

TESIS CARRERA DE MAESTRÍA EN FÍSICA MÉDICA

**ESTUDIO DEL PROCESO DE CALENTAMIENTO DE
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS CON CAMPOS
MAGNÉTICOS AC PARA SU UTILIZACIÓN EN
TRATAMIENTO DE TUMORES POR HIPERTERMIA**

Mary Luz Mojica Piscioti

Mary Luz Mojica Piscioti
MAESTRANDO

Roberto D. Zysler, Dr.
DIRECTOR

Diciembre 2009

Centro Atómico Bariloche

Instituto Balseiro
Universidad Nacional de Cuyo
Comisión Nacional de Energía Atómica
Argentina

*A mi familia,
el esquema más apropiado para mí.
Los amo.*

*A Alexandre,
porque su presencia en mi vida
me hace inmensamente feliz.*

*Quel est cet élixir? Pêcheur, c'est la science,
c'est l'élixir divin que boivent les esprits,
trésor de la pensée et de l'expérience...*

(Fragment of *La bouteille à la mer*)

Alfred de Vigny (1797-1863)

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Fundamento	2
1.2. Antecedentes	3
1.3. Motivación	6
1.4. Estructura de la tesis	8
2. Nanopartículas magnéticas	11
2.1. Hipertermia	13
2.1.1. Aspectos técnicos	16
2.2. Monodominios magnéticos	16
2.3. Superparamagnetismo	18
2.3.1. Anisotropía	20
2.4. Mecanismos de relajación	22
2.4.1. Modelo de Néel	23
2.4.2. Modelo de Brown	25
2.5. Magnetita	27
3. Curvas de magnetización	29
3.1. Determinación experimental de la curva de magnetización	29
3.1.1. Sistema en equilibrio termodinámico: $\tau < \tau_m$	30
3.1.2. Sistema en no equilibrio termodinámico: $\tau > \tau_m$	32
3.1.3. Magnetización en función de campo aplicado	38
3.2. Fluidos magnéticos	39
3.2.1. Índice de absorción específico (SAR)	40
3.2.2. Histéresis	42
3.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas	42

4. Caracterización de las nanopartículas	45
4.1. Muestras	45
4.1.1. Ácido oleico	46
4.1.2. DEXTRAN	46
4.1.3. Silica	47
4.1.4. PEI (Polietilenimina)	48
4.1.5. PEG (Polietilenglicol)	48
4.2. Resultados	50
4.2.1. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)	50
4.2.2. Volumen hidrodinámico	54
4.2.3. Magnetización	56
4.2.4. Capa magnéticamente débil	62
4.2.5. Specific Absorption Rate (SAR)	66
5. Cuantificación de la cantidad de nanopartículas en tejidos biológicos	73
5.1. Cuantificación de nanopartículas	73
5.2. Captación de nanopartículas magnéticas en sistemas <i>in vivo</i>	79
6. Conclusiones	83
A. Aspectos biológicos de la hipertermia	89

Índice de figuras

1.1. Clasificación de materiales magnéticos para hipertermia. Tomado de Bahadur (Bahadur, 2003) [4].	2
1.2. Volumen del sarcoma MX11 después del tratamiento por inyección intratumoral de dextran-ferrita (DF) (grupo 2), después del tratamiento con inyección de DF y campo magnético permanente (grupos 3 y 4), y en animales de control (grupo 1). Los resultados representan la media de cuatro experimentos independientes. Figura reproducida de Brusentsov (Brusentsov, 2002) [12].	4
1.3. Experimento de calentamiento de tumores en ratones. (a) Radiografía mostrando la posición de termosensores en la periferia distal y proximal del tumor. (b) Variación de la temperatura rectal e intratumoral durante la exposición de 10 ratones portadores del tumor sometidos a un campo magnético (frecuencia: 410 kHz, amplitud: 11.06 kOe) por 242 s. Aplicación intratumoral de 21 ± 9 mg de nanopartículas de magnetita recubiertas con dextran. Tomado de Hilger (Hilger, 2005) [37].	5
1.4. Radiografía mostrando las observaciones típicas de un ratón con tumor inducido (a) antes y (b) después de calentamiento magnético del tumor. Tomado de Hilger (Hilger, 2001) [36].	5
2.1. Esquema de una nanopartícula magnética con aplicación biológica. Se presenta la capa surfactante y las moléculas que componen el recubrimiento.	12
2.2. Esquema del eje de anisotropía (línea punteada) de una partícula monodominio, junto con el vector de magnetización y de campo aplicado. Aquí el ángulo θ está definido entre el vector de magnetización y eje de anisotropía, y el ángulo θ_n está definido entre el campo aplicado y el eje de anisotropía.	21

2.3.	Representación esquemática de los mecanismos de relajación de Néel y de Brown.	22
2.4.	(a) Energía magnética de una nanopartícula con anisotropía uniaxial en función del ángulo θ entre el eje de magnetización y el eje de anisotropía, definido en la figura 2.2 y dada por la ecuación 2.7. (b) Idem anterior para una nanopartícula con anisotropía uniaxial que se somete a un campo magnético, dada por la ecuación 2.8.	24
2.5.	Esquema del comportamiento de las constantes de tiempo de relajación en función del diámetro d de las nanopartículas de magnetita.	26
2.6.	Estructura espinel inversa de la magnetita. (a) El lado frontal de una celda cúbica unidad. (b) Organización ferrimagnética en la magnetita: ilustración del plano $[1,1,1]$	27
3.1.	Función de Langevin $\mathcal{L}(\alpha x) = \coth(\alpha x) - \frac{1}{(\alpha x)}$ para los valores de α señalados en cada curva.	32
3.2.	Curva teórica de magnetización en función de temperatura en condiciones (a) ZFC y (b) FC respectivamente. Se señala también la temperatura de bloqueo T_B	34
3.3.	Curva de magnetización en función de temperatura en condiciones ZFC y FC respectivamente, para una muestra con distribución de tamaño.	35
3.4.	Ciclo de histéresis de la magnetización para un sistema de monodominios con el eje de anisotropía uniaxial (a) paralelo al campo aplicado, (b) distribuido al azar, medido a $T < T_B$	38
3.5.	Dependencia de la potencia (ecuación 3.19) con el diámetro de nanopartículas de magnetita con recubrimiento de ácido oleico y disueltas en tolueno. Los valores de campo aplicado y frecuencia fueron 500e y 115kHz, para efectos de hacer el gráfico. Inspirado en (Kalambur, 2005) [43].	41
4.1.	Estructura molecular del ácido oleico.	46
4.2.	Estructura molecular del DEXTRAN.	47
4.3.	Estructura molecular del dióxido de silicio (silica).	48
4.4.	Estructura molecular de la polietilenimina.	49
4.5.	Estructura molecular del polietilenglicol.	49
4.6.	Mediciones TEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con los surfactantes indicados.	52

4.7. Ajuste tipo log-normal de la distribución de tamaños obtenida mediante TEM y mostrada en los recuadros, para nanopartículas de magnetita recubiertas con los surfactantes indicados.	53
4.8. Mediciones TEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con silica. . .	54
4.9. Valor medio de los volúmenes hidrodinámicos para las muestras de ácido oleico, DEXTRAN y PEI en la curva de potencia en función de diámetro. Los valores de campo aplicado y frecuencia fueron 112Oe y 115kHz, los usados en el experimento. Inspirado en (Kalambur, 2005) [43].	55
4.10. Curvas de magnetización vs. temperatura para muestras de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI. Las mediciones se hicieron en el SQUID para las dos primeras muestras con un campo aplicado de 10 Oe y 20 Oe respectivamente. Para las otras dos muestras, las mediciones fueron realizadas en el VSM con un campo aplicado de 50 Oe.	57
4.11. Curva de la magnetización ZFC invertida vs. T para la muestra de nanopartículas de magnetita recubiertas con silica, basada en los resultados presentados en la figura 4.10, el cual se reproduce en el recuadro.	59
4.12. Curvas de $-d(M_{FC} - M_{ZFC})/dT$ vs. temperatura para muestras de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI, basadas en los resultados presentados en la figura 4.10. Las flechas señalan el máximo de la curva.	60
4.13. (a) Curva de magnetización sin normalizar en función de campo para todas las muestras de nanopartículas de magnetita. (b) Curva de M/M_S vs. H/T para todas las muestras. Mediciones realizadas a temperatura de 300 K. . .	62
4.14. Esquema de la capa magnéticamente débil de una nanopartícula.	63
4.15. (a) Curva de M/M_S vs. H/T para todas las muestras, con la corrección lineal correspondiente para la muestra revestida con silica. (Gráfica modificada de la figura 4.13). (b) Detalle de la curva para enfatizar el comportamiento de las nanopartículas con silica.	64
4.16. Ciclos de histéresis medidos a temperatura de 5 K para las muestras de ácido oleico, DEXTRAN y PEI.	65
4.17. Detalle del termómetro de alcohol empleado para las mediciones de temperatura.	67
4.18. Mediciones de temperatura en función del tiempo para nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico. Pruebas iniciales.	67
4.19. Mediciones de temperatura en función del tiempo para nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI.	68

5.1. Muestras de carne para determinación de la cantidad de material magnético a través de la medición de magnetización versus campo. La muestra 1 no contiene material magnético, mientras que la 2 y la 3 contienen nanopartículas extraídas de soluciones con distintas concentraciones. Dentro del portamuestras, la muestra del líquido con mayor concentración. No se muestra la correspondiente al líquido con menor concentración.	74
5.2. Curvas de magnetización obtenidas a partir de la medición de la muestra 1, de carne sin material magnético agregado. (a) Curva experimental. (b) Curva ajustada por la señal del portamuestras.	75
5.3. Curvas de magnetización de las suspensiones de partículas de baja y alta concentración respectivamente.	76
5.4. Curva de magnetización de la muestra de carne con agregado de material magnético de alta concentración.	77
5.5. Prototipo de los ratones portadores de tumor mamario LM3 inducido usados en pruebas de captación. (a) Morfología del tumor en un ratón. (b) Arquetipo de la disposición de ratones empleados para los estudios. Nótese la presencia de imanes sobre uno de los especímenes.	80
A.1. Efecto letal de la hipertermia <i>in vitro</i> . Imagen tomada de Hildebrandt. (Hildebrandt, 2002) [35]	90

Índice de tablas

4.1. Muestras de nanopartículas de magnetita estudiadas.	50
4.2. Diámetro medio de las nanopartículas recubiertas determinado mediante ajustes tipo log-normal de las distribuciones de tamaños determinadas en la figura 4.7. El valor de σ corresponde al del ajuste log-normal.	51
4.3. Parámetros físicos de las muestras estudiadas: diámetro interno, diámetro hidrodinámico, concentración de las muestras en el líquido dispersante. . .	55
4.4. Valores de las temperaturas T_{max} dadas por el valor máximo de la curva ZFC, y de las temperaturas de irreversibilidad dadas por la separación de las curvas ZFC y FC a partir de los resultados mostradas en la figura 4.10.	57
4.5. Estimación de la constante de anisotropía de las muestras trabajadas a partir de las temperaturas de bloqueo T_B relacionadas en la tabla 4.4. . .	58
4.6. Valores de la magnetización de saturación M_S , obtenidas a partir de la curvas no normalizadas mostradas en la figura 4.13(a).	61
4.7. Valores de la magnetización de remanencia M_r y el campo coercitivo H_C a partir de los datos de los ciclos de histéresis medidos a 5 K presentados en la figura 4.16.	65
4.8. Determinación del valor del SAR para todas las muestras a partir de las mediciones presentadas en 4.19.	69
5.1. Características de las muestras de tejido muscular mostradas en la figura 5.1, y del portamuestras empleado en la medición.	75
5.2. Comparación de cantidad de nanopartículas calculadas y determinadas experimentalmente para las muestras de carne con agregado magnético de baja y alta concentración, respectivamente.	78

- 5.3. Características de las muestras de tejido tumoral de ratones: masa de las muestras, magnetización de saturación (sin normalizar) y descripción de las mismas. 81
- 5.4. Momento magnético medio $\bar{\mu}$, cantidad y concentración (en $\mu\text{g/g}$) de nanopartículas para las muestras A y D relacionadas en la tabla 5.3. . . . 81

Índice de abreviaturas

CONSTANTES Y FACTORES

C	Constante de Curie
cgs	Sistema cegesimal de unidades
d	Ancho de la pared de dominio
E_a	Energía de anisotropía
f	Frecuencia del campo aplicado
$f_v(V)$	Función de distribución de volúmenes
\hbar	Constante de Planck reducida
H	Campo aplicado
H_C	Campo coercitivo
J	Constante de intercambio entre espines
K_a	Constante de anisotropía
k_B	Constante de Boltzmann
$\mathcal{L}(x)$	Función de Langevin
M_r	Magnetización remanente
M_S	Magnetización de saturación
N	Número de partículas por unidad de volumen
SAR	<i>Specific Absorption Rate</i> (Índice de absorción específico)
T	Temperatura absoluta
T_{amb}	Temperatura ambiente
T_B	Temperatura de bloqueo
T_{irr}	Temperatura de irreversibilidad
T_{max}	Temperatura máxima

τ	Tiempo de relajación
τ_B	Tiempo de relajación de Brown
τ_m	Tiempo de medición
τ_N	Tiempo de relajación de Néel
μ_B	Magnetón de Bohr
V_C	Volumen crítico
χ	Susceptibilidad magnética

INSTITUCIONES

CAB	Centro Atómico Bariloche
CAC	Centro Atómico Constituyentes
CNEA	Comisión Nacional de Energía Atómica
IB	Instituto Balseiro
LRM	Laboratorio de Resonancias Magnéticas
MEMS	Dispositivos Electromecánicos
UNCu	Universidad Nacional de Cuyo

QUÍMICOS Y OTROS

PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina

TÉRMINOS EXPERIMENTALES

FC	<i>Field Cooling</i> (Enfriamiento con campo magnético aplicado)
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> (Imágenes de Resonancia Magnética)
SQUID	<i>Superconducting quantum interference device</i>
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopio electrónico de transmisión)
VSM	<i>Vibrating Sample Magnetometer</i> (Magnetómetro de muestra vibrante)
ZFC	<i>Zero Field Cooling</i> (Enfriamiento con campo magnético nulo)

Resumen

Dentro del esquema general de los nuevos avances tecnológicos para tratamientos contra el cáncer, la nanomedicina es una de las vertientes más prometedoras. En los últimos años la inclusión de la nanotecnología en este campo se ha dado de forma progresiva, haciéndose manifiesta en diversidad de aplicaciones, como en la marcación de células madre, el reconocimiento de células tumorales, la entrega de fármacos en sitios específicos, entre otras. Particularmente, entre los recientes procedimientos clínicos para control tumoral se cuenta una técnica conocida como hipertermia, mediante la cual se busca ubicar nanopartículas magnéticas dentro de una región tumoral en el organismo para posteriormente hacerlas interactuar con un campo magnético AC externo, fenómeno que al generar un incremento en la temperatura de la zona ocasiona la muerte de las células tumorales.

A pesar de que se han reportado numerosas evidencias que sustentan la eficacia de dicha técnica, los tratamientos por hipertermia no se aplican actualmente a escala de investigación. Un tratamiento de este tipo requiere que se tenga control detallado sobre una multiplicidad de factores antes de poder ejecutarse en la práctica. Uno de los elementos primordiales se relaciona con la elección del material magnético que debe usarse según los beneficios y ventajas que éste provea. Otro factor importante es el proceso mediante el cual dicho material en forma de nanopartículas magnéticas llega a la zona tumoral, es captado y posteriormente eliminado del organismo. En esta tesis de maestría nos hemos enfocado en estudiar algunas de las propiedades magnéticas y no magnéticas de nanopartículas de magnetita con potencial aplicación en tratamientos de hipertermia.

Hemos trabajado con nanopartículas monodominio sintetizadas por precipitación química y recubiertas con cuatro tipos de surfactantes: ácido oleico, DEXTRAN, polietilenimina (PEI) y silica, las cuales caracterizamos morfológicamente con

microscopía electrónica de transmisión. Hicimos comparaciones de los cambios que presentan ciertos comportamientos magnéticos de las nanopartículas por causa del tipo de revestimiento que poseen, lo cual es básico para entender las notables variaciones de las respuestas de las partículas cuando se someten a condiciones similares. Esto es coadyuvante en la optimización de la selección del material magnético con el cual se calentará el tumor. Las nanopartículas sintetizadas presentaron diámetros entre 5 nm y 26 nm aproximadamente, lo cual asegura que se trata de partículas monodominio que además se encuentran dentro de un rango de tamaños en el que el proceso de calentamiento exhibe una respuesta favorable.

El estudio del calentamiento de las nanopartículas lo realizamos mediante la determinación del índice de absorción específico con mediciones de temperatura en función del tiempo para las muestras sometidas a un campo magnético alterno con condiciones de intensidad y frecuencia invariables. Estudiamos dicho calentamiento con algunas muestras dispersadas en solución orgánica y otras en solución acuosa.

Finalmente, propusimos un método para determinar la cantidad de nanopartículas magnéticas presentes en un tejido a través de mediciones de magnetización y pruebas de captación natural. En la revisión literaria no se encontró ningún reporte sobre este tipo de cuantificación. Aún así, consideramos este desarrollo una herramienta fundamental para futuras referencias encaminadas a proponer protocolos de control sobre la cantidad de material magnético que se empleará en la técnica de hipertermia según el tumor a tratar.

Palabras clave: Nanopartículas, hipertermia, calentamiento, nanomagnetismo, materiales magnéticos, magnetita, nanomedicina

Abstract

In the general scheme of new technological advances in treatments against cancer, the nanomedicine is one of the most promising aspects. In the last years the inclusion of nanotechnology in this field has been increasing progressively in diverse applications like stem-cell marking, tumor cells recognition, targeting and delivery of drugs to a specific site, among others. Particularly, among recent clinical procedures for tumoral control there exists a technique known as hyperthermia, which seeks to locate magnetic nanoparticles inside a tumoral region to make them interact with an external AC magnetic field later, a phenomenon that generates an increment in the temperature of the zone and causes the death of the tumor cells.

In spite of the fact that there has been reported a lot of evidences that support the effectiveness of this technique, hyperthermia treatments are not currently applied on a clinical scale. A treatment like this requires a detailed control about a multiplicity of factors before it can be implemented in practice. One of the fundamental elements is related with the choice of the magnetic material that should be used according to the benefits and advantages it provides. Another important factor is the process by which that material in the form of magnetic nanoparticles reaches the tumor zone, is captured and subsequently is eliminated from the organism. In this master thesis we have focused in studying some of the magnetic and non magnetic properties of magnetite nanoparticles with potential application in hyperthermia treatments.

We have worked with single domain nanoparticles synthesized by chemical precipitation and coated with four types of surfactants: oleic acid, DEXTRAN, polyethilenimine (PEI) and silica, which were characterized morphologically with electron microscopy transmission. We made comparisons of the changes that have certain magnetic behavior of the nanoparticles because of the coating type which is basic to understand the significant variations of the responses of the particles

when subject to similar conditions. This is instrumental in optimizing the selection of magnetic material with which the tumor will be heated. The synthesized nanoparticles showed diameters between 5 nm and 26 nm, which ensures that these are single-domain nanoparticles within a range of sizes in which the heating exhibits a favorable response.

The study of nanoparticle heating was done by determining the specific absorption rate with temperature measurements versus time for the samples subjected to an alternate magnetic field in terms of invariant intensity and frequency. We studied that heating with some samples dispersed in organic solution and others in aqueous solution.

Finally, we proposed a method to determine the amount of magnetic nanoparticles present into a tissue through magnetization measurements and natural captation tests. In the literature review it wasn't found any report on this type of quantification. Even so, we consider this development is a fundamental tool for future references in order to suggest control protocols over the amount of magnetic material to be used into hyperthermia technique depending on the tumor to be treated.

Keywords: Nanoparticles, hyperthermia, heating, nanomagnetism, magnetic materials, magnetite, nanomedicine

*Not only is the universe stranger than we imagine,
it is stranger than we can imagine.*

Sir Arthur Eddington (1882 - 1944)

1

Introducción

Con el estudio del comportamiento de la materia a escala nanométrica se ha hecho evidente una gran variedad de potenciales aplicaciones del uso de nanopartículas en distintas áreas del conocimiento. Actualmente se desarrollan técnicas en pro de mejorar los procesos para sintetizarlas, caracterizarlas y emplearlas con funciones específicas, ya que las propiedades físicas que éstas presentan difieren de las que posee la materia a un nivel macroscópico, otorgándoles características muy particulares. Es así que la atención en los últimos años se ha focalizado en usar las nanopartículas como transportadoras de medicamentos, inmovilizadoras de proteínas, marcadores celulares, agentes de contraste para MRI (Magnetic Resonance Imaging), y mediadoras para el tratamiento de cáncer por hipertermia. (Mornet, 2004) [52]

De manera particular, el tratamiento del cáncer por hipertermia se centra en el proceso de calentar nanopartículas previamente ubicadas dentro de un tumor por medio de la aplicación de un campo magnético alterno a determinada frecuencia, de tal forma que se genera un incremento en la temperatura de las células que deriva en la muerte de éstas y por ende, en la remoción del tumor. Este aumento localizado de temperatura se debe a la respuesta de las nanopartículas al campo oscilante. En principio la técnica parecería ser efectiva contra todos los tipos de tumores, presentando además la ventaja adicional de ser mínimamente invasiva. Por esta razón la posibilidad de emplear la hipertermia a nivel clínico promueve altas

expectativas en el tratamiento del cáncer.

1.1. Fundamento

Cualquier material que tenga uso biotecnológico debe aprobar una evaluación exhaustiva consistente en varias pruebas *in vitro* e *in vivo*, lo cual califica a dicho material como compatible en su entorno de aplicación. Esto implica que en un periodo de tiempo el empleo de ese material no causará reacciones perjudiciales que puedan alterar las propiedades intrínsecas de un sistema biológico. (Bahadur, 2003) [4] Para emplear entonces nanopartículas magnéticas en el contexto de la hipertermia es necesario efectuar estudios de viabilidad que las cualifiquen como biocompatibles.

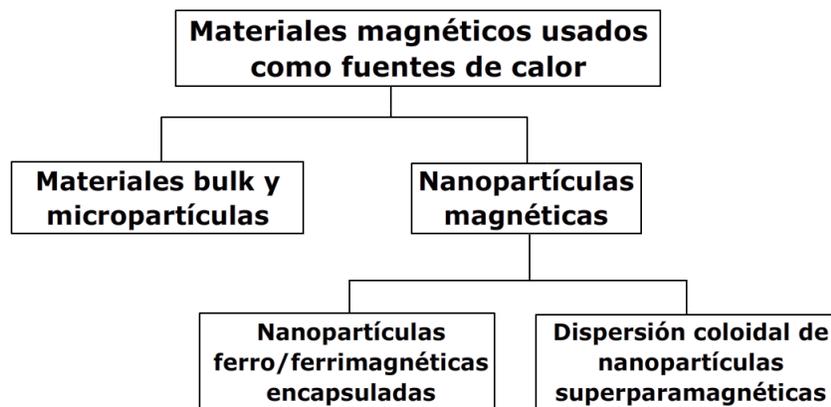


Figura 1.1: Clasificación de materiales magnéticos para hipertermia. Tomado de Bahadur (Bahadur, 2003) [4].

Dependiendo del enfoque de la investigación con materiales magnéticos como fuentes de calor, éstos pueden clasificarse como se muestra en la figura 1.1. El desarrollo que discutiremos en este trabajo se concentra en nanopartículas superparamagnéticas ya que son las que satisfacen condiciones para aplicación terapéutica.

Ahora bien, para decidir si determinadas partículas magnéticas son o no adecuadas para la hipertermia clínica, es necesario seguir una serie de pasos. Primero se hace una preparación de las mismas como suspensiones en un medio acuoso. Ya sea que las nanopartículas estén encapsuladas o en preparación ferrofluida, el paso siguiente a la preparación está fundamentado en los estudios *in vitro*. Para llevarlos

a cabo se emplea usualmente un cultivo celular sobre el cual se efectúa un estudio de la captación intracelular. Se hace además un ensayo de biocompatibilidad que conlleve a verificar la viabilidad de usar esas células y a la vez analizar la toxicidad en el proceso. Finalmente se hace una valoración de la correlación existente entre muerte celular y campo magnético aplicado para ese tipo de células particular.

Una vez que las partículas han arrojado resultados provechosos de los estudios *in vitro*, se pasa a probar su efectividad en estudios *in vivo*. Para esto se crea un modelo tumoral con animales mediante la selección de diversos tipos celulares cancerígenos. En este modelo se estudia la capacidad de internalización del material magnético y la disipación en otros órganos haciendo histopatologías o análisis químicos. Puede establecerse la disminución del volumen tumoral mediante biopsias o medidas físicas directas. Lo anterior finalmente provee la suficiente información para trabajar sobre la optimización de la metodología basada en el potencial tecnológico y la efectividad de la misma.

Para hacer de la hipertermia una terapia clínicamente establecida y aceptada, hace falta además considerar otros elementos aparte de la inclusión de material biocompatible. A continuación revisaremos algunos experimentos con el objetivo de contextualizar el estado del arte.

1.2. Antecedentes

En una etapa temprana del desarrollo de la técnica de tratamiento de tumores por hipertermia se reportaron en la literatura diversidad de experimentos centrados en demostrar que el método ofrecía resultados convenientes para el control tumoral. Entre estos trabajos se destaca el de Brusentsov et al. (Brusentsov, 2002) [12] quienes básicamente estudiaron en un grupo de 36 ratones con sarcoma MX11 inducido la evolución del volumen tumoral, dividiendo en subgrupos a la población original. Uno de estos subgrupos fue de control, otro fue tratado con inyecciones intratumorales de fluidos magnéticos de dextran-ferrita, y a los otros dos además de administrarles fluidos magnéticos de dextran-ferrita los sometieron a un campo magnético permanente con gradiente de campo fijo. En la figura 1.2 se reproducen los resultados de este trabajo.

Puede verse aquí que los ratones que no fueron tratados presentan un crecimiento del volumen tumoral, al igual que aquellos a los cuales se les inyectó el fluido

magnético pero no se les sometió a ningún otro estímulo. Por el contrario, los grupos que fueron tratados con el fluido de dextran-ferrita y además el campo magnético presentaron una reducción importante del volumen tumoral, alcanzando una regresión completa máxima del 33%. Reportan además un incremento en el lapso de vida del 150% para los ratones tratados en este último caso.

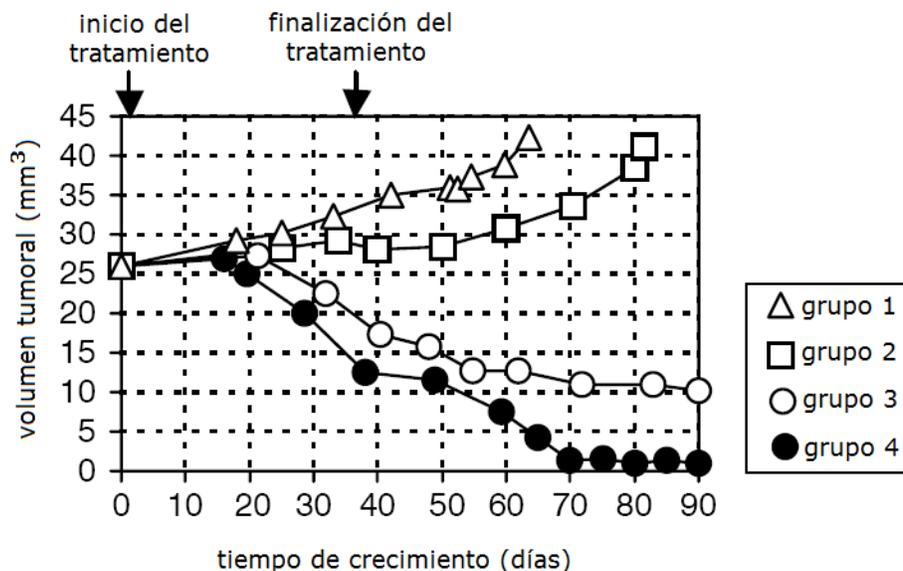


Figura 1.2: Volumen del sarcoma MX11 después del tratamiento por inyección intratumoral de dextran-ferrita (DF) (grupo 2), después del tratamiento con inyección de DF y campo magnético permanente (grupos 3 y 4), y en animales de control (grupo 1).

Los resultados representan la media de cuatro experimentos independientes. Figura reproducida de Brusentsov (Brusentsov, 2002) [12].

Cabe indicar que la reducción del volumen tumoral no es un indicador confiable de control tumoral porque un tumor contiene estroma¹ además de las células cancerígenas, y éste puede estar tan desarrollado en una neoplasia particular generando que ésta muestre una escasa reducción de su volumen. No obstante, lo importante de este estudio es que la disminución del volumen tumoral muestra una íntima correlación con la idea básica de la hipertermia: el calentamiento de las células mediante el uso de nanopartículas magnéticas que interactúan con un campo magnético provee beneficios terapéuticos para tratar un tumor.

¹Tejido conjuntivo laxo compuesto de células no tumorales, vasos sanguíneos y matriz extracelular.

Desarrollos más recientes han estudiado los efectos benéficos del método a pesar de comprometer la eficiencia del mismo. Por ejemplo, en el trabajo de Hilger (Hilger, 2005) [37] se midió el incremento de la temperatura en una zona tumoral y el recto de un grupo de ratones como se muestra en la figura 1.3.

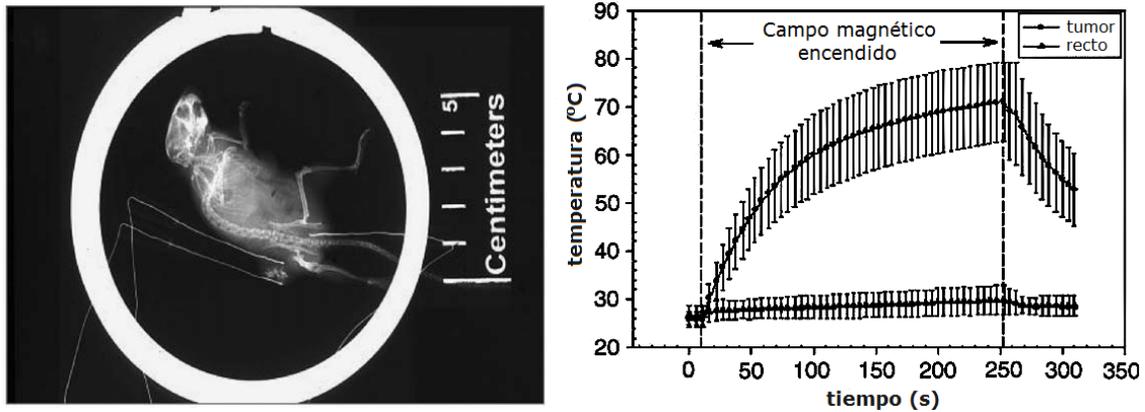


Figura 1.3: Experimento de calentamiento de tumores en ratones. (a) Radiografía mostrando la posición de termosensores en la periferia distal y proximal del tumor. (b) Variación de la temperatura rectal e intratumoral durante la exposición de 10 ratones portadores del tumor sometidos a un campo magnético (frecuencia: 410 kHz, amplitud: 11.06 kOe) por 242 s. Aplicación intratumoral de 21 ± 9 mg de nanopartículas de magnetita recubiertas con dextran. Tomado de Hilger (Hilger, 2005) [37].

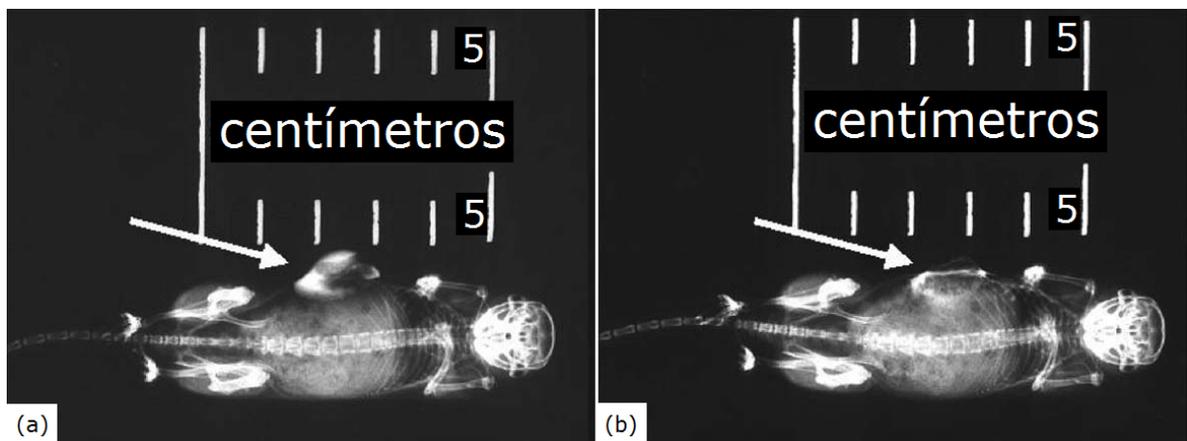


Figura 1.4: Radiografía mostrando las observaciones típicas de un ratón con tumor inducido (a) antes y (b) después de calentamiento magnético del tumor. Tomado de Hilger (Hilger, 2001) [36].

En este experimento se aplicó un campo magnético de gran amplitud y frecuencia por espacio de 242 segundos. En algunos casos, el mismo grupo de trabajo observó un colapso de los tumores implantados como se observa en la figura 1.4, en donde es claro que hubo destrucción celular en el tumor. Nótese que las condiciones experimentales manejan umbrales elevados en parámetros decisivos como la frecuencia y la intensidad de campo. Estos dos factores pueden reducirse ampliamente, optimizando la práctica de tal manera que la cantidad de material magnético que deba usarse sea la mínima.

Asimismo se han presentado resultados alusivos a las ventajas biológicas del tratamiento, por ejemplo un experimento desarrollado por Ito et al. (Ito, 2006) [39], quienes usaron nanopartículas de magnetita en un tumor implantado en los fémures de una rata experimental (modelo de glioma T-9). Sometieron uno de los dos tumores a hipertermia, y encontraron que se presentó una respuesta inmune antitumoral en el otro tumor por la expresión de las HSPs. El tumor no calentado directamente también desapareció. Estudios de este tipo ofrecen una perspectiva enorme en cuanto a la capacidad curativa de la técnica, y son la base de múltiples esfuerzos encaminados a hacer de los tratamientos por hipertermia una realidad colectiva.

1.3. Motivación

Si bien hemos revisado solamente tres ejemplos interesantes de los muchos que se presentan en la literatura acerca del efecto que tiene la técnica de hipertermia en modelos experimentales, resulta natural preguntarse porqué ésta técnica no se aplica actualmente a escala masiva a nivel clínico.

Esta condición puede sustentarse en la dificultad tecnológica asociada principalmente a la marcación tumoral y a la generación de campos magnéticos alternos altamente controlados y precisos. También puede pensarse en otros factores limitantes, como son el malestar que puede llegar a experimentar el paciente, la viabilidad de usar la técnica en ciertos tumores específicos, la relación de superficie/volumen de las nanopartículas que puede no ser suficiente para ingresar en algún sitio específico del organismo, la perfusión sanguínea, etcétera. Aún así en la literatura se ha reportado el uso de hipertermia para tratar tumores superficiales con resultados positivos, y numerosos casos en los que también se ha empleado para tratar tumores profundos. (Franckena, 2009; Hildebrandt, 2002; Johannsen, 2007; Maier, 2007), [20, 35, 41, 50]

Retomando lo anterior, la respuesta parece tener una raíz más primitiva: los

parámetros fundamentales asociados a la técnica de hipertermia no han sido completamente entendidos. Por esta razón la potencialidad terapéutica de este tipo de tratamientos no se ha explotado correctamente. Algunas inconsistencias que presenta el método en la actualidad son:

- ⊙ Falta entender completamente el proceso de calentamiento de las nanopartículas magnéticas dentro del tumor. Para esto es necesario correlacionar la interacción entre los diferentes parámetros que influyen en dicho calentamiento, considerando además factores biológicos propios del organismo, como son la perfusión sanguínea y la oxigenación tumoral. Por ejemplo, aunque la potencia crece con un campo magnético más intenso y también con la frecuencia, estos parámetros no se pueden incrementar por encima de un valor crítico porque se debe prevenir el calentamiento inductivo del tejido sano.
- ⊙ No se han estudiado exhaustivamente las variables que deben ajustarse para tratar diferentes tumores, como son volúmenes hidrodinámicos, tipos de fluidos magnéticos, frecuencia e intensidad de campo magnético, entre otros. Esto es un requisito necesario para optimizar las propiedades magnéticas en aras de emplear la concentración de nanopartículas más baja posible que ofrezca suficiente efectividad. Una distribución adecuada de las nanopartículas dentro del tumor es esencial para evitar la ocurrencia de áreas con defecto o exceso de temperatura que llevarían a dar un mal tratamiento.
- ⊙ A nivel experimental se requiere un mayor control sobre las distribuciones de tamaño de las nanopartículas, así como también un estudio más detallado de la biocompatibilidad de las mismas según los recubrimientos.
- ⊙ Se requiere profundizar en estudios sobre el mecanismo de captación de las nanopartículas en los tejidos tumorales que puedan ofrecer una base biológica válida para el desarrollo de protocolos de tratamiento. Además, no existe mucha información acerca del proceso que sigue a la captación de las nanopartículas, referido a la opsonización del material magnético a nivel celular.
- ⊙ No encontramos reportes en la literatura de ningún método dirigido a cuantificar la cantidad de nanopartículas magnéticas en las zonas de interés en sistemas *in vivo*. Los estudios se limitan a reconocer las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión en análisis histológicos, o bien a identificar la presencia de hierro en un tejido tumoral por otros métodos, como

marcación con azul de prusia. Aún así, es imperativo manejar una herramienta de cuantificación de energía térmica como evento previo a la determinación de distribuciones de energía térmica en las zonas tumorales.

Los anteriores puntos requieren atención para poder entender aspectos inciertos de la hipertermia que permitan estimar su plausibilidad. Luego, es de particular interés proveer información detallada de los elementos que en este caso forman el empalme entre la posibilidad de realización de una técnica y la materia prima para su ejecución. En esta tesis hemos abordado algunos de dichos puntos con el objetivo de aportar a su esclarecimiento.

Nuestro enfoque parte del estudio de propiedades de nanopartículas de magnetita recubiertas con diferentes tipos de surfactantes que tienen potencial aplicación en hipertermia. Buscamos entender el proceso de calentamiento de las nanopartículas mediante determinaciones experimentales que están en concordancia con los modelos teóricos expuestos caracterizando las muestras de material magnético y evaluando el comportamiento de las nanopartículas respecto a diferentes variables. También proponemos un método de cuantificación para determinar la cantidad de nanopartículas presentes en un tejido para estudios *in vivo* apoyado en resultados previos, lo cual, como se mencionó anteriormente, no tiene una contraparte hasta la actualidad.

1.4. Estructura de la tesis

En esta tesis empleamos diversos recubrimientos para las nanopartículas de magnetita, a saber: ácido oleico, polietilenimina, polietilenglicol, DEXTRAN y silica. La influencia de las diferentes superficies en el desempeño de las nanopartículas junto a un análisis más detallado de algunas propiedades tanto magnéticas como no magnéticas conforman la estructura de esta tesis. A lo largo de la misma se trabaja con el sistema cegesimal de unidades (cgs). A manera de guía, el contenido de los capítulos puede sintetizarse en:

- ⊙ Capítulo 1: Introducción. Revisión de antecedentes y motivación.
- ⊙ Capítulo 2: Generalidades sobre las nanopartículas de magnetita. Introducción a la técnica de hipertermia. Esquema teórico fundamental de los monodominios y el superparamagnetismo. Mecanismos de relajación de Néel y Brown.

-
- ⊙ Capítulo 3: Curvas de magnetización y determinación experimental de las mismas. Síntesis de nanopartículas de magnetita y definición del índice de absorción específico.
 - ⊙ Capítulo 4: Determinación experimental de propiedades magnéticas (magnetización en función de temperatura y campo) y no magnéticas (morfología, índice de absorción específico). Discusión de los resultados obtenidos.
 - ⊙ Capítulo 5: Determinación de la cantidad de nanopartículas presentes en un tejido por mediciones de magnetización. Resultados de un experimento de captación natural.
 - ⊙ Capítulo 6: Conclusiones de la tesis.

*Gentlemen, to you the first honors always!
Your facts are useful, and yet they are not my dwelling,
I but enter by them to an area of my dwelling.
(Fragment of Song of Myself)*

Walt Whitman (1819-1892)

2

Nanopartículas magnéticas

Una nanopartícula magnética es una partícula de tamaño nanométrico formada por un núcleo inorgánico magnético que puede estar rodeado por una sustancia con componentes orgánicos capaces de recubrir la partícula, conocida como surfactante. En muchos casos, esta sustancia es necesaria porque si una nanopartícula consistiera únicamente en el centro magnético, éste se oxidaría rápidamente al interactuar con un medio acuoso, lo cual lo inutilizaría para aplicaciones biológicas de interés.

El surfactante influye en la forma, tamaño y estructura de las nanopartículas, las solubiliza, previene que se aglomeren por repulsiones estéricas, posibilita su biocompatibilidad al contener moléculas que se asocian selectivamente a tejidos de interés y las protege de la oxidación.

Cabe resaltar que el tamaño de las partículas resulta ser un concepto ambiguo, primero porque pueden definirse diferentes partes de la nanopartícula: la parte cristalina del interior, la coraza magnética, el recubrimiento, la capa hidratada, o cualquier otra dimensión no necesariamente relacionada con la geometría, y segundo, porque en casi todos los casos las nanopartículas tienen un carácter polidisperso. (Laurent, 2008) [47]

En la figura 2.1 puede verse esquemáticamente la estructura de una nanopartícula magnética utilizable en aplicaciones biológicas o médicas. En este capítulo se introducirán los fundamentos de la hipertermia, los monodominios magnéticos, el

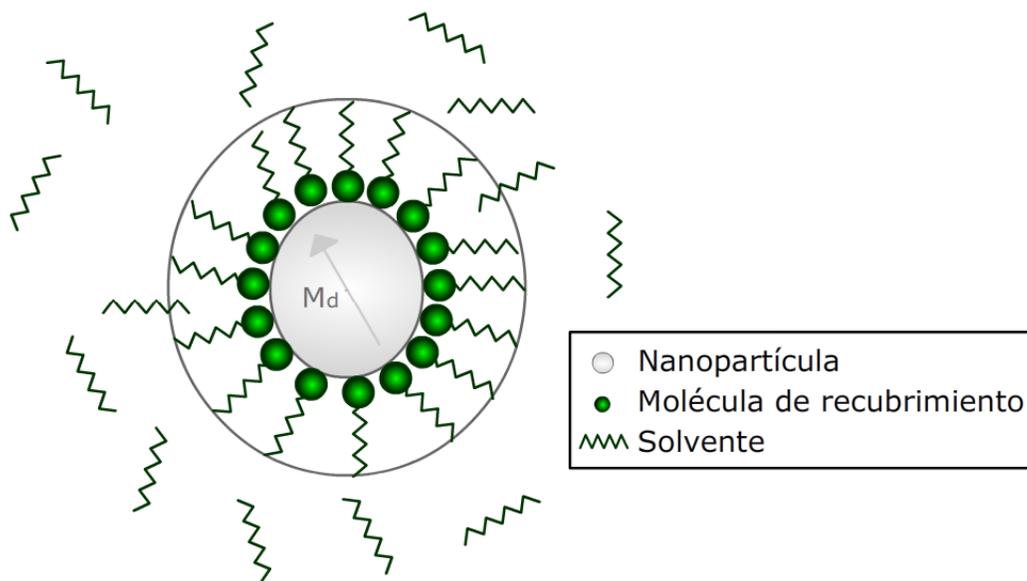


Figura 2.1: Esquema de una nanopartícula magnética con aplicación biológica. Se presenta la capa surfactante y las moléculas que componen el recubrimiento.

superparamagnetismo y los mecanismos de relajación de Néel y de Brown.

El comportamiento de las nanopartículas magnéticas durante el proceso relativo a la técnica de hipertermia que introducimos de forma tan general es un asunto que debe examinarse cuidadosamente.

Inicialmente, la síntesis de las nanopartículas origina un reto importante porque se busca tener el máximo control sobre su tamaño, su carga superficial, y su estabilidad. Esto último se debe a que los procesos metabólicos que suceden en el organismo se dan en un medio acuoso en constante adaptación, y se espera que las nanopartículas puedan fijarse en sitios específicos sin perder sus propiedades por las características del medio. Lo anterior requiere que se consideren otras componentes, por ejemplo, asegurar que las nanopartículas sean biocompatibles, no tóxicas, que no se aglomeren y a la vez puedan mantener su aislamiento con respecto a las demás, entre muchos otros factores.

Una vez que las nanopartículas ingresan al organismo, ya sea por vía intravenosa o intratumoral, pueden presentarse esencialmente dos eventos de captación: marcación externa de las células tumorales o endocitosis diferencial. En este último caso, la célula incorpora las nanopartículas a su interior, y se hace posible la hipertermia

intracelular. Dicho comportamiento cede cierta selectividad que puede resultar muy provechosa para el tratamiento particular.

Una vez que las nanopartículas han cumplido su objetivo pasan por un proceso de opsonización¹ en el cual son marcadas para ser posteriormente absorbidas por macrófagos y finalmente son eliminadas. Por todo lo anterior, para que la técnica completa sea exitosa resulta primordial asegurar un nivel óptimo en cada detalle del proceso.

2.1. Hipertermia

Cuando un sistema de nanopartículas magnéticas se somete a un campo magnético oscilante, éstas absorben energía que luego se transforma en calor, principalmente por cuatro procesos: corrientes de fuga, histéresis, relajación y resonancia. El primero de estos mecanismos usualmente se desprecia por la baja conductividad eléctrica que tienen las nanopartículas, y por la no interacción entre ellas, la cual previene este tipo de pérdidas. El último de estos cuatro mecanismos, se desprecia por la baja frecuencia del campo aplicado. No obstante, el segundo y tercero de estos mecanismos son los que más influyen en el calentamiento de las nanopartículas. En el caso de pérdidas por relajación, se recurre a los mecanismos de Néel (relajación de los monodominios superparamagnéticos) y Brown que se explicaran más adelante (sección 2.4).

El tratamiento de tumores con temperatura es una línea que maneja principalmente dos orientaciones: termoablación e hipertermia.² (Berry, 2003) [6] En la termoablación se debe considerar la sensibilidad de las células normales a las temperaturas de trabajo (que rondan los 55°C), y por lo tanto se ven afectadas. Esta técnica deriva en la destrucción del tumor por necrosis celular directa, coagulación o carbonización. (Mornet, 2004) [52] Debido a esto se busca ubicar las partículas lo más concentradas posible en la región tumoral para evitar hacer daño excesivo al tejido normal.

¹Es un proceso de aglutinación de agentes patógenos provocado por proteínas plasmáticas, inmunoglobulinas, interleuquinas, proteínas del sistema del complemento que culmina con la destrucción por fagocitosis de los agentes patógenos.

²La termoablación induce efectos biológicos distintos a los que se obtienen con la primera, por lo cual no se clasifica dentro de la hipertermia.

Por otra parte, la hipertermia es una técnica mínimamente invasiva que se basa en calentar las células³ de un tejido a temperaturas entre 41°C y 46°C aproximadamente, hasta el punto de generar la destrucción por apoptosis de las mismas. Se busca lograr tal aumento de la temperatura por aproximadamente 30 minutos para obtener un efecto terapéutico. A propósito, con excepción del sistema nervioso central, la mayoría de los tejidos en el cuerpo humano pueden soportar hasta 44°C por una hora. (Hall, 2006) [31]

A pesar de que la idea de tratar tumores por hipertermia ha existido desde hace siglos, fue en 1971 cuando se publicaron resultados del primer experimento en el tema analizando células de mamífero. A partir de entonces se empezó a estudiar el comportamiento en células y tejidos que se someten a diferentes temperaturas. De este modo, se desarrolló en 1975 el International Symposium on Cancer Therapy by Hyperthermia and Radiation, el cual generó muchas expectativas positivas para trasladar a procedimientos *in vivo* la técnica. No obstante, los resultados que se venían obteniendo con los experimentos *in vitro* no cumplieron con las expectativas en los ensayos clínicos⁴. (Herrera, 2009) [34] En 1957, Gilchrist *et al.* (Gilchrist, 1957) [22] pusieron en evidencia tal comportamiento de las nanopartículas. Propusieron la idea de tratar tumores con óxidos de hierro en un estudio que realizaron calentando selectivamente muestras de tejido de nódulos linfáticos usando nanopartículas de maghemita⁵ con fines de destruir células tumorales remanentes en éstos empleando un campo magnético alterno de 1.2MHz. Éste fue el primer reporte de tratamiento de tumores con temperatura.

Es conocido que las células cancerígenas son más sensibles a los efectos de la temperatura que las células normales. (Jordan, 1999; Mornet, 2005) [42, 52] El tratamiento por hipertermia induce un aumento de la perfusión en el tejido tumoral, por lo tanto se produce un incremento en la oxigenación del mismo que deriva en más radiosensibilidad. Es por esto que se ha propuesto trabajar la hipertermia conjuntamente con la radioterapia y eventualmente con la quimioterapia, para

³El calentamiento de las nanopartículas se lleva a cabo principalmente por pérdidas durante la reorientación de la magnetización, o por pérdidas por fricción si la partícula puede rotar en un ambiente que se lo permita. El calentamiento de las células se presenta por disipación de calor.

⁴Una de las razones del fallo es que la habilidad de las partículas magnéticas para concentrarse en el tumor depende del flujo sanguíneo y de la intensidad del campo magnético. (Berry, 2003) [6] Además, en dichos ensayos pudo presentarse una exposición de los tumores a temperaturas subóptimas.

⁵Producto típico de la oxidación de la magnetita: $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

obtener un efecto sinérgico. (Mornet, 2005) [52] Numerosos estudios han indicado que pacientes tratados con una combinación de radioterapia e hipertermia han respondido con más beneficio que pacientes tratados únicamente con radioterapia en algunos tipos particulares de tumores. Contrariamente hay pocas evidencias, la mayoría ensayos comparativos, en donde se ha estudiado el efecto combinado de la hipertermia con la quimioterapia. (Hildebrandt, 2002) [35]

Ahora bien, la incorporación de las partículas magnéticas al tejido tumoral se lleva a cabo principalmente por la inyección de un ferrofluido que las contiene, del cual se espera que sea estable, contenga polímeros biocompatibles y sea de carácter acuoso para evitar que haya toxicidad (Buzea, 2007) [13] una vez que se introduce en el cuerpo humano ya sea por vía intravenosa o intratumoral. Adicionalmente hay una relación muy fuerte entre el calentamiento de las nanopartículas y el tipo de suspensión en la cual se encuentran, mostrando que la optimización del procedimiento exige condiciones adicionales sobre los fluidos que se emplean.

Entre los retos más marcados que tiene la hipertermia hoy en día se encuentra la capacidad de señalar la cantidad precisa de material magnético que se debe introducir al paciente junto con el tiempo que se debe ajustar el tratamiento para el tipo particular de cáncer. Además, es esencial que se empleen nanopartículas con alta capacidad de disipación de potencia, que no se precipiten por la gravedad o por fuerzas electrostáticas y que además haya un control sobre la homogeneidad de la distribución de temperatura en la región a tratar, para reducir los riesgos de hacer daño al tejido sano.

El comportamiento de las células una vez que se calientan puede cambiar y aún no hay un modelo que pueda explicar el mecanismo exacto de dicho proceso. Existen estudios que señalan que las células tumorales aumentan la expresión de proteínas HSPs (Heat Shock Proteins) como una respuesta propia al estrés celular. Este tipo de reacción induce inmunidad antitumoral, lo cual es otra razón más para buscar la ventaja que ofrece el calentamiento localizado de las células tumorales. (Ito, 2006) [39]

Por otro lado, el entorno en el cual se depositan las partículas afecta directamente diversas características biofísicas de éstas, como la viscosidad y la conductividad térmica, factores que deben considerarse al proponer modelos que puedan explicar el proceso de calentamiento. La acción conjunta de todos los mecanismos moleculares subyacentes a la hipertermia se encuentra aún en investigación. No es uno de los temas principales de esta tesis abordar la transformación bioquímica mediante la

cual se produce el daño de las células tumorales, sin embargo, en el apéndice A se encuentra una sinopsis orientada a ilustrar aspectos biológicos de este cambio.

2.1.1. Aspectos técnicos

Entre los múltiples aspectos técnicos a destacar se mencionará brevemente uno: para efectuar un tratamiento por hipertermia una de las limitaciones que se presenta es la tolerancia al calor que presentan las células normales del paciente. Es conocido que un campo magnético alterno que genera corrientes de fuga en un paciente puede llegar a entregar energía suficiente para afectar al tejido tumoral, pero también al tejido sano porque no es selectivo. Entonces se requiere un límite que impida que el tejido normal se vea comprometido. De acuerdo a la ley de inducción la potencia para el calentamiento depende de la frecuencia f del campo aplicado y el cuadrado del producto entre el campo aplicado H y el diámetro del dispositivo inductor de corriente D . (Cantillon, 2008) [14]

Experimentalmente Brezovich (Brezovich, 1988) [9] determinó un valor estimativo de dicho límite efectuando experimentos en voluntarios. De ese estudio, concluyó que para una bobina de 30 cm de diámetro, Hf debería ser máximo 3.86×10^{10} Oe/s. (Hergt, 2006) [33] En la tesis se ha trabajado con un circuito que genera un campo de ≈ 122 Oe a frecuencia de 115 kHz, con lo cual Hf resulta 1.4×10^7 Oe/s. Sin embargo, no se hace ninguna afirmación que vincule el resultado con el límite propuesto por Brezovich, puesto que se desconoce la viabilidad de suponer una relación lineal y extrapolar a diámetros más pequeños, como en el presente caso.

2.2. Monodominios magnéticos

Una vez que se ha introducido el concepto de nanopartícula y se ha esbozado su influencia en el mecanismo de hipertermia, se procede a estudiar la física que tiene lugar en este ámbito.

Se sabe que un material magnético macroscópico se divide en dominios magnéticos disminuyendo así la energía cuando no está sometido a un campo magnético externo. Dentro de estos dominios la magnetización local está saturada. Estas regiones están separadas por paredes de dominios, que se conocen como paredes de Bloch, y su formación está sujeta a varias contribuciones de la energía, como son

la de intercambio, la de anisotropía, y la magnetostática. (Kittel, 1986) [44] Una generalidad que puede establecerse es que la estructura de dominios siempre tiene su origen por la necesidad de minimizar la energía de un sistema pasando de un estado saturado que tiene alta energía magnética a otro con menor energía. (Kittel, 1986) [44]

A medida que un material se va haciendo cada vez más pequeño el seccionamiento por dominios experimenta cambios que van requiriendo más energía, de tal forma que por debajo de un cierto tamaño crítico ya no es factible la creación de dominios por el costo energético que implica, y se tienen entonces partículas monodominio. Esencialmente la teoría de las partículas monodominio consiste en dos partes: la determinación de las condiciones para que exista el estado de monodominio y el cálculo de las propiedades magnéticas con la suposición de que la partícula está en ese estado. (Brown, 1963) [11]

La existencia de las partículas monodominio fue propuesta en 1950 por Kittel, Galt y Campbell (Kittel, 1950) [45], quienes estudiaron la respuesta de nanopartículas magnéticas suspendidas en una matriz no magnética al campo mínimo requerido para magnetizar muestras de hierro y níquel. Usaron bajas concentraciones de partículas para asegurar que la interacción entre ellas fuera despreciable. Bajo estas condiciones, el campo necesario para alcanzar la saturación es considerablemente mayor para partículas multidominio que para partículas monodominio. Obtuvieron determinaciones sobre los campos de saturación, y a partir de los datos comprobaron la presencia de partículas cuya energía de intercambio era comparable a la energía de demagnetización, lo cual, si no eran partículas monodominio, estaban muy cerca de serlo. (Kittel, 1950) [45]

Se ha mencionado que la energía total es el resultado de la contribución de varias energías.⁶ Luego, la energía de las paredes de Bloch puede expresarse como:

$$E = Js^2\pi^2 + K_a d \quad (2.1)$$

en donde J es la constante de intercambio entre los espines s , K_a es la constante de anisotropía y d es el ancho de pared de dominio, que a su vez está dado por:

$$d = s\pi\sqrt{\frac{J}{aK_a}} \quad (2.2)$$

⁶La derivación de las expresiones puede consultarse en (Kittel, 1986) [44] en el capítulo 15 de Introduction to solid state physics.

donde a es el parámetro de red del material. De esta relación puede verse que el tamaño de pared depende de la relación entre las energías de intercambio y de anisotropía.

En la literatura para nanopartículas de magnetita⁷ se reporta $d \simeq 100$ nm (Kittel, 1986) [44]. Las nanopartículas que se han sintetizado y caracterizado en este trabajo tienen tamaños entre 5 nm y 26 nm aproximadamente, por lo cual, según la información anterior, se trata de partículas monodominio.

2.3. Superparamagnetismo

Se ha establecido que el tamaño de grano de un material magnético al reducirse a escala nanométrica presenta cambios en sus propiedades físicas, y el material se considera como un sistema de nanopartículas magnéticas. En un sistema con esta característica, es claro que puede manipularse la población con campos magnéticos externos, y más aún, que es posible inducir resonancia en el mismo con la aplicación de campos variables en el tiempo.

Por otra parte, en tales nanopartículas los dominios magnéticos que se tenían en un nivel macroscópico presentan una alteración profunda al disminuir sus dimensiones. En este caso se hace comparable el tamaño de la pared de los dominios con el tamaño de las partículas, y la energía que se requiere para crear un sistema multidominio provoca un aumento en la energía total del sistema. De esta manera las nanopartículas se transforman en estructuras de monodominio al disminuir de cierto tamaño crítico que depende del material, como se presentó en la sección 2.2.

En la evolución del concepto de monodominio, la referencia clara es que una partícula de único dominio se encuentra en un estado de magnetización uniforme en cualquier campo. (Bean, 1959) [5] Este comportamiento de la magnetización es idéntico al del paramagnetismo atómico, es decir, al fenómeno de la alineación de los momentos magnéticos libres con respecto a un campo magnético aplicado, con la diferencia de que el momento magnético en las nanopartículas con monodominios es mucho más grande, lo cual implica que se manejen altas susceptibilidades. A este

⁷La magnetita es un cristal ferrimagnético, término que describe un tipo de ordenamiento de spin que comprende casi cualquier componente en el cual algunos iones tienen un momento magnético antiparalelo a otros iones. (Kittel, 1986) [44]

comportamiento con momentos magnéticos muy grandes aún en presencia de campos magnéticos débiles, se lo conoce como superparamagnetismo⁸.

En 1959, Bean y Livingston (Bean, 1959) [5] expusieron los fundamentos de la teoría superparamagnética, en donde plantearon que los momentos magnéticos en un conjunto de partículas no interactuantes tienen un movimiento coherente en el interior de cada partícula, pudiéndolos describir a través del momento magnético atómico μ_{at} y el número N total de átomos magnéticos que conforman la partícula, quedando el momento magnético dado por $\mu = N\mu_{at}$.

La dirección del momento magnético depende de la anisotropía propia de la partícula y del campo magnético externo, lo cual caracteriza el eje de fácil magnetización, que es una dirección preferencial en la cual se sitúa el vector de momento magnético. Una vez que se retira el campo magnético, la magnetización sigue un comportamiento que puede describirse con una ley tipo Arrhenius⁹, a saber:

$$M(t) = M_0 e^{-t/\tau} \quad (2.3)$$

en donde $M(t)$ es la magnetización en función del tiempo, M_0 es la magnetización inicial, t es el tiempo después de que se suspende la aplicación del campo, y τ es el tiempo de relajación o tiempo característico del decaimiento, dado a su vez por:

$$\tau = \tau_0 e^{K_a V / k_B T} \quad (2.4)$$

con τ_0 el tiempo característico del sistema, el cual está asociado a la frecuencia de intentos de cambios del momento magnético de la partícula entre los sentidos opuestos del eje de fácil magnetización y usualmente se encuentra entre 10^{-9} s y 10^{-11} s, K_a es la constante de anisotropía magnética, V es el volumen de la partícula, k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura del sistema. No obstante, este comportamiento exponencial en sistemas reales en los cuales se tiene una distribución de energías como consecuencia de la distribución de tamaños de las nanopartículas, no se presenta.

⁸Cabe destacar que en general cuando las nanopartículas de un material tienen diámetros menores de aproximadamente 30 nm presentan comportamiento monodominio dependiendo del material. (Bean, 1959) [5]

⁹El factor de Arrhenius $e^{-\Delta E / k_B T}$ es empleado para explicar el comportamiento de múltiples fenómenos asociados a procesos de activación en función de la temperatura T , es decir, cómo un sistema físico puede escapar de un estado metaestable como consecuencia de las fluctuaciones térmicas que experimenta. En este factor ΔE es el cambio de energía entre los estados y k_B es la constante de Boltzmann.

Puede decirse entonces que el superparamagnetismo es el resultado de la fluctuación térmica de los momentos de nanopartículas no interactuantes, en donde la energía de anisotropía dependiente del volumen ($K_a V$) de cada partícula es fácilmente superada por la energía térmica ($k_B T$). (Hariharan, 2005) [32]

Es interesante notar además que las nanopartículas superparamagnéticas conservan su momento magnético alineado aleatoriamente en la ausencia de un campo magnético, por lo cual no presentan ni remanencia magnética ni campo coercitivo, de lo cual se hablará con detalle más adelante.

2.3.1. Anisotropía

La anisotropía es la ruptura de la simetría esférica del entorno del momento magnético en direcciones privilegiadas.¹⁰ Hay varios tipos de anisotropía, siendo el más común la anisotropía magnetocristalina, causada porque la interacción spin-órbita produce que la distribución de cargas de iones cercanos no sea esférica sino esferoidal. De esta forma, la contribución de la energía de anisotropía se debe a interacciones electrostáticas asociadas a distribuciones electrónicas, y se presenta porque la órbita de los electrones, ligada a la estructura cristalográfica, genera que ésta prefiera alinearse a lo largo de ejes cristalográficos bien definidos conocidos como ejes de fácil magnetización.¹¹ Así resultan direcciones en el espacio en las cuales es más fácil magnetizar un cristal que en otras, y tal preferencia puede expresarse mediante un término de energía que depende de la dirección. (Aharoni, 2000) [1]

Otros tipos de anisotropía son la magnetostática o energía de forma, que es la energía requerida por una partícula para crear su campo; la de superficie, que se debe a las distorsiones del cristal que modifican la anisotropía magnetocristalina; y la anisotropía por interacción, que se produce por las interacciones que modifican la barrera de energía según la simetría de la anisotropía.

La energía de anisotropía uniaxial está dada por:

$$E_a = K_a V \sin^2 \theta \quad (2.5)$$

¹⁰Una definición más general establece que la anisotropía es la no homogeneidad que se presenta en ciertos materiales en algunas propiedades al ser medidas en diferentes direcciones.

¹¹Debido a que es mucho más fuerte el acoplamiento entre los orbitales y la red cristalina en los 3d, los espines electrónicos podrán reorientarse recién cuando la energía que gane el sistema sea mayor a la energía del acoplamiento spin-órbita. (Curiale, 2008) [15]

con K_a la constante de anisotropía magnética por unidad de volumen, V el volumen de la partícula y θ el ángulo entre el momento magnético de la partícula y el eje de anisotropía paralelo a la dirección z , como es el caso representado en la figura 2.2.

Esencialmente, el campo de anisotropía recibe cuatro contribuciones: primero, la anisotropía magnetocristalina que depende de la composición química y la estructura cristalográfica del material; segundo, el campo demagnetizante determinado por la forma de la partícula (para una esfera, la anisotropía de forma es nula); tercero, la constante de anisotropía la cual depende de la estructura superficial de la partícula; y cuarto, para estructuras aglomeradas, la interacción dipolar entre dos partículas vecinas. (Laurent, 2008) [47]

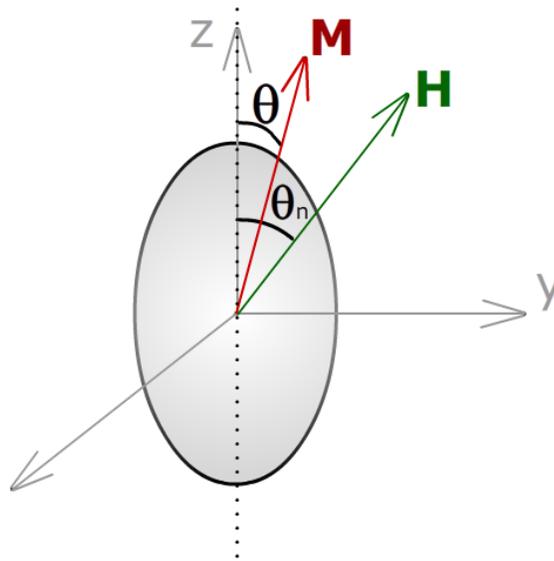


Figura 2.2: Esquema del eje de anisotropía (línea punteada) de una partícula monodominio, junto con el vector de magnetización y de campo aplicado. Aquí el ángulo θ está definido entre el vector de magnetización y eje de anisotropía, y el ángulo θ_n está definido entre el campo aplicado y el eje de anisotropía.

Es común proponer que la anisotropía tiene una simetría uniaxial. A pesar de que esta suposición no es válida estrictamente, es razonable para sistemas de más alta simetría basados en modelos cúbicos. Para considerar simetrías más complejas se deben tener en cuenta múltiples contribuciones para evaluar la anisotropía de un sistema. (Laurent, 2008) [47] Finalmente, el campo de anisotropía magnética

está dado por $H_a = 2K_a/M_S$ donde M_S es la magnetización de saturación.¹²

2.4. Mecanismos de relajación

Dentro de un ferrofluido las nanopartículas monodominio se encuentran en un estado superparamagnético y tienen sus momentos orientados al azar. Por esta razón, en ausencia de campo magnético, la suspensión no presenta magnetización neta. Cuando se aplica un campo magnético alterno, las nanopartículas reciben energía del campo que impulsa a sus momentos magnéticos a rotar en pro de vencer la barrera de energía generada principalmente por la anisotropía para alinearse con el campo.

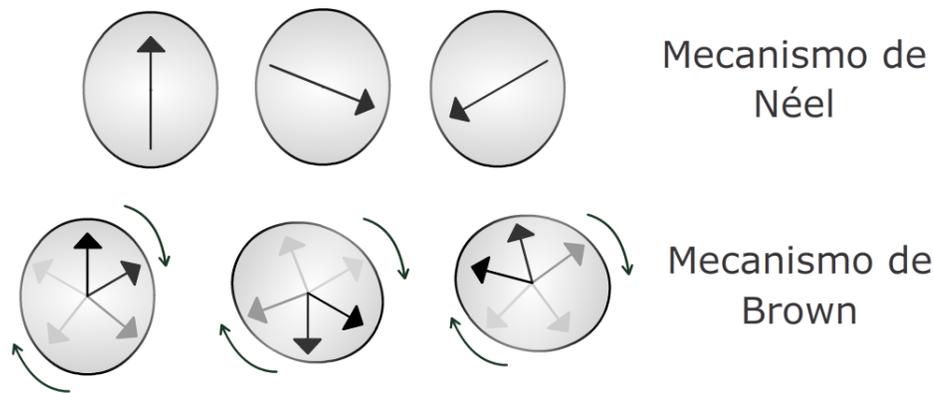


Figura 2.3: Representación esquemática de los mecanismos de relajación de Néel y de Brown.

Se hace natural considerar que la rotación de los momentos puede darse de dos formas diferentes. Por una parte, en la nanopartícula se puede presentar una rotación del vector de momento magnético sin que haya una rotación mecánica de la misma, y por otro lado, la partícula puede rotar manteniendo su momento magnético en la misma dirección con respecto a ella por efecto del torque ejercido por el campo sobre el momento, de tal forma que su rotación física permite que se dé la alineación.

¹²En realidad las nanopartículas magnéticas no son totalmente esféricas, lo cual conlleva a que presenten anisotropía por su forma. Este término de anisotropía cristalina es menor que la anisotropía asociada a un sistema en el cual se tiene anisotropía uniaxial, por lo cual considerar este último factor como el más influyente es razonable para efectos del interés de esta tesis. (Aharoni, 2000) [1]

La elección de uno u otro mecanismo depende principalmente del tamaño de las partículas.

Para partículas pequeñas, el mecanismo dominante se debe a la rotación del vector magnético dentro de la partícula, y está gobernado por la relajación de Néel. Para partículas grandes, la relajación de Brown se explica por la rotación de la partícula dentro del líquido transportador.

La dinámica relativa a la alineación de la partícula con el campo magnético aplicado está dada por el tiempo de relajación del ferrofluido, que puede expresarse como:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (2.6)$$

en donde τ_N y τ_B son el tiempo de relajación de Néel y de Brown respectivamente. En la figura 2.3 se muestra esquemáticamente en qué consiste cada uno de dichos mecanismos.¹³

Ahora bien, el modelo de Stoner-Wohlfarth (Stoner, 1948) [64] describe sistemas magnéticos que satisfacen ciertas propiedades. Los elementos que componen el sistema deben ser monodominios magnéticos, poseer anisotropía con simetría uniaxial y no presentar interacción entre ellos. Por añadidura se asume que la rotación del momento magnético de cada uno se presenta en forma global. En nuestro caso, se trata efectivamente de nanopartículas magnéticas monodominio que satisfacen dichas condiciones. A continuación se describirán los fundamentos de dicho modelo, y se unirán a los modelos de relajación de Néel y Brown.

2.4.1. Modelo de Néel

En la ecuación 2.4 el producto $K_a V$ representa la energía de barrera que es introducida principalmente por la anisotropía propia de la partícula. La anisotropía conjuntamente con el superparamagnetismo muestran una fuerte dependencia con el tamaño, la forma y la composición química de las nanopartículas. (Vargas, 2005) [68]

Consideremos un ensamble de átomos ordenados magnéticamente con $T < T_{\text{Curie}}$ o $T < T_{\text{Néel}}$. Se tiene que la energía magnética de una partícula con anisotropía

¹³Para partículas grandes, $\tau_B \ll \tau_N$ porque la componente browniana de la relajación magnética es proporcional al volumen del cristal, y la relajación de Néel es una función exponencial del volumen. (Laurent, 2008) [47]

uniaxial¹⁴ puede expresarse como:

$$E = K_a V \sin^2 \theta \quad (2.7)$$

donde K_a es la constante de anisotropía por unidad de volumen, V es el volumen de la partícula y θ es el ángulo entre el momento magnético de la partícula y el eje de anisotropía paralelo a la dirección z . En la figura 2.2 se observa la disposición de los vectores de magnetización y campo aplicado junto con los ángulos correspondientes.

Como la energía E (ecuación 2.7) tiene dos mínimos equivalentes que corresponden a direcciones opuestas de la magnetización, en $\theta = 0$ y $\theta = \pi$, dichos mínimos determinan que el eje de anisotropía sea el más favorecido para la alineación del momento magnético.

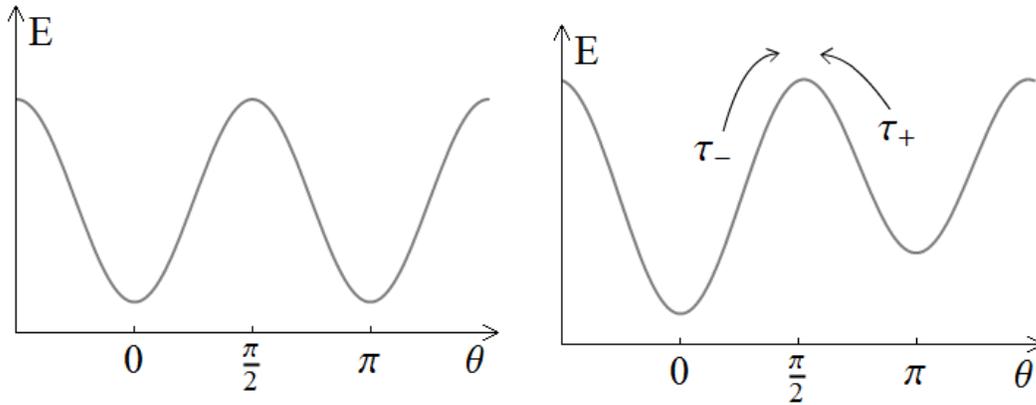


Figura 2.4: (a) Energía magnética de una nanopartícula con anisotropía uniaxial en función del ángulo θ entre el eje de magnetización y el eje de anisotropía, definido en la figura 2.2 y dada por la ecuación 2.7. (b) Idem anterior para una nanopartícula con anisotropía uniaxial que se somete a un campo magnético, dada por la ecuación 2.8.

En la figura 2.4(a) se muestra la energía definida en la ecuación 2.7 en función del ángulo θ . Ahora bien, una vez que se aplica un campo magnético $\vec{H} = H\hat{k}$ se presentan cambios en el nivel energético en cada una de éstas orientaciones, haciendo que haya una descompensación en una de ellas, y en la otra el sistema permanezca en un estado metaestable.

¹⁴La anisotropía de cristales hexagonales, que es función de un parámetro solamente: el ángulo θ entre el eje c (eje rotativo que describe el movimiento alrededor del eje z) y la dirección de la magnetización.

En este caso, la energía magnética que se tenía en la ecuación 2.7 cambia, y resulta dada por:

$$E = K_a V \sin^2 \theta - H \mu \cos(\theta_n - \theta) \quad (2.8)$$

en donde θ_n es el ángulo entre el campo magnético y el eje de anisotropía como se observa en la figura 2.2, H es la magnitud del campo magnético aplicado y μ es el momento de la partícula. Este cambio que genera la presencia de \vec{H} desequilibra la simetría en la inversión de la magnetización, lo cual origina que la altura de la barrera de energía cambie y que entonces se tengan probabilidades diferentes según la dirección de salto de la barrera, con tiempos característicos τ_+ , asociado a la menor barrera (y por consiguiente más corto), y τ_- , asociado a la mayor barrera (y por consiguiente más largo), como se esquematiza en la figura 2.4(b).

El tiempo de relajación observable queda entonces dado por:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_+} + \frac{1}{\tau_-} \quad (2.9)$$

El equilibrio puede volverse inestable para cierto valor del campo aplicado, lo cual genera una rotación irreversible de la magnetización en la dirección del campo. No obstante, justo antes de alcanzar ese valor crítico de campo, la barrera de energía entre los dos estados se va haciendo cada vez más pequeña, tanto así que la agitación térmica puede producir una transición espontánea durante un intervalo de tiempo comparable al tiempo de medición. En el caso en que el tiempo de relajación sea mucho menor al tiempo de medida, se obtiene un comportamiento superparamagnético de la partícula. (Bean, 1959) [5]

Finalmente, el tiempo de relajación de Néel a campo aplicado nulo está dado por:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_a V}{k_B T}} \quad (2.10)$$

2.4.2. Modelo de Brown

El modelo para el mecanismo de relajación propuesto por Brown contempla que el momento magnético está ligado al eje del cristal, de tal manera que cuando la partícula interactúa con un campo magnético externo, como producto del torque que se produce, ésta rota para que se dé la alineación del momento con el campo.

El tiempo de relajación de Brown está dado por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (2.11)$$

con η la viscosidad dinámica del líquido transportador y V_H el volumen hidrodinámico (es decir, con surfactante) de las nanopartículas. El volumen hidrodinámico es más grande que el volumen magnético (V) de la nanopartícula.

En este trabajo, V_H se ha determinado teóricamente para contrastar con la teoría de Brown. Existen varios modelos teóricos para determinar V_H a partir de V , los cuales contemplan la determinación del espesor de una capa de surfactante absorbido. Sin embargo, en el presente trabajo se revisará el propuesto por Rosensweig (Rosensweig, 2002) [57]. Considerando todo lo anterior, se hace especial énfasis en que el tiempo de relajación depende del arreglo detallado de las estructuras geométricas de las partículas y de las orientaciones de los ejes fáciles de magnetización de las mismas. (Mørup, 1994) [53]

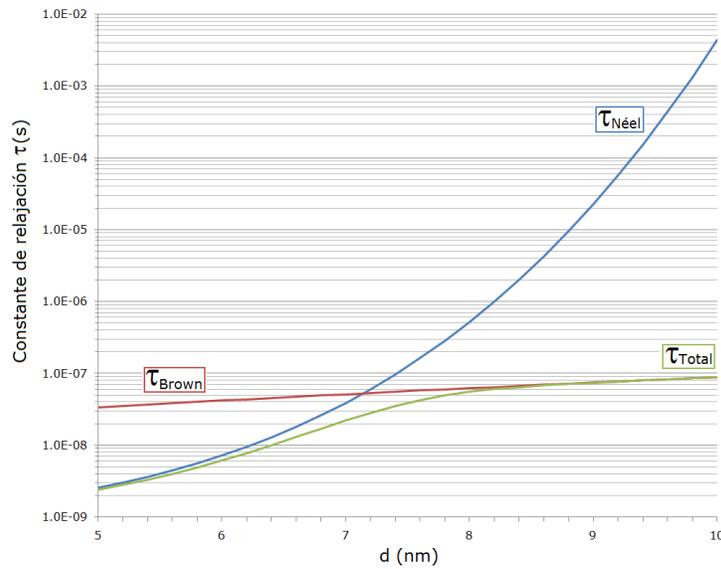


Figura 2.5: Esquema del comportamiento de las constantes de tiempo de relajación en función del diámetro d de las nanopartículas de magnetita.

En la figura 2.5 se ilustra esquemáticamente el comportamiento del tiempo de relajación de Néel τ_N (ec. 2.10), de Brown τ_B (ec. 2.11) y el total τ (ec. 2.6). Nótese que la constante de tiempo más pequeña tiende a ser dominante en determinar el tiempo de relajación efectivo τ para cualquier tamaño de partícula dado. (Rosensweig, 2002) [57]

2.5. Magnetita

La magnetita es un tipo de cristal cúbico constituido por óxido ferroso diférrico (Fe_3O_4) con fórmula química $\text{Fe}^{2+}\text{Fe}_2^{3+}\text{O}_4$. Es miembro del grupo espinel, de sistema cristalino cúbico y de estructura espinel inverso como se muestra en la figura 2.6. En su estado puro es fuertemente magnética y se oxida. Contiene un 72 % de hierro distribuido así:

Hierro 72.36 %Fe 31.03 %FeO / 68.97 %Fe₂O₃
 Oxígeno: 27.64 %O

Se forma a alta temperatura y se presenta en masas densas, frágiles y de color negro, con brillo metálico. Es de clase óptica isotrópica y de transparencia opaca de color gris. Presenta dureza entre 5 y 6.5, es decir, es un cristal semiduro. Tiene densidad de 5.2 g/cm^3 y gravedad específica de 4.9 - 5.2.

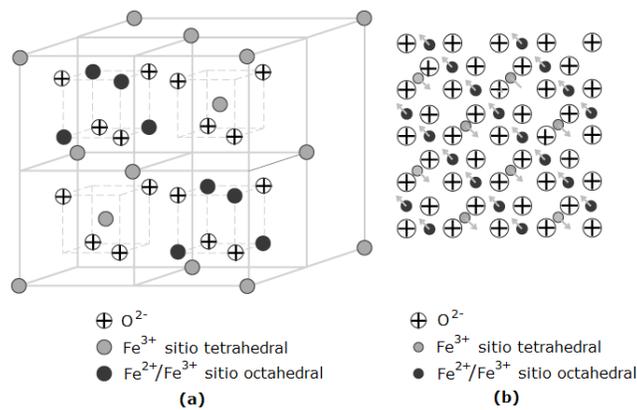


Figura 2.6: Estructura espinel inversa de la magnetita. (a) El lado frontal de una celda cúbica unidad. (b) Organización ferrimagnética en la magnetita: ilustración del plano $[1,1,1]$.

La magnetita contiene 32 oxígenos, 32 sitios octaédricos ocupados por 8 Fe_2^+ (\downarrow) y 8 Fe_3^+ (\downarrow), y 64 sitios tetraédricos ocupados por 8 Fe_3^+ (\uparrow). En cristalografía se clasifica como sistema isométrico y hace parte del grupo espacial Fd3m (sintético). El parámetro de red es $a = 8,3970 \pm 1 \text{ \AA}$ y tiene $Z = 8$. Su temperatura de Curie T_C es 851 K. Finalmente, la magnetización de saturación para un monodominio M_d de magnetita es de $446 \times 10^6 \text{ emu/cm}^3$ y la magnetización de saturación para la magnetita bulk se estima en 92.5 emu/g .

*Words are the means to meaning,
and for some, the annunciation of truth.*

V (From V for Vendetta)

3

Curvas de magnetización

En este capítulo se introduce la teoría para la determinación experimental de las curvas de magnetización. Posteriormente se ilustra de forma general el concepto del índice de absorción específico (SAR) y finalmente se presenta una breve exposición acerca de la síntesis de las nanopartículas de magnetita que se han estudiado en la tesis.

3.1. Determinación experimental de la curva de magnetización

Los resultados de los experimentos dependen del tiempo típico de medición τ_m que está directamente influenciado por la ventana temporal del equipo de medición. Esto es, si $\tau_m \gg \tau$, el tiempo que transcurre mientras se efectúa la medición es el suficiente para que el sistema se relaje, de tal forma que el promedio temporal de la magnetización visto con ese instrumento es nulo, y se dice que el sistema está en equilibrio termodinámico. Por otra parte, si $\tau_m \ll \tau$, el sistema no alcanza a relajarse en el tiempo que dura la medición. En este último caso se observan propiedades cuasiestáticas como en los sistemas magnéticamente ordenados, por lo cual se dice que el sistema está en un estado de no equilibrio termodinámico, o

bien, en un régimen bloqueado. Debe notarse que en ambos casos no es el sistema el que cambia sus propiedades, la diferencia de los resultados que se observan se debe al instrumento de medición. Adicionalmente, cuando el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico, los resultados que se obtienen no dependen de la historia magnética que ha experimentado el material, lo cual no ocurre cuando el sistema está en régimen bloqueado.

Se define la temperatura de bloqueo T_B como aquella en la cual $\tau_m \approx \tau$, es decir, la temperatura límite en donde el estado de equilibrio termodinámico y el estado bloqueado se separan. Dicha temperatura depende esencialmente del tamaño de las partículas y del tiempo característico de la medición. Las partículas más grandes requieren una temperatura mayor para alcanzar el régimen superparamagnético.

De forma general, las mediciones de magnetización DC involucran un tiempo característico $\tau_m = 100\text{s}$, para lo cual se sucede que: (Socolovsky, 2003) [61]

$$T_B \approx \frac{K_a V_0}{25k_B} \quad (3.1)$$

con $\tau_0 = 10^{-9}$ s y la consideración de un volumen V_0 fijo para todas las partículas. Cuando hay baja temperatura, τ aumenta y los momentos magnéticos no alcanzan a fluctuar en la ventana de tiempo del experimento τ_m , quedando congelados, de tal forma que las mediciones dependen de la historia magnética de la partícula.

Alternativamente, si se tiene alta temperatura, el valor de τ permanece muy por debajo del tiempo que los instrumentos de medida emplean usualmente, por lo cual el sistema permanece en un régimen superparamagnético ya que los momentos magnéticos pueden cambiar sus orientaciones dentro de la ventana temporal de dichos instrumentos. (Socolovsky, 2003) [61]

Nótese entonces que la temperatura de bloqueo de un sistema de nanopartículas puede variarse ajustando el tamaño de las mismas, su forma, su dispersión y la interacción que se produce entre ellas. (Hariharan, 2005) [32]

3.1.1. Sistema en equilibrio termodinámico: $\tau < \tau_m$

Consideremos el caso en el cual el sistema está en equilibrio termodinámico ($\tau_m \gg \tau$), es decir, las partículas se encuentran en un régimen superparamagnético. En relación con el campo aplicado \vec{H} , se tiene una distribución de Boltzmann de

los momentos magnéticos $\vec{\mu}$ de las partículas, cada uno con una energía potencial $E_p = -\mu H \cos \theta$, con θ el ángulo entre $\vec{\mu}$ y \vec{H} . Sabiendo que la magnitud de la magnetización \vec{M} puede determinarse con la contribución de todos los momentos magnéticos, se sucede que:

$$M = n\mu \left[\coth(x) - \frac{1}{x} \right] \quad \text{con} \quad x = \frac{\mu H}{k_B T} \quad (3.2)$$

donde n es el número total de momentos magnéticos, y $n\mu$ corresponde al valor máximo posible que presentaría el material si todos los momentos estuvieran alineados, es decir, es la magnetización de saturación M_S . Esta magnetización puede determinarse como $M_S = \phi M_d$, en donde ϕ es la fracción de volumen de los sólidos en la suspensión, y M_d es la magnetización de saturación de un monodominio, que para magnetita resulta 446×10^6 emu/cm³ aproximadamente. De esta forma, la ecuación 3.2 puede reescribirse como:

$$M = M_S \mathcal{L} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) \quad (3.3)$$

en donde $\mathcal{L}(x)$ corresponde a la función de Langevin¹, la cual se muestra en la figura 3.1 para diferentes valores del argumento.

La función de Langevin sugiere que el comportamiento de la magnetización de equilibrio depende del tamaño de la partícula. Con base en lo anterior, con una gráfica de M/M_S en función de H/T es posible determinar con las medidas de magnetización si un sistema es o no superparamagnético, ya que si lo es, la curva resultante tiende a converger en una Langevin. Además, para distintas temperaturas, dichas curvas se superponen. No obstante, puede presentarse que el ajuste no sea perfecto, debido a factores que afectan el comportamiento del sistema, como puede ser la interacción entre partículas, o distribuciones de los ejes de anisotropía y de los tamaños de las partículas, entre otros.

Sintetizando, en el sistema en equilibrio termodinámico la magnetización (ec. 3.2) puede ser descrita a través de una función tipo Langevin. Esta función puede expandirse como:

$$\mathcal{L}(x) = \frac{x}{3} - \frac{x^3}{45} + \frac{2x^5}{945} + O(x^7) \quad (3.4)$$

¹Esta expresión supone que el sistema está compuesto de partículas no interactuantes y monodispersas.

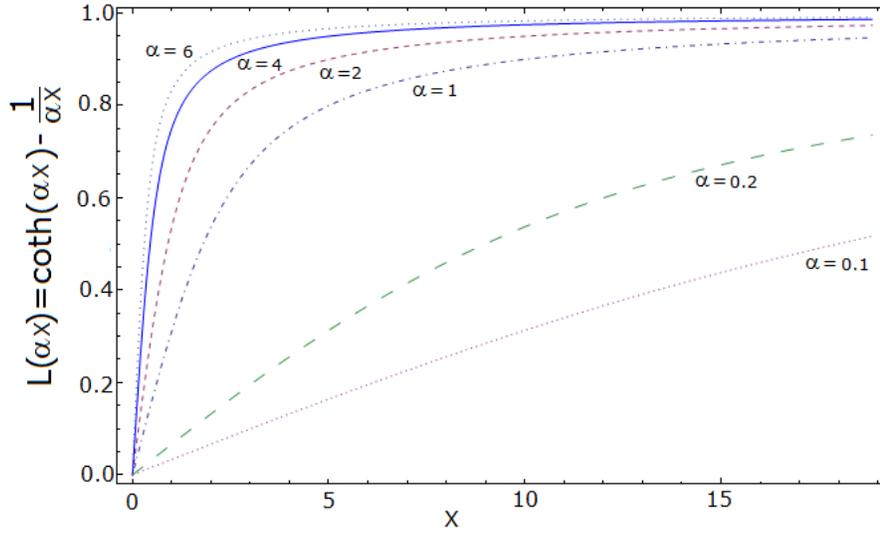


Figura 3.1: Función de Langevin $\mathcal{L}(\alpha x) = \coth(\alpha x) - \frac{1}{\alpha x}$ para los valores de α señalados en cada curva.

de donde, considerando el límite en el que $x \rightarrow 0$, sobrevive el primer término de la expansión, originando entonces que la magnetización (ec. 3.2) pueda escribirse como:

$$M(H, T) = \frac{N\mu^2 H}{3k_B T} = \frac{C}{T} H \quad (3.5)$$

donde N es el número de partículas por unidad de volumen y C es la constante de Curie. Esta aproximación es conocida como la ley de Curie, y es válida mientras se cumpla que $\mu H \ll k_B T$. De forma general, en el régimen superparamagnético se tiene que la magnetización no presenta irreversibilidad ni dependencia de la historia magnética de la muestra, las curvas de M/M_S vs. H/T medidas a diferentes temperaturas se superponen, y la curva de M vs. T medida con un campo magnético suficientemente pequeño sigue la ley de Curie para $T > T_B$.

3.1.2. Sistema en no equilibrio termodinámico: $\tau > \tau_m$

Consideremos un sistema de partículas que se encuentran en régimen bloqueado. En este caso, la magnetización de las partículas se orienta para minimizar la energía del sistema, a saber:

$$M(H, T) = \frac{N\mu^2 H}{3k_B T} \quad (3.6)$$

donde las variables son las mismas que en la ecuación 3.2. En este tipo de sistemas que no están en equilibrio, los resultados experimentales dependen de la historia magnética del material además del campo aplicado y la temperatura, que son las variables que influyen en el caso de equilibrio termodinámico. Es interesante resaltar que la información del comportamiento del material se complementa al estudiarse su respuesta en ambos regímenes.

Por esta razón, el estado inicial del ensamble de los momentos magnéticos de las nanopartículas (que se suponen con anisotropía uniaxial y no interactuantes entre sí) es determinante para poder reproducir las mediciones y verificar la información experimental. Principalmente se emplean dos protocolos de medición para obtener información sobre las barreras de energía: enfriamiento con campo magnético nulo (Zero Field Cooling, ZFC) y enfriamiento con campo magnético aplicado (Field Cooling, FC).

Medición de magnetización enfriando con campo magnético nulo: Zero Field Cooling (ZFC)

En este protocolo la muestra se enfría desde cierta temperatura por encima de la temperatura de bloqueo T_B , en donde las nanopartículas se encuentran en régimen superparamagnético, hasta una temperatura muy por debajo de T_B , desde donde se iniciará la medición. Después se aplica un campo magnético igual al que se emplea para medir la magnetización M en el régimen superparamagnético, y se mide ésta de nuevo en función de la temperatura T hasta un valor mayor que la temperatura de bloqueo.

Al principio los momentos magnéticos están distribuidos todos al azar, por lo cual el sistema presenta una magnetización neta igual a cero. En el proceso de enfriamiento, no obstante, dichos momentos tienen una probabilidad no nula de invertirse espontáneamente sin cambiar la magnetización neta, por lo cual se obtiene que para $\tau_m < \tau$, aproximadamente la mitad de los momentos magnéticos se encuentran en una dirección y la otra mitad en la contraria. Éste es el ensamble inicial.

Una vez que se ha alcanzado la distribución inicial de momentos, al aumentar la temperatura, éstos tienden a permanecer en el mismo estado a pesar de que τ se hace más pequeño. Cuando la temperatura es mayor que T_B , los momentos se encuentran libres para alinearse con el campo magnético, la magnetización deja de ser nula, y

el sistema pasa a un estado de equilibrio termodinámico. A temperaturas más altas, la magnetización seguirá el comportamiento descrito por la ley de Curie (ec. 3.5). La magnetización en ZFC es un resultado de la acumulación de varios procesos de inversión. En la figura 3.2(a) se esquematiza el comportamiento de la magnetización en función de la temperatura en ZFC.

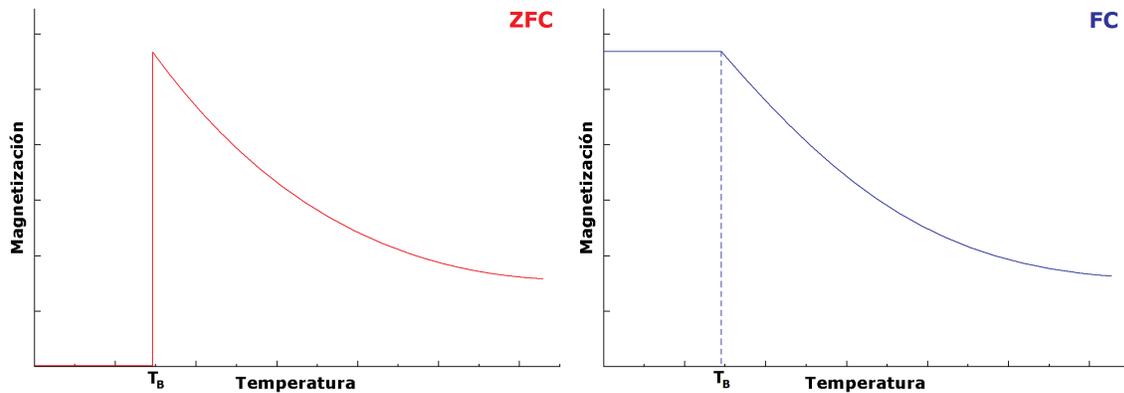


Figura 3.2: Curva teórica de magnetización en función de temperatura en condiciones (a) ZFC y (b) FC respectivamente. Se señala también la temperatura de bloqueo T_B .

Medición de magnetización enfriando con campo magnético aplicado: Field Cooling (FC)

La curva FC se obtiene cuando se toma como estado inicial el conjunto de momentos magnéticos que resulta de aplicar el campo magnético al sistema desde el régimen superparamagnético. Es decir, a $T > T_B$ se aplica un campo magnético por el cual los momentos experimentan interacción Zeeman que tiende a ordenarlos y fluctuaciones térmicas que tienden a desordenarlos, de tal forma que la magnetización resultante de estas alteraciones puede describirse con la ley de Curie (ec. 3.5) para ese campo a esa temperatura T . Cuando comienza a disminuir la temperatura, puede entonces observarse que M aumenta su valor hasta llegar a la temperatura de bloqueo, en donde ya no se observan cambios en la magnetización.

Luego la medición de M para $T < T_B$ da como resultado un valor constante de magnetización igual a $M(H, T) = CH/T_B$, el último que registra en equilibrio termodinámico. El comportamiento esquemático de M versus T en este protocolo se ilustra en la figura 3.2(b).

Se ha visto entonces que los resultados experimentales de la medición de la magnetización para sistemas en no equilibrio termodinámico depende del procedimiento que se siga, además del estado inicial del sistema. Se observa un comportamiento de irreversibilidad en la magnetización en el régimen bloqueado, contrario al comportamiento reversible que se presenta cuando el sistema está en equilibrio termodinámico. Un factor a tener en cuenta es que para los dos protocolos se debe asegurar que el campo de anisotropía es lo suficientemente más intenso que el campo de medición para asegurar que los resultados provean información necesaria de la barrera de energía. (Aharoni, 2000) [1]

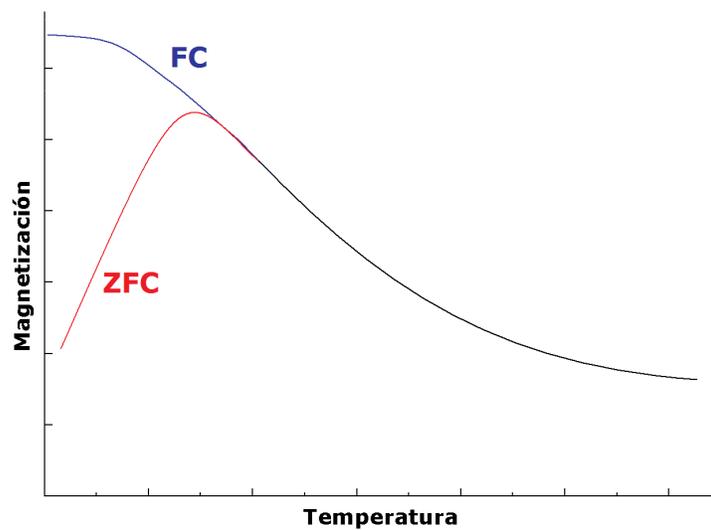


Figura 3.3: Curva de magnetización en función de temperatura en condiciones ZFC y FC respectivamente, para una muestra con distribución de tamaño.

En la figura 3.2 se ha representado esquemáticamente el comportamiento de la magnetización en los protocolos ZFC y FC, en caso de tener un sistema de nanopartículas con igual tamaño. No obstante, en el caso real, existe una distribución de tamaños de las partículas, lo cual implica la existencia de una distribución de barreras de energía, y por lo tanto, el comportamiento de M versus T se modifica, tal como se muestra en la figura 3.3. Se puede inferir de tal comportamiento que a medida que se pasa de un régimen a otro, una parte de la muestra puede estar en régimen bloqueado mientras la otra ya está en régimen superparamagnético. Considerando además la dependencia de T_B con el volumen (ec. 2.4), puede entonces decirse que para ciertas temperaturas, mientras las partículas de mayor tamaño se encuentran en régimen bloqueado, las de menor volumen pueden permanecer en

régimen superparamagnético por tener menor temperatura de bloqueo.

Las curvas de magnetización que reflejan un comportamiento más real (figura 3.3) son resultado de la suma de las curvas individuales que corresponden a cada tamaño de partícula, pesadas por la cantidad de partículas con dicho tamaño presentes en la muestra, es decir, por la distribución de tamaños. En este tipo de gráficas se tiene que el máximo de la curva de ZFC corresponde al valor medio de la temperatura de bloqueo del sistema según la distribución de tamaños, y el valor de temperatura en el cual las curvas de FC y ZFC se unen es conocida como la temperatura de irreversibilidad, correspondiente a la barrera de energía más grande, es decir, a la temperatura de bloqueo de las partículas con tamaños más grandes.

Sea $f(\mu)$ la función de distribución de tamaños de un sistema de nanopartículas superparamagnéticas. El número de partículas por unidad de volumen de la muestra con momento magnético entre μ y $\mu + d\mu$ está dado por $f(\mu)d\mu$. Se sigue que la magnetización macroscópica de dicho sistema cuando se aplica un campo magnético H está dada por: (Ferrari, 1997) [19]

$$M(H, T) = \int_0^{\infty} \mu \mathcal{L} \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) f(\mu) d\mu \quad (3.7)$$

en donde $\mathcal{L}(x)$ es la función de Langevin definida en 3.2. Se considera usualmente que la función de distribución del tamaño de las nanopartículas puede describirse a través de una tipo log-normal (Knobel, 2004) [46].

Ahora bien, el volumen medio de las partículas está dado por: (Socolovsky, 2003) [61]

$$\langle V \rangle = \int_0^{\infty} V f_v(V) dV \quad (3.8)$$

en donde $f_v(V)$ es la distribución de volúmenes, y $f_v(V)dV$ da la fracción de partículas con volúmenes entre V y $V + dV$. Considerando que hay momentos magnéticos tanto en régimen superparamagnético como en régimen bloqueado, la expresión para la magnetización (ec. 3.7) puede separarse en las contribuciones de cada uno de estos regímenes. Para hacer esta división, se tiene en cuenta que existe un volumen crítico V_C , dado por la relación 3.1. De esta manera, la magnetización sería:

$$M(H, T) = \int_0^{V_C} M_V(H, T) f_v(V) dV + \int_{V_C}^{\infty} M_V(H, T) f_v(V) dV \quad (3.9)$$

en donde $M_V(H, T)$ es la magnetización de un sistema de partículas normalizadas por su volumen. En esta expresión el primer término corresponde a la contribución

de los momentos superparamagnéticos y el segundo a la de los bloqueados. Para los momentos superparamagnéticos, el valor de la magnetización es conocido, puesto que responde a la ley de Curie (ec. 3.5). En el otro caso, no obstante, el valor de la magnetización depende del protocolo de medición. Para mediciones en ZFC, la magnetización de las partículas bloqueadas es nula, así resulta:

$$M_{ZFC}(H, T) = \int_0^{V_C} \frac{\mu^2(V)}{3k_B T} H f_v(V) dV \quad (3.10)$$

y tomando que μ es proporcional a la magnetización de saturación por unidad de volumen M_S , resulta:

$$M_{ZFC}(H, T) = \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_0^{V_C} \frac{V^2}{T} f_v(V) dV = A \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_0^T \frac{T_B^2}{T} f(T_B) dT_B \quad (3.11)$$

en donde se ha empleado la relación entre volumen crítico y temperatura de bloqueo para hacer un cambio de variable, y A es la constante de proporcionalidad de dicho cambio. Ahora bien, en el caso del experimento FC, se sigue un análisis similar, teniendo en cuenta que en este caso la magnetización en el régimen bloqueado no es nula, es decir:

$$M_{FC}(H, T) = \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_0^{V_C} \frac{V^2}{T} f_v(V) dV + \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_{V_C}^{\infty} \frac{V^2}{T_B(V)} f_v(V) dV \quad (3.12)$$

que con el cambio de variables respectivo queda:

$$M_{FC}(H, T) = A \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_0^T \frac{T_B^2}{T} f(T_B) dT_B + A \frac{M_S^2 H}{3k_B} \int_T^{\infty} T_B f(T_B) dT_B \quad (3.13)$$

Por lo tanto, de las expresiones 3.11 y 3.13 se sigue que:

$$\frac{\partial [M_{ZFC}(T) - M_{FC}(T)]}{\partial T} \propto T_B f(T_B) \quad (3.14)$$

Esta relación provee información acerca de la distribución de energías de barrera (y consecuentemente del tamaño de las nanopartículas) a partir de mediciones de magnetización en estado de no equilibrio termodinámico, y la usaremos de forma complementaria a las mediciones obtenidas por microscopía electrónica de transmisión.

Como dato adicional, Socolovsky *et al.* (Socolovsky, 2003) [61] han mostrado que la diferencia entre las curvas FC y ZFC es que la contribución de las partículas bloqueadas es 25 veces mayor en la curva FC de lo que es en la curva ZFC. (Socolovsky, 2003) [61]

3.1.3. Magnetización en función de campo aplicado

Para realizar las mediciones de la magnetización M en función del campo H , el estado inicial que se considera corresponde al de la muestra enfriada desde el régimen superparamagnético con campo aplicado nulo. Al aplicar el campo a baja temperatura el tiempo de relajación del sistema es mayor que el de medición, por lo cual el sistema permanece con la misma magnetización. Ahora bien, si la temperatura de medición es nula, los momentos que están antiparalelos al campo aplicado no experimentan cambios hasta que el valor del campo sea $H = 2K_a/M_S$, porque en este punto la barrera de energía producida por la anisotropía deja de existir y solamente permite un mínimo posible para la magnetización. Si la temperatura es distinta de cero, el cambio se produce en algún valor de campo menor ($H < 2K_a/M_S$) porque el tiempo de relajación comienza a disminuir a medida que aumenta el campo. El campo $H_a = 2K_a/M_S$ se conoce como campo de anisotropía, el cual coincide con el campo coercitivo² H_C en el modelo de Stoner-Wohlfarth². Cuando los campos ya son muy grandes se dice que el sistema ha saturado y en esos valores de campo la magnetización vale M_S .

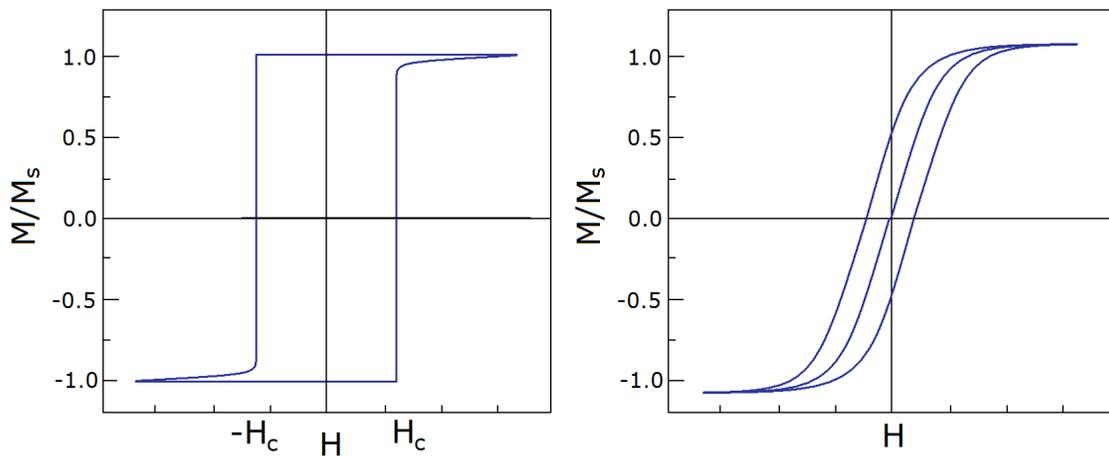


Figura 3.4: Ciclo de histéresis de la magnetización para un sistema de monodominios con el eje de anisotropía uniaxial (a) paralelo al campo aplicado, (b) distribuido al azar, medido a $T < T_B$.

Idealmente al disminuir el campo magnético la magnetización tendrá el mismo valor de saturación hasta que $H = -H_C$, momento en el cual la probabilidad de

²Aquel campo necesario para anular la imanación.

inversión de los momentos dentro de la ventana temporal de medición es no nula. La curva así obtenida es un ciclo de histéresis con campo coercitivo H_C y magnetización remanente³ $M_r = M_S$. Este comportamiento genera dos ramas de la curva que no retornan por el mismo camino. Cabe destacar que el estado saturado también es un estado inicial bien definido para efectuar las mediciones. En la figura 3.4 se muestran esquemáticamente ciclos de histéresis para la magnetización, cuando los ejes de anisotropía uniaxial están paralelos al campo y cuando están distribuidos al azar. Nótese que en esta última disposición, cada rama es más redondeada, producto de la suma de diferentes ciclos, y éstas no corresponden a funciones de Langevin.

La remanencia total resulta ser la suma de las contribuciones de cada tamaño de partícula pesada por la función de distribución de tamaños, a saber,

$$M_r(T) = \int_{V_C}^{\infty} M_r(T, V) f_v(V) dV = M_S \int_{V_C}^{\infty} V f_v(V) dV \quad (3.15)$$

en donde V_C es el volumen crítico en el cual $T_B = T$. Efectuando un cambio de variables adecuado para poner la expresión anterior en términos de la temperatura, resulta:

$$M_r(T) = AM_S \int_T^{\infty} T_B f(T_B) dT_B \quad (3.16)$$

de lo cual se sucede que:

$$-\frac{\partial [M_r(T)]}{\partial T} \propto T_B f(T_B) \quad (3.17)$$

esta expresión da información acerca de la distribución de tamaño de las nanopartículas a partir de mediciones de la magnetización remanente en función de la temperatura. Luego, de las mediciones de M en el régimen bloqueado se puede decir que éstas son fuertemente dependientes de la historia magnética a la cual se ha sometido la muestra. Por otra parte, las curvas de M vs. T no siguen una ley de Curie, presentando irreversibilidad. Finalmente, las curvas de M vs. H muestran ciclos de histéresis, en donde $M_r(T)$ da información de los tamaños de las nanopartículas en el sistema.

3.2. Fluidos magnéticos

Un fluido magnético es una suspensión de partículas nanométricas ferromagnéticas o ferrimagnéticas (fase magnética) en un líquido portador (fase no

³Magnetización en $H = 0$.

magnética) que previene la aglomeración de éstas. Dichas partículas son altamente susceptibles a campos magnéticos. (Williams, 2008) [73] En 1965, Stephen Papell (Papell, 1963) [55], de la National Aeronautics and Space Administration (NASA) registró una patente acerca del desarrollo de un método de preparación de coloides ferrofluidos, mediante la suspensión de partículas de magnetita en queroseno y la agregación posterior de ácido oleico, logrando que las partículas no se aglomerasen. Fue la primera vez que se tuvo un método para la creación de dichos coloides y a partir de entonces, se han estudiado diversidad de procesos mediante los cuales pueden generarse fluidos con propiedades ferromagnéticas.

Un campo magnético externo entrega a las nanopartículas suficiente energía para permitir que los momentos magnéticos sobrepasen la barrera de energía y puedan fluctuar. Esta energía es disipada cuando el momento de la partícula se relaja a su orientación de equilibrio, permitiendo entonces que el conjunto de monodominios se caliente, lo cual se requiere en tratamientos por hipertermia. También pueden presentarse pérdidas por resonancia cuando se trabaja a ciertas frecuencias, dependiendo de la anisotropía de las partículas.

3.2.1. Índice de absorción específico (SAR)

El calentamiento de un material puede describirse con el índice de absorción específico (SAR), que es la medida de la razón a la cual la energía es absorbida por el cuerpo o la muestra cuando se expone a un campo magnético alterno. En este caso es la potencia absorbida por masa de tejido. La energía se libera después al medio por procesos que dependen de las características de las partículas y de la intensidad del campo aplicado.

El SAR provee un valor numérico para comparar el potencial de calentamiento de diferentes partículas bajo diferentes condiciones, y puede determinarse mediante la expresión: (Drake, 2007) [17]

$$SAR = c \frac{m_{muestra}}{m_{magnetita}} \frac{dT}{dt} \quad (3.18)$$

en W/g , en donde c es la capacidad calorífica del agua⁴, $m_{muestra}$ es la masa de la muestra, $m_{magnetita}$ es la masa del óxido de hierro presente en la muestra (medida magnéticamente), y dT/dt es la pendiente inicial de la curva de calentamiento.

⁴Aquí se toma como $c = 4,187 \times 10^4$ erg/g·K

(Fardis, 2007; Goya, 2008; Gonzales, 2009) [18, 26, 24] Una expresión teórica general para determinar el SAR consideraría múltiples variables, por lo cual se hace difícil proponer alguna.

La potencia resultante generada es una función de la constante de tiempo efectiva y los parámetros de campo, y puede determinarse con la siguiente relación: (Rosensweig, 2002) [57]

$$P = \pi\mu_0\chi_0H_0^2f\frac{2\pi f\tau}{1 + (2\pi f\tau)^2} \quad (3.19)$$

en donde μ_0 es la permeabilidad del espacio libre, χ_0 es la susceptibilidad, H_0 es el campo aplicado, f es la frecuencia del campo magnético aplicado, y τ es el tiempo de relajación total dado por la ecuación 2.6. En la figura 3.5 se muestra esquemáticamente la relación entre potencia y diámetro de las nanopartículas. Para una frecuencia de 115kHz hay un diámetro alrededor de los 17 nm para el cual la potencia generada es máxima y decrece después de éste valor muy rápidamente.

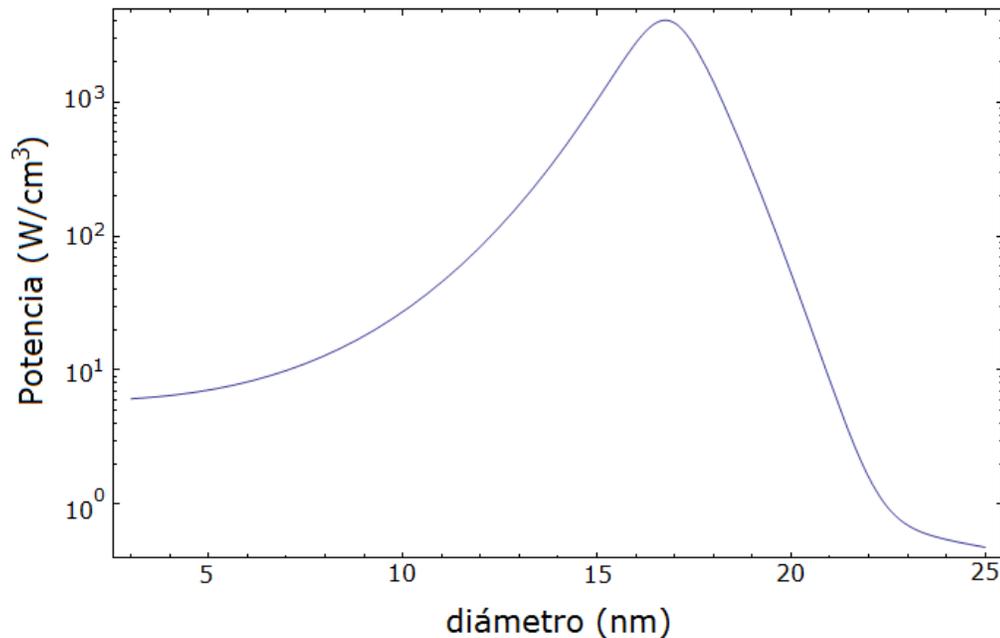


Figura 3.5: Dependencia de la potencia (ecuación 3.19) con el diámetro de nanopartículas de magnetita con recubrimiento de ácido oleico y disueltas en tolueno. Los valores de campo aplicado y frecuencia fueron 50Oe y 115kHz, para efectos de hacer el gráfico. Inspirado en (Kalambur, 2005) [43].

3.2.2. Histéresis

Para las partículas superparamagnéticas se tiene que el calentamiento de éstas se da por la rotación del momento magnético, es decir, por la relajación de Néel principalmente. La relajación de Brown, por su parte, contribuye al calentamiento en forma de pérdidas por fricción. Para las partículas monodominio, como no tienen pared de dominio, el comportamiento de histéresis no se observa. No obstante, para partículas ferrimagnéticas o ferromagnéticas de múltiples dominios, el calentamiento se origina por pérdidas debidas al movimiento de paredes de dominio.

La aparición del fenómeno de histéresis en un sistema de partículas magnéticas suele asociarse al crecimiento de los dominios magnéticos por la reorientación de los momentos magnéticos, lo cual es causado por la presencia de un campo magnético aplicado sobre un sistema. No obstante, en el caso de un sistema de nanopartículas magnéticas monodominio lo anterior no ocurre así. En este caso la magnetización no alcanza el equilibrio en la ventana de tiempo de un experimento porque cada nanopartícula tiene un tiempo de relajación relativamente grande comparado con el tiempo que se requiere para barrer el campo magnético que se aplica al sistema. De esta manera, el fenómeno de histéresis en un sistema de nanopartículas magnéticas monodominio está relacionado directamente con la dinámica de cada nanopartícula ($\tau_{\text{Néel}}$), y no con el crecimiento de dominios magnéticos. (Gatteschi, 2006) [21]

Finalmente, para partículas de magnetita las pérdidas máximas por histéresis pueden esperarse en un monodominio que tenga un diámetro cerca de 30 nm. En esta tesis, no se han trabajado partículas de dichas dimensiones. (Hergt, 2006) [33]

3.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas

Los desafíos para la obtención de ferrofluidos estables que puedan usarse en la hipertermia yacen primordialmente en la capacidad de sintetizar nanopartículas magnéticas con tamaños muy precisos y en asegurar que éstas se dispersen en una solución acuosa. Desde hace por lo menos la mitad del siglo pasado la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas ha representado un desafío para la ciencia, y ha derivado en diferentes técnicas para la obtención de las mismas. En la presente tesis se empleó para la síntesis una técnica química en la cual se descompone a alta temperatura acetilacetonato de hierro, $\text{Fe}(\text{acac})_3$, en un solvente orgánico cuya

temperatura de ebullición es de 260°C o 320°C, y se agregan surfactantes, como lo son el ácido oleico ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ en configuración *cis*) y la oleilamina ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7=\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{NH}_2$).⁵

Se ha remarcado que en la hipertermia se requiere la suspensión de las nanopartículas en un medio acuoso, por lo cual una vez que han sido sintetizadas, se debe modificar su superficie para asegurar que dicha condición se cumpla. Existen esencialmente tres procedimientos para efectuar el proceso: en el primero se ligan los extremos hidrofóbicos de la superficie de las nanopartículas a moléculas cuyos grupos terminales se asocien de tal forma que los extremos hidrofílicos queden libres para interactuar con el solvente acuoso, en el segundo se busca que las nanopartículas absorban polímeros anfifílicos dentro de ellas, y el tercero se basa en la construcción de una coraza inorgánica (usualmente de sílica) mediante reacciones de precipitación o deposición de coloides preformados en la superficie de las nanopartículas que se desean recubrir. (Shivang, 2009) [59]

El primer método es uno de los más empleados debido a su simpleza, a pesar de que presenta ciertas fallas. Por ejemplo, si la nanopartícula no queda perfectamente recubierta inicialmente, una vez que se quiere modificar su superficie pueden presentarse alteraciones en los enlaces, las cuales se traducen en pérdida de eficiencia biológica del material magnético. Por su parte, el segundo método presenta la ventaja de aumentar la biocompatibilidad de las nanopartículas porque promueve el uso de polímeros originalmente diseñados para transporte de medicamentos en el proceso, a pesar de ser un tipo de encapsulamiento más complejo que el anterior. Finalmente, el tercer método requiere un poco más de elaboración, pero ofrece ventajas en cuanto a la biocompatibilidad, la facilidad de bioconjugación, y la bioestabilidad *in vivo*. (Shivang, 2009) [59]

Aquí se han cambiado los solventes orgánicos por recubrimientos de DEXTRAN, polietilenimina, polietilenglicol y sílica (ver sección 4.1) y la sustitución se ha hecho por el método de intercambio de ligandos, el cual se basa esencialmente en que las moléculas que estabilizan las partículas en una fase son reemplazadas por otros ligandos que permiten la transferencia de las mismas a otra fase diferente y le otorgan estabilidad en dicha fase. Este proceso de sustitución implica que las nuevas moléculas deben tener una afinidad lo más fuerte posible con el recubrimiento con el fin de reemplazar rápida y efectivamente las moléculas de surfactante originales. (Sperling,

⁵Para más detalles acerca del proceso de síntesis de nanopartículas de magnetita consultar Sun (Sun, 2002) [65] y Vargas (Vargas, 2005) [68].

2008) [63]

El tamaño de las nanopartículas se controla mediante el recubrimiento sucesivo de capas de óxido de hierro sobre las nanopartículas sintetizadas previamente. La producción de nanopartículas tiene muchas variables que se deben considerar. Es importante resaltar que la concentración de surfactante tiene un efecto importante en las propiedades de las nanopartículas, puesto que si dicha concentración es demasiado baja se puede producir agregación y por lo tanto podrán recuperarse ninguna o muy pocas nanopartículas. Por otra parte, si la concentración es alta, la interacción de las nanopartículas con el surfactante puede afectar la eficiencia de los recubrimientos, y por lo tanto las propiedades magnéticas de las partículas. (Llabot, 2008) [49]

*Avanzo, el caos empieza a unos metros.
Sí señores, un desequilibrio se vuela en la pasada armonía.*

Federico Racca (1971 - actual)

4

Caracterización de las nanopartículas

4.1. Muestras

Las moléculas ligadas a las nanopartículas aparte de recubrirlas, evitan que se presente agregación de las mismas. En principio, la fuerza repulsiva entre nanopartículas vecinas puede deberse a repulsión electrostática, exclusión estérica o a alguna capa de hidratación en la superficie que dificulta la interacción. (Sperling, 2008) [63] Es así que la estabilidad de la dispersión de las nanopartículas del ferrofluido dependerá entonces de las posibles interacciones entre éstas y, más influyentes aún, las interacciones entre la solución y las superficies revestidas. (Piao, 2009) [56]

En realidad las nanopartículas son objetos más complejos comparados con aquellos que la teoría describe puesto que no poseen forma esférica perfecta, no son totalmente rígidas, y a pesar de estar recubiertas por diferentes surfactantes, la distribución de carga superficial es desconocida en la mayor parte de los casos. (Sperling, 2008) [63] Para la presente tesis se sintetizaron muestras de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica, polietilenimina y polietilenglicol.

4.1.1. Ácido oleico

El ácido oleico es un ácido graso¹ monoinsaturado que se encuentra en varias fuentes animales y vegetales. Es un líquido oleoso e incoloro que al contacto con el aire se torna de color amarillento, casi café.

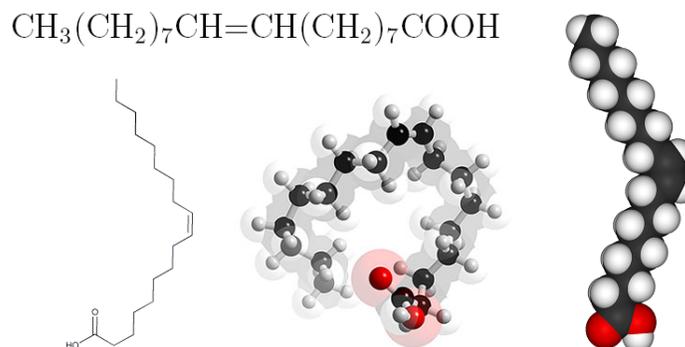


Figura 4.1: Estructura molecular del ácido oleico.

Este ácido se obtiene mediante la hidrólisis del éster y es purificado por destilación, es decir que por hidrogenación del ácido oleico se obtiene el ácido esteárico (saturado). No es soluble en agua, pero sí en benceno, alcohol, tolueno y otros disolventes de carácter orgánico. Se solidifica por enfriamiento y es empleado en la fabricación de jabones y cosméticos, en la industria textil y en la limpieza de metales.

4.1.2. DEXTRAN

El DEXTRAN ($\text{H}(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_x\text{OH}$) es un polímero de glucosa hidrosoluble que se obtiene a partir de la fermentación bacteriana de la sacarosa, caracterizada por su alto peso molecular, buena solubilidad en agua y baja toxicidad. Posee características fisicoquímicas que lo hacen altamente biocompatible. Esta cadena lineal de unidades de alfa D glucosa presenta uniones por enlace α 1,6 y ramificaciones que empiezan en las uniones α 1,4.²

¹Un ácido graso es una molécula orgánica de naturaleza lipídica formada por una cadena hidrocarbonada con número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo.

²El enlace alfa se identifica por la posición del hidrógeno en el primer carbono de la molécula, el cual se representa en este caso hacia arriba.

Se ha demostrado la influencia en el tamaño, la estabilidad, y las propiedades magnéticas de las nanopartículas por la reducción de la glucosa terminal del DEXTRAN. Por otra parte, este polímero también presenta propiedades que optimizan las interacciones polares con las superficies de óxido de hierro, a pesar de que los enlaces de hidrógeno son débiles, al ser muchos la energía de ligadura puede ser muy alta. (Laurent, 2008) [47]

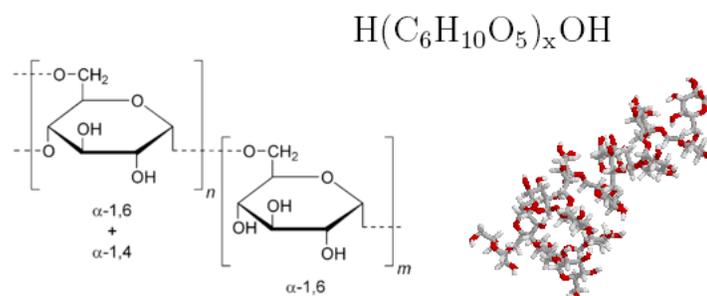


Figura 4.2: Estructura molecular del DEXTRAN.

4.1.3. Silica

La silica es un polímero inorgánico conocido también como dióxido de silicio³ (SiO_2), muy abundante en la corteza terrestre e insoluble en agua pero soluble en medios con alto pH. Su papel en el recubrimiento de nanopartículas magnéticas ha sido considerablemente documentado (Alcala, 2006; Ohmori, 1993; Zhou, 2005) [2, 54, 74], y se han presentado resultados en los cuales se muestra que este tipo de revestimientos es bastante bueno para prevenir la agregación, otorgando estabilidad a las soluciones a la vez que disminuye su toxicidad.

El recubrimiento de silica presenta dos propiedades importantes: la primera es que la capa polimérica reduce la interacción magnética dipolar con el recubrimiento, y la segunda es que la silica hace que las nanopartículas recubiertas tengan carga negativa por lo cual optimiza la repulsión electrostática. (Laurent, 2008) [47] Es decir, la silica se emplea como recubrimiento intermediario para la fijación de otras moléculas.

³A pesar de que su fórmula contiene dos oxígenos, cuando está en presencia de otras unidades de silica, cada átomo de silicio está rodeado por cuatro oxígenos.

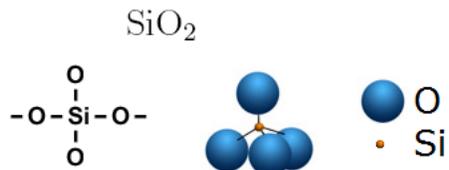


Figura 4.3: Estructura molecular del dióxido de silicio (silica).

Una ventaja de una superficie enriquecida con silica es la presencia de grupos silanol terminales que fácilmente pueden reaccionar con alcoholes y con agentes de acoplamiento de silanos para producir dispersiones que no solamente son estables en medios acuosos, sino que también proveen el anclaje ideal para interacciones covalentes de ligandos específicos. Estas propiedades hacen de la silica un recubrimiento que confiere alta estabilidad en grandes fracciones de volumen. (Gupta, 2005) [29]

4.1.4. PEI (Polietilenimina)

La polietilenimina es un polímero catiónico (policación) con fórmula estructural $(-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-)_n$ (Gupta, 2004; Lukovkin, 1973) [30, 48] y alta densidad de carga iónica. Generalmente forma complejos catiónicos que interactúan de forma inespecífica con especies cargadas negativamente. (Tang, 2006; Tang, 2003) [66, 67] Cada tercer átomo de PEI se encuentra un átomo de nitrógeno con un grupo amino, lo cual hace que la red polimérica actúe como una esponja de protones en virtualmente cualquier pH. Por esta razón, este compuesto presenta alta estabilidad sobre un rango amplio de pH. (Boussif, 1995) [8]

4.1.5. PEG (Polietilenglicol)

El polietilenglicol con fórmula química $\text{HO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2-\text{OCH}_2-)_n-\text{CH}_2-\text{OH}$ es un polímero lineal (poliéter) químicamente muy estable que resulta de la unión de subunidades de etilenglicol. Este polímero posee propiedades anfífilas⁴, es soluble

⁴Cualidad química de una sustancia que le permite ser simultáneamente hidrofílica y lipofílica. Las nanopartículas que son recubiertas con polietilenglicol pueden ser solubles en un número importante de solventes con polaridad intermedia, además de ser muy estables en soluciones acuosas y soluciones salinas fisiológicas.

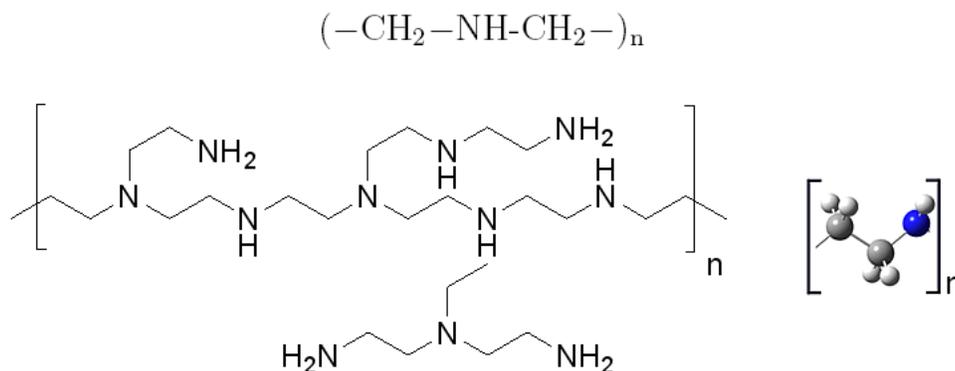


Figura 4.4: Estructura molecular de la polietilenimina.

en solventes polares y apolares así como también en agua en donde está altamente hidratado, y forma anillos desordenados con diámetros mucho más grandes que las proteínas de peso molecular comparable. (Sperling, 2008) [63]

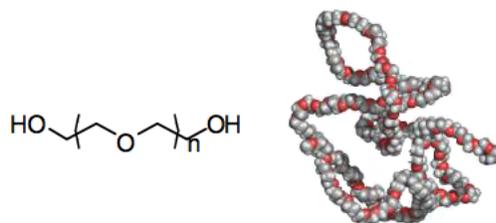


Figura 4.5: Estructura molecular del polietilenglicol.

En la literatura se encuentra ampliamente documentado (Gref, 2000) [27] que recubrir las nanopartículas con polietilenglicol previene que éstas sean opsonizadas, lo cual optimiza la biocompatibilidad e incrementa el tiempo de circulación de las nanopartículas en el organismo. El polietilenglicol en la superficie actúa repeliendo otras moléculas por efectos estéricos, lo cual da como resultado superficies menos pegajosas.

Se empleó PEG-400 ultrapuro, el cual es altamente hidrofílico y modifica además el diámetro de las nanopartículas. Este polímero se usó para preparar muestras que fueron inyectadas a una población de ratones con tumores inducidos para analizar la captación de las mismas. En la tesis se menciona solamente la característica general del recubrimiento, puesto que los resultados de dicho experimento aún se encuentran bajo estudio. Finalmente, en la tabla 4.1 se relacionan las muestras cuyos análisis se

presentan en las siguientes secciones.

Muestra	Recubrimiento
1	Ácido oleico
2	DEXTRAN
3	Silica
4	PEI

Tabla 4.1: Muestras de nanopartículas de magnetita estudiadas.

4.2. Resultados

En esta sección se presentarán resultados de la caracterización de las muestras de las nanopartículas de magnetita relacionadas en la tabla 4.1.

4.2.1. Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM)

Quizá la característica más fundamental de las nanopartículas más allá de su composición sea su tamaño, el cual incluye no solamente la parte magnética de la nanopartícula, sino también la capa formada por el surfactante. Esta disposición da origen a un tamaño hidrodinámico caracterizado esencialmente por la velocidad de difusión de la partícula en el solvente. Una manera de determinar el tamaño de la partícula se basa en el análisis de imágenes obtenidas con el microscopio electrónico de transmisión o TEM. Con esta técnica se obtiene información tanto del tamaño total de la coraza de las partículas como de su forma.

El TEM es una herramienta poderosa para estudiar la morfología de sistemas en donde se manejan escalas nanométricas. Esencialmente, en esta técnica un haz de electrones acelerado con cierto potencial y conformado con lentes magnéticas se hace incidir en la muestra, y una vez que los electrones pasan a través de ella, se obtiene una imagen que contiene información estructural de la misma. Usualmente la imagen está asociada a la intensidad (corriente) del haz de electrones que son transmitidos a través de la muestra. Esto implica también que el espesor de la muestra debe ser lo suficientemente pequeño para permitir el paso de los electrones. Por su parte, el contraste electrónico está asociado a los mecanismos de interacción de los electrones con el material de la muestra. (Curiale, 2008) [15]

Para hacer la caracterización morfológica de las nanopartículas se empleó un microscopio Philips CM 200 UT operado en modo convencional y de alta resolución.

Las muestras fueron preparadas remojando rejillas de cobre con cubierta de carbón ultradelgadas en cada una de las soluciones. Se emplearon rejillas de soporte con agujeros de 400 mesh y una capa de carbón. En las figuras 4.6 y 4.8 se muestran las imágenes obtenidas con el TEM para las muestras estudiadas.

La muestra de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico se dispersó en tolueno, y puede verse en las imágenes correspondientes que no se presentan agregados de nanopartículas. En el caso de la muestra con DEXTRAN se observa que las partículas tienden a permanecer aisladas dentro de un recubrimiento que reúne a varias de ellas. Para la muestra con PEI se tiene una dispersión mayor que en el caso de DEXTRAN, aunque no tan distribuida como en el caso de la muestra con ácido oleico. Por su parte, la morfología de la superficie en el caso de la muestra de silica no es fácilmente observable a partir de las imágenes obtenidas. Esto puede deberse a algún fallo en la funcionalización de la superficie.

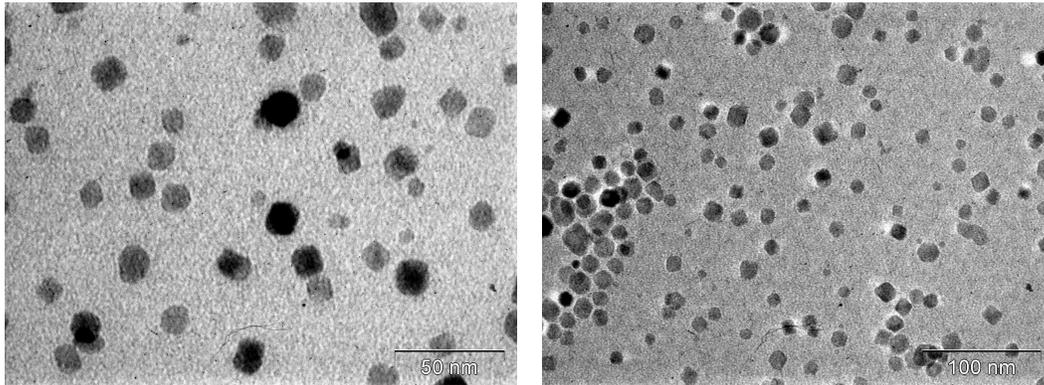
Sobre las imágenes obtenidas se realizó una estadística para determinar el tamaño (diámetro) de las nanopartículas en cada caso. En la figura 4.7 se presentan los histogramas obtenidos para los tamaños de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico (fig. 4.7(a)), DEXTRAN (fig. 4.7(b)) y PEI (fig. 4.7(c)) a partir del análisis de las fotografías obtenidas en el microscopio electrónico de transmisión.

En el caso de las nanopartículas recubiertas con silica, como puede observarse de las imágenes mostradas en la figura 4.8, la información que puede extraerse de las fotografías no es suficiente para obtener un histograma confiable.

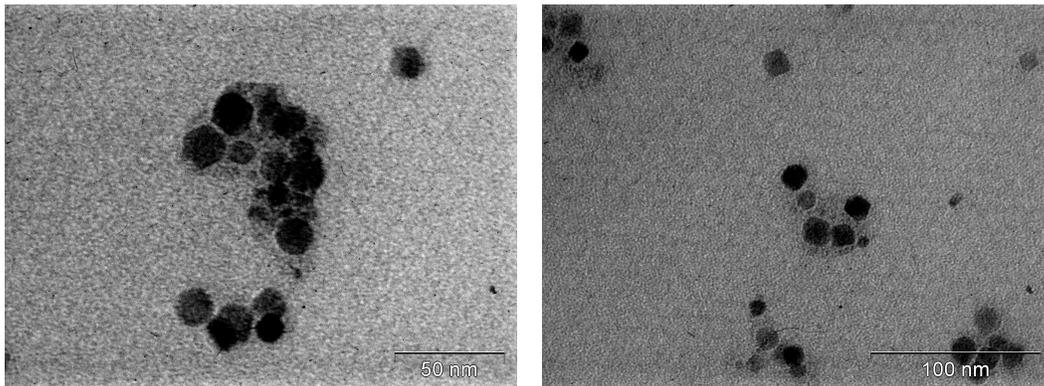
Recubrimiento	Diámetro medio (nm)	σ
Ácido oleico	13.6	0.1
DEXTRAN	13.8	0.2
PEI	12.7	0.1

Tabla 4.2: Diámetro medio de las nanopartículas recubiertas determinado mediante ajustes tipo log-normal de las distribuciones de tamaños determinadas en la figura 4.7. El valor de σ corresponde al del ajuste log-normal.

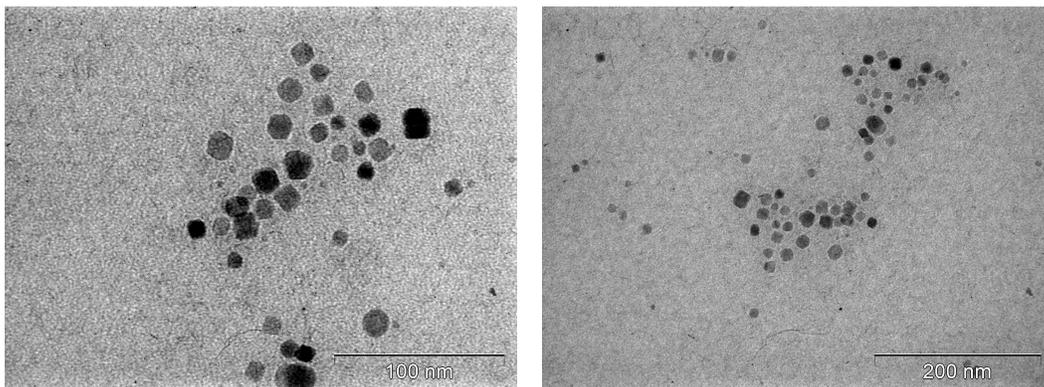
Sobre los histogramas se realizó un ajuste con una distribución tipo log-normal, dando como resultado un valor medio del tamaño de las nanopartículas para cada muestra, como se relaciona en la tabla 4.2.



(a) Ácido oleico



(b) DEXTRAN



(c) PEI (Polietilenimina)

Figura 4.6: Mediciones TEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con los surfactantes indicados.

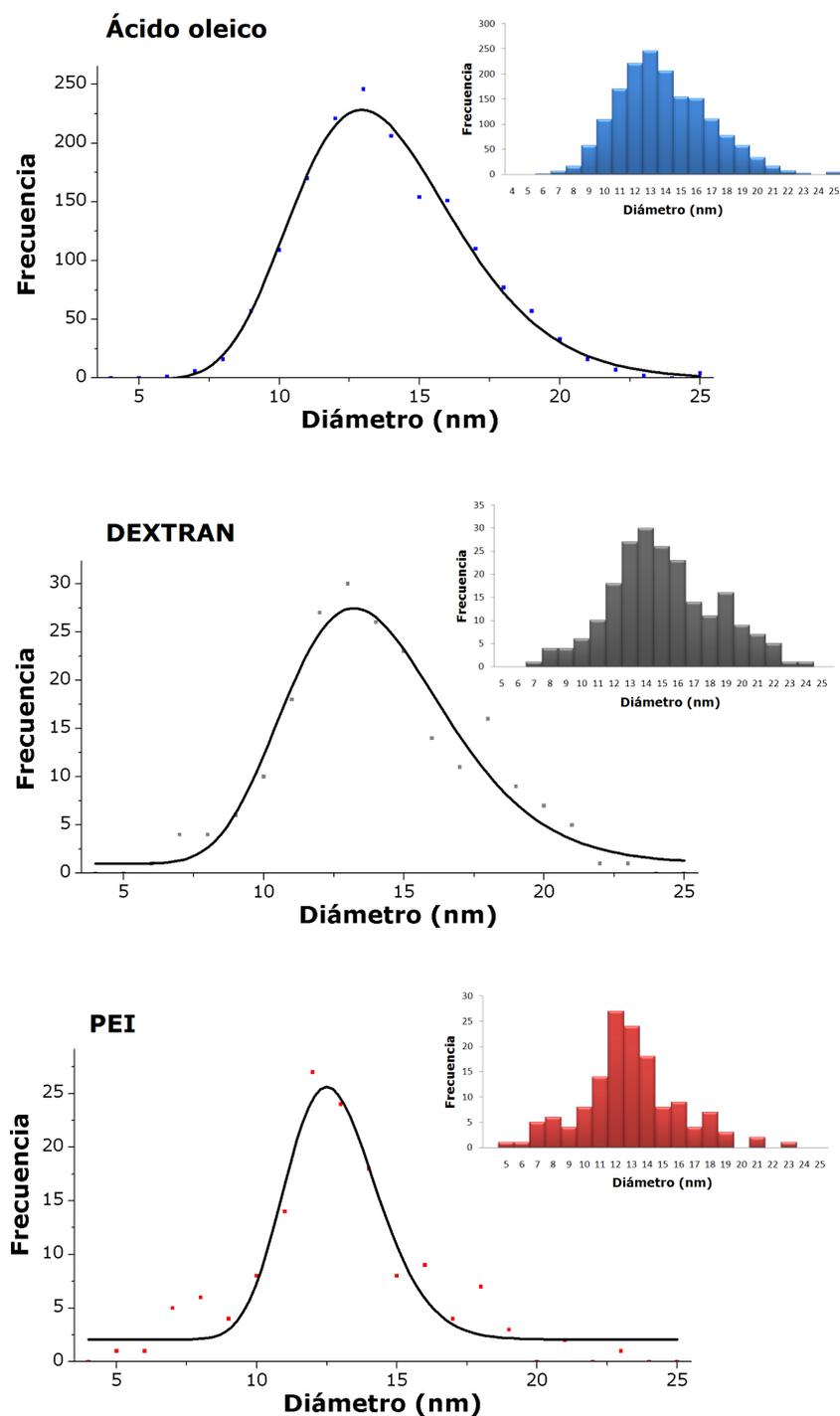


Figura 4.7: Ajuste tipo log-normal de la distribución de tamaños obtenida mediante TEM y mostrada en los recuadros, para nanopartículas de magnetita recubiertas con los surfactantes indicados.

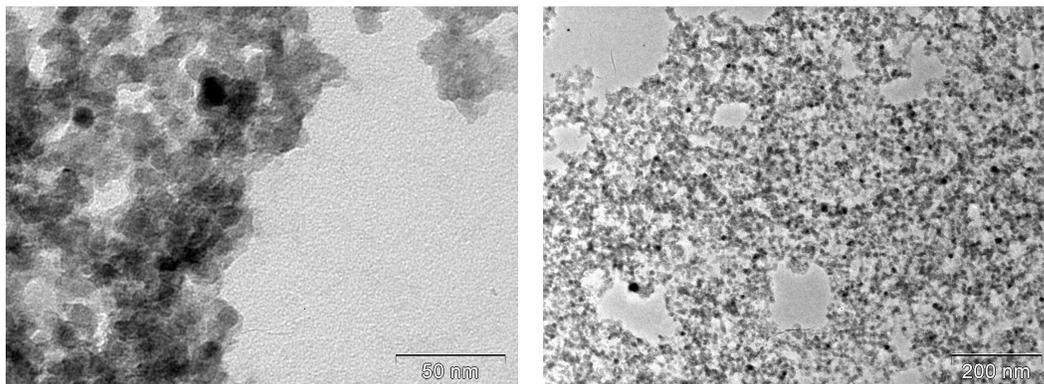


Figura 4.8: Mediciones TEM de nanopartículas de magnetita recubiertas con silica.

4.2.2. Volumen hidrodinámico

El mecanismo de relajación de Brown tiene en cuenta entre sus variables el volumen hidrodinámico, el cual depende de el recubrimiento de la nanopartícula, el solvente en el cual se suspende, y usualmente es mayor que el volumen magnético de las partículas magnéticas. (Mornet, 2004) [52] Es posible estimar este volumen hidrodinámico V_H de las nanopartículas utilizando el modelo aceptado de Rosensweig (Rosenzweig, 2002) [57] para éste caso, dado por:

$$V_H = \left(1 + \frac{\delta}{r}\right) V_m \quad (4.1)$$

en donde δ es el espesor de la capa de surfactante de la nanopartícula, r es su radio magnético y V_m es el volumen magnético de la misma.

Empleando los resultados obtenidos por TEM se determinó el valor de δ para las muestras y se calculó teóricamente el valor del volumen hidrodinámico de las partículas con los recubrimientos. En la tabla 4.3 se muestran los resultados de este cálculo. En los casos reportados, a saber, ácido oleico, DEXTRAN y PEI, el diámetro hidrodinámico es 1.2, 1.9 y 1.6 veces más grande que el diámetro magnético respectivamente, lo cual está en concordancia con el concepto de capa magnéticamente débil que se evaluará en la sección 4.2.4 y además es una respuesta esperada puesto que los surfactantes determinan el tamaño final de las nanopartículas.

Retomando la figura 3.5 considerando parámetros propios de nuestro experimento

Muestra	d_{int} (nm)	σ	d_{hid} (nm)	Concentración
Ácido Oleico	13.6	0.1	16.4	1 wt % en tolueno
DEXTRAN	13.8	0.2	26.6	1 wt % en agua destilada
Silica	—	—	—	1 wt % en agua destilada
PEI	12.7	0.1	20.1	1 wt % en agua destilada

Tabla 4.3: Parámetros físicos de las muestras estudiadas: diámetro interno, diámetro hidrodinámico, concentración de las muestras en el líquido dispersante.

y con los resultados del volumen hidrodinámico relacionados aquí resulta el comportamiento de la potencia mostrado en la figura 4.9.

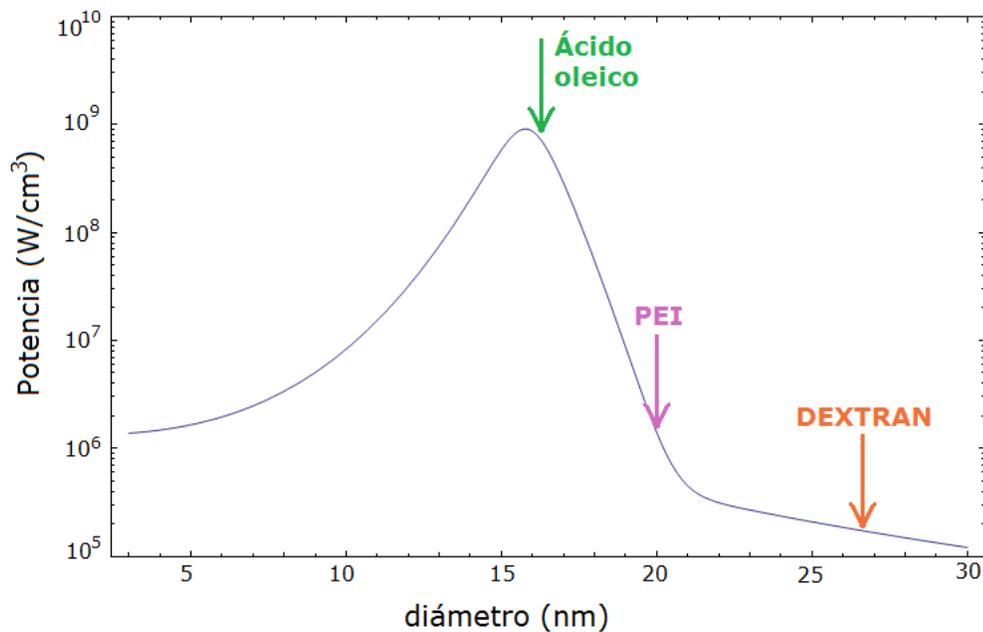


Figura 4.9: Valor medio de los volúmenes hidrodinámicos para las muestras de ácido oleico, DEXTRAN y PEI en la curva de potencia en función de diámetro. Los valores de campo aplicado y frecuencia fueron 1120e y 115kHz, los usados en el experimento.

Inspirado en (Kalambur, 2005) [43].

Podemos ver que el tamaño medio de las nanopartículas de magnetita de cada una de las tres muestras se ubica en una parte de la curva de potencia, con lo cual esperamos para las condiciones experimentales dadas que el calentamiento que se obtenga tenga relación con la influencia de los respectivos volúmenes hidrodinámicos. Es decir, la muestra correspondiente al recubrimiento de ácido oleico mostrará mayor

eficiencia en el proceso, mientras que la de DEXTRAN mostrará la menor eficiencia. Los resultados de la determinación del índice de absorción específico están en concordancia con la anterior afirmación (ver sección 4.2.5).

Finalmente este comportamiento provee información acerca de cómo la relación entre volumen hidrodinámico y volumen magnético de las nanopartículas actúa sobre los mecanismos de relajación. Por transición ilustra su influencia sobre el proceso de calentamiento y no solamente sobre las propiedades magnéticas que se detallan a continuación para cada una de las muestras.

4.2.3. Magnetización

Para las mediciones de magnetización se empleó un magnetómetro de muestra vibrante VSM LakeShore modelo 7307 ubicado en el Laboratorio de Resonancias Magnéticas del Centro Atómico Bariloche, y un magnetómetro tipo SQUID marca Quantum Design modelo MPMS2, también disponible en el CAB.

Dependencia con la temperatura

Se efectuaron mediciones de magnetización en función de temperatura con un campo aplicado $H = 10$ Oe para la muestra con ácido oleico, $H = 20$ Oe para la muestra con DEXTRAN, y $H = 50$ Oe para la de silica y polietilenimina. En la figura 4.10 se presentan las curvas de magnetización en los modos FC y ZFC para las cuatro muestras. Cada una de las muestras presenta un valor máximo en la curva de ZFC, relacionado con el valor de la temperatura de bloqueo T_B .⁵ Éste valor, junto al de la temperatura de irreversibilidad dada por la separación de las curvas ZFC y FC se relacionan en la tabla 4.4.

En las curvas ZFC se observa un valor inicial de magnetización en 10 K para ácido oleico (fig. 4.10(a)), en 10 K para DEXTRAN (fig. 4.10(b)), en 4.6 K para PEI (fig. 4.10(d)) y 5 K para silica (fig. 4.10(c)). Esto se debe probablemente a alguna magnetización remanente en las muestras porque éstas podían no estar totalmente demagnetizadas antes de la medición.

⁵Nótese que el máximo de la curva de magnetización ZFC, T_{max} , está relacionado con la distribución de tamaños $f_v(V)$ (ver sección 3.1.2).

Recubrimiento	T_{max} (K)	T_{irr} (K)
Ácido oleico	111.11	300.03
DEXTRAN	238.32	273.66
PEI	105.01	300
Silica	50.42	65

Tabla 4.4: Valores de las temperaturas T_{max} dadas por el valor máximo de la curva ZFC, y de las temperaturas de irreversibilidad dadas por la separación de las curvas ZFC y FC a partir de los resultados mostradas en la figura 4.10.

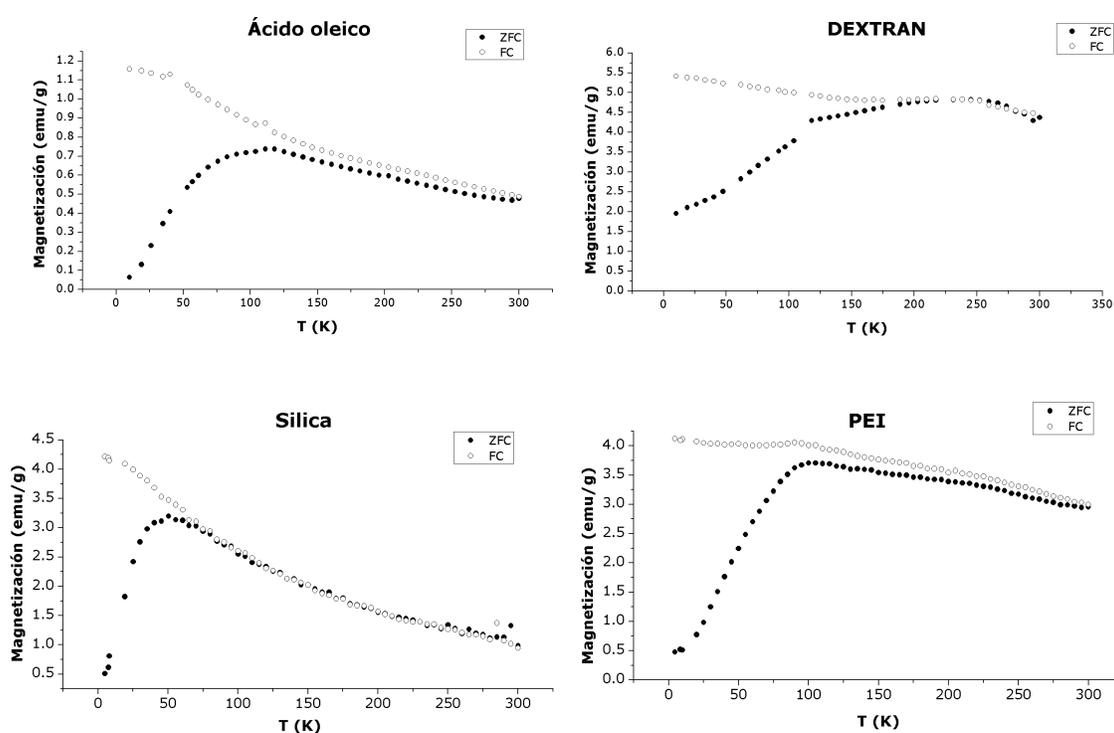


Figura 4.10: Curvas de magnetización vs. temperatura para muestras de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI. Las mediciones se hicieron en el SQUID para las dos primeras muestras con un campo aplicado de 10 Oe y 20 Oe respectivamente. Para las otras dos muestras, las mediciones fueron realizadas en el VSM con un campo aplicado de 50 Oe.

Por debajo de T_{max} el comportamiento de las nanopartículas de magnetita no es el mismo en todos los recubrimientos. No obstante, en todas las muestras la curva de magnetización FC aumenta al disminuir la temperatura, una respuesta típica

de sistemas no interactuantes, es decir, que no presentan interacciones dipolares, sugiriendo que éstas se reducen ampliamente debido a que el surfactante en cada caso mantiene las partículas separadas (ver sección 4.2.1). De todas maneras, el hecho de que FC y ZFC se agrupen por encima de T_{irr} sugiere que hay algunos agregados presentes. (Guardia, 2007) [28]

La magnetita presenta una transición de estructura cúbica a ortorrómbica alrededor de los 118 K, conocida como transición de Verwey. Por encima de esta temperatura el Fe^{3+} y el Fe^{2+} están distribuidos al azar en sitios octaédricos facilitando la conducción electrónica. Nótese que en los resultados de magnetización en función de la temperatura puede apreciarse cierta reducción de intensidad de la magnetización alrededor de los 120 K, lo cual puede atribuirse a la transición de Verwey. (Jeppson, 2006) [40]

Sabiendo que la temperatura de bloqueo puede determinarse con la expresión 2.4 como:

$$T_B = \frac{K_a V}{25k_B} \quad (4.2)$$

es posible estimar la constante de anisotropía de la distribución de nanopartículas de cada muestra. (Hou, 2003) [38] En el caso de la muestra de magnetita con recubrimiento de silica, el cálculo no se presenta puesto que se carece de información a partir del TEM para calcular el volumen de las nanopartículas. Los resultados de este cálculo se relacionan en la tabla 4.5.

Recubrimiento	K_a (erg/cm ³)
Ácido oleico	$5.9 \pm 0,4 \times 10^5$
DEXTRAN	$2.9 \pm 0,2 \times 10^5$
PEI	$3.4 \pm 0,2 \times 10^5$
Silica	-

Tabla 4.5: Estimación de la constante de anisotropía de las muestras trabajadas a partir de las temperaturas de bloqueo T_B relacionadas en la tabla 4.4.

En la figura 4.11 se muestra el comportamiento de la magnetización ZFC invertida en función de la temperatura para la muestra de silica con un ajuste sobre el segmento lineal en la última parte de la curva. En esta curva el ajuste arroja un valor positivo de la pendiente con intercepción en $\theta \approx 0$ K, es decir, un comportamiento que responde a una ley de Curie (ec. 3.5). Nótese que el comportamiento de las curvas de magnetización FC y ZFC en el caso de los recubrimientos de ácido oleico y PEI

presentan irreversibilidad (figura 4.10). Por esta razón no se analizan bajo una ley de Curie, puesto que la curva de magnetización invertida debe tener superpuesta alguna otra originada por la respuesta de partículas más grandes o por interacciones que generan dicha irreversibilidad.

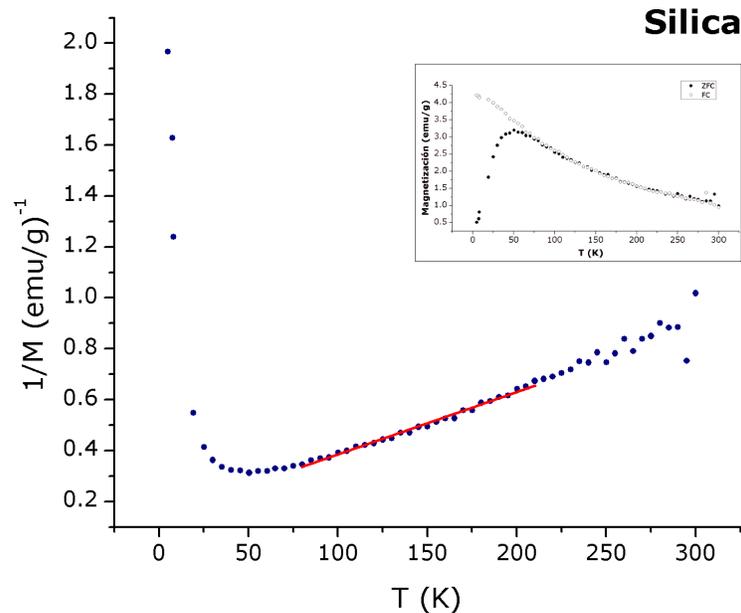


Figura 4.11: Curva de la magnetización ZFC invertida vs. T para la muestra de nanopartículas de magnetita recubiertas con silica, basada en los resultados presentados en la figura 4.10, el cual se reproduce en el recuadro.

Una suposición que se había hecho con anterioridad era que se asumían sistemas de nanopartículas no interactuantes, pero desde el punto de vista físico los resultados de este análisis sugieren que esta consideración no es del todo cierta. Esto podría ser consecuencia de una alta concentración de material magnético, pero más allá de esta aseveración, el resultado está en concordancia con lo que se obtuvo en la sección 4.2.1, en donde se mostraron los resultados del análisis por TEM de las muestras.

En el caso de ácido oleico las nanopartículas están dispersas y no presentan aglomerados (fig. 4.6(a)). En el caso de DEXTRAN las partículas están recubiertas por una capa externa de surfactante, aunque cada una de ellas no se encuentra aglomerada. En el caso de PEI (fig. 4.6(c)) las nanopartículas se encuentran muy próximas entre sí, aunque no se observa que compartan un recubrimiento externo común a más de una de ellas. En el caso de la silica (fig. 4.8(a)), se observa que las

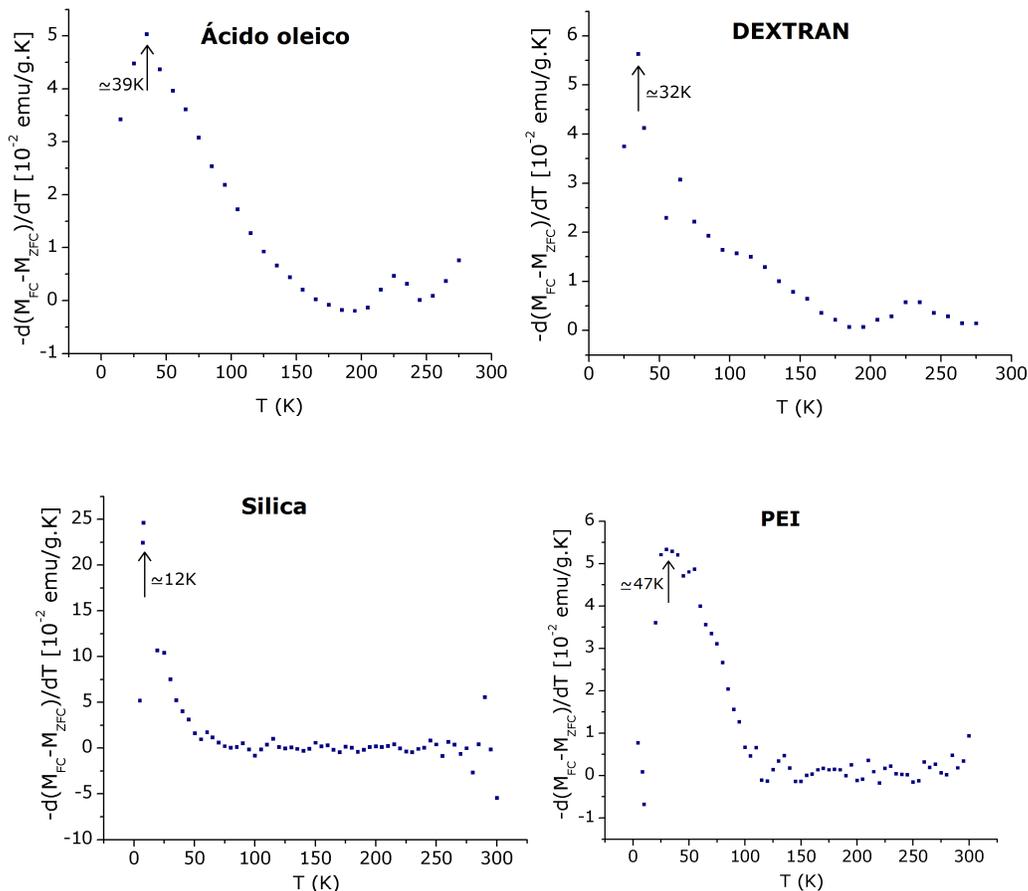


Figura 4.12: Curvas de $-d(M_{FC} - M_{ZFC})/dT$ vs. temperatura para muestras de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI, basadas en los resultados presentados en la figura 4.10. Las flechas señalan el máximo de la curva.

nanopartículas se encuentran dentro de una matriz que las coacciona a no mantener una dispersión estable.

Por otra parte, la figura 4.12 muestra la curva de $-d(M_{FC} - M_{ZFC})/dT$ vs. temperatura, la cual da información acerca del perfil de la distribución de energías de barrera, que es proporcional a los tamaños de las nanopartículas en la muestra. Este análisis a partir de las curvas de magnetización da resultados complementarios a los obtenidos por TEM acerca de la morfología de las nanopartículas.

Dependencia con el campo aplicado

El comportamiento de la magnetización M en función del campo H para las muestras de ácido oleico, DEXTRAN y PEI se presenta en la figura 4.13(a). Estas mediciones se hicieron a temperatura ambiente ($T_{amb} = 300\text{K}$). A partir de estas gráficas se determina la magnetización de saturación M_S con la pendiente de cada curva a alto campo. Los resultados se relacionan en la tabla 4.6.

Recubrimiento	M_S (emu/g)
Ácido oleico	28 ± 7
DEXTRAN	40 ± 5
PEI	11 ± 5

Tabla 4.6: Valores de la magnetización de saturación M_S , obtenidas a partir de la curvas no normalizadas mostradas en la figura 4.13(a).

Se ha mencionado que muchas de las características propias de las nanopartículas dependen directamente del recubrimiento que éstas tienen. A partir de los resultados de la figura 4.13(a) se construyó la gráfica de M/M_S en función de H/T (figura 4.13(b)), comportamiento que según se estableció con anterioridad (ver sección 3.1.1) puede ser descrito por una función de Langevin (ecuación 3.3) bajo ciertas condiciones.

A partir de los resultados de la figura 4.13(b) se observa que para las muestras con recubrimientos de ácido oleico, DEXTRAN y PEI, la magnetización de las nanopartículas puede modelarse a través de una función de Langevin, tal como se describió en la sección 3.1.1.

No obstante, en el caso de las nanopartículas recubiertas con silica, se observa un cambio sustancial en el comportamiento de la curva de M/M_S vs. H/T , lo cual induce a proponer un modelo que además del comportamiento que puede describirse mediante una curva de Langevin, contenga un parámetro lineal con el campo, a saber,

$$M(H, T) = \mathcal{L}\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) + \chi H \quad (4.3)$$

en donde $\mathcal{L}(x)$ es la función de Langevin con los argumentos usuales, y χH es una contribución lineal propia de algún agregado paramagnético. A continuación se introducirá el concepto de capa magnéticamente débil, con el fin de enfatizar la importancia de dicha contribución lineal.

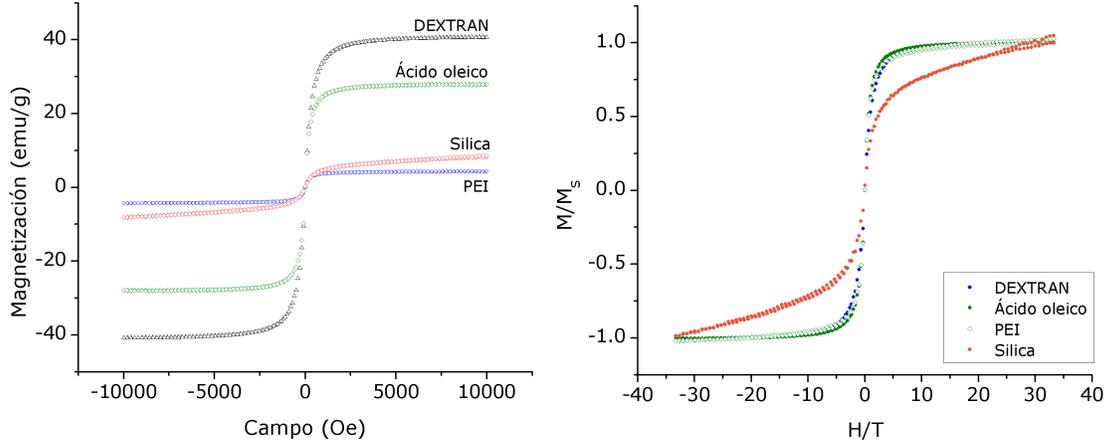


Figura 4.13: (a) Curva de magnetización sin normalizar en función de campo para todas las muestras de nanopartículas de magnetita. (b) Curva de M/M_S vs. H/T para todas las muestras. Mediciones realizadas a temperatura de 300 K.

4.2.4. Capa magnéticamente débil

Una vez que los resultados obtenidos de la magnetización de saturación de las nanopartículas magnéticas monodominio para cada uno de los recubrimientos son comparados, es evidente que surgen alteraciones que podrían deberse a la presencia no sólo de defectos cristalinos, sino también de vacancias de oxígeno en las ramificaciones de cada uno de los revestimientos, puesto que en forma general la proporción de un grano que forma parte de su superficie depende entre otras cosas del tipo de compuesto y el método de síntesis. (Curiale, 2008) [15]

Para determinar el espesor de la capa que es superficie se considera que en el interior la magnetita alcanza para la magnetización el valor de saturación M_S , y la capa externa permanece en un estado magnéticamente desordenado, lo cual hace que la magnetización de dicho sector sea prácticamente nula. En la figura 4.14 se presenta un esquema de esta disposición. Bajo estas condiciones, el volumen total del grano magnético de diámetro d es:

$$V_T = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 = \frac{\pi}{6}d^3 \quad (4.4)$$

Por su parte, el volumen que aporta al valor de la magnetización estará dado por:

$$V_{core} = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{d}{2} - t\right)^3 = \frac{4}{3}\pi \left(\frac{d}{2}\right)^3 \left(1 - \frac{t}{d/2}\right)^3 = V_T \left(1 - \frac{t}{r}\right)^3 \quad (4.5)$$

en donde r es el radio de la nanopartícula magnética. De lo anterior se tiene:

$$t = r \left(1 - \sqrt[3]{\frac{V_T}{V_{core}}} \right) \quad (4.6)$$

Ahora, considerando que la magnetización total M_T es la aportada por el grano completo, y la de saturación es aportada por el interior de la nanopartícula, se tiene que la expresión 4.6 puede reescribirse como:

$$t = r \left(1 - \sqrt[3]{\frac{M_T}{M_S}} \right) \quad (4.7)$$

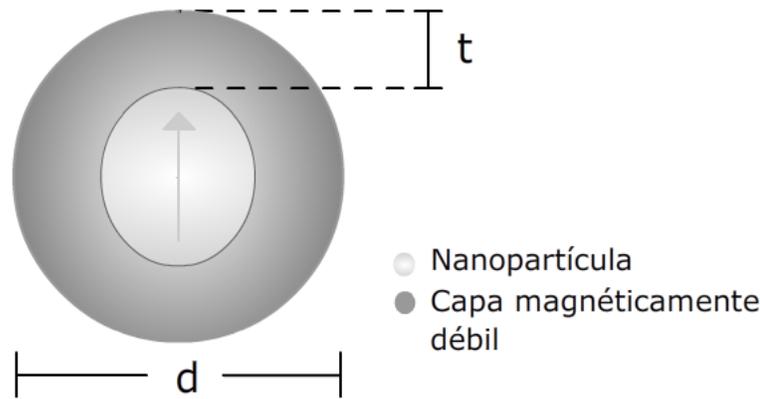


Figura 4.14: Esquema de la capa magnéticamente débil de una nanopartícula.

Consideremos que la superficie de la nanopartícula tiene un espesor equivalente a un parámetro de red a , que para la magnetita es de $8,3970 \text{ \AA}$. Considerando un tamaño medio de las partículas de magnetita de 13 nm , el volumen completo de la nanopartícula sería de aproximadamente 1150 nm^3 , y el de la capa superficial correspondería a 760 nm^3 , es decir, el volumen de la capa superficial sería $\approx 34\%$ del volumen total. De esta manera, las nanopartículas recubiertas con silica deberían tener el menor tamaño de grano de magnetita, lo cual se sigue y sustenta del tratamiento de las mediciones de M_{FC} y M_{ZFC} mostradas en la figura 4.12.

Retomando los resultados obtenidos en la figura 4.13, y considerando el modelo propuesto para las nanopartículas recubiertas con silica dado por la expresión 4.3, se obtiene el comportamiento mostrado en la figura 4.15(a). De la curvatura, ampliada en la figura 4.15(b) se concluye que el valor del momento magnético, a pesar de tratarse de las mismas nanopartículas, en el caso de la silica es mucho menor. Esto

está en concordancia con lo visto anteriormente acerca de la capa magnéticamente débil.

Podemos decir entonces que el orden magnético de la nanopartícula se ve alterado cuando se recubre con silica, lo cual sugiere que el recubrimiento no es el mejor para optimizar las propiedades magnéticas de las muestras, o bien, que para emplear este recubrimiento sería mucho más favorable que el tamaño de las nanopartículas fuera mayor, afirmación que no es concluyente acerca de ningún punto de vista biológico, sino puramente físico.

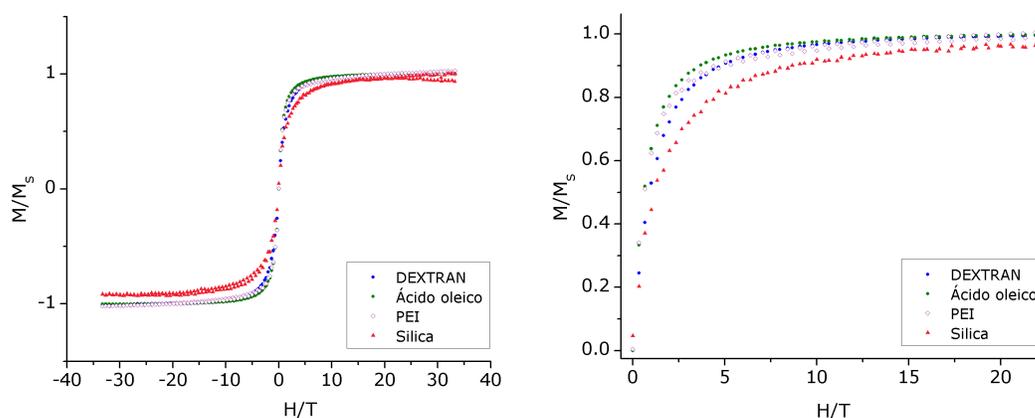


Figura 4.15: (a) Curva de M/M_S vs. H/T para todas las muestras, con la corrección lineal correspondiente para la muestra revestida con silica. (Gráfica modificada de la figura 4.13). (b) Detalle de la curva para enfatizar el comportamiento de las nanopartículas con silica.

En la figura 4.16 se muestran ciclos de histéresis medidos a temperatura de 5 K para tres de las cuatro muestras de nanopartículas de magnetita que se han estudiado, las cuales no muestran histéresis según la curva $M(H)$ medida a 300 K (fig. 4.13). Esto es característico de las muestras siendo superparamagnéticas a temperatura ambiente y entrando a un estado bloqueado a baja temperatura, lo cual resulta en la abertura del ciclo.

En otras palabras, la presencia de histéresis en la magnetización se observa hasta la temperatura de irreversibilidad T_{irr} relacionada en la tabla 4.4, la cual se obtuvo analizando las curvas de magnetización en función de la temperatura en modos FC y ZFC. De los ciclos de histéresis presentados, se puede determinar el valor de la magnetización remanente M_r . Estos resultados se muestran en la tabla 4.7.

Recubrimiento	M_r (emu/g)	M_r/M_S	H_C (Oe)
Ácido oleico	$2.8 \pm 0,4$	0.33	308 ± 15
DEXTRAN	$17.6 \pm 0,3$	0.44	290 ± 14
PEI	$7.2 \pm 0,2$	0.63	314 ± 16

Tabla 4.7: Valores de la magnetización de remanencia M_r y el campo coercitivo H_C a partir de los datos de los ciclos de histéresis medidos a 5 K presentados en la figura 4.16.

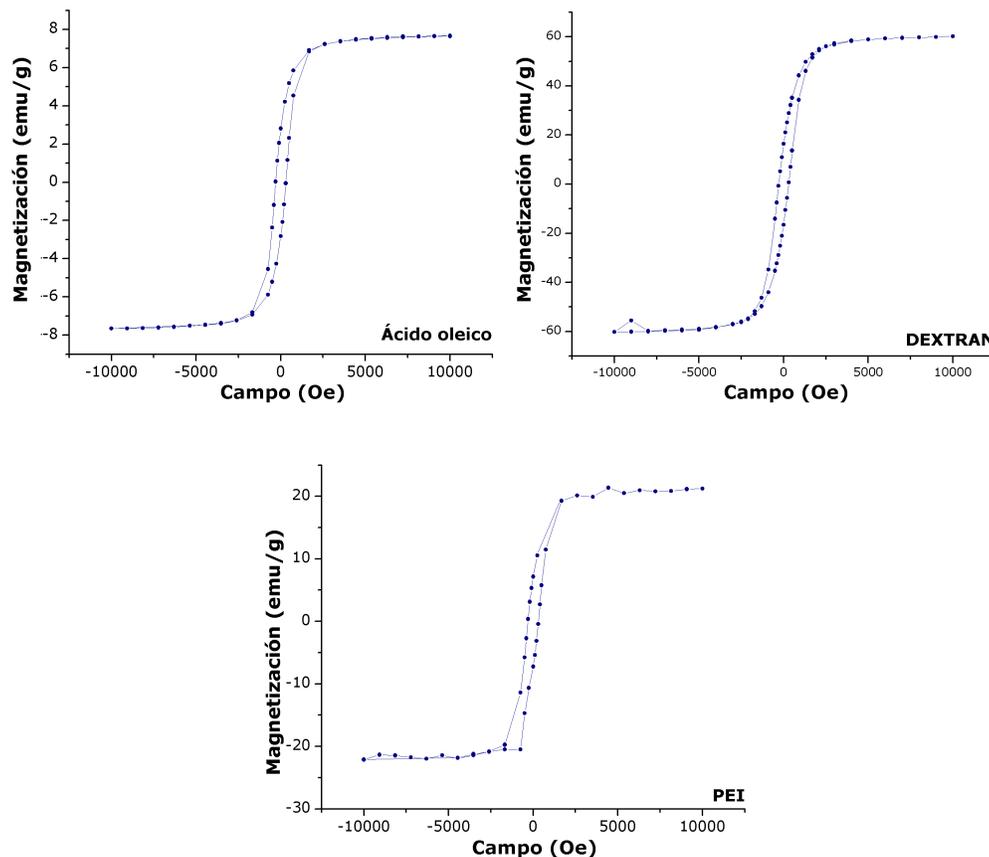


Figura 4.16: Ciclos de histéresis medidos a temperatura de 5 K para las muestras de ácido oleico, DEXTRAN y PEI.

La proporción de partículas bloqueadas se puede estimar de la relación M_r/M_S , que también se muestra en la tabla 4.7. (Vasquez, 2004) [70] El valor teórico para partículas no interactuantes y con anisotropía uniaxial para este factor es menor que $0.5M_S$. Esto sugiere que con la temperatura de 5 K una proporción considerable de partículas permanece en régimen superparamagnético. (Vasquez, 2004) [70] Para

ácido oleico $M_r/M_S = 0,33$, es decir, se estima que el 33% de las partículas se encuentran bloqueadas. En el caso del DEXTRAN este porcentaje es de 44%, y para el PEI, 63%.

El campo coercitivo H_C de las muestras, que para la magnetita bulk se encuentra entre 175 Oe y 210 Oe, también se muestra en la tabla 4.7. La coercitividad de un material en la forma de finas partículas es más grande que la del material en bulk, y más grande para partículas elongadas que para partículas esféricas. (Brown, 1962) [10]

A partir de las constantes de anisotropía calculadas (tabla 4.5), se encuentra que el campo de anisotropía dado por $H_a = 2K_a/M_S$, sería aproximadamente 8 kOe para la muestra de ácido oleico, 3 kOe para la de DEXTRAN, y 12 kOe para PEI. Esta estimación teórica es mayor que el resultado experimental. Tal cambio en el campo de anisotropía es un comportamiento que se puede explicar a partir de variaciones del orden magnético interno de las nanopartículas con el tamaño, las cuales influyen en su anisotropía de forma. Este trabajo no pretende el estudio de este fenómeno.

4.2.5. Specific Absorption Rate (SAR)

Modelar la generación de calor en los tejidos no es un asunto sencillo. Inicialmente se debe considerar que las nanopartículas son polidispersas, por lo cual la potencia generada no es uniforme en todas las muestras.

Por otra parte, la medición de la temperatura se efectúa a escala global, es decir, no se conoce con exactitud la variación de la temperatura a escala nanométrica, y es aún un tema de constante investigación. También debe tenerse en cuenta que el organismo está en constante adaptación, así que la presencia de flujo sanguíneo afecta el desempeño de las nanopartículas magnéticas como fuentes de calor, y no se tiene un modelo preciso para explicar el proceso. Finalmente, la respuesta de las propiedades biofísicas varía fuertemente con el ambiente *in vivo* en donde se lleve a cabo el estudio. (Kalambur, 2005) [43]

Las nanopartículas de magnetita pueden encontrarse superparamagnéticas o bloqueadas a temperatura ambiente dependiendo de su tamaño. (Rosensweig, 2002) [57] Se ha evaluado un diámetro crítico para las nanopartículas de magnetita de 18.7 nm tomando una constante de anisotropía de 3×10^5 erg/cm³ (30 kJ/m³). (Atsumi, 2007) [3] Considerando el rango de frecuencia que se emplea para calentar las

nanopartículas y el campo magnético que se aplica, se ha dicho que la disipación de potencia depende de la susceptibilidad magnética de la partículas (ec. 3.19), que a su vez es función del diámetro de la nanopartícula. En esta sección se presentarán los resultados obtenidos para el calentamiento de las muestras relacionadas en la tabla 4.1.



Figura 4.17: Detalle del termómetro de alcohol empleado para las mediciones de temperatura.

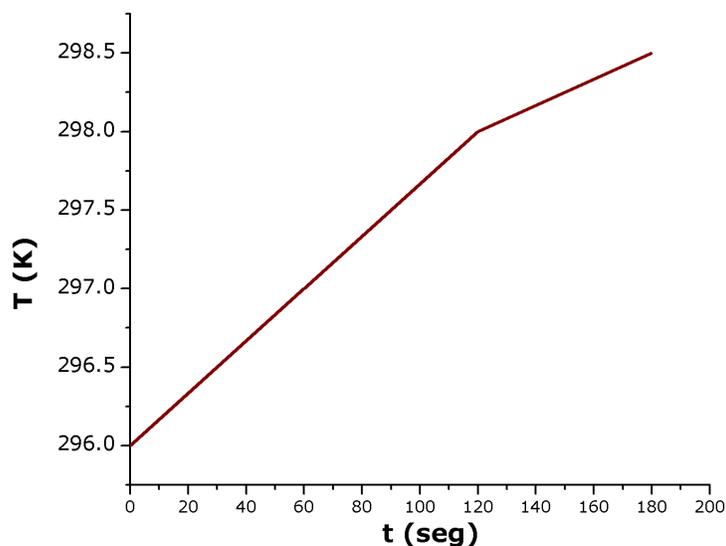


Figura 4.18: Mediciones de temperatura en función del tiempo para nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico. Pruebas iniciales.

Para hacer las mediciones del calentamiento de las nanopartículas se empleó un termómetro de alcohol, el cual se colocaba dentro de un termo pequeño que a su

vez se ubicaba en medio de dos bobinas que pertenecen a un circuito que genera un campo AC con frecuencia de 115 kHz. Se hacía una grabación de la escala del termómetro, la cual posteriormente se procesaba para obtener las curvas respectivas. Un detalle de estas grabaciones se muestra en la figura 4.17.

Se hicieron pruebas preliminares para registrar la efectividad del calentamiento de las mismas con el circuito. De estos experimentos iniciales se muestra un resultado en la figura 4.18. Aquí se tomó 1 ml de solución con nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico en tolueno al 1 % w/w y se calentó durante 200 segundos. Como puede verse, la temperatura incrementó 2.5 grados.

Una vez que se determinó que el circuito efectivamente producía condiciones para tener calentamiento mensurable de la temperatura de las nanopartículas, se colocó en el termo 1 ml de solución de cada muestra por vez, con concentraciones de 0.5 wt % para las muestras con recubrimientos de DEXTRAN y silica, y de 1 wt % para las de ácido oleico y PEI. En la figura 4.19 se muestran los resultados de la medición de temperatura en función de tiempo para todas las muestras.

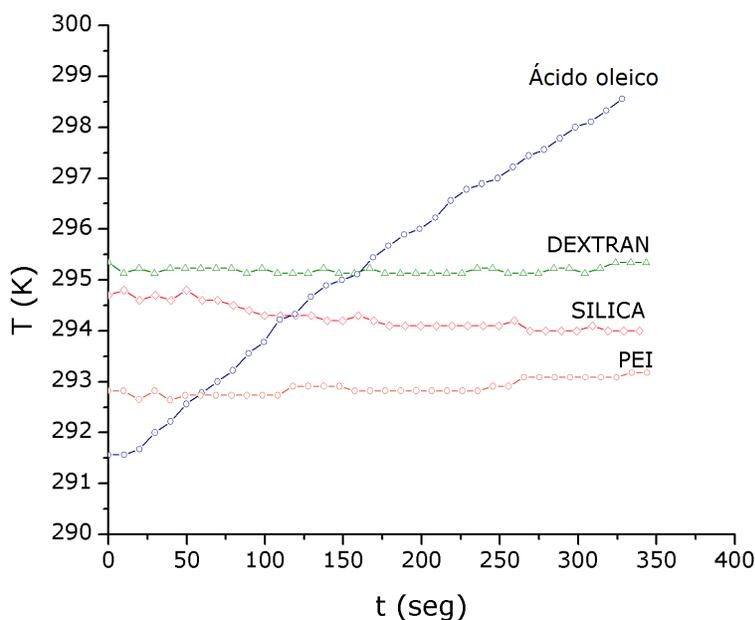


Figura 4.19: Mediciones de temperatura en función del tiempo para nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, silica y PEI.

Se realizó sobre los resultados de la figura 4.19 un ajuste lineal en cada caso, con el fin de determinar la pendiente de cada curva y así obtener la tasa de absorción específica SAR de cada muestra. En la tabla 4.8 se presentan los resultados del valor

de SAR para todas las muestras calculado con la ecuación 3.18. Se relacionan en las columnas la masa de la muestra $m_{muestra}$, la masa de las nanopartículas que contiene la muestra m_{np} , y el factor SAR calculado con los valores de los ajustes lineales correspondientes.⁶

Muestra	$m_{muestra}$ (g)	m_{np} (g)	SAR (W/g)
Ácido Oleico	0.878 ± 0.001	0.011 ± 0.001	7.2 ± 0.3
DEXTRAN	1.667 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.1 ± 0.2
Silica	1.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	-4.0 ± 0.3
PEI	1.014 ± 0.001	0.014 ± 0.001	0.4 ± 0.3

Tabla 4.8: Determinación del valor del SAR para todas las muestras a partir de las mediciones presentadas en 4.19.

Para la muestra de silica el valor de SAR que obtuvimos arroja un resultado negativo, lo cual es consecuencia de que las nanopartículas recubiertas en silica cuando están en la suspensión tienden a irse al fondo del termo, ocasionando que la medición no provea información correcta. Otro factor que puede influir en este comportamiento no esperado del calentamiento es el hecho de que las nanopartículas no están suspendidas de forma individual, sino que están ligadas a la matriz de silica, lo cual les impide rotar por el mecanismo de Brown. Este carácter de adhesión se presenta en los resultados obtenidos en el TEM mostrados en la figura 4.8.

En los casos de DEXTRAN y PEI, si bien determinamos valores positivos del SAR, observamos también baja eficiencia en el calentamiento. Esencialmente esto es producto de las variaciones en dos factores: el primero es el volumen hidrodinámico de las nanopartículas que cambia dependiendo del surfactante, y el segundo corresponde a la viscosidad que es una propiedad particular del medio líquido. Estos dos factores influyen en el tiempo de relajación de Brown (ver sección 2.4.2), por lo cual alteran también el tiempo de relajación total.

A partir del comportamiento de los tiempos de relajación en función del diámetro de las nanopartículas (fig. 2.5) y considerando el comportamiento de la potencia disipada para el caso de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico mostrado

⁶En esta tesis se aplica sobre todas las muestras el mismo campo aplicado, con la misma la frecuencia, no obstante, se hace hincapié en la importancia de ser cuidadoso para comparar los resultados obtenidos del SAR, porque dependen fuertemente de estos dos factores. (Drake, 2007) [17] Recuérdese la dependencia de la potencia generada mostrada en la figura 3.5.

en la figura 3.5 para la frecuencia de 115 kHz, tenemos que los volúmenes de las nanopartículas en nuestras muestras de DEXTRAN y PEI son mayores que en el caso de ácido oleico, y por tanto se ubican fuera del máximo del SAR, donde la eficiencia del método cae rápidamente para dicha frecuencia (ver figura 4.9).

De los resultados presentados podemos ver que la muestra que más se calienta es la que tiene el recubrimiento de ácido oleico, muestra que también es aquella que contiene nanopartículas superparamagnéticas cuya temperatura de bloqueo es aproximadamente la temperatura ambiente, según los resultados de la magnetización medida en el VSM presentados en las secciones precedentes.⁷

Observamos que el calentamiento de las nanopartículas recubiertas con ácido oleico es posible, pero de esta afirmación se deriva una implicación sobre los demás recubrimientos, y es que es necesario proponer un reajuste de los parámetros dominantes del mecanismo. Éstos serían el volumen magnético de las partículas, el volumen hidrodinámico y la frecuencia para cada caso particular.

En otras palabras, en el caso de los recubrimientos de DEXTRAN y PEI sería recomendable disminuir el volumen magnético de la nanopartícula lo cual a su vez reduciría el volumen hidrodinámico, optimizando simultáneamente la relación entre los tiempos de relajación. Recordemos que la variación de los parámetros debe hacerse en forma controlada sin descuidar el equilibrio de todos los involucrados, porque una mala compensación de alguno de éstos puede derivar en la generación de dificultades en algún otro. Hay otra alternativa para mejorar el calentamiento cambiando la frecuencia del campo magnético aplicado para obtener el máximo rendimiento. Ésta no es tan recomendable por la dificultad experimental que ofrece, pero aún así es viable.

Las revisiones indicadas para mejorar la respuesta de las nanopartículas a la relajación de Brown resultan imprescindibles para plantear protocolos de aplicación en los sistemas *in vivo*. Cabe anotar que en esta discusión nos referimos a sistemas *in vivo* genéricos, porque no hemos hecho énfasis sobre la diferencia que se presenta a nivel tisular, en donde el proceso de calentamiento puede variar también por factores biológicos propios de cada tejido.

Finalmente, los resultados que se obtienen por las distintas técnicas dependen

⁷Para nanopartículas con esta condición sobre su temperatura de bloqueo se ha propuesto que generan más calor que las partículas ferromagnéticas que se someten a un campo magnético alterno de más frecuencia. (Atsumi, 2007) [3]

del tiempo de medición del sistema τ_m , que es más grande a 115 kHz. Es decir, una nanopartícula que presente $T_B \approx 80$ K en VSM, en la bobina del circuito tendrá $T_B \approx 180$ K. Es fundamental para entender el proceso, puesto que un material superparamagnético puede estar bloqueado en condiciones distintas de trabajo. Esto admite cierto comportamiento que debe analizarse a la luz del modelo, que no es exacto pero reproduce resultados lógicos.

*Haemoglobin is the key
to a healthy heart beat...*

Brian Molko (1972 - actual)

5

Cuantificación de la cantidad de nanopartículas en tejidos biológicos

5.1. Cuantificación de nanopartículas

A lo largo de esta tesis se ha mencionado la importancia en el tratamiento de tumores por hipertermia de determinar la cantidad de material magnético que debe darse al paciente para generar la respuesta deseada. Esta determinación de la cantidad de material magnético en el organismo no es un procedimiento simple, puesto que se trata de un sistema dinámico en constante adaptación y con gran dependencia del entorno. (Glöckl, 2006) [23]

Es conocido que la hemoglobina presente en los eritrocitos tiene una susceptibilidad magnética no nula, y el efecto del campo en éstas células ha sido ampliamente estudiado en el contexto de flujos biológicos. Bajo la aplicación de campos suficientemente grandes, la sangre se magnetiza de forma paramagnética o diamagnética dependiendo de su oxigenación. (Williams, 2008) [73] Dicha dependencia influye en que una determinación precisa del material magnético pueda verse seriamente afectada. Tales razones nos han llevado a proponer un método

de cuantificación de nanopartículas a través de la determinación de la cantidad de éstas por mediciones de magnetización. Cabe señalar que en la literatura, hasta la fecha, no se reporta un método similar para hacer la cuantificación de cantidad de nanopartículas magnéticas monodominio para su uso en hipertermia.

Para verificar la capacidad de realizar la cuantificación se realizó un experimento de detección de la cantidad de nanopartículas en tejido muscular, con tal cantidad conocida previamente. Nótese que un procedimiento con dichas características es un mecanismo piloto para la elaboración de protocolos que indiquen cantidades de material magnético para los diferentes tratamientos por hipertermia.



Figura 5.1: Muestras de carne para determinación de la cantidad de material magnético a través de la medición de magnetización versus campo. La muestra 1 no contiene material magnético, mientras que la 2 y la 3 contienen nanopartículas extraídas de soluciones con distintas concentraciones. Dentro del portamuestras, la muestra del líquido con mayor concentración. No se muestra la correspondiente al líquido con menor concentración.

Para efectuar las mediciones se tomaron tres muestras de tejido muscular (carne vacuna), todas mostradas en la figura 5.1. De éstas, la número 1 se midió sin material magnético agregado. Se usó una solución de nanopartículas de magnetita recubiertas con DEXTRAN (sección 4.1.2), con concentración de 0.56 %wt¹, de la cual se agregó una gota a la muestra 3, y se preparó una dilución de 0.5 ml de ésta misma

¹Referido a la cantidad de nanopartículas por cantidad de suspensión.

en 1 ml de agua para agregarle una gota a la muestra 2. En la tabla 5.1 se relacionan los datos de la masa de la muestra $m_{muestra}$ y una observación general de cada una de ellas.

Muestra	$m_{muestra}$ (g)	Observaciones
1	0.1717	Sin material magnético agregado
2	0.1358	Concentración de material magnético: 0.0273 %wt
3	0.1266	Concentración de material magnético: 0.56 %wt
4	0.1268	Líquido con menor concentración (muestra 2)
5	0.0859	Líquido con mayor concentración (muestra 3)
Portamuestras	0.1299	Rígido, con susceptibilidad magnética conocida: $\chi_{pm} = -5,5 \times 10^{-7}$ emu/g·G.

Tabla 5.1: Características de las muestras de tejido muscular mostradas en la figura 5.1, y del portamuestras empleado en la medición.

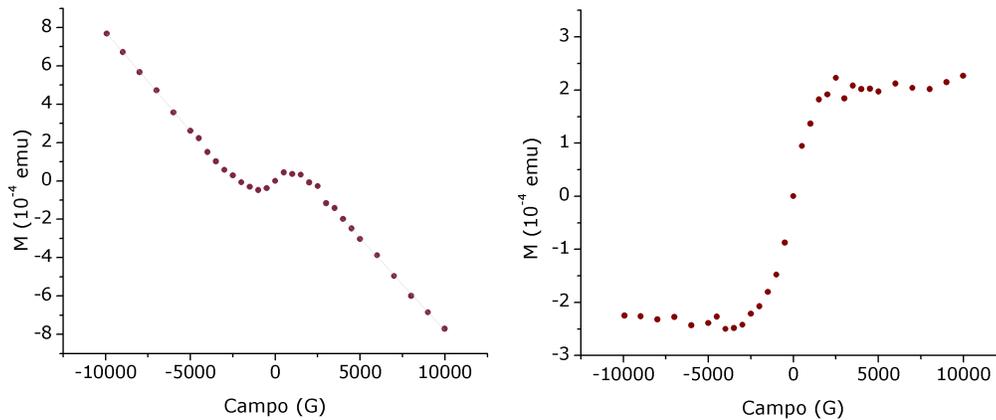


Figura 5.2: Curvas de magnetización obtenidas a partir de la medición de la muestra 1, de carne sin material magnético agregado. (a) Curva experimental. (b) Curva ajustada por la señal del portamuestras.

Se midió un ciclo de 10000G a -10000G a $T = 250\text{K}$ para congelar la muestra, obteniendo la curva mostrada en la figura 5.2(a). De esta curva se hizo un recálculo considerando la contribución a la señal de residuos de hierro en el portamuestras, obteniendo la curva de la figura 5.2(b).

Se obtuvo un valor de M_S de dichos residuos de $2,2 \pm 0,2 \times 10^{-4}$ emu. A partir de

este valor, y considerando que la magnetización por unidad de masa del hierro² es aproximadamente 229 emu/g, resulta que la masa correspondiente a algún residuo de hierro en el conjunto muestra/portamuestra es de 0,96 μg aproximadamente. Este valor se tuvo en cuenta para hacer las correcciones sobre las señales de las otras muestras.

A partir del tratamiento la curva mostrada en la figura 5.2(a) se encontró el valor de la susceptibilidad magnética de la carne, a saber, $\chi_{carne} = -5,82 \times 10^{-7}$ emu/g·G. Se midieron las curvas de M vs. H para las muestras líquidas de baja y alta concentración, las cuales se muestran en la figura 5.3.

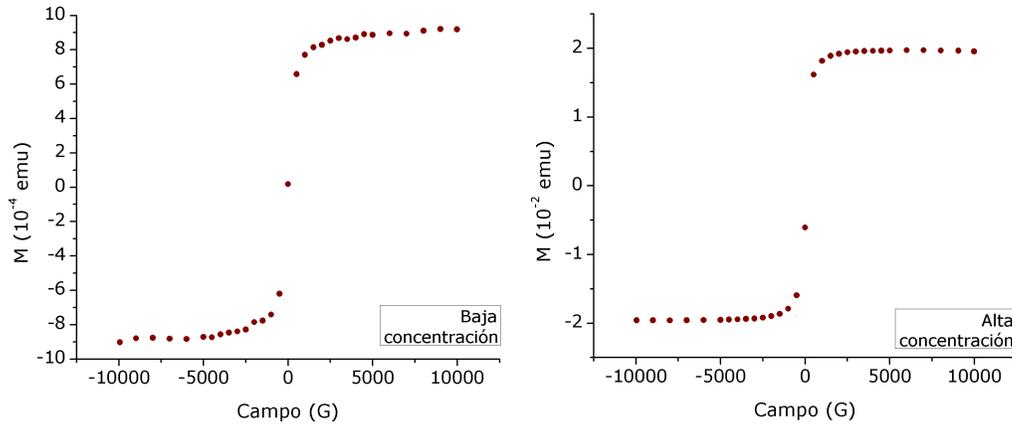


Figura 5.3: Curvas de magnetización de las suspensiones de partículas de baja y alta concentración respectivamente.

Considerando los resultados para la muestra con alta concentración (ver figura 5.3(b)), se tiene para la magnetización M_{alta} que:

$$M_{alta} = M_{medida} - H\chi_{pm}m_{pm} \quad (5.1)$$

en donde M_{medida} es la que se obtiene del experimento, H es el campo aplicado, y $\chi_{pm}m_{pm}$ es la susceptibilidad magnética del portamuestras multiplicada por su masa.

A partir de los datos de la figura 5.3 se obtiene que la magnetización de saturación de la muestra de alta concentración es $M_S = 1,9 \pm 0,3 \times 10^{-2}$ emu, lo cual, considerando la masa y la concentración de la misma (ver tabla 5.1), permite

²Tomando la magnetización de saturación $M_S = 1800$ emu/cm³ y la densidad del hierro como $\rho = 7,86$ g/cm³.

determinar que en la muestra se encuentran $4,7 \pm 0,4 \times 10^4$ g de nanopartículas. De esta forma, se obtiene que la magnetización de saturación de las nanopartículas es:

$$M_S = 41,6 \pm 0,5 \text{ emu/g} \quad (5.2)$$

Posteriormente, para la suspensión de baja concentración se tiene que:

$$M_{baja} = M_{medida} - H [\chi_{pm}m_{pm} + \chi_{agua}m_{agua}] \quad (5.3)$$

en donde las variables son las mismas que en el caso anterior (ec. 5.1), y se considera además el término $\chi_{agua}m_{agua}$, dado por el producto de la susceptibilidad magnética del agua y su masa. En éste caso, se considera esta contribución porque la contribución de la misma es comparable a la del portamuestras. Se considera que $\chi_{agua} = -6,8 \pm 0,4 \times 10^{-7}$ emu/g·G (Sosa, 2006) [62], y de esta forma resulta que la magnetización de saturación para la muestra es $M_S = 8,9 \pm 0,4 \times 10^{-4}$, la cual, al restar la contribución ferromagnética del portamuestras anteriormente calculada, resulta:

$$M_S = 6,7 \pm 0,4 \times 10^{-4} \text{ emu/g} \quad (5.4)$$

Considerando este valor y el resultado obtenido previamente en la ecuación 5.2, se obtiene para esta muestra una cantidad de $1,6 \pm 0,4 \times 10^{-5}$ g de nanopartículas. Luego, con la masa de la muestra se obtiene la concentración, como $1,3 \times 10^{-2}$ %wt.

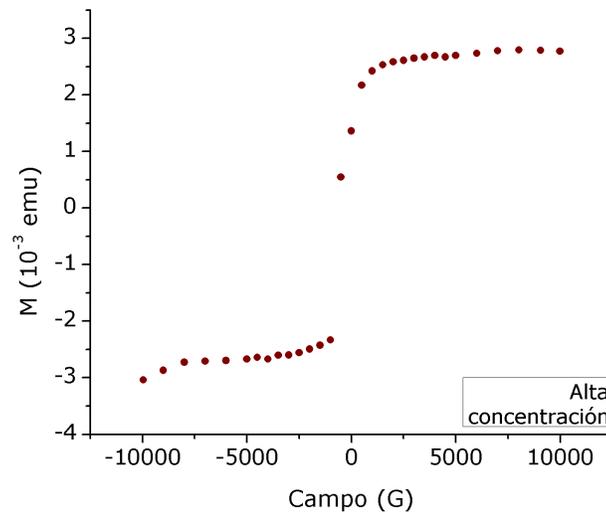


Figura 5.4: Curva de magnetización de la muestra de carne con agregado de material magnético de alta concentración.

En la figura 5.4 se muestra la curva de M vs. H obtenidas para la muestra 3 que contienen material magnético agregado en alta concentración. Considerando que en cada una de las muestras se puso una gota de la solución respectiva, y que la masa de una gota es $8,52 \times 10^{-3}$ g, se tiene para la muestra que $n_{alta} = 4,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$ g de nanopartículas.

En la tabla 5.2 se relacionan comparativamente los resultados obtenidos de la cantidad n de nanopartículas para las muestras 2 (n_{baja}) y 3 (n_{alta}), según la determinación experimental y el cálculo estimativo.

Muestra	n calculadas (g de nanopartículas)	n experimental (g de nanopartículas)	Diferencia porcentual (%)
2	$1,1 \pm 0,3 \times 10^{-6}$	—	—
3	$4,7 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$6,1 \pm 0,5 \times 10^{-5}$	23

Tabla 5.2: Comparación de cantidad de nanopartículas calculadas y determinadas experimentalmente para las muestras de carne con agregado magnético de baja y alta concentración, respectivamente.

En estos resultados se tiene que la cantidad de partículas que se considera se colocó en cada muestra no se corresponde con la cantidad de partículas detectadas con las mediciones de magnetización. Para la muestra 2 la determinación experimental exige un nivel de sensibilidad del instrumento de medición más alto, por lo cual no se presentan tales resultados.³ Para la muestra 3 se obtuvo una variación ligera entre los valores, resaltando que se presentan en el mismo orden de magnitud.

La discrepancia en las estimaciones puede deberse a que cada suspensión luego de un tiempo se estratifica, por lo cual al tomar una gota de la parte inferior de la solución, resulta que se tiene una concentración mayor de nanopartículas. Luego, la selección de cada gota presenta errores asociados a la precisión. Otro hecho que puede contribuir a la diferencia en estos resultados, está asociado a la incapacidad de establecer el número exacto de nanopartículas que se transfieren al material por efecto de la preparación de la muestra.

Aún así, un punto importante para destacar de este método propuesto es que permite detectar una cantidad de partículas del orden de 5×10^{-2} %wt (la masa de nanopartículas frente a la masa de la muestra), lo cual indica un valor límite de

³El rango dinámico del sistema VSM va de 5×10^{-6} emu hasta 10^3 emu, por lo cual la determinación experimental en el caso de la muestra 2 no es del todo adecuada.

detección que posibilita la discriminación del material magnético evitando que éste pueda confundirse con la hemoglobina de la sangre.

5.2. Captación de nanopartículas magnéticas en sistemas *in vivo*

Con el objetivo de evaluar la captación natural de las nanopartículas magnéticas por el organismo, estudiamos en una población de ratones con tumor mamario LM3 inducido la respuesta a la incorporación de nanopartículas de magnetita sin recubrimiento, las cuales se hacen hidrosolubles mediante el empleo de oleato de sodio. Para hacer este estudio de captación se contó con la colaboración del Dr. Pablo Gurman del grupo MEMS (Dispositivos Electromecánicos) del Centro Atómico Constituyentes, quien llevó a cabo la inducción subcutánea de los tumores en los ratones con la posterior inyección de las nanopartículas, y la toma de muestras para ser analizadas en el Laboratorio de Resonancias Magnéticas del CAB. Los resultados de dichos análisis se presentan en esta sección.

En la figura 5.5 se muestra un prototipo de los ratones que se han usado para efectuar los estudios de captación. Aunque los ratones de la figura no son los mismos de los cuales se presentan resultados en esta tesis, el procedimiento para llevar a cabo el análisis de captación es el mismo.

Inicialmente se induce sobre la espalda de los animales el tumor mamario hasta que crece y alcanza ciertos parámetros específicos de evolución. Las nanopartículas se inyectan vía intravenosa a cada ratón, sometiendo a algunos a un campo magnético no homogéneo mediante la fijación de un imán en la superficie tumoral externa. Esto se hace porque se pretende correlacionar la captación de las nanopartículas con la presencia de dicho campo magnético en la zona de interés. Una vez que se han inyectado las nanopartículas y se ha aplicado o no el campo, los ratones son sacrificados y se toma muestra del tejido del tumor. Para poder estudiar la captación debe tenerse en cuenta que no hay un recubrimiento activo que genere o medie la fijación de nanopartículas en la zona del tumor, se pretende investigar la adhesión natural de éstas a las células malignas.

En diferentes muestras del tejido se efectuaron mediciones en un magnetómetro comercial tipo SQUID marca Quantum Design modelo MPMS2 de las muestras con

diamagnetismo a alto campo, con ordenada al origen correspondiente a la saturación M_S de la magnetita, con una temperatura de 50 K. Estos resultados se muestran en la tabla 5.3.

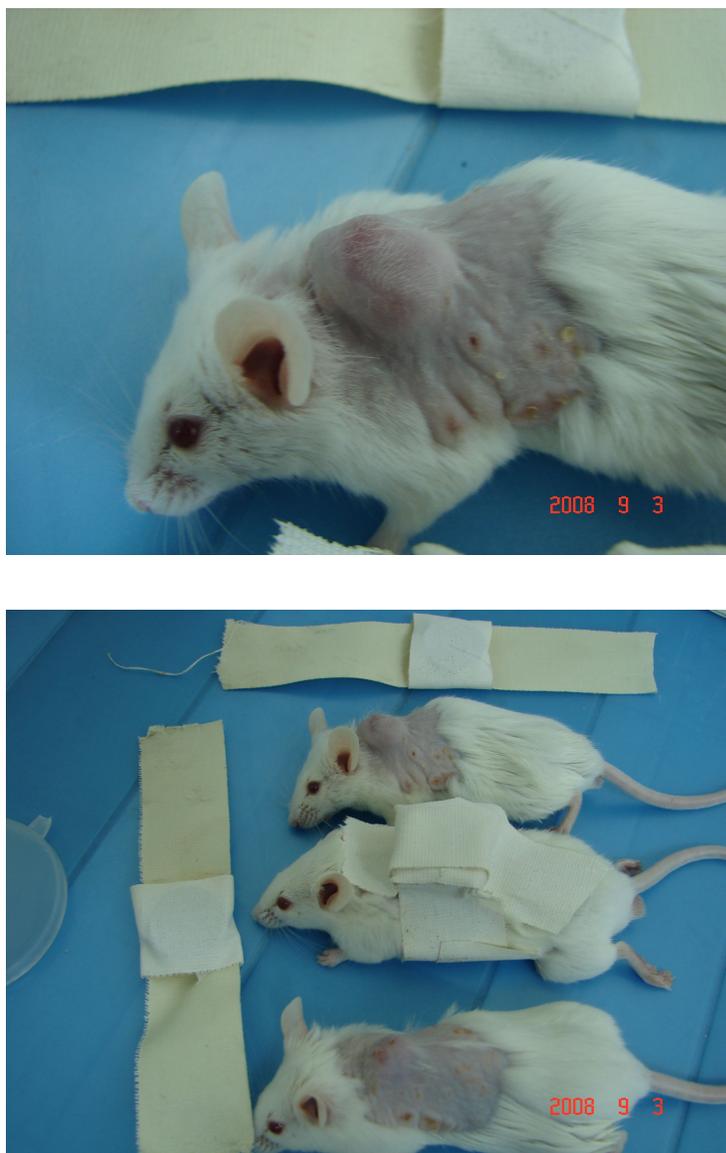


Figura 5.5: Prototipo de los ratones portadores de tumor mamario LM3 inducido usados en pruebas de captación. (a) Morfología del tumor en un ratón. (b) Arquetipo de la disposición de ratones empleados para los estudios. Nótese la presencia de imanes sobre uno de los especímenes.

A partir de mediciones de magnetización con un campo aplicado de 10^4 G para las muestras A y D se efectúa la superposición de la Langevin con el diamagnetismo, con lo cual puede calcularse el valor medio del momento magnético en cada muestra, y por consiguiente, la cantidad asociada de nanopartículas.

Muestra	$m_{muestra}$ (mg)	M_S (emu)	Descripción
A	$5.7 \pm 0,2$	$8,2 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	Sin imán externo
B	$6.8 \pm 0,2$	$3,9 \pm 0,4 \times 10^{-5}$	Sin imán externo
C	$29.5 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	Con imán externo
D	$93.7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,5 \times 10^{-4}$	Con imán externo

Tabla 5.3: Características de las muestras de tejido tumoral de ratones: masa de las muestras, magnetización de saturación (sin normalizar) y descripción de las mismas.

Considerando la magnetización de saturación estimada para la magnetita bulk ($M_S \approx 92,5$ emu/g) (Betancourt, 2004; Vereda, 2008) [7, 72], y la influencia de la capa magnéticamente débil (ver sección 4.2.4), se determina la masa de las nanopartículas m_{np} en las muestras A y D como se muestra en la tabla 5.4. En estos resultados se observa una leve diferencia entre la cantidad de nanopartículas que se detectan en muestras que han sido sometidas a campo magnético no homogéneo y aquellas que no han interactuado con ningún campo. En este caso se pretende verificar si existe alguna correlación en la captación natural y la presencia del campo magnético de un imán permanente en la zona del tumor inducido.

Muestra	$\bar{\mu}$ (μ_B)	m_{np} (g)	Concentración (ppm)
A	1504	$2.06 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	0.31
D	1332	$5.13 \pm 0,2 \times 10^{-6}$	0.05

Tabla 5.4: Momento magnético medio $\bar{\mu}$, cantidad y concentración (en $\mu\text{g/g}$) de nanopartículas para las muestras A y D relacionadas en la tabla 5.3.

Según los resultados observamos que se presenta un cambio en cuanto a la cantidad de nanopartículas que son detectadas en el caso de la muestra que tiene influencia del campo magnético inhomogéneo producido por el imán permanente, y la muestra que no lo tiene. No obstante, esta variación no es demasiado grande, lo cual nos indica que para esa configuración de campo el gradiente no es el ideal. Por lo tanto, para optimizar el proceso de captación habrá que diseñar la configuración

de campo apropiado para inducir mayor fijación de las nanopartículas en las células malignas.

El análisis que se ha hecho es un estudio que muestra la factibilidad de determinar con técnicas experimentales la cantidad de material magnético presente en una muestra de tejido de forma precisa. El método es completamente reproducible, y ofrece ventaja sobre otros puesto que separa adecuadamente la contribución de la señal magnética producida por el hierro presente en la sangre (hemoglobina) de la señal originada por la presencia de las nanopartículas.

Con la metodología que hemos propuesto a lo largo de este capítulo es posible fundamentar la elaboración de protocolos para determinar la cantidad de material magnético que se inyectará en pacientes según cada tipo de tumor. Para llegar a esto, es necesario proponer configuraciones de gradiente de campo de acuerdo a las condiciones particulares de los tejidos, además de establecer la influencia de otros parámetros como los que se han ido revisando en esta tesis.

*One may ask the question as to the extent to which
the quest for beauty is an aim in the pursuit of science...
It is, indeed, an incredible fact that what the human mind,
at its deepest and most profound,
perceives as beautiful finds its realization in external nature.*

S. Chandrasekhar (1910-1995)

6

Conclusiones

La hipertermia es hoy en día una técnica promisoriosa en el tratamiento del cáncer. La idea de la misma es poder dirigir nanopartículas a sitios específicos de un tejido cancerígeno, para después calentarlas usando un campo magnético AC externo incrementando así la temperatura de las células. Este aumento ocasiona la destrucción selectiva de las células vecinas y en principio este mecanismo de calentamiento es aplicable a cualquier tipo tumoral. Para poder utilizar este procedimiento es necesario que las nanopartículas que se emplean sean superparamagnéticas, para minimizar los riesgos de ocurrencia de agregados de material magnético que puedan afectar los procesos normales del organismo.

A lo largo de esta tesis de maestría estudiamos un conjunto de muestras de nanopartículas de magnetita y discutimos resultados e implicaciones de los mismos. En este capítulo, a modo de sumario, presentamos conclusiones generales que complementan tales análisis.

Puntualmente, la síntesis de las nanopartículas magnéticas es uno de los factores que tiene mayor influencia en el éxito de la hipertermia como modalidad de tratamiento contra el cáncer. Esto es principalmente porque se requiere que las partículas cumplan un conjunto de condiciones sobre su tamaño, forma y estabilidad para optimizar su uso en este tipo de técnicas. De esta manera, un conocimiento detallado de la respuesta del material magnético permite establecer las cantidades

mínimas de éste que generarían distribuciones específicas y terapéuticas de energía térmica (dosis) dentro de un tumor.¹ Para lograr lo anterior, es necesario efectuar estudios de la forma y configuración de las nanopartículas considerando posibles factores que sean de carácter influyente en su desempeño.

En esta tesis hemos trabajado con nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico, DEXTRAN, polietilenimina, silica y polietilenglicol. Analizamos morfológicamente las muestras de nanopartículas por microscopía electrónica de barrido obteniendo distribuciones de tamaño de las mismas entre 5 nm y 25 nm de diámetro aproximadamente para todas ellas, además de imágenes de la dispersión de las mismas en las diferentes muestras. Según el modelo propuesto por Rosensweig (Rosenweig, 2002) [57] al desarrollar relaciones analíticas para determinar la potencia que se disipa en un ferrofluido que se somete a un campo magnético alterno, hay evidencia de un tamaño óptimo de las nanopartículas para el cual se alcanzan tasas de calentamiento favorables. Este tamaño óptimo se encuentra en el rango de tamaños de nanopartículas que empleamos en esta tesis.

Para dar cuenta del calentamiento de las nanopartículas en cada muestra hemos determinado el índice de absorción específico calentándolas por un tiempo de seis minutos en un circuito que produce un campo alterno de aproximadamente 112 Oe de intensidad con una frecuencia de 115 kHz. Los resultados arrojan que las nanopartículas que exhiben más efectividad en la tasa de calentamiento son aquellas recubiertas con ácido oleico cuando están suspendidas en tolueno. A pesar de la baja eficiencia en el calentamiento obtenida para los demás recubrimientos, hemos determinado la validez de aplicación del modelo para estos casos según la respuesta del tiempo de relajación para distintos tamaños de las partículas.

A partir de los resultados del SAR no obtuvimos calentamiento eficiente en dos de las muestras, por lo cual propusimos dos formas básicas de mejorar la respuesta de las nanopartículas al calentamiento: por un lado, una disminución del volumen hidrodinámico de la partícula que no afecte en demasía sus propiedades magnéticas; y por otro lado, un cambio en la frecuencia del campo magnético aplicado para ubicar un punto equilibrado entre el tamaño de las nanopartículas y la eficiencia de la potencia que disipan. En el primer caso, una reducción del diámetro magnético implicaría una disminución de V_H , lo cual favorecería el calentamiento siempre y

¹Actualmente los cálculos de energía térmica se hacen con el modelo desarrollado por Sapareto (Sapareto, 1984) [58] en el cual básicamente se convierte una curva de temperatura-tiempo a un tiempo equivalente a 43°C.

cuando no se comprometa excesivamente la respuesta magnética del sistema. El segundo caso tiene asociada una desventaja a nivel experimental principalmente, puesto que habría que hacer varias modificaciones sobre el circuito que genera el campo. No obstante, es una opción viable también para mejorar la eficiencia de la técnica. Nótese que cualquiera de las dos soluciones deben considerarse antes de realizar cualquier protocolo de aplicación, con el fin de tener en cuenta las implicaciones de las mismas sobre la cantidad de material magnético que finalmente se introducirá al paciente para el tratamiento.

Por otro lado, la caracterización magnética es un método adecuado para determinar la distribución de tamaños de las partículas. Por ello estudiamos variaciones en el comportamiento de la magnetización en función de la temperatura y el campo aplicado para los cuatro tipos de recubrimientos. Para las muestras con recubrimientos de ácido oleico, DEXTRAN y PEI se obtuvieron respectivamente valores de la magnetización de saturación M_S correspondientes al 30 %, 43 % y 12 % del valor de 92.5 emu/g para la M_S de la magnetita bulk que se reporta en la literatura. (Betancourt, 2004) [7] Esto responde al modelo de la capa magnéticamente débil y está en concordancia con las distribuciones de tamaños obtenidas con el análisis de las curvas FC y ZFC.

Una particularidad que discutimos en la tesis y sobre la cual queremos hacer énfasis es que a partir del análisis de las curvas de magnetización en función del campo para la muestra con recubrimiento de silica, obtuvimos que éste surfactante altera no solamente el tamaño y la forma de las nanopartículas de magnetita sino también el orden magnético de la superficie de éstas. En este caso, es válido emplear un modelo de carozo monodominio (descrito por una función de Langevin) con capa paramagnética (descrita por una función lineal con el campo) para describir tal comportamiento. En cuanto a los otros recubrimientos obtuvimos resultados en concordancia con el carácter superparamagnético de las partículas a las temperaturas de medición especificadas.

Propusimos un método para cuantificar la cantidad de nanopartículas de magnetita en tejido biológico a partir de mediciones de magnetización. En este desarrollo buscamos garantizar una determinación del material magnético independiente de la señal producida por la hemoglobina, obteniendo un procedimiento experimental confiable con un límite de detección del orden de los 0.05 %wt. Esta estrategia se utilizó para estudiar la captación natural en sistemas *in vivo* mediante el análisis de muestras de tejido tumoral mamario inducido en ratones. De aquí concluimos

que es necesario evaluar las configuraciones de campo magnético que generen gradientes optimizados en pro de mejorar la captación de las nanopartículas en las zonas tumorales.

Consideramos indispensable resaltar que aún a pesar de tratarse de nanopartículas de magnetita sintetizadas de la misma forma, los diferentes surfactantes generan que las propiedades que hemos estudiado en esta tesis presenten variaciones mensurables. Estos cambios influyen en el desempeño del material magnético sometido a iguales condiciones de campo y frecuencia principalmente. De ahí que puedan emplearse en multiplicidad de aplicaciones de carácter biológico por el amplio rango de acción terapéutica (dependiendo de los recubrimientos) para el tratamiento por hipertermia.

Aunque la mayor limitación del tratamiento de tumores por hipertermia está en la necesidad de lograr una captación adecuada de las partículas magnéticas en el tumor o dentro del suministro arterial del mismo, otro tema de importancia es la fijación de cantidades específicas de partículas según el tipo de tumor que va a tratarse. La importancia del análisis que hemos desarrollado en este trabajo radica en el impacto que tiene sobre la creación de protocolos de aplicación de los tratamientos de hipertermia. En estas páginas ofrecemos el fundamento básico para poder establecer parámetros determinantes sobre el tipo y la cantidad de material magnético que se empleará en el tratamiento de un tumor específico.

En perspectiva se planea sintetizar partículas de menor tamaño de tal forma que pueda mejorarse la eficiencia del proceso de calentamiento. También se pretende continuar con estudios acerca de la captación diferencial de las nanopartículas de magnetita en una población de ratones con características similares a las expuestas aquí para obtener resultados trazables a otros tipos tumorales y otras especies. Se pretende efectuar un estudio de plausibilidad más completo, empleando además de los recubrimientos vistos en esta tesis, variaciones de éstos con cromoproteínas como la porfirina y otras moléculas de interés biológico como anticuerpos y medicamentos. También se espera desarrollar un dispositivo que tenga la capacidad de generar diversas configuraciones de campos magnéticos, más acordes a las patologías particulares. El trabajo que sigue para formalizar la hipertermia como una técnica terapéutica en el tratamiento de cáncer es un área interdisciplinar que aún requiere investigación activa y resultados contundentes.

Apéndices

*An extensive knowledge is needful to thinking people
-it takes away the heat and fever;
and helps, by widening speculation,
to ease the burden of the mystery*

John Keats (1795-1821)

A

Aspectos biológicos de la hipertermia

El efecto sinérgico de la hipertermia con la radioterapia y la quimioterapia ha sido ampliamente estudiado en los últimos años. Se han documentado experiencias de la aplicación conjunta de dichas técnicas en varios tipos de tumores. (Franckena, 2009; Maier, 2007) [20, 50] Durante la tesis no se hizo énfasis en el proceso biológico subyacente esta técnica de tratamiento para el cáncer, por lo cual en este anexo se presentará una exposición breve y un poco más profunda de la misma, desde el punto de vista de la radiobiología.

La hipertermia puede presentar efectos citotóxicos directos, indirectos con la perfusión sanguínea, estimulantes del sistema inmune y sinérgicos con otras técnicas como son la radioterapia y quimioterapia, como se mencionó en la sección 2.1. Entre los efectos citotóxicos directos cabe anotar que por encima de los 42°C se han presentado *in vitro* alteraciones en la membrana celular, en las proteínas intracelulares, en el citoesqueleto y en los ácidos nucleicos principalmente. Estas alteraciones producen otras, que en conjunto generan el daño completo.

Cuando se tiene un cultivo celular con crecimiento exponencial y se expone a temperaturas entre los 41°C y los 46°C, se puede elaborar una curva para representar la evolución del efecto en el cultivo causada por la influencia de dicho parámetro. Una

curva típica de respuesta celular puede ser la que se obtiene de la tasa de células que sobreviven en función del tiempo de duración del calentamiento, como la mostrada en la figura A.1. Esta curva presenta un hombro que refleja un efecto de dos pasos sobre la población celular. Estos dos pasos son, por una parte un crecimiento lineal que refleja un daño no letal y reversible al inicio del tratamiento, y por otra parte, un decaimiento exponencial que refleja la muerte celular. (Hildebrandt, 2002) [35]

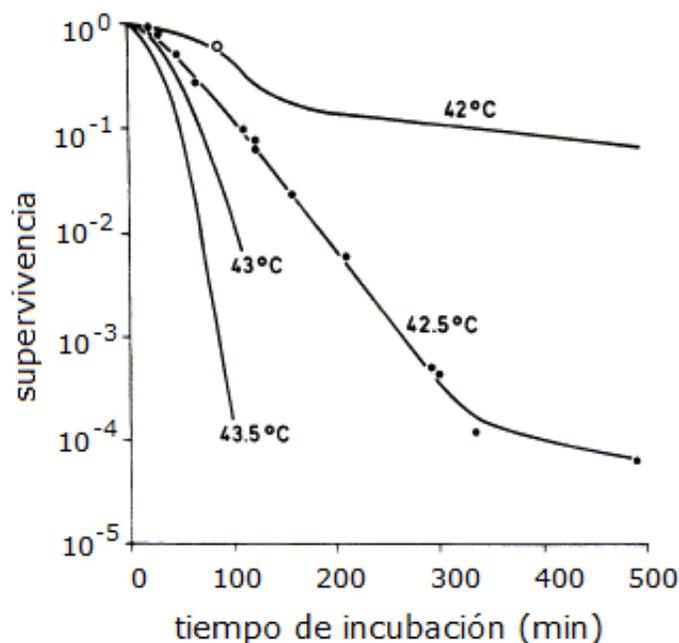


Figura A.1: Efecto letal de la hipertermia *in vitro*. Imagen tomada de Hildebrandt. (Hildebrandt, 2002) [35]

La temperatura necesaria para inducir muerte celular por hipertermia varía en un algún factor según el tipo de célula tumoral que se esté tratando. De cualquier forma, los estudios revelan que la energía térmica requerida para generar muerte celular por hipertermia están muy correlacionados con la energía requerida para desnaturalizar las proteínas celulares. Por esta razón se ha propuesto una hipótesis en la cual se relaciona el efecto citotóxico de la hipertermia con la desnaturalización de las proteínas de membrana y citoplasmáticas, aunque no existe un modelo teórico que pueda explicarlo claramente. (Hildebrandt, 2002) [35]

Según la fase del ciclo celular¹ en el que se encuentren las células, el impacto de

¹Ampliar tema de ciclo celular en Curtis (Curtis, 2008) [16].

la hipertermia puede variar su intensidad. Este impacto es lo que se conoce como termosensibilidad. Se ha observado que la fase de mitosis (M) es la más sensible al aumento de temperatura.² La fase de síntesis (S) también resulta ser muy sensible a la hipertermia³, según se ve en el daño cromosómico de células sometidas al tratamiento. Las células más resistentes al aumento de temperatura son aquellas que están en la fase gap 1 (G1), puesto que no muestran daño microscópico, aunque pueden presentar un posterior aumento de la tasa de muerte celular una vez han salido de dicha fase. (Hildebrandt, 2002) [35] Otro factor a resaltar es que las células hipóxicas⁴ son también más termosensibles.

Dentro del organismo la aplicación de un tratamiento por hipertermia incrementa la perfusión sanguínea como mecanismo de oposición al aumento de temperatura. Esto quiere decir que las células sanguíneas se ven directamente afectadas, lo cual provoca una lesión. Se favorece entonces de igual forma que el flujo nutricional tumoral se vea limitado. Hay múltiples mecanismos por los cuales la hipertermia afecta indirectamente (Vaupel, 1988) [71]. También se ha intentado relacionar los efectos de la hipertermia sobre las reacciones del sistema inmunitario. Aunque no hay evidencias claras al respecto, se ha establecido de forma general que esta técnica tiende a deprimir los mecanismos inmunes.

Por su parte, la ventaja del efecto sinérgico de la hipertermia con la radioterapia se da por la complementariedad de estas dos técnicas: por un lado la fase del ciclo celular más radioresistente (fase S) es también muy termosensible, y por otro lado las células hipóxicas toleran más radiación que las termosensibles pero son también más sensibles a cambios de temperatura. (Hildebrandt, 2002) [35]

Finalmente, la hipertermia puede aplicarse de forma externa, intraluminal, intersticial y regional, dependiendo básicamente del tipo de tumor que se esté tratando. En la actualidad existen lugares en donde ya se aplican tratamientos de hipertermia en forma individual y como acompañantes de radioterapia. Representa un reto en constante desarrollo optimizar la práctica para obtener una combinación beneficiosa en el tratamiento del cáncer.

²Al observar en el microscopio células en fase M que han sido sometidas a hipertermia, se registra daño en su aparato mitótico que se deriva en mitosis ineficiente seguida de poliploidía.

³La fase S es también la más resistente a la radioterapia, por lo cual un efecto sinérgico adquiere mucha importancia para la terapia.

⁴Aquellas que contienen poco oxígeno.

Bibliografía

- [1] Aharoni A. Introduction to the theory of ferromagnetism. Second Edition. New York, United States of America. Oxford University Press, 2000.
- [2] Alcalá M.D., Real C. Synthesis based on the wet impregnation method and characterization of iron and iron oxide-silica nanocomposites. *Solid State Ionics*, 177(9-10): 955-960, 2006.
- [3] Atsumi T., Jeyadevan B., Sato Y., Tohji K. Heating efficiency of magnetite particles exposed to AC magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.*, 310(2.3): 2841-2843, 2007.
- [4] Bahadur D., Giri J. Biomaterials and magnetism. *Sadhana*, 28(3-4): 639-646, 2003.
- [5] Bean C.P., Livingston J.D. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.*, Supplement to vol. 30(4): 120S-129S, 1959.
- [6] Berry C., Curtis A. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D.: Appl. Phys.*, 36(13): R198-R206, 2003.
- [7] Betancourt R., Rodríguez O., Medina E. Obtención de látex magnético mediante la técnica de polimerización en miniemulsión. *Superficies y vacío*, 17(1): 38-41, 2004.
- [8] Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Djavaheri M., Scherman D., Demeneix B. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: Polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(16): 7292-7301, 1995.

- [9] Brezovich I.A. Low frequency hyperthermia: capacitive and ferromagnetic thermoseed methods. *Med. Phys. Monograph*, 16: 82-111, 1988
- [10] Brown W.F.Jr. Magnetostatic principles in ferromagnetism. Volume I. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1962.
- [11] Brown W.F.Jr. Micromagnetics. Interscience Tracts on Physics and Astronomy Publishers, John Wiley & Sons, New York, London, 1963.
- [12] Brusentsov N., Nikitin L., Brusentsova T., Kuznetsov A., Bayburtskiy F., Shumakov L. et al. Magnetic fluid hyperthermia of the mouse experimental tumor. *J. Magn. Magn. Mater.*, 252: 378-380, 2002.
- [13] Buzea C., Pacheco I., Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4): MR17-MR71, 2007.
- [14] Cantillon-Murphy P. On the dynamics of magnetic fluids in magnetic resonance imaging. Thesis (Doctorate of Philosophy). Massachusetts, Massachusetts Institute of Technology, 2008. 233p.
- [15] Curiale C.J. Nanohilos y nanotubos magnéticos: preparación, caracterización microestructural y estudio de las propiedades eléctricas y magnéticas. Tesis (Doctorado en Física). S.C. de Bariloche, Universidad Nacional de Cuyo, Instituto Balseiro, 2008. 215 p.
- [16] Curtis H., Sue Barnes N., Schnek A., Massarini A. Biología. Séptima edición en español. Santiago de Chile, Chile. Editorial Médica Panamericana, 2008.
- [17] Drake P., Cho H-J., Shih P-S., Kao C-H., Lee K-F., Kuo C-H. et al. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumour therapy *via* magnetic field hyperthermia. *J. Mat. Chem.*, 17: 4914-4918, 2007.
- [18] Fardis M., Rabias I., Diamantopoulos G., Boukos N., Tsitourli D., Papavassiliou G. et al. Magnetic nanoparticles for biomedical applications. *J. Opto. Adv. Mat.*, 9(3): 527-531, 2007.
- [19] Ferrari E.F., Da Silva F.C.S., Knobel M. Influence of the distribution of magnetic moments on the magnetization and magnetoresistance in granular alloys. *Phys. Rev. B*, 56(10): 6086-6093, 1997.

- [20] Franckena M., Fatehi D., De Bruijne M., Canters R.A.M., Van Norden Y., Mens J.W. et al. Hyperthermia dose-effect relationship in 420 patients with cervical cancer treated with combined radiotherapy and hyperthermia. *Eur. J. Can.*, 45(11): 1969-1978, 2009.
- [21] Gatteschi D., Sessoli R., Villain J. Observation of microscopic magnetism. **En:** Gatteschi D., Sessoli R., Villain J. Molecular nanomagnets. First Edition. New York, United States of America. Oxford University Press, 2006.
- [22] Gilchrist R.K., Medal R., Shorey W., Hanselman R., Parrot J., Taylor B. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann. Surgery*, 146(4): 596-606, 1957.
- [23] Glöckl G., Hergt R., Zeisberger M., Dutz S., Nagel S., Weitschies W. The effect of field parameters, nanoparticle properties and immobilization on the specific heating power in magnetic particle hyperthermia. *J. Phys.: Condens. Matter*, 18(38): S2935-S2949, 2006.
- [24] Gonzales-Weimuller M., Zeisberger M., Krishnan K. Size-dependant heating rates of iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia. *J. Magn. Mater.*, 321(13): 1947-1950, 2009.
- [25] Gossuin Y., Gillis P., Hocq A., Vuong Q., Roch A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(3): 299-310, 2009.
- [26] Goya G.F., Grazú V., Ibarra M. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Curr. Nanos.*, 4(1): 1-16, 2008.
- [27] Gref R., Lück M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnish S. et al. 'Stealth' corona-core nanoparticles surface modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 18(3-4): 301-313, 2000.
- [28] Guardia P., Batlle-Brugal B., Roca A.G., Iglesias O., Morales M.P., Serna C.J. Surfactant effects in monodisperse magnetite nanoparticles of controlled size. *J. Magn. Mater.*, 316(2): e756-e759, 2007.

- [29] Gupta A.K., Gupta M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomat.*, 26(18): 3995-4021, 2005.
- [30] Gupta V., Nath S., Chand S. Estimation of proteins in the presence of polyethylenimine. *Biotech. Lett.*, 22(11): 927-929, 2004.
- [31] Hall E.J., Giaccia A.J. Radiobiology for the radiologist. Sixth Edition. Philadelphia, United States of America: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
- [32] Hariharan S., Gass J. Superparamagnetism and magneto-caloric effect (MCE) in functional magnetic nanostructures. *Rev. Adv. Mater. Sci.*, 10(5): 398-402, 2005.
- [33] Hergt R., Dutz S., Müller R., Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J. Phys.: Condens. Matter*, 18(38): S2919-S2934, 2006.
- [34] Herrera A.P. Synthesis of multifunctional magnetic nanoparticles for biomedical applications. Thesis (Doctorate of Philosophy in Chemical Engineering). Mayagüez, Puerto Rico, University of Puerto Rico, Mayagüez Campus, 2009. 151 p.
- [35] Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T. et al. The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 43(1): 33-56, 2002.
- [36] Hilger I., Andrä W., Hergt R., Hiergeist R., Schubert H., Kaiser W. Electromagnetic heating of breast tumors in interventional radiology: *In vitro* and *in vivo* studies in human cadavers and mice. *Radiology*, 218(2): 570-575, 2001.
- [37] Hilger I., Hergt R., Kaiser W. Towards breast cancer treatment by magnetic heating. *J. Magn. Magn. Mater.*, 293(1): 314-319, 2005.
- [38] Hou Y., Yu J., Gao S. Solvothermal reduction synthesis and characterization of superparamagnetic magnetite nanoparticles. *J. Mat. Chem.*, 13: 1983-1987, 2003.

- [39] Ito A., Honda H., Kobayashi T. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of 'heat-controlled necrosis' with heat shock protein expression. *Cancer Immunol. Immunother.*, 55(3): 320-328, 2006.
- [40] Jeppson P., Sailer R., Jarabek E., Sandstrom J., Anderson B., Bremer M. et al. Cobalt ferrite nanoparticles: Achieving the superparamagnetic limit by chemical reduction. *J. Appl. Phys.*, 100(11): 114324, 2006.
- [41] Johannsen M., Gneveckow U., Taymoorian K., Cho C.H., Thiesen B., Scholz R. et al. Termoterapia en cáncer de próstata mediante el uso de nanopartículas magnéticas. *Actas Urol. Esp.* 31(6): 660-667, 2007.
- [42] Jordan A., Scholz R., Wust P., Fähling H., Felix R. Magnetic Fluid Hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *J. Magn. Magn. Mater.*, 201(1-3): 413-419, 1999.
- [43] Kalambur V.S., Han B., Hammer B.E., Shield T., Bischof J. *In vitro* characterization of movement, heating and visualization of magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Nanotechnology*, 16(8): 1221-1233, 2005.
- [44] Kittel C. Introduction to solid state physics. Sixth Edition. Canada. John Wiley & Sons, Inc., 1986.
- [45] Kittel C., Galt J.K., Campbell W.E. Crucial experiment demonstrating single domain property of fine ferromagnetic powders. *Phys. Rev.*, 77(5): 725-725, 1950.
- [46] Knobel M., Socolovsky L.M., Vargas J.M. Propiedades magnéticas y de transporte de sistemas nanocristalinos: conceptos básicos y aplicaciones a sistemas reales. *Rev. Mex. Fís. E*, 50(1): 8-28, 2004.
- [47] Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst L. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem. Rev.* 108(6): 2064-2110, 2008.
- [48] Lukovkin G.M., Pshezhetsky V.S., Murtazaeva G.A. NMR ^{13}C study of the structure of the polyethyleneimine. *Eur. Pol. J.*, 9(6): 559-565, 1973.

- [49] Llabot J., Palma S., Allemandi D. Nanopartículas poliméricas sólidas. *Revista Nuestra Farmacia*, 53: 40-47, 2008.
- [50] Maier-Hauff K., Rothe R., Scholz R., Gneveckow U., Wust P., Thiesen B. et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J. Neurooncol.*, 81(1): 53-60, 2007.
- [51] Mornet S., Portier J., Duguet E. A method for synthesis and functionalization of ultrasmall superparamagnetic covalent carriers based on maghemite and dextran. *J. Magn. Magn. Mater.*, 293(1): 127-134, 2005.
- [52] Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.*, 14(14): 2161-2175, 2004.
- [53] Mørup S., Tronc E. Superparamagnetic relaxation of weakly interacting particles. *Phys. Rev. Lett.*, 72(20): 3278-3281, 1994.
- [54] Ohmori M., Matijević E. Preparation and properties of uniform coated inorganic colloidal particles, 8. Silica on iron. *J. Colloid Interface Sci.*, 160(2): 288-292, 1993.
- [55] Papell S.S. Low viscosity magnetic fluid obtained by the colloidal suspension of magnetic particles. US., 3.215.572. 149/2 Int C06B23/00. 2 Nov 1965. 9 Oct 1963. 4 p.
- [56] Piao L., Lee K.H., Kwon W.J., Kim S., Yoon S. The simple and facile methods to improve dispersion stability of nanoparticles: Different chain length alkylcarboxylate mixtures. *J. Coll. Interface Sci.* 334(2): 208-211, 2009.
- [57] Rosensweig R.E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J. Magn. Magn. Mater.*, 252: 370-374, 2002.
- [58] Sapareto S.A., Dewey W.C. Thermal dose determination in cancer therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 10(6): 787-800, 1984.
- [59] Shivang R.D., Gao X. Monodisperse magnetic nanoparticles for biodetection, imaging, and drug delivery: a versatile and evolving technology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(6): 583-609, 2009.

- [60] Shubayev V., Pisanic II T., Jin S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 61(6): 467-477, 2009.
- [61] Socolovsky L.M., Knobel M., Vargas J.M. Propiedades magnéticas de sistemas nanocristalinos: conceptos básicos. *Rev. Cub. Fis.*, 20(1): 3-10, 2003.
- [62] Sosa M., Córdova T., Bernal J., Caldera G., Cano M., Carrillo G. et al. Medición de la susceptibilidad magnética de sustancias líquidas en el laboratorio de física. *Rev. Mex. Fis. E*, 52(2): 111-115, 2006.
- [63] Sperling R.A. Surface modification and functionalization of colloidal nanoparticles. Thesis (Doctorate in Sciences (Physics)). Wiesbaden, Marburgh/Lahn, 2008. 185 p.
- [64] Stoner E.C., Wohlfarth E.P. A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys. *Phil. Trans. R. Soc. London A. Math. Phys. Sciences*, 240(826): 599-642, 1948. Reimpreso en *IEEE Trans. Magn.* 27(4): 3475-3518, 1991.
- [65] Sun S., Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(28): 8204-8205, 2002.
- [66] Tang G.P., Wang Z. Polyethylenimine (PEI)-g-comb-poly(ethylene glycol)-transferrin(I): Tumor-targeted vector for gene delivery *in-vitro*. *Chin. Chem. Lett.*, 17(1): 113-116, 2006.
- [67] Tang G.P., Zeng J.M., Gao S.J., Ma Y.X., Shi L., Li Y. et al. Polyethylene glycol modified polyethylenimine for improved CNS gene transfer: effects of PEGylation extent. *Biomaterials*, 24(13): 2351-2362, 2003.
- [68] Vargas J.M., Zysler R.D. Tailoring the size in colloidal iron oxide magnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(9): 1474-1476, 2005.
- [69] Vasquez M. Fabricación, caracterización y estudio de las propiedades magnéticas en nanopartículas magnéticas. Tesis (Licenciatura en Física). San Carlos de Bariloche, Universidad Nacional de Cuyo, Instituto Balseiro, 1997. 71 p.
- [70] Vasquez M. Síntesis, estudio estructural y propiedades magnéticas de nanopartículas de óxidos de hierro. Tesis (Doctorado en Física). San Carlos de Bariloche, Universidad Nacional de Cuyo, Instituto Balseiro, 2004. 137 p.

-
- [71] Vaupel P., Kallinowski F., Kluge M., Egelhof E., Fortmeyer H.P. Microcirculatory and pH alterations in isotransplanted rat and xenotransplanted human tumors associated with hyperthermia. *Rec. Res. Cancer Res.*, 109: 173-82, 1988.
- [72] Vereda F., Vicente J., Morales M., Rull F., Hidalgo-Álvarez R. Synthesis and characterization of single-domain monocrystalline magnetite particles by oxidative aging of $\text{Fe}(\text{OH})_2$. *J. Phys. Chem. C*, 112(15): 5843-5849, 2008.
- [73] Williams A.M. The hydrodynamics of ferrofluid aggregates. Tesis (Doctorado en Ingeniería Mecánica). Blacksburg, Virginia, United States of America, Virginia Polytechnic Institute, 2008. 154 p.
- [74] Zhou W., Gao P., Shao L., Caruntu D., Yu M., Chen J. et al. Drug-loaded, magnetic, hollow silica nanocomposites for nanomedicine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 1(3): 233-237, 2005.

Índice alfabético

ácido

- graso, 44
- oleico, 38, 44

anisotropía, 20

- energía, 20
- energía de, 19
- magnetocristalina, 20
- magnetostática, 16
- uniaxial, 21, 31, 37

apoptosis, 14

Arrhenius

- ley de, 19

biocompatibilidad, 41

biotecnología, 2

Bloch

- pared de, 16, 17

Boltzmann

- distribución de, 28

campo

- coercitivo, 20, 36

ciclo celular, 86

citotóxico

- efecto, 86

corrientes

- de fuga, 13

Curie

- constante, 30
- ley de, 30, 37

DEXTRAN, 44

DEXTRAN-ferrita, 3

dispersión

- estabilidad de la, 43

efecto

- citotóxico directo, 85

estimulante

- sistema inmune, 85

indirecto

- perfusión sanguínea, 85

sinérgico, 85

encapsulamiento, 41

energía

- barrera de, 22, 24, 33

de intercambio, 16

magnética, 24

potencial, 29

térmica, 86

espesor, 61

estroma, 4

estudios

- in vitro, 2, 75

- in vivo, 3, 8

- ferrofluido, 15, 22, 38, 40
- hemoglobina, 69
- hipertermia, 1, 13, 38
- histéresis, 39
 - ciclo de, 37
- HSPs
 - Heat Shock Proteins, 15
- inmune
 - respuesta, 6
- irreversibilidad, 30
- Langevin
 - ajuste, 30
 - función, 29, 34
- macrófago, 13
- maghemita, 14
- magnética
 - capa débil, 60
 - historia, 30
 - remanencia, 20
- magnético
 - campo, 20
 - alterno, 22
 - dominio, 16
 - momento, 19, 22
 - monodominio, 17, 18, 29
- magnetita, 18, 38
- magnetización, 24, 31, 54
 - de saturación, 29, 35
 - eje fácil, 19, 20
 - remanente, 37
- muerte celular, 86
- nanopartícula, 11, 13
 - agregación, 43
 - captación, 7
 - cuantificación, 8, 69
 - magnética, 11, 17
 - síntesis, 40
 - tamaño
 - ajuste, 49
 - histograma, 49
- nanopartículas
 - biocompatibles, 2
 - captación natural, 75
 - dispersión de las, 43
 - superparamagnéticas, 2
- opsonización, 13
- PEG (Polietilenglicol), 47
- PEI (Polietilenimina), 46
- proteínas
 - desnaturalización, 86
- protocolo
 - Field Cooling (FC), 31
 - Zero Field Cooling (ZFC), 31
- quimioterapia, 85
- régimen
 - bloqueado, 28, 30, 33
 - superparamagnético, 28, 30–32, 36
- radiobiología, 85
- radioterapia, 85
- relajación, 13
 - de Brown, 13, 22
 - de Néel, 13, 22
- resonancia, 13, 18
- SAR
 - índice de absorción específico, 38
 - Specific Absorption Rate, 38, 64

- silica, 45
- solución acuosa, 40
- Stoner-Wohlfarth
 - modelo de, 23
- superparamagnetismo, 18, 19, 30
- surfactante, 8, 11, 43
 - espesor, 25
- suspensión, 29

- tejido, 14
- TEM, 48
- temperatura, 14
 - bloqueo, 31
 - de Curie, 30
 - de irreversibilidad, 34
 - distribución, 15
- termoablación, 13
- termodinámico
 - equilibrio, 27, 28, 31
 - no equilibrio, 27
- tiempo
 - de medición, 27
 - de relajación, 23
- toxicidad, 15
- tumor
 - inducido, 3, 75
- tumoral
 - control, 4
 - marcación, 6
 - volumen, 3, 4

- volumen hidrodinámico, 25, 52

- Zeeman
 - interacción, 32

Agradecimientos

Ha llegado el momento de manifestar mi agradecimiento a todas y cada una de las personas e instituciones que me acompañaron en este periodo de formación. Inicialmente quiero agradecer a Roberto Zysler por su apoyo y guía constante en la elaboración de este trabajo. Lo admiro no solamente por sus cualidades humanas y profesionales, sino por la pasión que manifiesta hacia su trabajo. Agradezco también a la Comisión Nacional de Energía Atómica por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría, al Centro Atómico Bariloche por aportar a mi vida un ambiente académico tan agradable, y particularmente al Insituto Balseiro, que a través de este tiempo me ha ofrecido oportunidades invaluableles. Me ha dejado enseñanzas muy valiosas. Incluyo aquí al Laboratorio de Resonancias Magnéticas por el ambiente atractivo con el que se hace ciencia dentro de él.

Manifiesto también mi agradecimiento a Enio Lima, por la ayuda que me brindó con todas las temáticas de mi tesis. A Marcelo Vásquez, por su perseverancia, creatividad y visión al ejecutar cualquier proyecto sin dejar de lado el espíritu curioso que contagia la ciencia. A Emilio De Biasi, mi compañero de oficina, que siempre tuvo palabras de ánimo cuando era necesario escucharlas. A la gente del laboratorio, quienes reconocieron más allá de mi hiperactividad mis capacidades. A Horacio Troiani, por ayudarnos con el TEM. A mis profesores de la Universidad Nacional de Colombia, Karen Fonseca, Fabio Fajardo, Victor Tapia, Lucimar Nova.

También quiero agradecer a los amigos que me llevo en el corazón. A Diego Etchepareborda porque el concepto de amistad incondicional toma forma con él. Rulito, eres un gran hombre. A Diego Franco por su bondad, tiene la sinceridad y transparencia hasta en su nombre. A mis compañeros de clases, muy especialmente a Gabriela Miranda y Erika Rodríguez con quienes esta maestría se vivió como toda una aventura. A Claudia, que me acompañó muchas veces en mis caminatas

nocturnas para despejar mi cabeza y poder continuar mi labor. A María Elena y Sergio, porque ahí están siempre creyendo en mí. A Mayerlin, por todo. A la gente del instituto con la que compartí memorables momentos de integración: Nathalie, René, Soledad, Renata, Gabriela, Andrés, Pablo, Ricardo, Sebastián, Paula, Renato, Federico, José Daniel (¡es tu hijo!), Pachito, Walter, Marcos, Victor, Mariano, Martín, Rodrigo, Ezequiel y Nicolás Borda. A mis catekes, Stefanny, David, Javier, Diana, Adriana, Yamile, Leticia. Al Padre Richard por dejar que Dios me hablara tantas veces a través de él.

Reservo esta parte para las personas más importantes en mi vida, sin quienes yo no sería la mitad de lo que soy, ni habría llegado tan lejos como he llegado hasta ahora: mi familia. A mis padres porque el amor que me han brindado siempre no tiene comparación con nada más, han sido fuente de inspiración en cada época, en cada momento. Gracias por transmitirme la vehemencia para luchar por mis sueños a pesar de todo, por ser ejemplo de sabiduría, por aguantar mi hiperactividad y particular forma de ser. Ser la mujer juiciosa que soy no tendría sentido sin ustedes a mi lado. A Felipe y Camilo porque son los hombres más maravillosos y bondadosos que he conocido. A Martha, porque desde que tengo memoria, siempre ha estado ahí, sin falta. A mi abuelita Isabel, porque sin ella las cosas no tendrían el color que tienen. A Andrés, por su ternura. A mis gemelos, Santiago y Alejandro, por haber llegado a ser parte fundamental de mi vida. A la parte de mi familia que quiero. A Dios por roderame de personas tan fantásticas y otorgarme día a día tantas y tan hermosas bendiciones.

Finalmente, y no menos importante, a Alexandre por estar a mi lado, dejarme sentir su amor y aceptar sentir el mío.