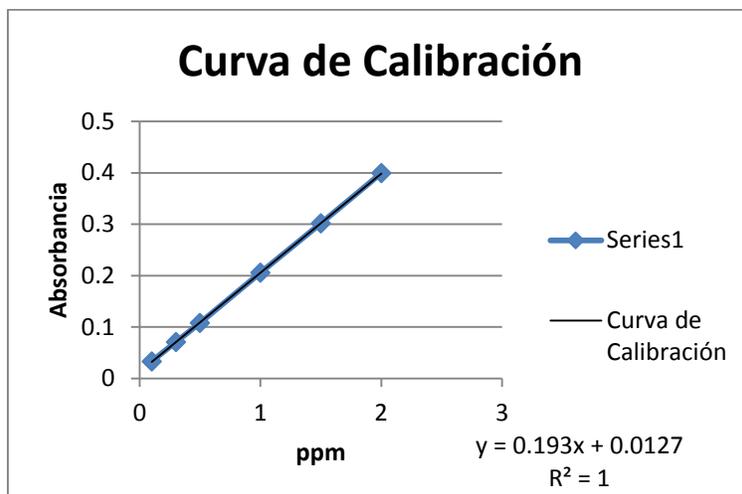


Fig. 26. Curva de calibración

Para obtener la concentración de muestras de masa conocida de los productos preparados de magnetita funcionalizada con PEG o TREG, se pesaron 10 mg de las muestras (E1, E2, E3, E4, E5 y E8) y se agregaron en 10 ml de ácido clorhídrico, en distintos vasos de precipitado, para llevar a cabo una digestión ácida (ver figura 27); posteriormente se determinó la concentración de Fe total en las muestras. Para tal propósito se llevó a cabo el siguiente procedimiento detallado:

La determinación espectrofotométrica de Fe^{2+} y los iones Fe^{3+} simultáneamente en una solución dada se basa en el hecho de que los iones férrico (Fe^{3+}) forman un complejo similar con el ligante 1,10-fenantrolina acomplejado con los iones ferrosos (Fe^{2+}), pero el complejo es de color amarillo. Ambos, los complejos ferrosos y férricos tienen absorción idéntica a 396 nm y son aditivos. Por lo tanto, la medición de la absorción a 396 nm daría a la cantidad total de hierro presente. Para ello, la solución se hace ligeramente ácida con ácido sulfúrico diluido, se trató con 1,10-fenantrolina y tamponada con ftalato ácido de potasio a un pH de 3.9. Por otro lado, la absorción a 508 nm (que es la que monitoreamos en este experimento) corresponde sólo al complejo ferroso, Fe^{2+} . Por lo tanto, la absorbancia a 508 nm, da la

cantidad de iones ferrosos. La reducción de todo el Fe^{3+} presente en el sistema empleando un exceso de clorhidrato de hidroxilamina y luego estabilizándolo en un medio amortiguador de buffer de acetatos, nos permite la determinación cuantitativa colorimétrica del Fe total en el sistema, siguiendo el proceso previamente descrito.

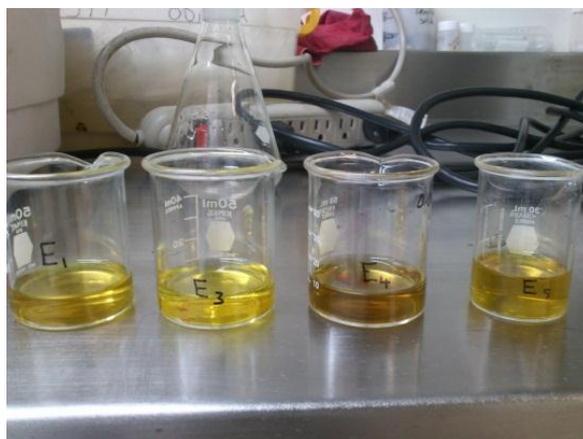


Fig. 27. Muestra la digestión acida de las diferentes nanopartículas preparadas en las muestras E1, E3, E4, E5.

Capítulo 5 RESULTADOS

En la tabla 2 se presentan las características de las síntesis llevadas a cabo para encontrar diferentes tamaños, se observa que si se varía la concentración del precursor de hierro, el recubrimiento, y el tiempo de calentamiento; el tamaño de la nanopartícula cambia.

Tabla 3.- Características de las síntesis llevadas a cabo para encontrar diferentes tamaños,

TREG	Referencia (autor)	Referencia (autor)	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9
PEG											
Precursor de hierro (acetil acetato de hierro III)	0.706 gramos (2 mmol)	0.4 gramos (1.132 mmol)	1.412g 4mmol	0.8g	1.412g (4mmo l)	0.8g 2.264 mmol	0.353g 1mmol	0.4 g 1.132 mmol	0.706g 2mmol	0.70 6g 2mmol	1.412g 4mmol

Cantidad de recubrimiento	25 mililitros (186.4 mmol) de TREG	1.0 gramos (aprox 0.166 mmol) de PEGCOOH 6000.	25 mL (186.4 mmol) de TREG	1.0 g (0.166 mmol) de PEG	25 mL (186.4 mmol) de TREG	0.75 g (0.1245 mmol) de PEG	9.375mL (69.9 mmol) de TREG	0.5g (0.083 mmol) de PEG	12.5mL (93.2 mmol) de TREG	37.5 mL (139.8 mmol) de TREG	18.75 mL (139.8 mmol) de TREG
Temperatura primer calentamiento	180°C	200°C	180°C	200°C	180°C	200°C	180°C	200°C	180°C	180°C	180°C
Tiempo primer calentamiento	30min	30min	30min	30min	1h	1h	1h	1h	1h	1h	1h
Temperatura segundo calentamiento	280°C	260° C	280°C	260° C	280°C	260° C	280°C	260°C	280°C	280° C	280°C
Tiempo segundo calentamiento	30min	40 min	30min	40 min	1h	1.33h	1h	1.33h	1h	1h	1h
Respuesta Magnética	Si	si	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	No
Tamaño promedio	9nm	10nm	20nm	20nm	40nm	200nm	40nm			20nm	
Se les agrego recubrimiento adicional								0.25g de PEG 50nm y 400nm	6.25mL de TREG 25nm		25ml de TREG
											20nm

Caracterizaciones

Se realizaron diferentes caracterizaciones a los productos obtenidos para confirmar que se obtuvieron los resultados deseados.

Caracterización de nanopartículas magnéticas utilizando TEM

Para obtener imágenes que muestren el tamaño promedio de las nanopartículas y su morfología se realizaron las caracterizaciones de las muestras utilizando un microscopio electrónico de transmisión, las muestras se enviaron al Department of Chemistry, Texas Christian University para el estudio.

Las imágenes obtenidas muestran las nanopartículas con un tamaño y morfología cercanos a lo esperado con la síntesis realizada.

En la siguiente imagen (Fig. 28) se muestran las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con trietilenglicol etiquetada como E1 con escalas de 100, 50, 20 y 10 nanómetros, en las que podemos apreciar que la morfología de la muestra es mayoritariamente esférica, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura para sistemas similares.

En la imagen también se puede apreciar que la muestra presenta buena dispersión y solo se observan algunas aglomeraciones. Se observa un fenómeno donde las nanopartículas se unen formando cadenas, además, con la escala de 20nm se pueden observar partículas con tamaños menores a los 15 nanómetros.

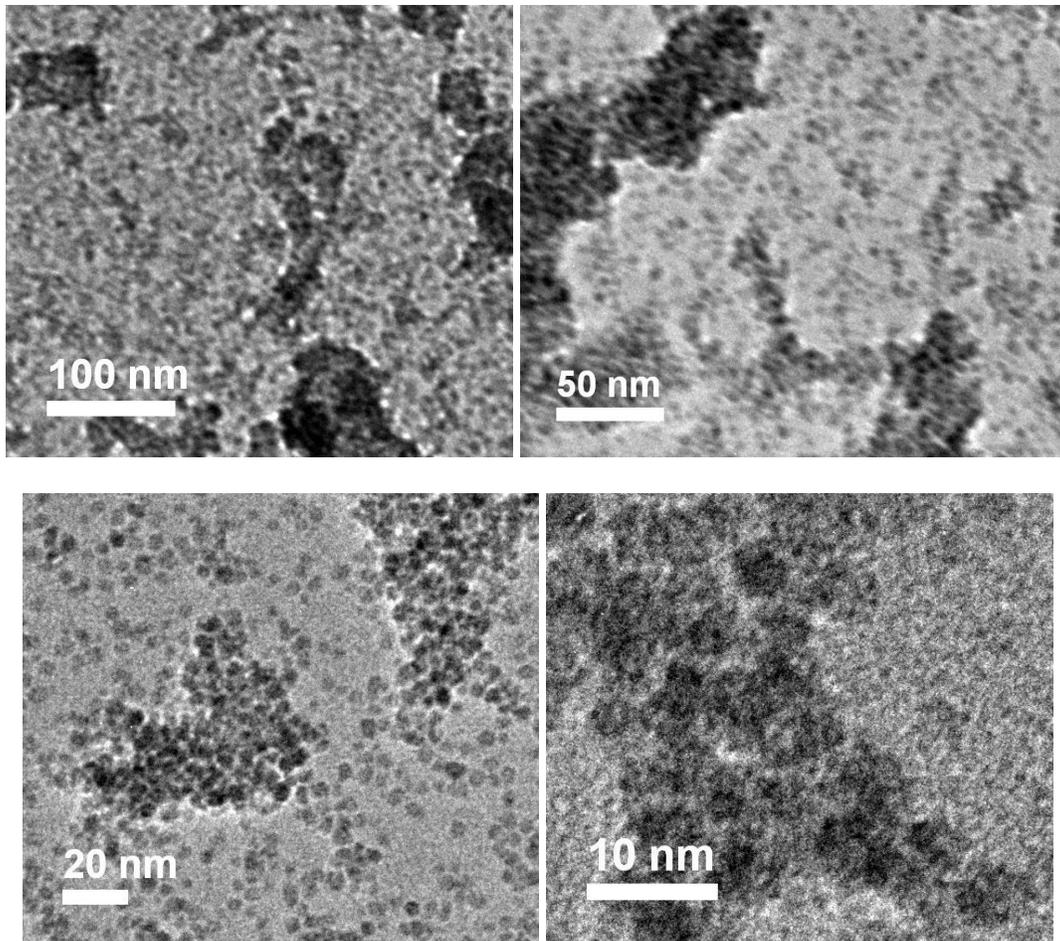


Fig. 28. Micrografía de la muestra E1 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con TREG, con una escala de 100, 50, 20, 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica

En la siguiente imagen (Fig. 29) se muestran las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PEG etiquetada como E2 con una escala de 50, 20 y 10 nanómetros, en las que podemos apreciar que la morfología de la muestra es mayoritariamente esférica, como en la literatura.

En la imagen también se puede apreciar que la muestra presenta buena dispersión y solo se observan algunas aglomeraciones. Se observa poca cantidad de óxido de hierro, además, con la escala de 20nm se pueden observar partículas con tamaños menores a los 15 nanómetros.

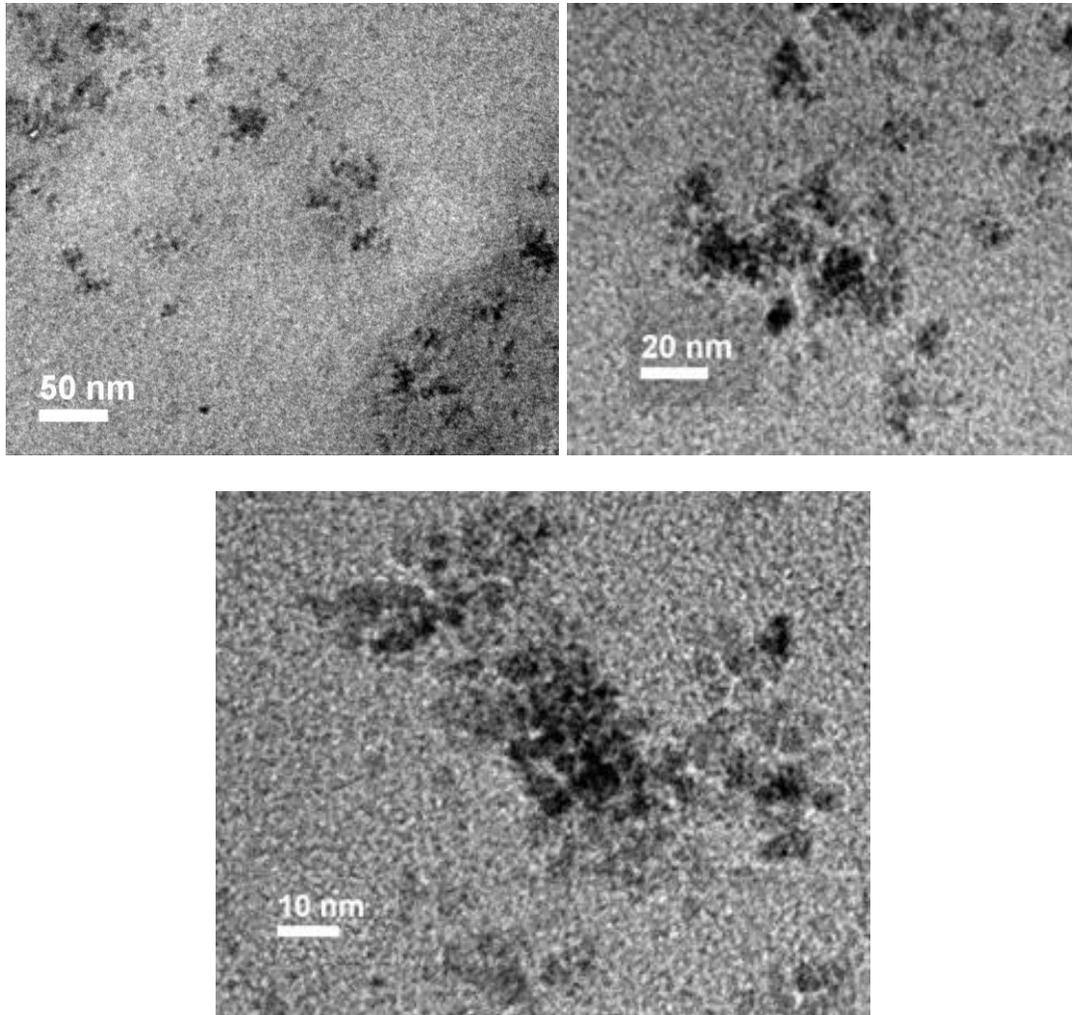


Fig. 29. Micrografía de la muestra E2 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEG, con una escala de 50, 20 y 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica

En la siguiente imagen (Fig. 30) se muestran las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con trietilenglicol etiquetada con E3 con una escala de 100, 20, 10 y 2 nanómetros, en las que podemos apreciar que la morfología de la muestra es mayoritariamente esférica.

En la imagen también se puede apreciar que la muestra presenta buena dispersión y solo se observan algunas aglomeraciones. Se observa también el fenómeno más claro donde las nanopartículas se unen formando cadenas, además, en la escala de 20nm se pueden observar

partículas con tamaños menores a los 15 nanómetros. En la micrografía de escala de 2 nanómetros muestra algo que en las micrografías analizadas anteriormente no se puede apreciar tan fácilmente, los planos cristalográficos de las nanopartículas.

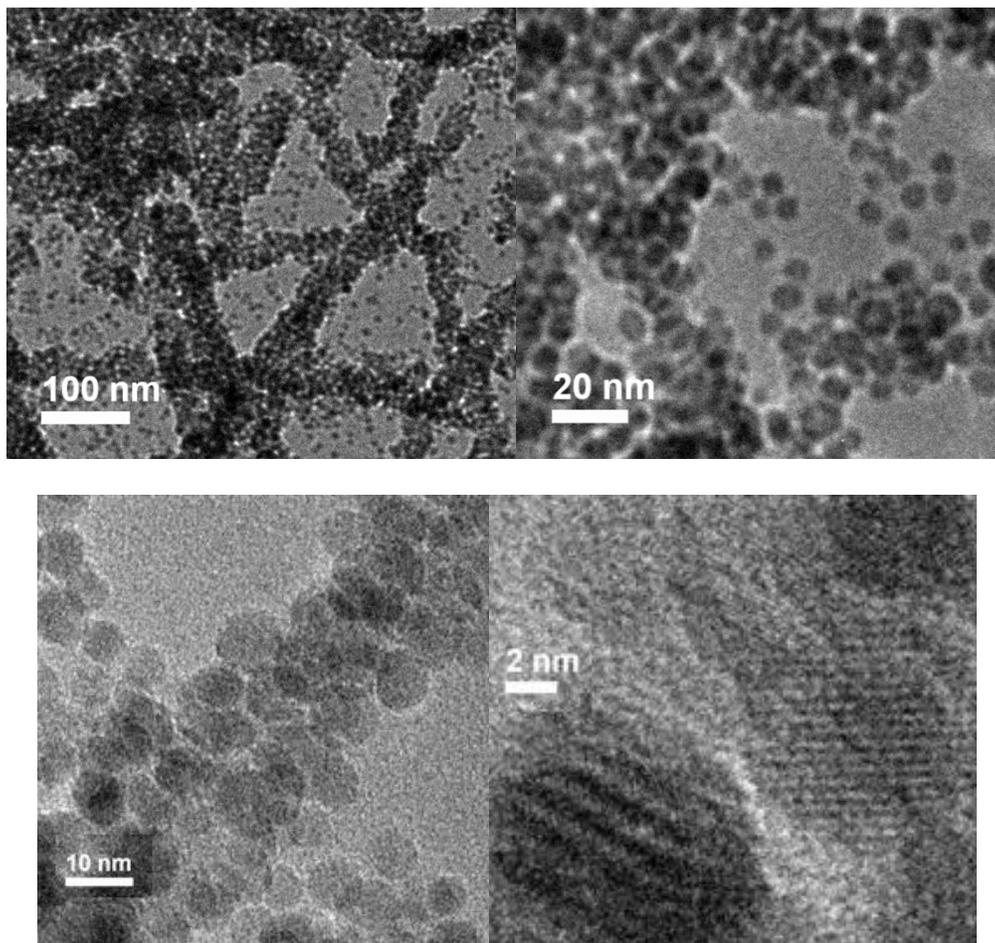


Fig. 30. Micrografía de la muestra E3 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con TREG, con una escala de 100, 20, 10 y 2 nm donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica, En la escala de 2 nanómetros muestra algo que en las micrografías analizadas anteriormente no se puede apreciar tan fácilmente, los planos cristalográficos de las nanopartículas.

En la siguiente imagen (Figura 31) se muestran las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con PEG y etiquetada como E4 con una escala de 100, 50, 20 y 10 nanómetros, en las que podemos apreciar que la morfología de la muestra es mayoritariamente esférica.

Con la imagen también se puede apreciar que la muestra presenta buena dispersión y solo se observan algunas aglomeraciones. Se observa poca cantidad de óxido de hierro, además, con la escala de 20 nm se pueden observar partículas con tamaños menores a los 15 nm.

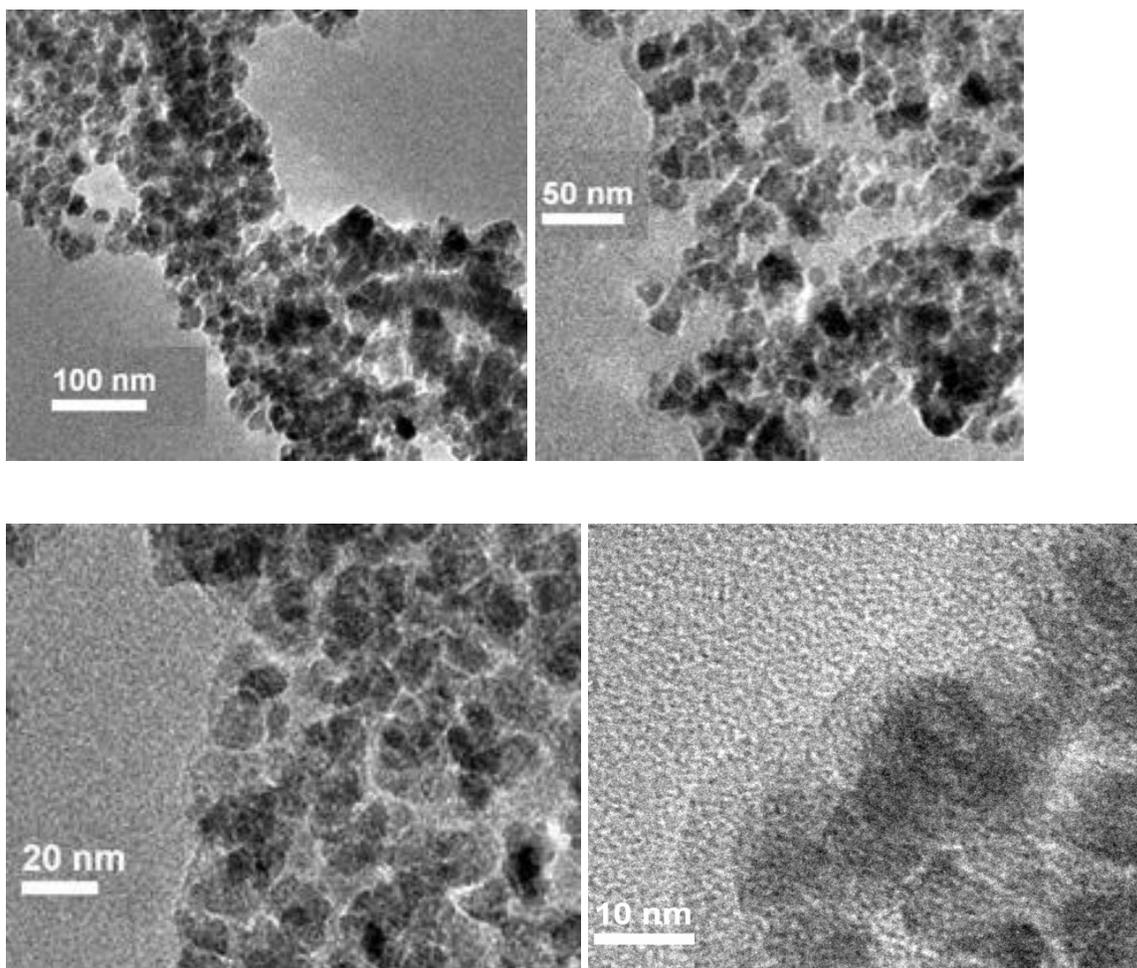


Fig. 31. Micrografía de la muestra E4 TEM de la síntesis de nanopartículas funcionalizadas con PEG, con una escala de 100, 50, 20, 10 nm, donde se pueden observar aglomeraciones de nanopartículas, y la morfología predominantemente esférica

Caracterización de nanopartículas magnéticas con DLS

La última caracterización que se llevó a cabo de las nanopartículas magnéticas fue realizada con DLS (dispersión de luz dinámica) la cual nos dió información sobre el tamaño y distribución de las nanopartículas en solución. A pesar de que esperaríamos observar resultados similares a los obtenidos con el TEM, los datos pueden variar por el hecho de que

la técnica de DLS mide el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, el cual se verá afectado por las moléculas de los polioles que se encuentran en la superficie de las nanopartículas, así como la esfera de solvatación generada por las interacciones entre el disolvente y las nanopartículas.

Para la realización de las caracterizaciones se prepararon suspensiones coloidales con nanopartículas funcionalizadas con TREG y PEG en agua. Se consideró un índice de refracción de 2.42 para la magnetita. En el caso de la muestra funcionalizada con TREG el índice de refracción del medio (agua) es de 1.33, mientras que la viscosidad del disolvente se estableció con un valor de 0.797. Las muestras de nanopartícula recubiertas con TREG o PEG se prepararon con una concentración 1 mg/10 ml de agua a una temperatura promedio de 21°C.

Los datos de la muestra E1 funcionalizada con TREG en el tiempo 0 (figura 32) muestran un tamaño de partículas promedio de 20 nm, con una distribución en un rango de 1 a 100 nm. Esta distribución de tamaños, si se comparan con el obtenido de las caracterizaciones hechas con TEM, nos muestra que la muestra presenta un cierto grado de aglomeración, la cual hace ver una fracción con tamaños mayores a los obtenidos en otras pruebas de caracterización.

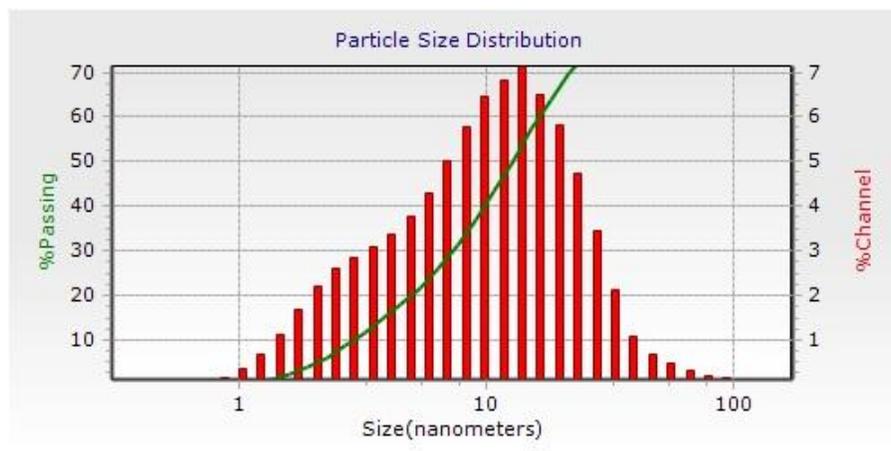


Fig. 32. Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E1 funcionalizada con TREG.

Los datos de la muestra E2 funcionalizada con PEG en el tiempo 0 (Fig. 33) muestran un tamaño de partículas promedio de 20 nm, en un rango de 1 a 100 nm. Al igual que en el caso anterior, al comparar con los valores de tamaño promedio determinados con TEM se puede suponer que la muestra presenta aglomerados, los cuales hacen ver una fracción de la muestra con tamaños mayores a los obtenidos en otras pruebas de caracterización.

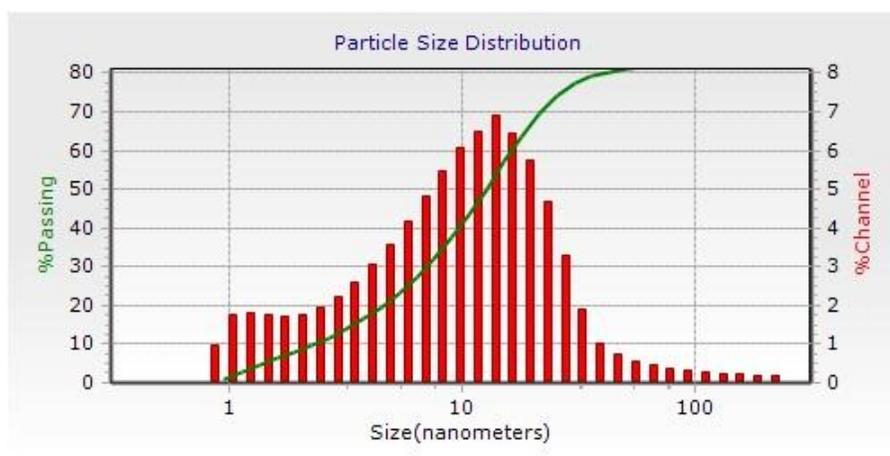


Fig. 33 Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E2 funcionalizada con PEG

Los datos de la muestra E3 funcionalizada con TREG en el tiempo 0 (Fig. 34) muestran un tamaño de partículas promedio de 40 nm, en un rango de distribución de 1 a 120 nm. Nuevamente, la comparación con los datos obtenidos por TEM nos permite suponer que la muestra presenta aglomerados, los cuales hacen ver una fracción de la muestra con tamaños mayores a los obtenidos en otras pruebas de caracterización.

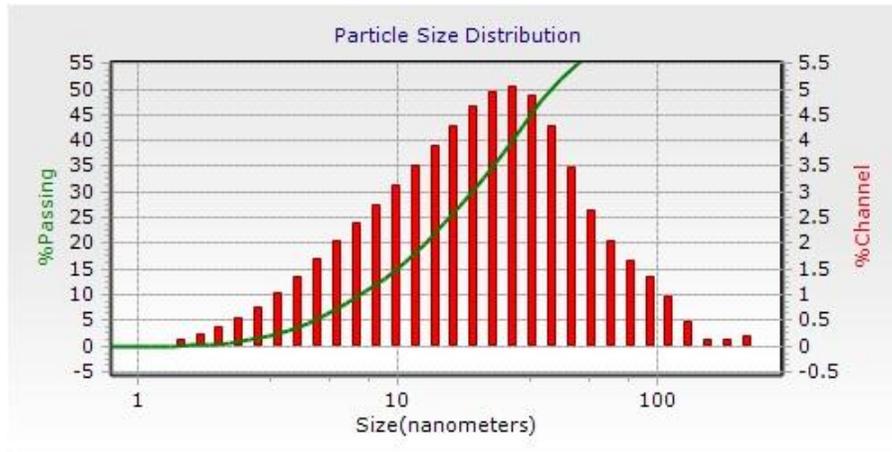


Fig. 34. Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E3 funcionalizada con TREG

Los datos de la muestra E4 funcionalizada con PEG en el tiempo 0 (figura 35) muestran un tamaño de partículas promedio de 200 nm, en un rango de 1 a 250 nm. Al no ser los tamaños esperados si se comparan con las caracterizaciones hechas con TEM se puede suponer que la muestra presenta un mayor grado de aglomeración, los cuales hacen ver distribuciones con tamaños mayores a los obtenidos en otras pruebas de caracterización.

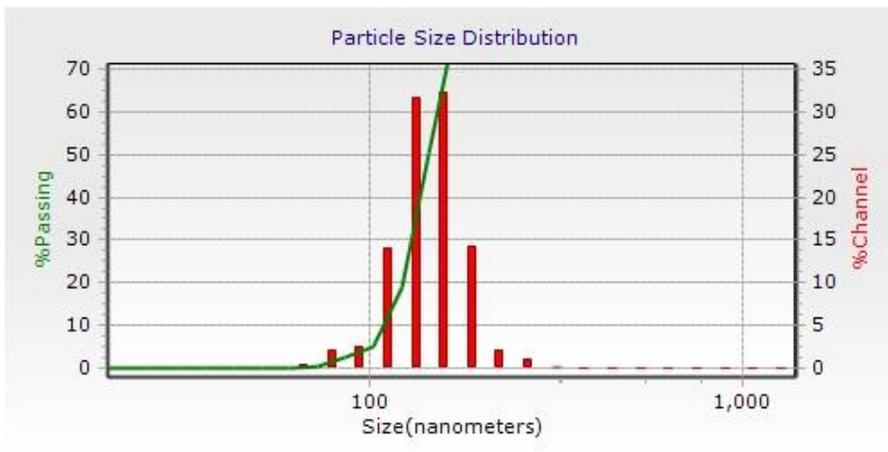


Fig. 35 Distribución de tamaño de nanopartículas de la muestra E4 funcionalizada con PEG

Evaluación de nanopartículas magnéticas como agentes de contraste en imágenes de resonancia magnética nuclear

La tabla 4 presenta los resultados de las concentraciones de hierro que se encontraron en las muestras, al hacer una digestión acida descrita en la sección de métodos.

Tabla 4. Calculo de la cantidad de fierro en las muestras preparadas

Muestra	Masa Original (PEG/TRG)	longitud de onda (nm)	Absorbancia	ppm de la curva de calibración	Masa de Fe en las muestras (mg)	% de masa en la muestras	Masa de PEG/TREG
E1	10mg	508	0.119	0.551	1.3769	13.7694	8.6231
E2	10mg	508	0.079	0.344	0.8588	8.5881	9.1412
E3	10mg	508	0.31	1.540	3.8510	38.5104	6.1490
E4	10mg	508	0.136	0.639	1.5972	15.9715	8.4028
E5	10mg	508	0.236	1.157	2.8925	28.9249	7.1075
E8	10mg	508	0.28	1.385	3.4624	34.6244	6.5376

Para la toma de imágenes se diseñó y construyó un maniquí (*phantoma*) (Fig. 36) en el que se le introdujeron con 12 tubos falcón, conteniendo diferentes concentraciones de hierro, como se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de Hierro que tiene los tubos falcón

Muestra	Recubrimiento	Tamaño promedio (nm)	Masa muestra (μg)	Agua y gel de agar al 0.15% (ml)	Concentración total ($\mu\text{g/ml}$)	Masa de Fe (mg)	Concretración de Fe (mg/ml)
E11	TREG	20	1800	12	150	0.24795	0.0207
E12	TREG	20	1200	15	80	0.1653	0.0110
E13	TREG	20	500	12	42	0.068875	0.0057
E21	PEG	20	2000	12	167	0.17176	0.0143
E22	PEG	20	900	12	75	0.077292	0.0064
E23	PEG	20	600	12	50	0.051528	0.0043
E31	TREG	40	2000	12	167	0.7702	0.0642
E32	TREG	40	1000	12	83	0.3851	0.0321
E33	TREG	40	700	12	58	0.26957	0.0225
E41	PEG	200	2100	12	175	0.335412	0.0280
E42	PEG	200	1000	12	83	0.15972	0.0133
E43	PEG	200	700	12	58	0.111804	0.0093
E51	TREG	40	2100	12	175	0.607425	0.0506
E52	TREG	40	800	12	67	0.1102	0.0092
blanco				12		0	

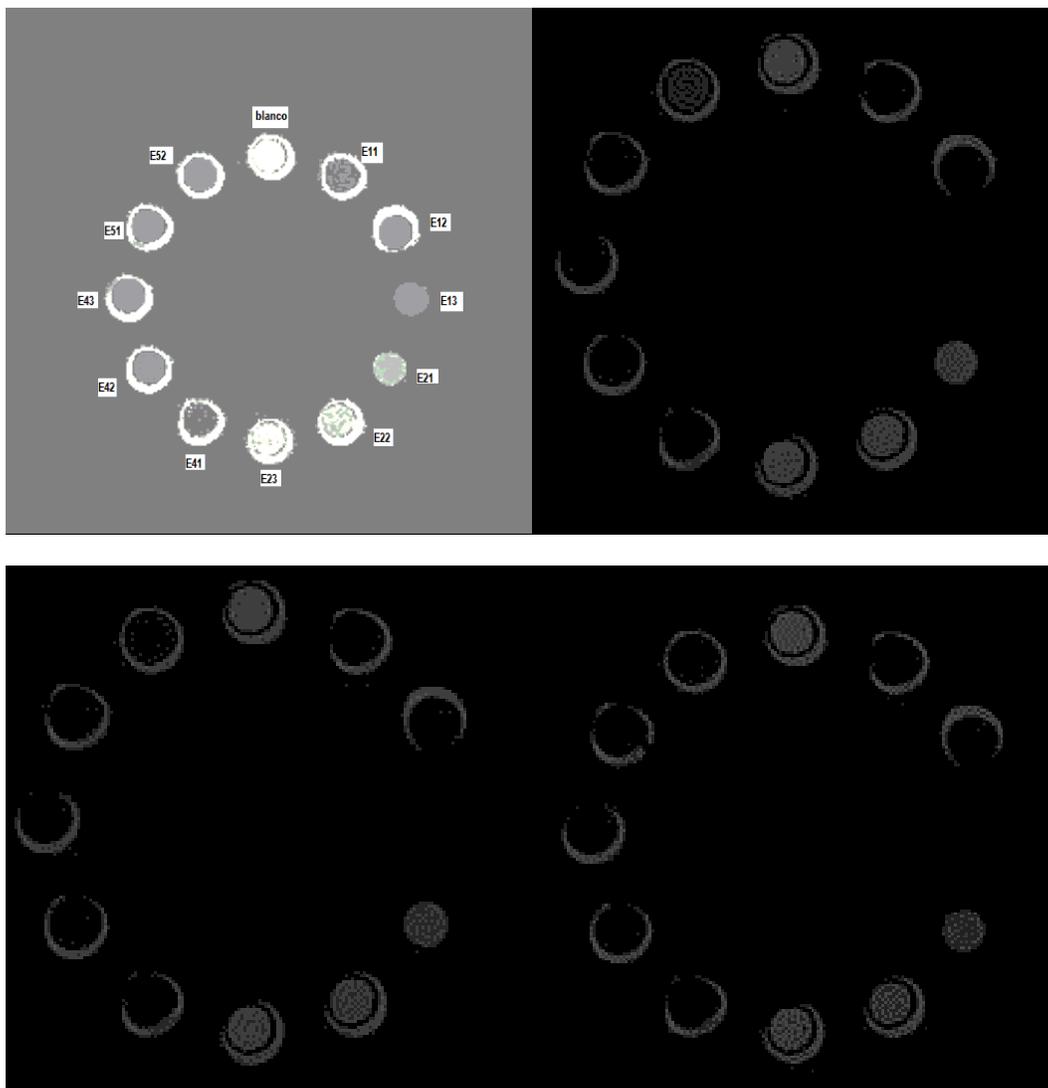
Las imágenes de resonancia magnética de dicho maniquí se obtuvieron en un equipo de IRM de 1.5 T (Philips- Intera-Achieva, Philips Healthcare, Best, Netherlands disponible el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, en la ciudad de México (Fig. 36).



Fig. 36. Maniquí y equipo Philips de 1.5 T

Toma de imágenes

Las imágenes se tomaron en modo 2D con una secuencia de campo de eco rápido mFFE (Fast Field Echo por sus siglas en ingles) que es una variante del gradiente eco. La amplitud del gradiente máximo fue de 80mT/m, velocidad de respuesta de 120mT/m/ms, con una bobina de cabeza SENSE de 8 canales, TR/TE=230/46ms, grosor de corte de 5mm y NEX=2, ángulo flip=18 y con tiempos ecos de TE=0 ms, 20 ms, 40 ms, 60 ms, 80 ms y 100 ms en la misma posición anatómica (Fig. 37).



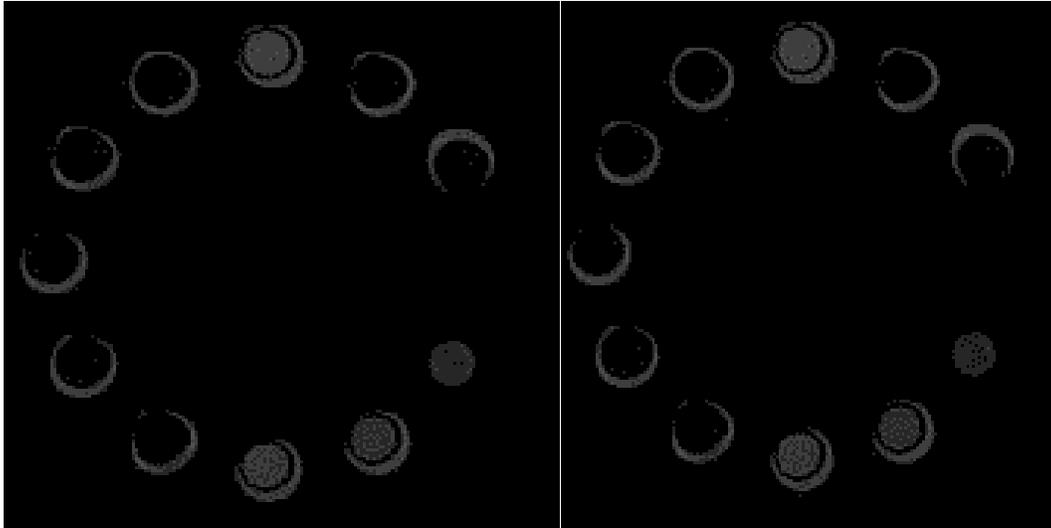


Fig. 37. Muestra un corte a los tiempo eco TE=0ms, 20 ms, 40 ms, 60 ms, 80 ms y 100 ms.

Análisis del decaimiento monoexponencial

Para calcular la relaxometría a las imágenes obtenidas, se empleó un algoritmo en Matlab, donde en primer lugar se calcula el decaimiento de la intensidad de señal S y se ajusta a una curva monoexponencial $S(TE)=S(0)e^{-R_2 \cdot TE}$ [17], [18]. Algunos estudios *in vivo* [14], [15], así como *in vitro* [16] han demostrado que existe un alto grado de correlación entre la concentración de hierro en tejido y la tasa $R_2=1/T_2$. El procedimiento se describe a continuación:

- a) A cada imagen con un TE específico, se midió la intensidad de señal promedio dada por el nivel de gris de cada muestra, usando un ROI de 7.19×1.8 mm en el software ImageJ.
- b) Se realizó un algoritmo en Matlab para ajustar los datos a una curva monoexponencial descrita anteriormente obteniendo el valor de R_2 para cada muestra, finalmente se obtiene T_2 .

En la figura 38 se puede ver el decaimiento de la intensidad de señal en la muestra E1 para diferentes concentraciones recubiertas con TREG, tomando el mismo ROI de tamaño 7.19 x 1.8 mm, obteniendo los siguientes tiempos de relajación: para E11 de $T_2=50.4913\text{ms}$, para E12 de $T_2=26.0124\text{ms}$, para E13 de $T_2=23.8915\text{ms}$.

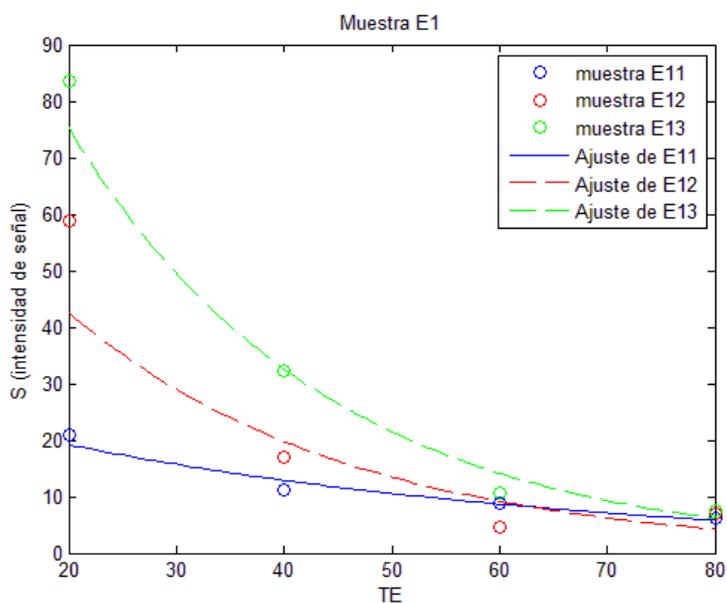


Fig. 38. Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E1 para diferentes concentraciones.

La figura 39 indica que si la concentración de la muestra E1 aumenta, también aumenta el tiempo de relajación.

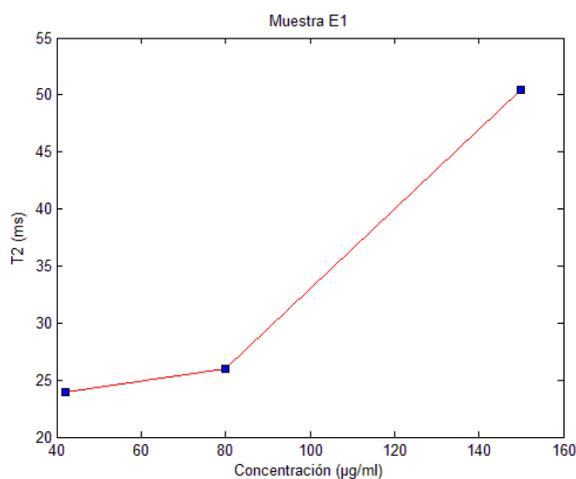


Fig. 39. Aumento de la constante T_2 de la muestra E1 en función de la concentración.

En la figura 40 se ve el decaimiento de la intensidad de señal en la muestra E2 para diferentes concentraciones recubierta con PEG, obteniendo los siguientes tiempos de relajación: para E21 es $T_2=93.9156\text{ms}$, para E22 es $T_2=73.6148\text{ms}$, para E23 de $T_2=45.0893\text{ms}$.

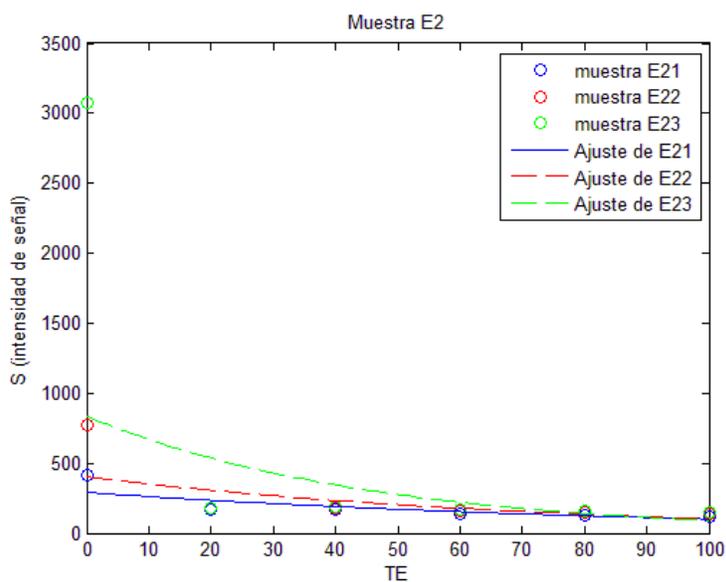


Fig. 40. Decaimiento de la intensidad señal de la muestra E2 para diferentes concentraciones.

La figura 41 indica que si la concentración de la muestra E2 aumenta, también aumenta el tiempo de relajación.

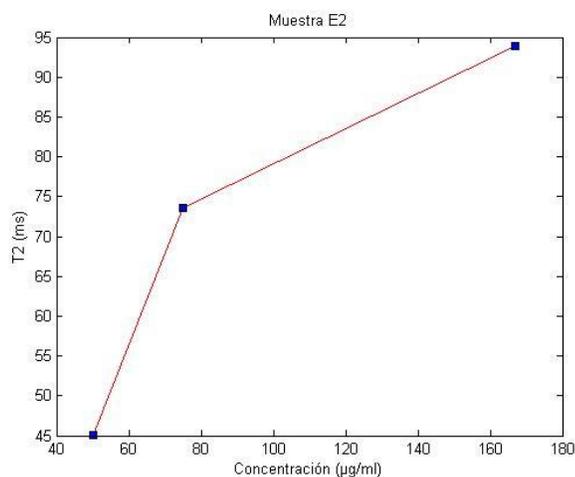


Fig. 41. Aumento de la constante T_2 de la muestra E2 en función de la concentración

En la figura 42 se ve el decaimiento de la intensidad de señal en la muestra E3 para diferentes concentraciones recubierta con TREG, obteniendo los siguientes tiempos de relajación: para E32 es $T_2=123.1659\text{ms}$, para E33 de $T_2=52.0564\text{ms}$.

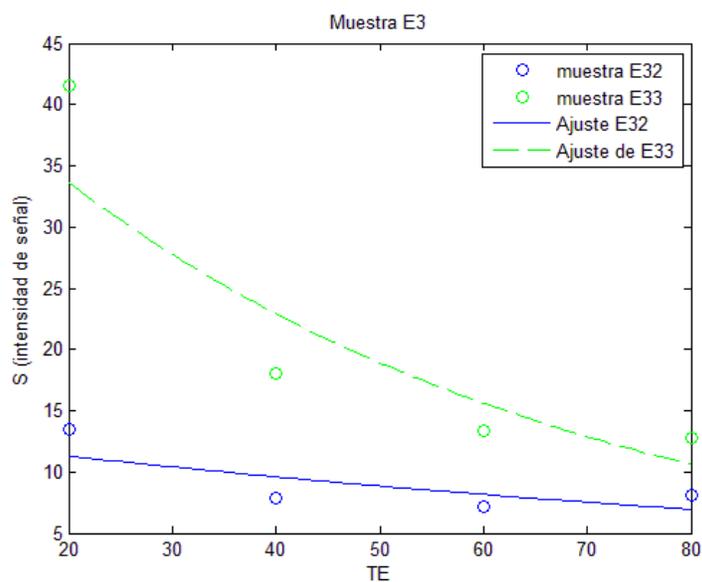


Fig. 42. Decaimiento de señal de la muestra E3 para diferentes concentraciones.

La figura 43 indica que si la concentración de la muestra E3 aumenta, también aumenta el tiempo de relajación.

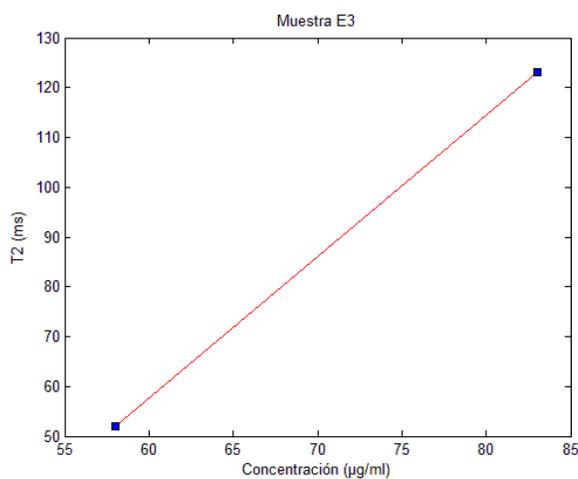


Fig. 43. Aumento de la constante T_2 de la muestra E3 en función de la concentración.

En la figura 44 se ve el decaimiento de la intensidad de señal en la muestra E4 para diferentes concentraciones recubierta con PEG, obteniendo los siguientes tiempos de relajación: para E42 es $T_2=49.9117\text{ms}$, para E43 de $T_2=33.0592\text{ms}$.

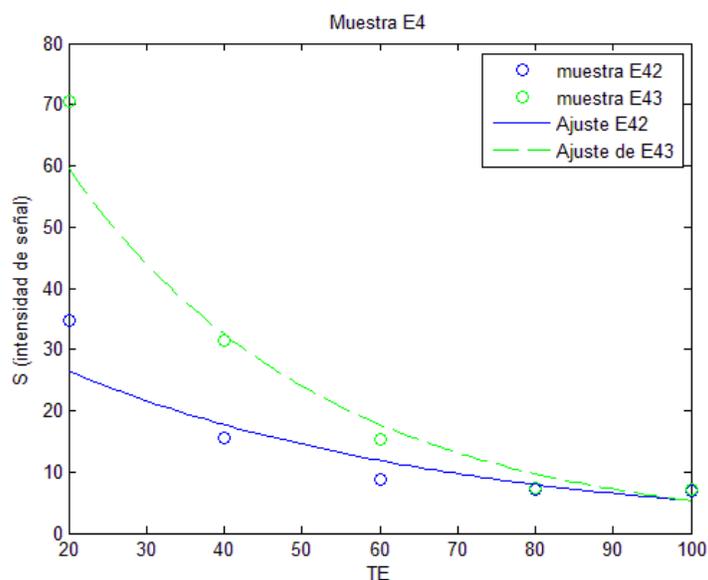


Fig. 44 Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E4 para diferentes concentraciones.

La figura 45 indica que si la concentración de la muestra E4 aumenta, también aumenta el tiempo de relajación.

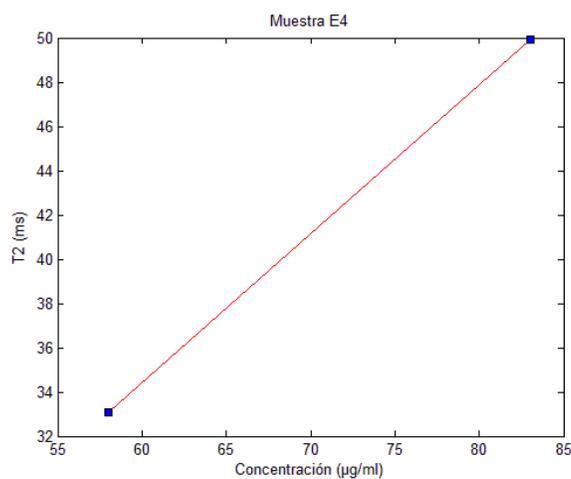


Fig. 45. Aumento de la constante T_2 de la muestra E4 en función de la concentración.

En la figura 46 se ve el decaimiento de la intensidad de señal en la muestra E5 para diferentes concentraciones recubierta con TREG, obteniendo los siguientes tiempos de relajación: para E51 es $T_2=46.5919\text{ms}$, para E52 de $T_2=39.9318\text{ms}$.

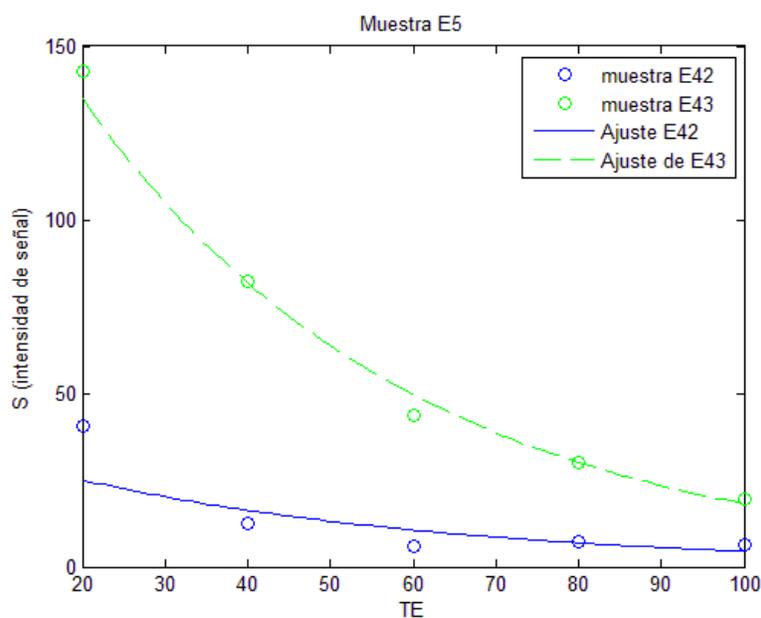


Fig. 46 Decaimiento de la intensidad de señal de la muestra E5 para diferentes concentraciones.

La figura 47 indica que si la concentración de la muestra E4 aumenta, también aumenta el tiempo de relajación.

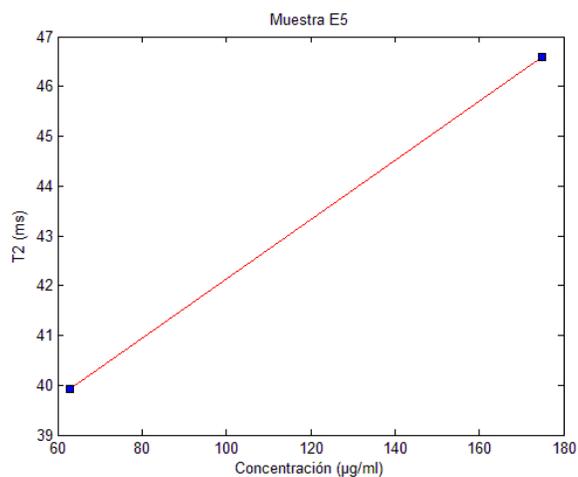


Fig. 47. Aumento de la constante T_2 de la muestra E5 en función de la concentración.

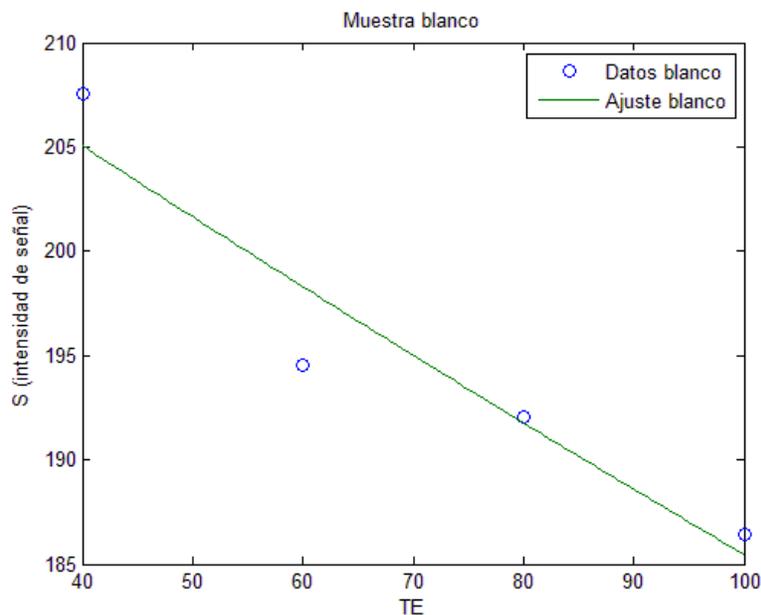


Fig. 48. Indica el decaimiento de señal de la muestra blanco obteniendo un $T_2=597.182\text{ms}$

En la siguiente tabla se hace un resumen de todos los tiempos de relajación de las diferentes muestras.

Tabla 6. *Tiempos de relajación de las diferentes muestras*

Muestra	Recubrimiento	Tamaño promedio (nm)	Concretración de Fe (mg/ml)	Tiempo de relajación (ms)
E11	TREG	20	0.0207	50.491
E12	TREG	20	0.0110	26.0124
E13	TREG	20	0.0057	23.8915
E21	PEG	20	0.0143	93.9156
E22	PEG	20	0.0064	73.6148
E23	PEG	20	0.0043	45.0893
E32	TREG	40	0.0321	123.1659
E33	TREG	40	0.0225	52.0564
E42	PEG	200	0.0133	49.9117
E43	PEG	200	0.0093	33.0592
E51	TREG	40	0.0506	46.5919
E52	TREG	40	0.0092	39.9318
blanco				597.182

La RM se considera que es altamente sensible (es decir, muestra condiciones patológicas fácilmente), pero no es muy específica (es decir, varias patologías diferentes tienen apariencias similares). Los agentes de contraste ayudan a mejorar la especificidad y en este trabajo la encontramos en nuestras SPIONs, además, de tener las concentraciones más bajas, para que cuando se aplique en pacientes se eviten problemas de toxicidad.

Capítulo 6 CONCLUSIONES

Se obtuvieron con éxito dos tipos de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) de tipo SPION, funcionalizadas superficialmente con polietilenglicol (PEG) y con trietilenglicol (TREG), las cuales presentan tamaños hidrodinámicos promedio en el rango entre *10 a 200 nm*, monodispersión, hidrosolubilidad y alta estabilidad en solución. Se exploraron las condiciones del proceso de preparación que permiten el control del tamaño de partícula en el producto obtenido, pudiendo de esta forma regularse la obtención de sistemas con propiedades deseables de acuerdo al tipo de aplicación necesaria.

Los resultados de la relaxometría muestran que los tiempos de relajación T_2 cambian con el tamaño y concentración de las SPIONs, predominando la tendencia de que si disminuye la concentración, el tiempo T_2 también lo hace.

Las concentraciones de hierro que se midieron en cada muestra en los tubos falcón para obtener las imágenes son mucho más bajas de $100\mu\text{g} / \text{ml}$, ya que la literatura científica reporta en un estudio realizado en células gliales normales, y en células de cáncer de mama que la toxicidad de las NPs de Fe_3O_4 recubiertas con un agente tensoactivo bipolar (tetrametilamonio-11-aminoundecanoato) se podía observar a partir de concentraciones mayores a $100\mu\text{g} / \text{ml}$ [7].

Analizando la relaxometría, el tamaño, el recubrimiento (TREG o PEG) y comparando el contraste en las imágenes tomadas de las muestras, se encontró que todas las muestras presentan respuesta a la diferencia de contraste, pero las muestras: E11 recubierta con TREG, con un tamaño hidrodinámico promedio de *20nm*, una concentración de hierro de $0.0207\text{mg} / \text{ml}$, un tiempo de relajación $T_2 = 50.491\text{ms}$; E42 recubierta con PEG, con un

tamaño hidrodinámico promedio de $200nm$, una concentración de hierro $0.0133mg / ml$ y un tiempo de relajación de $T_2 = 49.9117ms$; E52 recubierta con TREG, un tamaño hidrodinámico de $40 nm$, una concentración de hierro de $0.0092mg / ml$, un tiempo de relajación $T_2 = 39.9318ms$, son las que presentan mejor respuesta al cambio de contraste, es decir, son con las que podríamos ver una mejor diferencia de tejido en pacientes.

La literatura científica reporta que el tamaño promedio para que las SPIONs se internalicen en las células y puedan ocuparse para estudios enfocados a detectar cáncer en estadios tempranos están en el rango hidrodinámico de 20 a 50nm [28]. Por lo que concluimos que si nuestras SPIONs se quieren ocupar para el estudio antes mencionado, las muestras idóneas para aplicarlas a pacientes son E11 y la E52 recubiertas con TREG.

Este trabajo de investigación es la primera investigación realizada en nuestro país sobre el estudio de agentes de contraste magnético nanoestructurados, preparados en México y sentará las bases para poder continuar con el análisis de las SPIONs como potenciales medio de contraste para la formación de imágenes clínicas empleando los equipos de 1.5 o 3 T disponibles en hospitales de México.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Edelman, R. D., *et al.*, *MRI: Clinical Magnetic Resonance Imaging*. 2 ed.; W. B. Saunders Company: Philadelphia, Pennsylvania, 1996, pp. 1 150.
- [2]. Ferrari, M., *Nat Rev Cancer* (2005) **5**(3), 161.
- [3]. Wickline, S. A., *et al.*, *J Magn Reson Imaging* (2007) **25**(4), 667.
- [4]. Corot, C., *et al.*, *Invest Radiol* (2004) **39**(10), 619.
- [5]. Sun, C., *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev* (2008) **60**(11), 1 252.
- [6]. Sun, C. R., *et al.*, *Acs Nano* (2010) **4**(4), 2 402.
- [7]. Weissleder, R., *et al.*, *Am J Roentgenol* (1989) **152**(1), 167.
- [8]. Wang, Y.-X., *et al.*, *Eur Radiol* (2001) **11**(11), 2 319.
- [9]. Bonnemain, B., *J Drug Target* (1998) **6**(3), 167.
- [10]. Harisinghani, M. G., *et al.*, *New Engl J Med* (2003) **348**(25), 2 491.
- [11]. Veiseh, O., *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev* (2010) **62**(3), 284
- [12]. Zachary R., *et al.*, *Mat Today* (2011) **14**(7), 330.
- [13]. René Alfredo Bourlon Cuellar, *et al.*, (2009) **25**(3), 210.
- [14]. Neenu Singh, *et al.*, *Nano Rev* (2010), **1** (5358), 3402
- [15] <http://www.observatorynano.eu/project/document/2219/2/7m0n6/>
- [16] Wei Cai, J. W. *Journal of Colloid and Interface Science* (2007) **305**, 366-370.
- [17] Zhen, L. *Adv Mater* (2005) **17**, 1001-1005.
- [18] Fishman, A. *Synth Comm* (2004) **34**, 2309-2312.
- [19] Xianqiao, L *J Mag Mag Mater.* (2004) **270**, 1-6.
- [20] Bloch F., *Phys Rev* (1946) **70**(7-8), 460-474.
- [21] Bloembergen N., *et al.* *Phys Rev* (1948) **73**, 679-712.
- [22]. Wang, Y.-X., *et al.*, *Eur Radiol* (2001) **11**(11), 2 319.
- [23]. Bonnemain, B., *J Drug Target* (1998) **6**(3), 167.

- [24]. Harisinghani, M. G., *et al.*, *New Engl J Med* (2003) **348**(25), 2 491.
- [25] Robin A. de Graaf, *In Vivo NMR Spectroscopy*, 2nd edition, John Wiley & Sons, (2007)
- [26] Indira, T. *A Review* (2010) **3**, 1035-1042.
- [27] Donald W. McRobbie, *MRI From Picture to Proton*, 2nd edition, Cambridge University Press, (2006)
- [28] P. Mowat, *et al.*, *NMR Biomed* (2007) **20**, 21–27.

Relaxometry of PEG and TREG coated iron oxide nanoparticles as contrast agents in magnetic resonance imaging

Eric Gutiérrez García¹, Silvia Hidalgo Tobon^{2,3,a} Ciro López Vasquez⁴, Roberto Gonzalez-Rodriguez⁵, Jeffery L. Coffey⁵, Pilar Dies-Suarez³, Manuel Obregón³, Porfirio Ibanez³ and M. A. Méndez-Rojas^{3,b}

¹Universidad Autónoma del Estado de México, Instituto Literario # 100. Col., Centro
C.P.: 50000 Toluca, México

²Universidad Autónoma Metropolitana, Avenida San Rafael Atlixco 186 Iztapalapa, México City, México ³Hospital Infantil de Mexico “Federico Gomez”, Mexico City, México.

⁴Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de las Américas de Puebla, Sta. Catarina Mártir s/n, 72810 San Andrés Cholula, Puebla, México

⁵Department of Chemistry, Texas Christian University, Box 298860, Fort Worth, TX 76129

^ashid@xanum.uam.mx, ^bmiguela.mendez@udlap.mx

Keywords: Magnetic, nanoparticles, MRI, relaxometry, nanomedicine.

Abstract.

In several countries (including Mexico) there are no commercial sources of magnetic nanoparticles with the required properties for being used as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). Triethyleneglycol (TREG) and polyethyleneglycol (PEG) coated monodispersed superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) with controlled sizes were prepared by thermal decomposition of iron inorganic precursors using high boiling point solvents (polyol technique) [1, 2]. In order to determine their utility as MRI agents, a *phantom* containing a set of two types of SPIONs (PEG and TREG coated) in Agar gel was prepared and characterized at 1.5 T. To calculate the relaxometry of the obtained images, an algorithm in Matlab was developed which first calculates the decay of signal intensity S and fits it into a monoexponential curve $S(TE)=S(0)e^{-R2.TE}$. The magnitude of the *spin-echo* signal can be used for precise measurement of T_2 relaxation time (time of disappearance of the transverse magnetization after a disturbance) or the rate $R2 = 1/T_2$. Some studies *in vivo* [3, 4] and *in vitro* [5] have demonstrated a high level of correlation between iron concentration in tissue and $R2$. The results show that T_2 relaxation times change with the size and concentration of SPIONs, indicating that the T_2 time decreases changes proportionally to the concentration. The study will

provide the basis to utilize the SPIONs as magnetic contrast agents in clinical image formation using the 1.5T or 3 T facilities available at hospitals in Mexico.

Keywords: Fe₃O₄ NPs, MRI, polyol, relaxometry

Introduction

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) are of interest due to their great potential applications in diverse fields such as biomedicine, bioseparation, biotechnology, and catalysis [Roca AG, Costo R, Rebolledo AF, Veintemillas-Verdaguer S, Tartaj P, Gonzalez-Carreño T, Morales MP, Serna CJ, *J Phys D: Appl Phys* Vol. **42** (2009)224002 (11p); Zhang DH, Li GD, Li JX, Chen JS, *Chem Comm* (2008), p. 3414-3416]. Monodisperse and size-controllable magnetic nanoparticles may be prepared by several techniques, such as thermal decomposition or iron precursors in high boiling solvents (polyol synthesis), co-precipitation or reverse microemulsion, solvothermal reduction, or laser and spray pyrolysis [Wei Cai, J. W. *Journal of Colloid and Interface Science* Vol. 305 (2007), p. 366-370; Zhen, Li. *Advanced Materials* Vol. **17** (2005), p. 1001-1005; Hou Y, Yu J, Gao S, *J Mater Chem* Vol. **13** (2003), p. 1983-1987; Gao J, Gu H, Xu B, *Acc Chem Res* Vol. **42** (2009), p. 1097-1107]. Nanostructured iron oxide may become superparamagnetic when size is under 20 nm. This characteristic is important as they don't stay magnetized after removal of the magnetic field, avoiding undesirable aggregation after exposure to an external magnetic field [Berry CC, Curtis ASG, *J Phys D: Appl Phys* Vol. **36** (2003), p. R198-R206].

The polyol method has been widely used for the preparation of monodispersed, narrow size, inorganic nanoparticles (metallic or metal oxides), with high crystallinity, mostly spherical, although several other shapes can also be obtained [Feldmann, C. 2003, *Adv. Funct. Mater.* 13, 101; Feldmann, C. Jungk H-O. 2001, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 359; Sun, Y., Mater, B.; Herricks, T., Xia, Y. 2003, *Nano Lett.* 3, 955]. In the case of nanomagnetite, Fe₃O₄, it has been found that fine tuning of the magnetic properties can be achieved by controlling the size using this method, from superparamagnetism to ferromagnetism [Caruntu, D.; Caruntu, G.; O'Connor, C. J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2007, 40, 5801-5809]. Controlling the kinetics of precipitation, it can also be possible to obtain nanoparticles with well-defined size and shape, which exhibit no agglomeration [Indira, T. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology* Vol, 3 (2010), p. 1035-1042].

Another advantage is that the polyol-coated magnetic nanoparticles obtained in this one-step procedure are highly soluble in aqueous solvents and biocompatible, in contrast to the products obtained by other techniques which will require of further steps for surface functionalization and biocompatibilization. Furthermore, magnetic nanoparticles with sizes under 30 nm in diameter (USPIONS, ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles) have longer blood circulation times, avoid clearance by the reticuloendothelial system (RES) and may be able to reach other tissues aside liver [Weissleder, R.; Elizondo, G.; Wittenberg, J.; Rabito, C.A.; Bengele, H. H.; Josephson, L. *Radiology*, 1990, 175, 489-493; Bourrinet, P.; Bengele, H. H.; Bonnemain, B.; Dencausse, A.; Idee, J. M.; Jacobs, P. M.; Lewis, J. M. *Invest. Radiol.*, 2006, 41, 313-324; Lind, K.; Kresse, M.; Debus, N. P.; Muller, R. H. *J. Drug Target*. 2002, 10, 221-230; Kresse, M.; Wagner, S.; Pfefferer, D.; Lawaczek, R.; Elste, V.; Semmler, W. *Magn. Res. Med.*, 1998, 40, 236-242].

Magnetic resonance imaging (MRI) is a noninvasive technique for diagnostic, very attractive for early cancer diagnostics and therapeutics. However, it has limitations such as poor differentiation between altered and healthy tissues with similar composition, and low spatial resolution (0.4 x 0.4 x 4 mm³) [Nguyen BT, Vemula PK, Mitsouras D, Yu P, Tao M, Campagna C, Mulkern RV, Rybicki FJ, Karp JM, Ozaki CK]. Different contrast agents and formulations have been studied during the last years, however some of them may present issues with respect the speed of elimination in tissue, non-specific distribution *in vivo*, poor contrast enhancement or limited improving of the MR imaging.

At SPIONs it calculates its T_2 relaxometry to evaluate the properties of shape, size and concentration needed to be used in the clinic as a contrast medium in the formation of magnetic resonance imaging. The clinical images are taken on Mexico Children's Hospital with a Philips 1.5 Tesla.

Materials and Methods

All reagents were purchased from commercial sources (Aldrich) and used as received. Iron (III) acetylacetonate, [Fe(acac)₃], was used as the iron oxide precursor and thermally decomposed at high temperatures in both triethyleneglycol (TREG) and polyethyleneglycol 6000 (PEG₆₀₀₀). The main function of the polyol in the synthesis is the reduction of the metal salt to metal particles, however, also serve as the solvent with high boiling and as a stabilizer for controlling the growth of nanoparticles preventing aggregation of these. Nanosized magnetite particles were prepared by an

adaptation of the method proposed by Wei Cai et al, without the use of an inert atmosphere and obtaining nanoparticles with average sizes about 9 nm [Wei Cai, J. W. *Journal of Colloid and Interface Science* Vol. 305 (2007), p. 366-370].

Preparation of TREG coated Fe₃O₄ nanoparticles: In a typical synthesis, 25 ml (186.4 mmol) of TREG and 1.412 g (4 mmol) of [Fe(acac)₃] were mixed into a 100 ml round bottom flask equipped with a condenser, magnetic stirrer, heating nest, rheostat, thermocouple, and heated until the temperature reached 180°C. The temperature was hold there for 30 min until the solution start becoming darker. Then, the temperature was increased rapidly to 280°C for a second heating stage, during 30 min; after this time, the solution was completely black and positively responds to an external magnetic field. The reaction mixture was slowly cooled down to room temperature, and the product was washed 3 times with a mixture of 40 ml of ethyl acetate and 10 ml of ethanol. Magnetic precipitation of the product was induced with a permanent Nd magnet during a time lapse of 5 days, and the solid recovered by decantation. The final product, a black, magnetic powder (Fe₃O₄ nanoparticles) was dried at room temperature under vacuum and stored in a freezer (4°C).

Preparation of PEG₆₀₀₀ coated Fe₃O₄ nanoparticles: This synthesis was performed following an adaptation to the method reported by Zhen [Zhen, Li. *Advanced Materials* Vol. **17** (2005), p. 1001-1005]. First, the carboxylation of PEG₆₀₀₀, was achieved by an adaptation to the method proposed by Fishman for the oxidative carboxylation of PEG₃₄₀₀ [Fishman, A. *Synthetic Communications* Vol. **34** (2004), p. 2309-2312]. Once PEG₆₀₀₀ was available, 0.8 g (2.264 mmol) of [Fe(acac)₃] and 1.0 g (0.166 mmol) of it were mixed in a 100 ml round bottom flask, as previously described. The mixture was heated until it reached 200°C and then kept at that temperature for 30 min. After this time, the temperature was rapidly raised to 260°C and holded for 40 min. After this time, the reddish solution changed to black. The black suspension was cooled down to room temperature, and the solid product was solubilized in a mixutre 5:3 of ether/acetone (70 ml). After evaporation of the solvent, the product was washed 4 times with a 3:3 ether/acetone solution to remove impurities and starting materials and finally, magnetically precipitated, decantated, dried at room temperature and stored a 4°C. The dried product is a black powder with intense magnetic response and good solubility both in water and ethanol.

Physical characterization of nanoparticles. Transmission electron microscope (TEM) images were taken on a JEOL J-2100 electron microscope at an acceleration voltage of 200 kV. TEM samples were prepared by placing one drop of a dilute suspension of magnetite nanoparticles in water on a carbon-coated copper grid and allowing the solvent to evaporate at room temperature. The average particle size (D_{TEM}) and distribution were evaluated by measuring the largest internal dimension of 100 particles. Powder X-ray diffraction (XRD) measurements were performed on a Bruker-AXS D5000 diffractometer on grinded powders in a quartz sample holder using the Cu $K_{\alpha 1}$ line source ($\lambda = 1.54018 \text{ \AA}$) in 2θ mode (measuring interval: 10 to 80°); step scan = 0.02; step time = 0.6 seg. The hydrodynamic particle size and particle size distribution were determined *via* dynamic light scattering using a Nanotrak Wave (Nanotrak) instrument. Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded as grinded solids on a Varian-Scimitar FTIR-800 spectrophotometer equipped with an ATR detector, and recorded in the region $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

Fe content determination. An adaptation to the method reported by Song et al for the spectrophotometrical determination of Fe(II) was used [Song, M.; Zhang, Y.; Hu, S.; Song, L.; Dong, J.; Chem, Z.; Gu, N. *Colloid. Surface A*, 408, 114-121, 2012; A. E. Harvey, J. A. Smart, E. S. Amis, et al. *Anal. Chem.* 27, 26-29, 1955]. In summary, the UV-Visible spectrophotometrical determination of an iron(II) complex with 1,10-phenantroline was performed using a UV-Vis Cary 100 spectrophotometer. 10 mg of the polyol coated magnetic nanoparticle (Fe₃O₄@PEG or Fe₃O₄@TREG) were dissolved in 10 ml of HCl, 6 M until complete dissociation under sonication for 20 min. Then, 1 ml of a 10% hydroxylamine hydrochloride solution was added to reduce all Fe(III) to Fe(II). Then, 8 ml of sodium acetate buffer (pH 5.0) and 5 ml of a 1,10-phenantroline 1.0×10^{-4} M solution were added and mixed under vigorous stirring, followed almost immediately by the formation of the highly colored (orange) [Fe(phen)₃]²⁺ complex. After 15 min, the solution was diluted to 100 ml with deionized water and the absorbance of the sample monitored at 508 nm. Concentration of total iron for each sample was referred to a calibration curve previously prepared.

Magnetic resonance relaxometry. MR relaxometry of magnetic nanoparticles was performed using a clinical 1.5 T whole body MR scanner (Philips Intera-Achieva, Philips Healthcare, Best, Netherlands). Four SPION samples (**1-4**) were dispersed in a mixture of distilled water and 0.3 agar

gel at iron concentrations in a range from 4.3 to 28.0 $\mu\text{g/ml}$ for PEG coated nanoparticles and from 5.7 to 64.2 $\mu\text{g/ml}$ for TREG coated nanoparticles in plastic tubes (15 ml). Images were taken in 2D mode with a mFFE (Fast Field Echo) sequence, maximum gradient amplitude of 80mT/m and a slew rate of 120mT/m/ms, an 8 channel SENSE head coil, TR / TE = 230/46ms, slice thickness 5 mm and NEX = 2, angle flip = 18 and echo times of TE = 0, 20, 40, 60, 80 and 100 ms, at the same spatial position (Figure 5). For each sample, T₂-weighted images of three different Fe concentration samples (1: 5.7, 11.0, 20.7; 2: 4.3, 6.4, 14.3; 3: 22.5, 32.1, 64.2; 4: 9.4, 13.3, 28.0 $\mu\text{g/ml}$) were got. The relaxation time T₂ was obtained from the MR images using a Matlab algorithm where the signal intensity decay is calculated at each image and then adjusted to a monoexponential curve defined by: $S(TE)=S(0)e^{-R_2 \cdot TE}$. The procedure is described below: a) Each image with a specific TE, was measured average signal strength provided by the gray level of each sample, using a 7.19x1.8 mm ROI ImageJ software, b) was performed in Matlab algorithm to fit the data to a monoexponential curve described above R₂ value obtained for each sample, we finally obtain T₂. [St Pierre TG, *et al. Magn Reson Imag.* Vol. 17 (2004), p. 446-458; Positano V, *et al. Magnetic Resonance Imaging.* Vol. 27 (2009), p.188-197].

Results and discussions

The polyol method has been used in the preparation of highly monodispersed SPIONs by several research groups. Typically, it consists of two heating stages, one (the activation step) for achieving the thermal decomposition of a small fraction of the polyol, yielding a reducing agent (formaldehyde) and a second heating stage (the magnetite formation step) where the magnetic iron oxide is formed by the thermal decomposition of the iron precursor. The specific temperature in each stage, along with the reaction time, the nature of the polyol as well as the concentration of the precursors are factors influencing the final size, structure and morphology of the nanoparticles. Table 1 presents a summary of the characteristics of six products with similar physical properties and positive magnetic response obtained under different preparation conditions. For this work, it was found that depending of the nature of the polyol, the first heating stage temperature should be fixed at 180°C (TREG) or 200°C (PEG), in order to generate enough reducing agent to achieve the formation of an stoichiometric amount of Fe(II) from the Fe(III) ions coming from the thermal decomposition of [Fe(acac)₃]. Heating the mixture under this temperature, no matter the heating time, resulted in undesirable products, many times not presenting any magnetic response. In a similar fashion, not

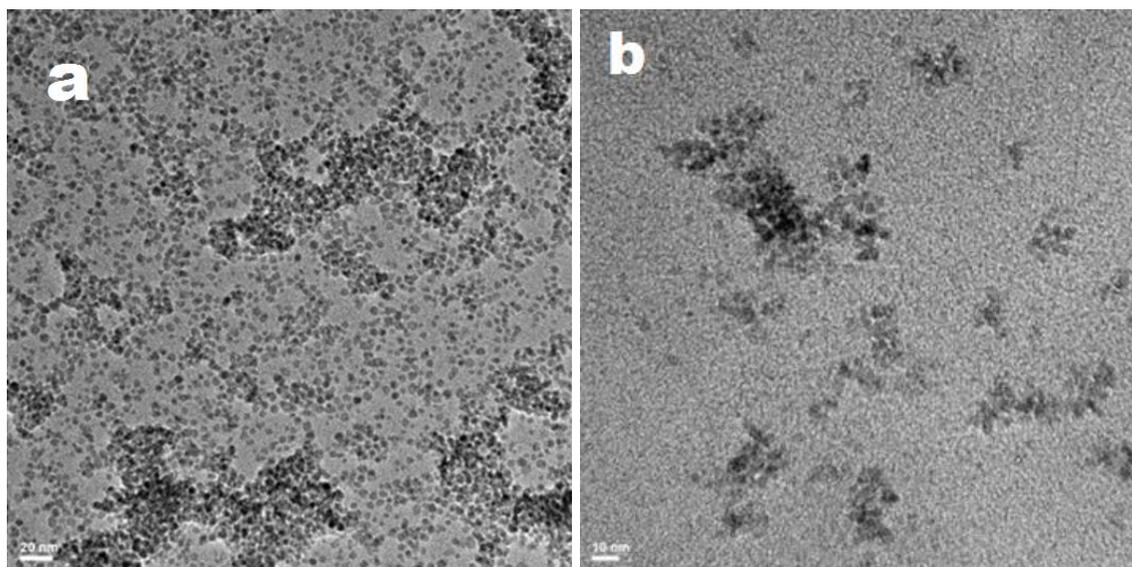
letting the system to have this initial thermal activation step at all or just having it for a smaller period of time had as consequence the no formation of the desired product formed during the second stage. In a similar way, the selection of an appropriate temperature for the second heating stage seems to be also crucial, as it was found that a product with the desired characteristics was formed only at 280°C (TREG) or 260°C (PEG), but not at higher or lower temperatures. In the other hand, the reaction time resulted to impact the nanoparticle size considerably. For example, doubling the time (from 30 to 60 minutes) in the activation step and in the second step (30 to 60 min, for TREG; 40 to 80 min for PEG) increases the hydrodynamic radii from 20 to 40 nm (for TREG coated nanoparticles) and from 20 to 200 nm for PEG coated nanoparticles. It can be related to an increase of the iron core diameter, which agrees with the findings of the spectrophotometrical iron content determination; almost twice the initial mass of iron from product 1 to 3 (TREG) and the same from product 2 to 4 (Table 2).

Table 1. Polyol coated magnetic nanoparticle preparation conditions

Condition	1	2	3	4
Amount of [Fe(acac) ₃]	1.41 g (4.0 mmol)	0.80 g (2.26 mmol)	1.41 g (4.0 mmol)	0.80 g (2.26 mmol)
Amount of polyol (PEG ₆₀₀₀ or TREG)	25.0 ml TREG (186.4 mmol)	1.0 g PEG (0.166 mmol)	25.0 ml TREG (186.4 mmol)	0.75 g PEG (0.125 mol)
Temperature (°C) (1 st stage)	180	200	180	200
Heating time (min) (1 st stage)	30	30	60	60
Temperature (°C) (2 nd stage)	280	260	280	260
Heating time (min) (2 nd stage)	30	40	60	80
Magnetic response	Yes	Yes	Yes	Yes

Average size	20	20	40	200
(nm) (DLS)				
Average size				
(nm) (TEM)				

Figure 1 shows TEM images of the magnetic nanoparticles samples **1** to **4** prepared by the polyol method. The particle size ranges from 10 to X nm, depending on the selected sample. However, in general, the size is in the monodisperse range (<0.20) for each case. TEM analysis of the samples shows an almost spherical and regular shape, as well as low agglomeration and good dispersion of the prepared nanoparticles in solution.



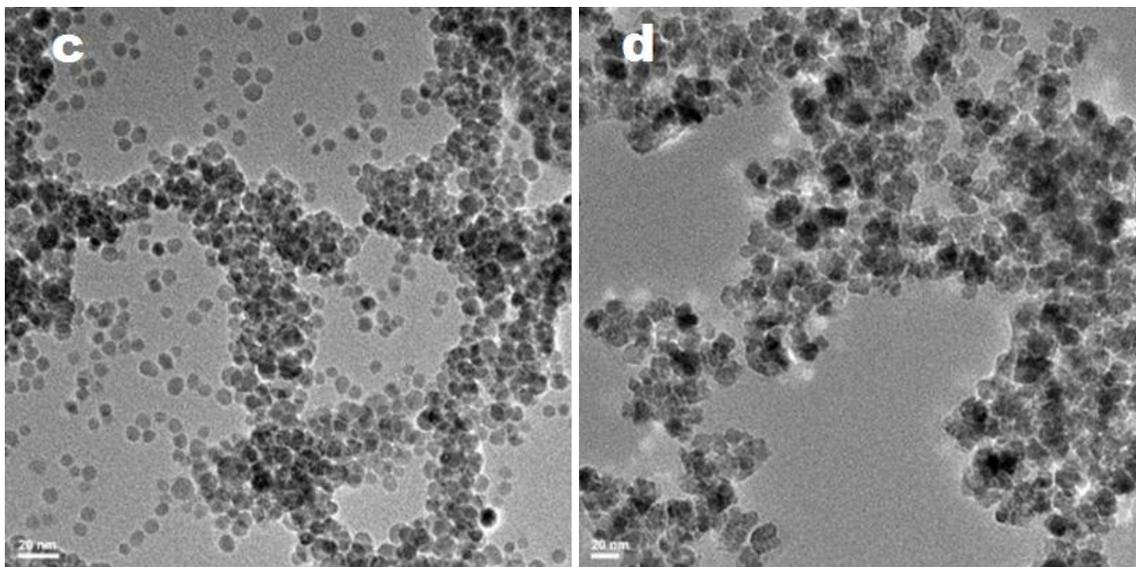


Fig. 1. a) TEM image of the sample E1, b) TEM image of the sample E2, c) TEM image of the sample E3 d) TEM image of the sample E4

The nanoparticle synthesized were identified as magnetite by their powder X-ray diffraction patterns. Figure 2 shows the XRD diffractogram for the TREG coated magnetic nanoparticles. The characteristic peaks for magnetite associated with the planes (220), (311), (400), (422), (511) and (440) are clearly identified.

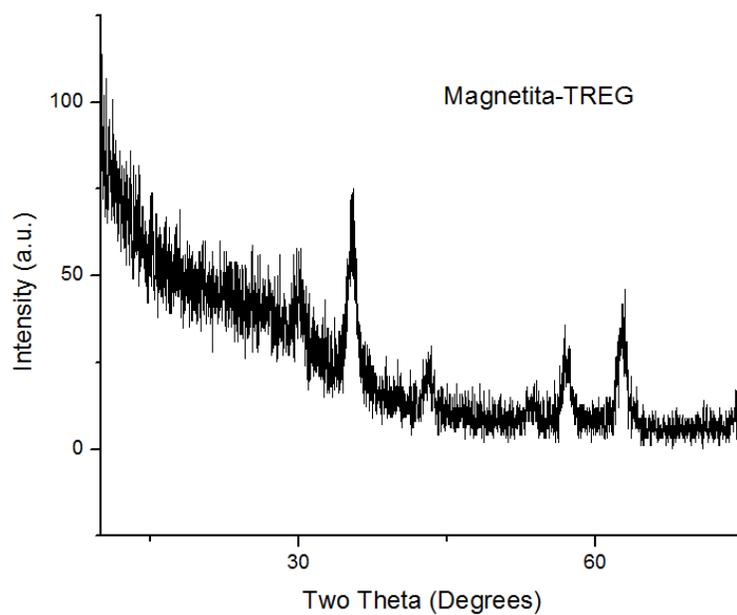


Figure 2.

Size distribution of Fe₃O₄-NPs was determined by Dynamic Light Scattering (DLS), using a NANOTRAC-Wave, at a concentration of 100 ppm in water, at 21°C.

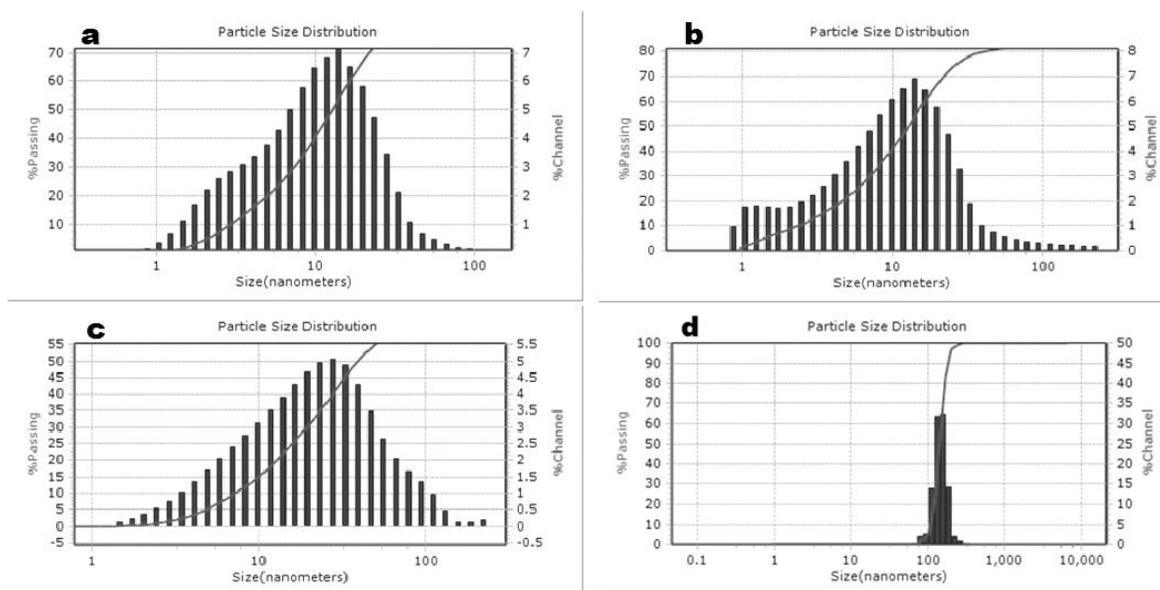
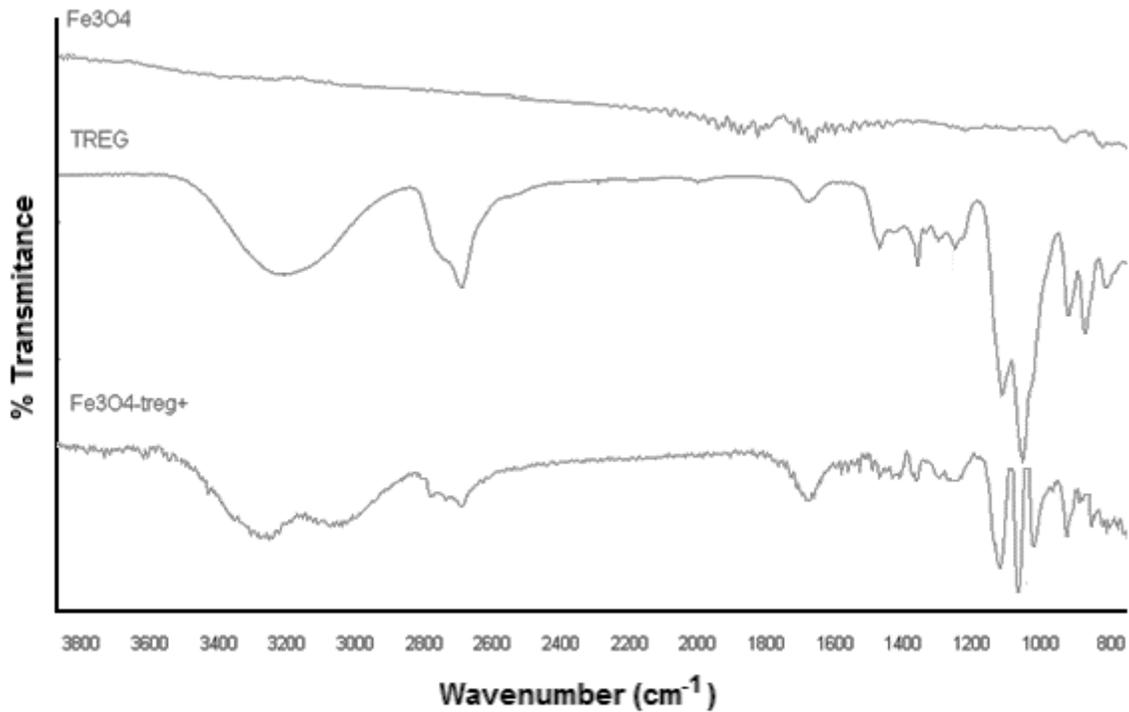
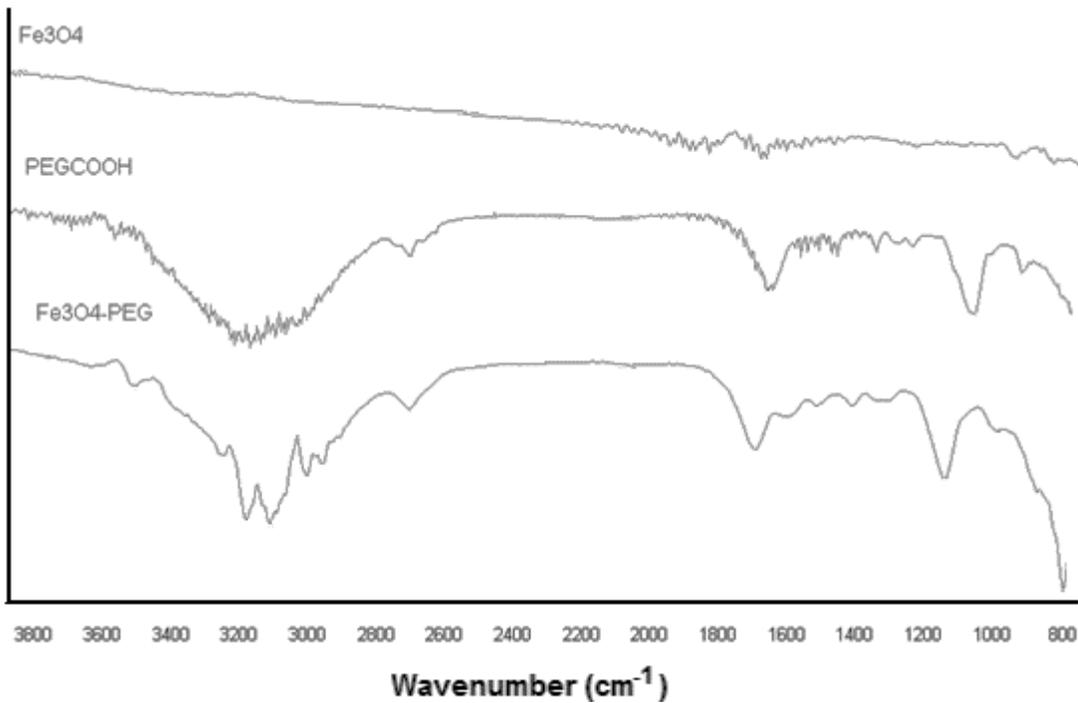


Fig. 2. a) Size distribution of E1 is on average 20nm, b) Size distribution of E4 is on average 20nm; c) Size distribution of E3 is on average 40nm, b) Size distribution of E4 is on average 200nm.

Figure 4 shows a comparison of the FT-IR spectra for the differently coated nanoparticles. New bands associated with the typical vibrational frequencies expected for PEG or TREG were found on the coated magnetic nanoparticles as expected. The PEG or TREG coatings adsorbed on the surface stabilize the nanoparticles in aqueous suspensions, even under physiological conditions. Samples dispersed in water and in physiological serum were refrigerated up to 2 months at -4°C without observing significant changes when the hydrodynamic radii was measured periodically.



The iron content of 10.0 mg of samples **1** to **4** was spectrophotometrically determined as previously described and the results are presented in Table 3. The differences in masses among the amount of sample initially weighted and the concentration of iron determined can be interpreted as the total mass

of polyol coating the nanoparticles surfaces, along with a small contribution from other small molecules adsorbed in the surface.

Table 2. Using the calibration curve obtained parts per million of the samples and the total mass of Fe

Sample	Fe in the samples (%)	Estimated PEG/TREG coating (%)
1	13.8	86.2
2	8.6	91.4
3	38.5	61.5
4	15.9	84.1

Obtaining IMR

Samples were diluted in water and agar gel 0.15% to avoid deposition of the nanoparticles. Falcon tubes were filled with the concentrations presented in Table 4.

Table 4. The different concentrations shown in falcon tubes

Sample	Coating	Average Size (nm)	Sample mass (μg)	Water and agar gel 0.15% (ml)	Total concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mass of Fe (mg)	Concentration of Fe (mg/ml)
E11	TREG	20	1800	12	150	0.24795	0.0207
E12	TREG	20	1200	15	80	0.1653	0.0110
E13	TREG	20	500	12	42	0.06887	0.0057
						5	
E21	PEG	20	2000	12	167	0.17176	0.0143
E22	PEG	20	900	12	75	0.07729	0.0064
						2	

E23	PEG	20	600	12	50	0.05152	0.0043
						8	
E31	TREG	40	2000	12	167	0.7702	0.0642
E32	TREG	40	1000	12	83	0.3851	0.0321
E33	TREG	40	700	12	58	0.26957	0.0225
E41	PEG	200	2100	12	175	0.33541	0.0280
						2	
E42	PEG	200	1000	12	83	0.15972	0.0133
E43	PEG	200	700	12	58	0.11180	0.0093
						4	
E51	TREG	40	2100	12	175	0.60742	0.0506
						5	
E52	TREG	40	800	12	67	0.1102	0.0092
target				12		0	

A *phantom* was prepared using Falcon tubes as shown in Figure 4. Images were acquired on a 1.5 T MRI (Philips Intera-Achieva, Philips Healthcare, Best, Netherlands) at Children's Hospital of Mexico "Federico Gomez" in Mexico City figure 4.



Fig. 4. Phantom with nanoparticles and 1.5T Philips scanner

The images were taken in 2D with spin-echo sequence with echo times TE = 0 ms, 20 ms, 40 ms, 60 ms, 80 ms and 100 ms in the same anatomical position figure 5.

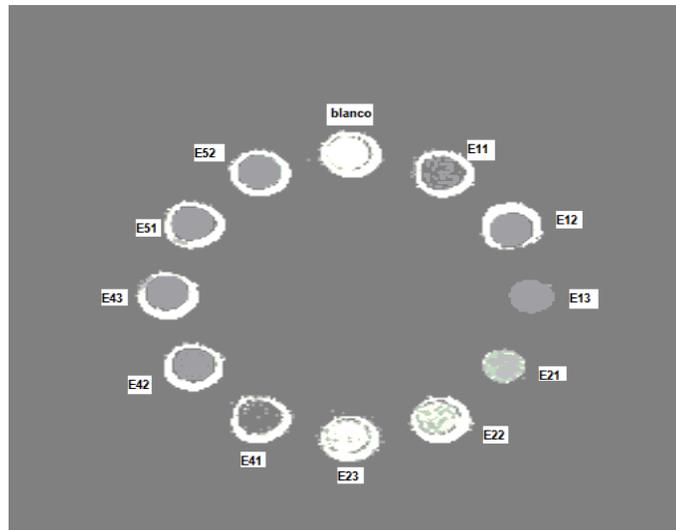


Fig. 5. Shows a cut to zero echo time TE = 0 ms.

Monoexponential decay analysis

Transverse relaxation time T_2 (~ ms) is associated with the transverse relaxation, whereby nuclear spins precess cease, thus losing the transverse magnetization (in the xy plane) after a radiofrequency pulse. This gap is produced by direct interaction between pairs of spins is therefore called spin-spin relaxation.

To calculate the relaxometry to the images obtained, was used an algorithm in Matlab, which first calculates the decay of signal intensity S and fits to a monoexponential curve $S(TE)=S(0)e^{-R_2 \cdot TE}$, where $S(0)$ is the first signal intensity while $TE = 0$. [St Pierre TG, *et al. Magn Reson Imag.* Vol. 17 (2004), p. 446-458; Positano V, *et al. Magnetic Resonance Imaging.* Vol. 27 (2009), p.188-197].

The spin-echo sequence can be used for accurate measurement of T_2 relaxation time or the rate $R_2 = 1/T_2$. Some studies *in vivo* [Engelhardt R, *et al. Magn Reson Imag.* Vol. 12 (1994), p. 999-1007; Papakonstantinou OG, *et al. Magn Reson Imag.* Vol.13 (1995), p.967-977] and *in vitro* [Clark PR, *et al. Magn Reson Imag.* Vol. 49: (2003), p. 572-575] have demonstrated a high degree of correlation between iron concentration and R_2 tissue. Show monoexponential decay curves of samples *E1* and *E4*, give you an overview of all curves were calculated see Fig. 6 y Fig. 7. .

In figure 6 indicates the E1 signal decay for different concentrations, obtaining relaxation times: $T_2 = 50.4913\text{ms}$ for E11, $T_2 = 26.0124\text{ms}$ for E12, $T_2 = 23.8915\text{ms}$ for E13.

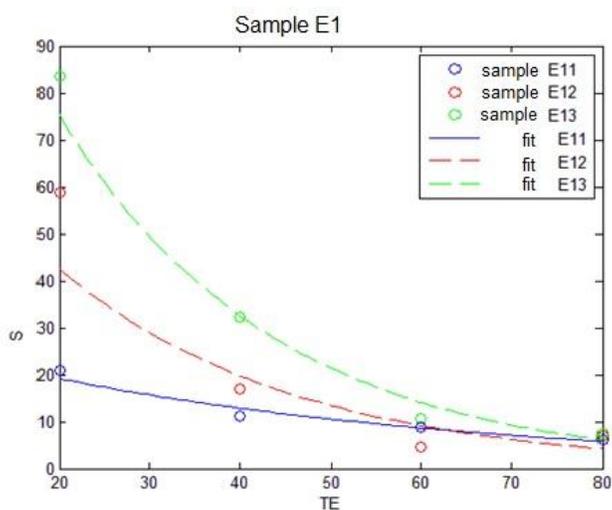


Fig.6. Decay of the signal intensity of the sample E1 to different concentrations.

In figure 7 indicates the E4 signal decay for different concentrations, obtaining relaxation times: $T_2=49.9117\text{ms}$ for E42, $T_2 = 26.0124\text{ms}$ for E12, $T_2=33.0592\text{ms}$ for E43.

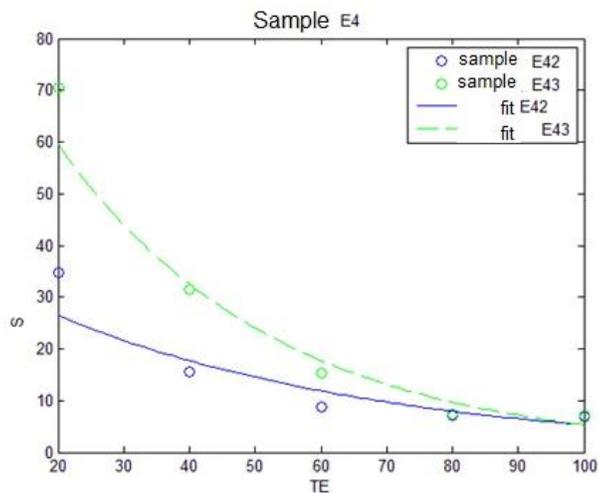


Fig. 7. Decay of the signal intensity of the sample E4 to different concentrations.

Relaxation times of all the samples are described in Table 5, and compare the size and type of coating having nanoparticles.

Table 5. Shows the summary of the relaxation times

Sample	Coating	average size (nm)	concentration of Fe (mg/ml)	Relaxation Time T ₂ (ms)
E11	TREG	20	0.0207	50.491
E12	TREG	20	0.0110	26.0124
E13	TREG	20	0.0057	23.8915
E21	PEG	20	0.0143	93.9156
E22	PEG	20	0.0064	73.6148
E23	PEG	20	0.0043	45.0893
E32	TREG	40	0.0321	123.1659
E33	TREG	40	0.0225	52.0564
E42	PEG	200	0.0133	49.9117
E43	PEG	200	0.0093	33.0592
E51	TREG	40	0.0506	46.5919
E52	TREG	40	0.0092	39.9318
blanco				597.182

MRI is considered highly sensitive (ie, pathologic conditions easily shown), but not very specific (ie several different pathologies have similar appearances). Contrast agents help improve the specificity and our SPIONs was found, also have the lowest concentrations of Fe, so that when applied to patients to avoid toxicity problems.

Conclusions

Were successfully obtained two types of nanoparticles of magnetite (Fe₃O₄) SPION type, surface functionalized with polyethylene glycol (PEG) and triethyleneglycol (Treg), which have an average

hydrodynamic size in the range 10 to 200 nm, monodisperse, water solubility and high stability in solution

The results show that T2 relaxation times change with the size and concentration of SPIONs, predominantly trend that decreasing concentration, time T2 does too.

Iron concentrations were measured in each sample in Falcon tubes to obtain images are much lower, because the scientific literature reported in a study conducted in normal glial cells and in breast cancer cells that the toxicity of Fe3O4 NPs coated with a bipolar surfactant (tetramethylammonium-11-aminoundecanoato) could be observed from concentrations greater than 100 µg/ ml [Weissleder, R., *et al.*, *Am J Roentgenol.* Vol. 152 (1989), p.167].

Relaxometry analyzing the size, the coating (Treg or PEG) and comparing the contrast in images taken of the samples, it was found that all samples showed response to the difference in contrast, but the samples: E11 Treg coated with an average hydrodynamic size of 20nm, an iron concentration of 0.0207mg/ml, relaxation time $T_2 = 50.491ms$; E42 PEG coated with an average hydrodynamic size of 200nm, an iron concentration 0.0133mg / ml , and relaxation time $T_2 = 49.9117ms$; E52 Treg coated with a hydrodynamic size of 40 nm, iron concentration 0.0092mg / ml , relaxation time $T_2 = 39.9318ms$, are those with better response to contrast change, ie, are ones that we could see a better tissue contrast in patients.

References

- [1] Wei Cai, J. W. *Journal of Colloid and Interface Science* Vol. 305 (2007), p. 366-370
- [2] Zhen, Li. *Advanced Materials* Vol. **17** (2005), p. 1001-1005.
- [3] Engelhardt R, *et al.* *Magn Reson Imag.* Vol. 12 (1994), p. 999-1007.
- [4] Papakonstantinou OG, *et al.* *Magn Reson Imag.* Vol. 13 (1995), p. 967-977.
- [5] Clark PR, *et al.* *Magn Reson Imag.* Vol. 49 (2003), p. 572-575.
- [6] Fishman, A. *Synthetic Communications* Vol. **34** (2004), p. 2309-2312.
- [7]. Indira, T. *International Journal of Pharmeceutical Sciences and Nanotecnology* Vol, 3 (2010), p. 1035-1042.
- [8] St Pierre TG, *et al.* *Magn Reson Imag.* Vol. 17 (2004), p. 446-458.

[9] Positano V, *et al. Magnetic Resonance Imaging*. Vol. 27 (2009), p.188-197.

[10] Engelhardt R, *et al. Magn Reson Imag*. Vol. 12 (1994), p. 999-1007.

[11] Papakonstantinou OG, *et al. Magn Reson Imag*. Vol.13 (1995), p.967-977.

[12] Clark PR, *et al. Magn Reson Imag*. Vol. 49: (2003), p. 572-575.

[13] Weissleder, R., *et al., Am J Roe*