UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS EN
TELECOMUNICACIÓN

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS
RELACIONADAS CON LA DETECCIÓN EN TEJIDOS
EX-VIVO Y CULTIVOS CELULARES

TESIS DOCTORAL
DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Ana Lorena Urbano Bojorge
Máster en Ingeniería Biomédica

2017

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA FOTÓNICA Y
BIOINGENIERÍA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS EN
TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS
RELACIONADAS CON LA DETECCIÓN EN TEJIDOS
EX-VIVO Y CULTIVOS CELULARES

TESIS DOCTORAL
DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Autor:

Ana Lorena Urbano Bojorge

Máster en Ingeniería Biomédica

Director:

José Javier Serrano Olmedo

Doctor Ingeniero de Telecomunicación

2017

TESIS DOCTORAL

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS
RELACIONADAS CON LA DETECCIÓN EN TEJIDOS
EX-VIVO Y CULTIVOS CELULARES

AUTOR: Ana Lorena Urbano Bojorge

DIRECTOR: José Javier Serrano Olmedo

Tribunal nombrado por el Magfco. y Excmo. Sr. Rector de la Universidad Politécnica de Madrid, el día 18 de Julio de 2017.

PRESIDENTE:

SECRETARIO:

VOCAL:

VOCAL:

VOCAL:

SUPLENTE:

SUPLENTE:

Realizado el acto de defensa y lectura de tesis el día 21 de Septiembre de 2017 en el Centro de Tecnología Biomédica de la Universidad Politécnica de Madrid.

Calificación:

EL PRESIDENTE:

EL SECRETARIO:

D/D^a.

D/D^a.

EL VOCAL:

D/D^a.

EL VOCAL:

D/D^a.

EL VOCAL:

D/D^a.

LABORATORIO DE BIOINSTRUMENTACIÓN Y
NANOMEDICINA

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS
PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS
RELACIONADAS CON LA DETECCIÓN EN TEJIDOS
EX-VIVO Y CULTIVOS CELULARES

TESIS DOCTORAL
DOCTORADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

Autor:

Ana Lorena Urbano Bojorge
Máster en Ingeniería Biomédica

Director:

José Javier Serrano Olmedo
Doctor Ingeniero de Telecomunicación

2017

Resumen de la tesis de Ana Lorena Urbano Bojorge, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de DOCTOR en INGENIERÍA BIOMÉDICA.

Madrid, 30 de Junio de 2017

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN APLICACIONES BIOMÉDICAS RELACIONADAS CON LA DETECCIÓN EN TEJIDOS EX-VIVO Y CULTIVOS CELULARES

Palabras clave:

Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM), Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR), nanopartículas magnéticas, ferrofluidos, caracterización magnética, tejidos biológicos ex-vivo, cultivos celulares.

RESUMEN:

Desde su aparición, la nanotecnología ha irrumpido como área puntera de investigación ofreciendo beneficios significativos a la sociedad a través de aplicaciones y desarrollos tecnológicos que han revolucionado diversas áreas de la ciencia. En el sector salud, el empleo de la nanotecnología (nanomedicina), ha beneficiado el sistema sanitario en áreas de diagnóstico y terapia mediante la introducción de técnicas más eficientes, localizadas y personalizadas.

El empleo de Nanopartículas Magnéticas (NPM) con fines biomédicos ha despertado un gran interés debido a que sus propiedades físicas únicas pueden conducir a nuevos métodos terapéuticos. Sin embargo, hay una necesidad de comprender las propiedades magnéticas de las nanopartículas y sus interacciones con los organismos vivos con el objetivo de desarrollar terapias más seguras y eficaces. Así mismo, la carencia de estudios centrados en el análisis de la distribución y destino final de las nanopartículas en el organismo tras una terapia, sumado a los problemas toxicológicos que pueda generar, ha ralentizado la aceptación comercial de muchas terapias que utilizan los nanomateriales. Esta situación se debe tanto a una infravaloración del estudio de la

nanotoxicología como a la dificultad de implementar técnicas de seguimiento y detección eficaces.

Por consiguiente, este trabajo de tesis doctoral busca dar respuesta directa a estas cuestiones aún sin resolver completamente. Por esta razón, se diseñó un exhaustivo protocolo de medida para llevar a cabo una adecuada caracterización de las NPMs distribuidas en los tejidos biológicos provenientes de ratones de experimentación a los cuales se les administró previamente una dosis de NPMs. Adicionalmente, se realizó la caracterización de NPMs suspendidas en diversos fluidos viscosos (agua desionizada y soluciones de fibroína) e internalizadas en cultivos celulares. A través de este estudio también se pretende demostrar y evaluar la viabilidad de los métodos de medición como una herramienta útil para realizar el estudio del comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos y su internalización en cultivos celulares y tejidos ex-vivo.

Para realizar la caracterización magnética de las nanopartículas, el Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina (LBN) del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) dispone de una plataforma de *Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas*. Esta plataforma corresponde a la Unidad 15 del sistema NANBIOSIS-ICTS impulsado por el Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) para el fomento de la investigación en biotecnología. La Unidad de *Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas* está formada por dos equipos: un Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM System) y un Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR).

El AGM mide la magnetización de los materiales magnéticos y su extremada sensibilidad y precisión lo hacen especialmente atractivo para caracterizar NPMs. El FFCR mide los tiempos de relajación y los perfiles de dispersión de las nanopartículas magnéticas.

Es importante mencionar que fue necesaria una adaptación de la sonda del AGM mediante la fabricación de un portamuestras con características específicas para llevar a cabo el estudio del comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos e internalizadas en cultivos celulares.

Los resultados obtenidos mostraron la validez de los procedimientos ya que efectivamente fue posible observar diferencias en el comportamiento magnético de las nanopartículas según el tiempo y el tipo de tejido. En general se apreció que, tras la inyección, las nanopartículas viajan a través del torrente sanguíneo durante las primeras horas y con el tiempo van siendo eliminadas a través de la orina o depositadas en ciertos órganos. Después de un mes de administrada la inyección de las NPMs, se detectó una acumulación de nanopartículas en el bazo e hígado indicando así una respuesta del sistema reticuloendotelial (RES). Sin embargo, en el cerebro no se detectó acumulación de NPMs durante el tiempo que duró el estudio (1 mes) indicando que las NPMs no atravesaron la barrera hematoencefálica (BHE).

Por otro lado, se pudo observar una disminución en la magnetización de las nanopartículas dependiendo de la viscosidad del medio y la concentración de material magnético. Esta alteración es causada por las interacciones dipolo-dipolo, la formación de clústers o cadenas y el impedimento de los momentos magnético para alinearse con el campo magnético por el aumento de la viscosidad del medio y la concentración. También fue posible detectar una disminución en la magnetización de las nanopartículas cuando se internalizaron en los lisosomas. La variación causada por el encapsulamiento de las NPMs en los lisosomas provoca una disminución en los grados de libertad de las NPMs y la formación de agregados.

Por otra parte, se observó un aumento en la relajatividad inducida por el incremento de la viscosidad del fluido debido a que la superficie de las NPMs está protegida contra el agua libre por la matriz de fibroína. Esto nos lleva a concluir que la fibroína podría ser un buen agente de recubrimiento para las NPMs.

De manera general, se pudo comprobar la viabilidad de la Unidad 15 como una herramienta eficaz y versátil para llevar a cabo estudios de biodistribución y seguimiento de NPMs a través del estudio de los tejidos ex-vivo. Así mismo, esta herramienta permite realizar investigaciones relacionadas con las propiedades físicas de las NPMs suspendidas en fluidos viscosos e internalizadas en cultivos celulares.

Abstract of the thesis of Ana Lorena Urbano Bojorge, presented as partial requirement to obtain the DOCTOR degree in BIOMEDICAL ENGINEERING.

Madrid, June 30th 2017.

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE MAGNETIC NANOPARTICLES PROPERTIES IN BIOMEDICAL APPLICATIONS RELATED TO DETECTION IN EX-VIVO TISSUES AND CELL CULTURES

Keywords:

Alternating Gradient Magnetometer (AGM), Fast Field Cycling Relaxometry (FFCR), magnetic nanoparticles, ferrofluids, magnetic characterization, ex-vivo biological tissues, cell cultures.

ABSTRACT

Since its original conception, nanotechnology has emerged as a leading area of research offering significant benefits to society through applications and technological developments that have revolutionized various areas of science. In the health sector, the use of nanotechnology, also known as nanomedicine, has benefited the health system in areas of diagnosis and therapy through the introduction of more efficient, localized, and personalized techniques.

The use of Magnetic Nanoparticles (MNPs) for biomedical purposes has generated a great interest due to their unique physical properties, which can lead to new therapeutic methods. However, there is a need for understanding the magnetic nanoparticles properties and their interactions with living organisms to develop safer and more efficient therapies. Moreover, the lack of studies focused on the analysis of nanoparticles distribution and final destination in the body after a therapy, in addition to the toxicological problems that it can generate, has slowed down the commercial acceptance of many therapies that utilize nanomaterials. This situation is due both to an underestimation of the study of nanotoxicology and to the difficulty of implementing effective monitoring and detection techniques.

Therefore, this thesis seeks to give a direct answer to these issues still completely unresolved. For this reason, an exhaustive measurement protocol was designed in order to carry out an appropriate characterization of MNPs distributed in biological tissues from experimental mouse models, which a dose of MNPs was previously administered. Additionally, the characterization of MNPs suspended in viscous fluids (deionized water and fibroin solutions) and internalization into cultured cells were performed. Through this study, also intends to demonstrate and to assess the feasibility of the measurement methods as an useful tool to perform the study of the magnetic behavior of the MNPs suspended into viscous fluids and their internalization into cell cultures and ex-vivo tissues.

In order to carry out the magnetic characterization of the nanoparticles, the Laboratory of Bioinstrumentation and Nanomedicine (LBN) of the Centre for Biomedical Technology (CTB) of the Technical University of Madrid (UPM), has a platform of functional characterization of MNPs. This platform corresponds to Unit 15 of the system NANBIOSIS-ICTS driven by the Centre for Biomedical Research Network Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER- BBN) to promote the biotechnology research. The Unity of functional characterization of MNPs is composed by two devices: an Alternating Gradient Magnetometer MicroMagTM 2900 (AGM System) and a Fast Field Cycling Relaxometry (FFCR).

The saturation magnetization of the magnetic materials is measured by an AGM. Their high sensibility and precision make these especially attractive to characterize MNPs. The relaxation times and dispersion profiles of the MNPs are measured with the FFCR.

It is important to mention that an adaptation of the AGM's probe was necessary through the manufacturing of a sample holder with specific characteristics to carry out the study of the magnetic behavior of nanoparticles suspend in viscous fluids and internalized into cell cultures.

The results obtained showed the validity of the procedures since it was possible to efficiently observe differences in the magnetic behavior of the nanoparticles according to the time and type of tissue. Overall, it was noticed that after the injection, the nanoparticles travel through the bloodstream during the first hours and over time these are eliminated via urine or deposited in some organs. One month after administrating the injection of the MNPs, an accumulation of nanoparticles was detected in the spleen

and liver, thus indicating a response of the reticuloendothelial system (RES). However, in the brain was not detected any accumulation of MNPs during the time the study last (1 month), indicating that MNPs did not cross the blood-brain barrier (BBB).

On the other hand, a decrease in the saturation magnetization of the MNPs was observed depending on the viscosity of the medium and the concentration of the magnetic material. This change is caused by the dipole-dipole interactions, the formation of clusters or chains, and the hindrance of magnetic moments to align with the magnetic field by increasing the viscosity of the medium and the concentration. Furthermore, it was possible to detect a decrease in the saturation magnetization of the nanoparticles when they were internalized into the lysosomes. The variation caused by the encapsulation of the MNPs in the lysosomes causes a decrease in the degrees of freedom of the magnetic moments of the MNPs and the formation of aggregates.

On the other hand, an increase in the relaxation induced by the increased viscosity of the fluid was observed because the surface of the MNPs is protected against free water by the fibroin matrix. This leads us to conclude that fibroin matrix could be a good coating agent for MNPs.

In general, the viability of Unit 15 was verified as an efficient and versatile tool to carry out studies on the biodistribution and monitoring of MNPs through the study of ex-vivo tissues. Likewise, this tool allows research on the physical properties of MNPs suspended in viscous fluids and internalized into cell cultures.

Agradecimientos

En esta memoria está plasmada parte del trabajo que he llevado a cabo durante los últimos años en el Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina (LBN) del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM). Sin embargo, antes de entrar en materia me gustaría agradecer sinceramente a todas aquellas personas que han contribuido directa o indirectamente en la realización de este trabajo de investigación.

La lectura de la tesis cierra una etapa en mi vida y es un buen momento para mirar atrás y recordar el largo, tedioso pero a la vez desafiante camino recorrido. El desarrollo de la tesis, por supuesto, tiene momentos de alegría, entusiasmo y satisfacción. Sin embargo, recuerdo que muchas veces estuve a punto de dejar la tesis, hubo muchos días en los que vi todo oscuro, pensé que esto no me llevaría a ningún lado... cuando los experimentos no tenían los resultados que pensaba conseguir y volvía a empezar de nuevo. Muchas veces pensé que esto no serviría de nada y que no tendría suficientes resultados para mostrar el día de la defensa. Sin embargo, en los últimos meses, cuando he visto un gran montón de hojas escritas, me di cuenta que no había valorado mis pequeños logros, mi trabajo, mi esfuerzo y el aprendizaje obtenido. Entonces, te das cuenta de que todos esos malos días, las lágrimas y la desesperación han valido la pena. Sin duda alguna, hoy puedo decir que he conseguido mi meta particular, la escritura de la Tesis Doctoral. Sólo hasta finalizar este recorrido de muchos años he comprendido aquella frase de Bo Bennett "La disciplina que aprendes y el carácter que construyes por establecer y lograr una meta pueden ser más valiosas que el logro de la misma meta".

No sé cuánto tiempo he estado frente al ordenador para escribir estas líneas de agradecimiento, tal vez sin sentido para algunos lectores, pero desde luego que si hoy están leyendo esta memoria, es en parte gracias a las personas que con su apoyo hicieron posible la culminación de esta tesis doctoral. Estas palabras son un pequeño homenaje a todos aquellos que en mayor o menor medida me han ayudado e influido para alcanzar esta meta que hace algunos años me apetecía pero que la veía lejana e incierta. A ellas están dedicadas estas líneas.

Agradezco a Dios por concederme el regalo de la vida y haberme guiado por el camino del bien colocando personas maravillosas en mi vida que han contribuido para ser la persona que soy.

A mi familia, en especial a mis padres, Ana Lucía Bojorge y Jesús Urbano que me dieron la posibilidad de realizar una carrera universitaria. A mi madre, que me ha apoyado especialmente durante esta etapa animándome en todo momento a luchar por lo que quería y sé, que mi padre desde el cielo también lo ha hecho; me hubiese gustado compartir este logro también contigo. A mis hermanos, que a pesar de nuestros disgustos han estado ahí dándome fuerzas para seguir adelante, especialmente a Alex UB, Sandra UB y Herley UB; así mismo a mi prima Sandra M. Gracias a todos por cada palabra de aliento en los momentos difíciles, por su apoyo incondicional en la distancia. Dentro del mismo grupo de mi familia, no puede faltar Wilmar Cabrera M, mi esposo...mi compañero de vida, gracias por tu apoyo, cariño y por saber motivarme cuando lo he necesitado. Gracias por creer en mí y por darme la oportunidad de ser mejor cada día. Te agradezco también por los aportes y correcciones en la escritura de esta memoria.

Agradezco al Dr. José Javier Serrano Olmedo, mi director de tesis doctoral, por abrirme las puertas en su grupo de investigación, por enseñarme, orientarme y corregirme. Por el apoyo y

la paciencia a lo largo de estos años, por el cariño y por haber confiado en mí desde el primer momento.

A los que empezaron siendo compañeros del grupo de investigación y que con el paso del tiempo se han convertido en parte de mis amigos... A Nazario Félix, Oscar Casanova, Cristina Sánchez, Noelia Antúnez, Wilton Ospina, Linbergh Hernández, Rubén García y Alejandra Mina, gracias por esos grandes momentos compartidos tanto en el laboratorio como fuera de él, por la amistad y el constante ánimo. Naz, Oscar, Noe, gracias por las enriquecedoras tertulias, las risas, los juegos de mesa, por ser el hombro cuando necesité llorar y por los consejos recibidos en el momento oportuno. Gracias a todos por haber estado ahí, por la paciencia y por animarme a insistir, persistir y nunca desistir... haberlos conocido es otra de las razones por las cuales ha merecido la pena todo este tiempo. A todos les llevaré en mi corazón.

También debo agradecer sinceramente a Vicente Ferro Llanos y a Nazario Félix por transmitirme su conocimiento acerca del funcionamiento de los dispositivos que se emplearon en este trabajo de investigación. Por estar siempre disponibles a orientarme cuando surgía alguna duda o complicación, ayudándome a través de su paciencia.

No debo olvidar agradecer a los compañeros Adrián Chaparro y Alfonso Muinelo que con su trabajo han contribuido a esta investigación.

Gracias a los investigadores del CTB donde he pasado la mayor parte de mi doctorado, por el buen trato, la ayuda y sugerencias que me han prestado en muchos momentos, y en especial a la Dra. Milagros Ramos, a Tamara Fernández, a Soledad Martínez, a Laura Fernández y a Oscar Casanova por su disposición para ayudarme y guiarme hacia el aprendizaje de los cultivos celulares. Así mismo, a Nazario Félix y Oscar Casanova por orientarme y aportar ideas para el desarrollo de este trabajo de investigación. A Francisco Mikusky por su valiosa colaboración y aporte en la fabricación de los portamuestras empleados en la adaptación del dispositivo utilizado en los experimentos de esta tesis doctoral.

A Marie Hirtz del "Laboratory of Natural Magnetism at the Institute of Geophysics" del ETH-Zürich por aceptarme en su grupo de investigación y transmitirme sus conocimientos de magnetismo durante mi estancia de investigación en Suiza.

Quiero agradecer el apoyo financiero recibido de parte de la Universidad Politécnica de Madrid a través de una beca predoctoral para la formación de Personal Investigador. Así mismo, agradecer el apoyo económico otorgado por la beca UPM-Santander.

Fuera del ámbito profesional me gustaría dar las gracias a la familia que he escogido en Madrid, mis amigos. Quiero agradecer especialmente a Adriana Calderón, Erika Calderón, Natalia Ávila, Laura Pedraza, Tatiana Caicedo y Mailin Villán, gracias por todos los momentos que hemos compartido, por la compañía, el apoyo, sus palabras de ánimo y por su sincera amistad... se les quiere un resto!

A David Coca y su esposa Claudette por abrirme las puertas de su casa y hacerme sentir como si aquella también fuera mi casa, fue muy importante tener un lugar cómodo para vivir y alcanzar esta meta.

También quiero agradecer A Jorge Velilla y Enos Delso por los geniales momentos compartidos, por las risas y nuestras largas pláticas trascendentales. A mi hermanito Indio

Himesh Patel por su alegría y el ánimo que me inyecta cuando me envía algún mensaje preguntándome acerca de la tesis doctoral.

A Jennifer V, por esos cortos momentos de tertulia divulgativa científica e intercambio de ideas en el área biomédica.

A Felisa, Marisa, José Moriana, José Luis, Carlos Zeitune, Juan José Abizanda y Gerardo Motoa, por su cariño y guía espiritual. A mi grupo de yoga por las vivencias, las enseñanzas y la calidad humana.

A mis viejos amigos, con los cuales sigo en constante comunicación a pesar del tiempo y la distancia, A Luz Edith Cometa, Carolina Martínez, Anne Fuertes, Denilsa Molina, Angie Astaiza, Fabio Cañón, María Elena García, Adriana Vargas, Luz Dalia Cerón, Francys Angulo, Sara Salazar, Cristina Díaz, Claudia Tascón, Rubén López, Diego Bayona, Gloria Manquillo, Julián Yacumal, Oscar Bolaños, Franklin Muñoz, Ricardo Ramírez, Marino Espinosa, Andrés Chozas, Amelia Escobar, Oscar Barbosa, Andrés Sánchez y, por supuesto, a mis amigos ERCIANOS que aunque no hablamos con mucha frecuencia sé que nos llevamos en el corazón... estoy infinitamente agradecida por ser incondicionales y por enseñarme el verdadero sentido de la amistad. Gracias por acompañarme todos estos años y espero que sean muchos más.

Para todos y para los que ya no están, gracias totales!!!

*Dedicada a las parsonas más importantes de mi vida,
mi madre Ana Lucía B y mi esposo Wilmar Cabrera M,
quienes siempre me acompañaron y me apoyaron
incondicionalmente durante todo este proceso.
Los amo infinitamente.*

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Motivación.....	2
1.2. Marco de Referencia.....	3
1.3. Marco teórico.....	4
1.3.1. Nanotecnología y nanomedicina.....	4
1.3.2. Propiedades de los nanomateriales	7
1.3.3. Nanopartículas magnéticas	8
1.3.3.1. Núcleo	8
1.3.3.2. Recubrimiento	9
1.3.3.3. Citotoxicidad.....	12
1.3.3.4. Bioacumulación y redistribución	14
1.3.4. Ferrofluidos.....	17
1.3.4.1. Estabilidad de los fluidos magnéticos.....	21
1.3.4.2. Interacciones atractivas y repulsivas.....	23
1.3.4.3. Propiedades magnéticas de los ferrofluidos	25
1.3.4.4. Efecto de la concentración y la viscosidad en un ferrofluido.....	25
1.3.4.5. Efecto Magnetoviscoso.....	27
1.4. Estado del arte	29
1.4.1. Técnicas de detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas	29
1.4.2. Comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos e internalizadas en cultivos celulares.....	33
1.4.2.1. Variación de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro suspendidas en fluidos viscosos	34
1.4.2.2. Variación de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro internalizadas en cultivos celulares	37
1.5. Planteamiento del problema	38
CAPÍTULO 2.....	39
HIPÓTESIS.....	40
CAPÍTULO 3.....	43
OBJETIVOS	44
3.1. Objetivos.....	44
3.1.1. Objetivo general.....	44
3.1.2. Objetivos específicos	44
CAPÍTULO 4.....	47
CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN TEJIDOS EX-VIVO	48
4.1. Materiales y Métodos	48
4.1.1. Preparación de las muestras biológicas	48
4.1.2. Detección de nanopartículas magnéticas	52
4.1.2.1. Análisis magnetométrico.....	52
4.1.2.2. Análisis Relajométrico	54
4.1.2.3. Estudio histológico.....	55
4.1.3. Procesado de datos experimentales	55
4.1.3.1. Datos obtenidos de la caracterización magnetométrica.....	55
4.1.3.2. Datos obtenidos de la caracterización relajométrica.....	56

4.2. Resultados.....	56
4.2.1. Detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas a través de la medida de la magnetización (M)	56
4.2.2. Detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas a través de la medida del tiempo de relajación longitudinal (T1).....	62
4.2.3. Histología del tejido.....	64
CAPÍTULO 5.....	65
TÉCNICA DE CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA Y ADAPTACIÓN DEL MAGNETÓMETRO AGM.....	66
5.1. Técnicas de magnetometría	66
5.1.1. Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag™ 2900 (AGM System). ..	69
5.1.2. Funcionamiento	70
5.1.3. Adaptación del magnetómetro AGM.....	71
5.1.3.1. Portamuestras de aro de plástico flexible.....	72
5.1.3.2. Portamuestras de Policarbonato	72
5.1.3.3. Portamuestras tubulares de plástico rígido.....	73
5.1.3.4. Portamuestras de Politetrafluoroetileno (PTFE)	74
5.1.3.5. Portamuestras de PolimetilMetacrilato (PMMA).....	75
5.1.4. Proceso de fabricación de los portamuestras PTFE y PMMA	77
5.1.5. Resultados.....	79
5.1.5.1. Caracterización de NPMs suspendidas en soluciones de agar-agar empleando el portamuestras de aro de plástico flexible.....	79
5.1.5.2. Caracterización de NPMs suspendidas empleando el portamuestras de Policarbonato.....	84
5.1.5.3. Caracterización de NPMs suspendidas empleando los portamuestras tubulares de plástico rígido	85
5.1.5.4. Caracterización de NPMs suspendidas empleando los portamuestras PTFE y PMMA.....	85
CAPÍTULO 6.....	89
INFLUENCIA DE LA VISCOSIDAD DEL MEDIO, EL AMBIENTE INTRACELULAR Y LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN SUS PROPIEDADES MAGNÉTICAS.....	90
6.1. Materiales y métodos.....	91
6.1.1. Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs) ..	91
6.1.2. Experimentos con muestras inertes	92
6.1.2.1. Soluciones de fibroína de seda de gusano	92
6.1.2.2. Soluciones de fibroína de seda de gusano con SPIONs.....	93
6.1.2.3. Caracterización coloidal.....	93
6.1.2.4. Caracterización de la magnetización (M) de las SPIONs	95
6.1.2.5. Caracterización del tiempo de relajación longitudinal (T1) de las SPIONs	95
6.1.3. Experimentos in vitro	96
6.1.3.1. Cultivos celulares de fibroblastos de ratón NIH/3T3	96
6.1.3.2. Viabilidad celular	97
6.1.3.3. Viabilidad celular en los portamuestras _{PMMA-AGM}	98
6.1.3.4. Adherencia celular en los portamuestras _{PMMA-AGM}	99
6.1.3.5. Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs	99
6.1.3.6. Tiempo de vida celular fuera del incubador.....	100
6.1.3.7. Localización intracelular de las SPIONs.....	100

6.1.3.8. Análisis de la magnetización (M) de las SPIONs libres y unidas a las células	101
6.1.3.9. Curva de calibración.....	101
6.1.4. Análisis Estadístico.....	102
6.2. Resultados.....	102
6.2.1. Nanopartículas de óxido de hierro (SPIONs)	102
6.2.2. Diámetro hidrodinámico	103
6.2.3. Influencia de la viscosidad del medio y la concentración de SPIONs en el nanomagnetismo	103
6.2.4. Influencia de la viscosidad del medio en la relajatividad (r1) de las SPIONs	108
6.2.5. Influencia de la internalización celular de las SPIONs en la magnetización	109
6.2.5.1. Viabilidad celular en los portamuestras _{PMMA-AGM}	109
6.2.5.2. Adherencia celular en los portamuestras _{PMMA-AGM}	110
6.2.5.3. Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs	111
6.2.5.4. Tiempo de vida celular fuera del incubador.....	112
6.2.5.5. Localización intracelular de las SPIONs.....	113
6.2.5.6. Análisis del magnetismo de las SPIONs dentro de las células NIH/3T3.....	114
6.2.5.7. Curva de calibración.....	115
CAPÍTULO 7.....	119
DISCUSIÓN.....	120
7.1. Estudio de la caracterización de nanopartículas magnética en tejidos ex-vivo	120
7.1.1. Dosis de nanopartículas magnéticas inyectada en ratones C57/BL6.....	120
7.1.2. Estudio de magnetometría	121
7.1.3. Estudio de relajometría	125
7.1.4. Estudio histológico	127
7.2. Influencia de la viscosidad del medio, el ambiente celular, la concentración y agregación de las SPIONs en su magnetismo	128
7.2.1. Nanopartículas de óxido de hierro	128
7.2.2. Tamaño hidrodinámico	128
7.2.3. Influencia de la viscosidad y concentración de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes.....	129
7.2.3.1. Influencia de la concentración en la magnetización de las nanopartículas magnéticas	129
7.2.3.2. Influencia de la viscosidad en la magnetización de las nanopartículas magnéticas	132
7.2.4. Influencia de la viscosidad en la relajatividad de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes.....	134
7.2.5. Influencia de la internalización de las SPIONs en las células NIH/3T3	134
7.2.5.1. Biocompatibilidad celular respecto a los portamuestras _{PMMA-AGM}	135
7.2.5.2. Biocompatibilidad celular respecto a las SPIONs.....	136
7.2.5.3. Alteración de la viabilidad celular en condiciones ambientales	137
7.2.5.4. Localización intracelular de las SPIONs.....	137
7.2.5.5. Comportamiento magnético de las SPIONs internalizadas o adheridas y liberadas de las células.....	138
CAPÍTULO 8.....	141
CONCLUSIONES	142
8.1. Caracterización y detección de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo	142

8.2. Influencia de la viscosidad del medio, el entorno celular y la concentración de NPMs	143
CAPÍTULO 9.....	147
TRABAJOS FUTUROS.....	148
REFERENCIAS	151
APÉNDICE A	165
FUNDAMENTOS DE MAGNETISMO	166
APÉNDICE B	193
TÉCNICAS INSTRUMENTALES	194
APÉNDICE C	203
PUBLICACIONES Y ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL	204

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Tamaños de organismos celulares que pueden interactuar con las partículas	6
Figura 1.2. Esquema del cuerpo humano con vías de exposición a las nanopartículas, órganos afectados y enfermedades epidemiológicas asociadas, in vitro e in vivo. (Buzea y col., 2007).	13
Figura 1.3. Vías inflamatorias inducidas por las nanopartículas.....	144
Figura 1.4. Transporte caveolae en estado sano (A) y enfermo (B). (Oberdörster y col., 2005).	166
Figura 1.5. Representación de dos partículas con diámetro d en un líquido con una capa protectora de espesor δ , s es la separación entre superficies y r es la distancia entre los centros de las partículas.	233
Figura 1.6. Origen del cambio de viscosidad dependiente del campo en una suspensión de nanopartículas magnéticas (Odenbach, 2002).....	28
Figura 4.1. Vasos sanguíneos en el seno retro-orbital. (Yardeni y col., 2011).....	50
Figura 4.2. Inyección retro-orbital. (Yardeni y col., 2011).....	50
Figura 4.3. Muestras procesadas de (A) Sangre, (B) orina, (C) bazo, (D) hígado, (E) pulmón y (F) cerebro.....	52
Figura 4.4. Comportamiento magnético de las NPMs Kisker #PMP-50.	57
Figura 4.5. Ajuste de la señal magnética de los tejidos biológico mediante la función sigmoideal de Boltzmann. Ajuste mediante la función sigmoideal de Boltzmann para la muestra de sangre a 0.5 horas. $R^2=0.99579$	59
Figura 4.6. Biodistribución de nanopartículas magnéticas en tejidos biológicos de ratón C57/BL6 mediante magnetometría. La presencia de las nanopartículas se ha determinado a través de las medidas de la magnetización (M) en $\text{Am}^2/\mu\text{l}$. Los tejidos analizados: (A) sangre, (B) cerebro, (C) hígado, (D) pulmón, (E) bazo y (F) orina. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de $n=4$ experimentos independientes. $*p<0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).	61
Figura 4.7. Biodistribución de nanopartículas magnéticas en tejidos biológicos de ratón C57/BL6 mediante relajometría. La presencia de las nanopartículas se ha determinado a través de las medidas de los tiempos de relajación longitudinal (T1) en segundos. Los tejidos analizados: (A) sangre, (B) cerebro, (C) hígado, (D) pulmón y (E) bazo. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de $n=4$ experimentos independientes. $*p<0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).	63
Figura 4.8. Análisis histológico del bazo obtenido 1 mes después de la inyección de (A) suero salino y (B) nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Las secciones se tiñen inicialmente mediante el ensayo de peroxidasa y posteriormente se tiñen con hematoxilina-eosina para revelar la presencia de NPMs en el bazo. Las flechas negras señalan la acumulación de NPMs.	64
Figura 5.1. Diagrama esquemático del Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag TM 2900 (AGM System).....	71
Figura 5.2. Fotografía del Portamuestra fabricado con un aro de plástico flexible.....	72
Figura 5.3. Fotografía del portamuestra fabricado con Policarbonato.	73
Figura 5.4. Fotografía del portamuestra tubular diseñado con plástico rígido.....	74
Figura 5.5. Fotografía del portamuestras diseñado con Politetrafluoroetileno (PTFE) o Teflón.	75
Figura 5.6. Fotografía de los portamuestras diseñados con PolimetilMetacrilato (PMMA). A) Placa de 121 portamuestras. B). Fotografía de la vista frontal y lateral del portamuestras _{PMMA-AGM} usando un sistema Leica EZ4 W. C) Fondo del portamuestras _{PMMA-AGM} (Barra de escala=0.5 mm).	77
Figura 5.7. Esquema de la cuadrícula empleada para la fabricación de 121 portamuestras PTFE y PMMA.....	78
Figura 5.8. Caracterización de la viscosidad de las soluciones de agar-agar que simulan la viscosidad de dos fluidos corporales. A) humor vítreo y B) la sangre.....	80

Figura 5.9. Caracterización magnética de nanopartículas FluidMAG-UC/A en suspensión y en fase sólida.....	81
Figura 5.10. Curvas M/Ms en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas ferromagnéticas FluidMAG-UC/A. A) En fase líquida y sólida. B) Magnificación de A.	82
Figura 5.11. Curvas de magnetización en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas FluidMAG-D suspendidas en soluciones de agar-agar a concentraciones de 2.65 mPa.s y 4.98 mPa.s.	83
Figura 5.12. Curvas de magnetización normalizadas M/Ms en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas FluidMAG-D suspendidas en soluciones de Agar-Agar. A) En soluciones de Agar-Agar a 2.65 mPa.s y 4.98 mPa.s en fase líquida y sólida. B) Magnificación de A.	84
Figura 5.13. Curvas de magnetización de nanopartículas FluidMAG-UC/A. A) Valor de magnetización de las nanopartículas en suspensión y en fase sólida. B) Curvas normalizadas (M/Ms vs H) en las dos fases (líquida y sólida).	85
Figura 5.14. Curvas de magnetización normalizadas M/Ms en función del campo externo aplicado (H) de micropartículas SiMAG/MP-DNA suspendidas en soluciones de goma arábica. A) Soluciones con viscosidades a 10.3 mPa.s, 40.8 mPa.s y 354.2 mPa.s y en fase sólida. B) Gráfica magnificada de A.	87
Figura 6.1. Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm sin recubrimiento. A) Gráfica de la difracción de rayos X para las nanopartículas de óxido de hierro en polvo. B) Imagen representativa TEM de la nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas.....	92
Figura 6.2. Células NIH/3T3 cultivadas en portamuestras _{PMMA-AGM} y ubicadas en una placa multipocillo P24 para su mejor almacenamiento y manipulación.....	99
Figura 6.3. Medidas de la Dispersión Dinámica de Luz (DDL). Medida del diámetro hidrodinámico (D_H) de dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm inmersas en agua desionizada (azul) y suspensiones de fibroína (roja) a 0.5mg/mL.....	103
Figura 6.4. Curvas de magnetización como función del campo magnético (H) de SPIONs suspendidas en fluidos inertes con dos diferentes concentraciones de nanopartículas. A) 2.5 mg/mL y B) 10mg/mL.	1044
Figura 6.5. Caracterización magnética de los fluidos inertes. Curvas de magnetización en función del campo (H) realizadas a temperatura ambiente de los fluidos inertes (agua desionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades).	105
Figura 6.6. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y SPIONs en sólido tomadas a temperatura ambiente. Las SPIONs fueron suspendidas a diferente concentración (2.5mg/mL y 10mg/mL).	106
Figura 6.7. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a una concentración de 2.5 mg/mL. Las curvas de magnetización se llevaron a cabo también a las SPIONs en sólido y todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.	106
Figura 6.8. Perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD). Medida de los perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD) para diferentes intensidades de campo magnético en dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades y una concentración de 2 mM.	108
Figura 6.9. Viabilidad celular en los portamuestras _{PMMA-AGM} . A) Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células NIH/3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras _{PMMA-AGM} . B) Comparación de la viabilidad celular de los portamuestras _{PMMA-AGM} y las placas multipocillos p24 a 24 horas. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM, el error estándar de la media, en inglés (Standar Error Medium) de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (Test de ANOVA).	110
Figura 6.10. Adherencia celular en los portamuestras _{PMMA-AGM} . Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras _{PMMA-AGM} . Los datos representan la cuantificación de la adherencia celular. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=3 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).....	111

Figura 6.11. Viabilidad de células NIH/3T3 incubadas con SPIONs. Imágenes de microscopía de fluorescencia para el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24 horas con SPIONs de 14 nm a 0 (A), 1 mg/mL (B) y 2.5 mg/mL (C). Barra de escala= 50 μ m. (D) Representa la cuantificación de la viabilidad celular para cada condición. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).	112
Figura 6.12. Porcentaje de viabilidad celular respecto al tiempo de vida fuera de las condiciones ambientales óptimas de crecimiento celular. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas con SPIONs durante 24 y posteriormente expuestas a condiciones ambientales externas durante 0.5, 1 y 2 horas. Los datos representan el porcentaje de viabilidad celular para en los diferentes tiempos. Cada valor indica la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).	113
Figura 6.13. Localización intracelular de SPIONs de 12nm de tamaño en células NIH/3T3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SPIONs de 14 nm sin recubrimiento. Las nanopartículas han sido incubadas en células NIH/3T3 durante 24h. Las SPIONs se muestran bajo transmisión de luz (A). Las células se tiñen con un marcador específico para lisosomas (B).	114
Figura 6.14. Comparación del comportamiento magnético de SPIONs internalizadas en células NIH/3T3 y fuera del interior celular. Comportamiento magnético de SPIONs de 14 nm incubadas en células NIH/3T3 durante 24 horas. Se llevan a cabo las mediciones de las curvas de histéresis (M-H) cuando las SPIONs están internalizadas en los orgánulos celulares y posteriormente cuando son liberadas de las células. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=6 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).	115
Figura 6.15. Curva de calibración para una suspensión de SPIONs y Trypsin-EDTA a diferentes concentraciones. Curva de masa vs. Momento magnético de una suspensión de SPIONs y Trypsin-EDTA en función de la concentración de nanopartículas. Se emplean concentraciones crecientes de SPIONs que van desde 0.05mg/mL hasta 2.5mg/mL.	116
Figura A.1. Momento dipolar magnético (A), y su interacción un campo magnético aplicado externamente (B). (Kasap, 2006).	167
Figura A.2. Momento magnético de Spin (Kasap, 2006).	168
Figura A.3. Curva de magnetización de los materiales. Magnetización M frente al campo magnético aplicado H característica típica de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas. Como comparación, también se muestra el comportamiento diamagnético y paramagnético (Arruebo y col., 2007).	170
Figura A.4. Paredes de dominio en un material ferromagnético. (Kasap, 2006).	172
Figura A.5. Minimización de la energía magnetostática a través de la formación de las paredes de dominio (Kasap, 2006).	172
Figura A.6. Evolución de las paredes de dominio de un material ferromagnético bajo la influencia de un campo magnético aplicado. (Kasap, 2006).	173
Figura A.7. Curvas de magnetización de materiales magnéticos blandos y duros. (Kasap, 2006).	175
Figura A.8. Esquema de configuración de dominio magnéticos para A. multidominio y B. dominio simple. (Sellmyer, 2006).	178
Figura A.9. Esquema de la coercitividad en función del tamaño de la partícula. (Sellmyer, 2006).	178
Figura A.10. Estructura magnética de los sólidos ferromagnéticos en función del tamaño de la partícula. A) Multidominio. B) Monodominio. C) Superparamagnético.	179
Figura A.11. Esquema de la variación de la energía de una partícula monodominio con anisotropía uniaxial en función del ángulo de magnetización.	181
Figura A.12. Esquema del eje de anisotropía (línea punteada) de una partícula monodominio, junto con el vector magnetización y de un campo magnético aplicado.	187
Figura A.13. Mecanismos de relajación de Néel y de Brown.	188

Figura A.14. Energía magnética de una nanopartícula con anisotropía uniaxial. A) En función del ángulo θ en el eje de magnetización y el eje de anisotropía. B) Energía magnética para una nanopartículas con anisotropía uniaxial que es sometido a un campo magnético externo.....	190
Figura B.1. Diagrama del magnetómetro por muestras vibrante (VSM).	196
Figura B.2. Diagrama del magnetómetro SQUID.....	196
Figura B.3. Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo para la obtención de los tiempos de relajación a diversas intensidades de campo magnético. SMARTracer (Stelar Magnetic Tracer, Italy).	197
Figura B.4. Curva de relajación T1. (Dale y col., 2015).	200

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Características de los recubrimiento de las nanopartículas magnéticas	11
Tabla 5.1. Revisión de las aplicaciones e instituciones que emplean el Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM System).....	68
Tabla 6.1. Valores de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes e internalizadas en cultivos celulares NIH/3T3.....	117

CAPÍTULO

1

Introducción

“Las leyes de la naturaleza presentan bastas áreas de oportunidad para el progreso, y la presión de un mundo competitivo estimula el desarrollo de la humanidad hacia nuevos horizontes. Para bien o para mal, los mayores avances tecnológicos en la historia aún están por venir”

*- Eric Drexler
Engines of Creation (1986)*

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Motivación

El estudio del comportamiento de la materia a escala nanométrica abre una prometedora perspectiva a nuevos conocimientos en el campo de la ciencia. Los nanomateriales, en especial las nanopartículas de óxido de hierro, se están volviendo cada vez más atractivos en diferentes áreas del conocimiento como la física, la ingeniería, la química, la biología y la medicina. Cuando las dimensiones de las partículas son del tamaño del nanómetro, las propiedades físicas son muy distintas de las que se observan en un sólido macroscópico con la misma composición química. En las últimas décadas, estas nuevas propiedades físicas detectadas en diferentes tipos de nanopartículas han despertado gran interés en la investigación de nuevas aplicaciones. En el área médica, el empleo de estos nanomateriales, especialmente su uso como ferrofluido, abre un enorme panorama en aplicaciones como el transporte selectivo de fármacos, el tratamiento para cáncer mediante hipertermia magnética, los agentes de contraste para diagnóstico en imágenes de resonancia magnética nuclear, entre otras. Sin embargo, cuando las nanopartículas son introducidas en el cuerpo humano las propiedades magnéticas de las nanopartículas se modifican provocando que las terapias que se están investigando sean menos efectivas. Además, existe una preocupación adicional relacionada con el destino final de las NPMs a largo plazo y los niveles de citotoxicidad.

Por esta razón, la motivación de este trabajo de investigación surge de la necesidad de conocer la forma en la que se afectan las propiedades magnéticas cuando las nanopartículas de óxido de hierro son suspendidas en fluidos inertes o son

internalizadas en cultivos celulares. Así mismo, estudiar la dinámica de biodistribución de las nanopartículas magnéticas inyectadas en animales de experimentación.

1.2. Marco de Referencia

El vertiginoso crecimiento de la población humana en décadas recientes, mientras que apunta a un mejoramiento considerable en el bienestar de las personas en promedio, ha ejercido una presión significativa en el sistema sanitario. Sin embargo, las instituciones dedicadas a proporcionar el cuidado de la salud de los pacientes, cada vez están más saturados debido tanto a un aumento en el número de usuarios y la compleja logística asociados con el tratamiento de baja incidencia y condiciones patológicas de alto riesgo. En consecuencia, el desarrollo de la atención sanitaria asequible, eficiente y sostenible es una de las necesidades más apremiantes que países desarrollados como aquellos en vía de desarrollo se enfrentan actualmente.

La consecución de este objetivo es un asunto complejo que requiere una gran cantidad de planificación ejecutiva y el esfuerzo de investigación, particularmente en relación con la coordinación entre el sector público, los grupos académicos de Investigación & Desarrollo e innovación (I+D+i), compañías farmacéuticas e instituciones de la salud.

Por esta razón, se creó el Centro de Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), un consorcio Español liderado por el Instituto de Salud Carlos III para fomentar la investigación de excelencia en el campo de la Biomedicina y Ciencias de la Salud.

De esta manera, el CIBER-BBN proporciona un espacio común necesario entre los grupos de investigación y las grandes empresas del sector salud, facilitando así, el intercambio de conocimientos y traslado de tecnologías.

De manera similar, el Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) tiene como objetivo fomentar la creación de grupos multidisciplinarios para desarrollar nuevas estrategias de investigación en biomedicina y biotecnología.

El Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina (LBN), adscrito al CTB, posee una Unidad 15 denominada *Unidad de Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas* (Unidad CFNPMs) que pertenece a la Plataforma Unidad 3 del sistema NANBIOS-ICTS (Infraestructuras Científico Técnicas Singulares) impulsado por el

CIBER-BBN. El objetivo principal de la Unidad CFNPMs es promover el desarrollo de técnicas y tecnologías ligadas al estudio de las propiedades magnéticas de los nanomateriales utilizados en aplicaciones biomédicas. Los equipos que hacen parte de esta plataforma de caracterización son: un Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM System) de Princeton Corporation y un Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR) SMARTracer de Stelar que cuenta con un electromagneto de intensidad de campo variable.

Una de las líneas de investigación que el LBN ha desarrollado a través de la Unidad CFNPMs, se basa en el estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro suspendidas en fluidos e internalizadas en tejidos biológicos y cultivos celulares. De esta manera, se investiga la influencia que tienen la concentración de nanopartículas, la viscosidad del medio donde están suspendidas y el ambiente intracelular sobre el comportamiento magnético de las nanopartículas con el objetivo de evaluar y mejorar la eficiencia de las nanopartículas magnéticas empleadas en aplicaciones biomédicas para investigación de nuevos agentes de contraste para imagen por resonancia magnética nuclear, tratamientos oncológicos basados en sistemas de hipertermia magnética y técnicas de guiado de nanopartículas magnéticas en la liberación localizada de fármacos. También es posible valorar los efectos de la nanotecnología en aplicaciones biomédicas *in vivo* a través del estudio de la biodistribución y citotoxicidad asociada a las nanopartículas magnéticas.

1.3. Marco teórico

1.3.1. Nanotecnología y nanomedicina

En la década de 1950, Richard Feynman planteó la posibilidad de manipular objetos a nivel molecular y atómico sin violar las leyes de la física (Feynman, 1950), pero fue sólo hasta finales de los años 80 que estos planteamientos pudieron ser demostrados empíricamente. En 1986, Eric Drexler afirmó que una nueva era de desarrollo científico y tecnológico estaba comenzando, una era en términos de nanotecnología y tecnología molecular. Esta tecnología crearía nuevos sistemas, máquinas y dispositivos equiparables en tamaño al de las proteínas, orgánulos celulares y moléculas.

La nanotecnología es una disciplina científica que nació de la fusión entre la biología, la física, la química y la ingeniería, alcanzando un emergente crecimiento desde la década

de los 90's. Aunque hay diferentes definiciones para la palabra nanotecnología, la mayoría de investigadores están de acuerdo con la definición dada por la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI): “el entendimiento y control de la materia a dimensiones aproximadamente de 1 a 100 nanómetros, donde los fenómenos únicos permiten nuevas aplicaciones” (Spiegel, 1995). Esta nueva área interdisciplinar involucra la investigación y desarrollo tecnológico a escalas atómicas y moleculares, así como también, el desarrollo y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades incluyendo el control y manipulación de la materia a escalas atómicas (Varadan 2008).

A partir de la miniaturización de la tecnología a nivel nanométrico, se vislumbró el nacimiento de la nanomedicina, en la que se planteó la idea de que pequeños nanoobjetos pudiesen viajar dentro del cuerpo humano a través de los vasos sanguíneos con el objetivo de reparar complicaciones dentro del organismo, eliminar tejido dañado o liberar fármacos directamente a nivel molecular (Freitas, 2005). La Fundación Europea de la Ciencia (EFS) definió la nanomedicina como “el uso de herramientas de tamaño nano para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades con el fin de obtener una mayor comprensión de la compleja fisiopatología subyacente de la enfermedad” (ETP Nanomedicine, 2005). El uso de la nanotecnología en la medicina ha ganado un impulso considerable en los últimos años (Wagner y col., 2008) debido a su potencial en este campo.

Existen varias razones que hacen de la nanotecnología una herramienta terapéutica y de diagnóstico atractiva. Desde una perspectiva puramente material, las propiedades físicas, las cuales son dependientes de la geometría, se modifican cuando se trabaja a nanoescala. En consecuencia, las propiedades físicas que exhiben muchos nanomateriales son una consecuencia del escalamiento de las leyes físicas convencionales ya que son causadas por los efectos cuánticos en función de su tamaño (Narducci y col., 2007). Mientras la mayoría de estas propiedades no están aún bien comprendidas, trabajar a estos límites finitos permite una mayor flexibilidad en la optimización del diseño y versatilidad, siempre y cuando los procedimientos tecnológicos asociados puedan permitirlo. Por otro lado, las propiedades químicas de los materiales experimentan modificaciones similares y, desde el punto de vista clínico, la más importante aquella relacionada a una mayor reactividad química. De hecho, la mayoría de las aplicaciones de nanomedicina existentes hasta el momento dependen en

mayor medida de una actividad química mejorada que de la modificación de su comportamiento físico a nivel nanométrico (Narducci y col., 2007). Se ha afirmado que esta respuesta química es el resultado de una mayor superficie del nanomaterial respecto a su volumen (Boisseau y col., 2011). Sin embargo, es evidente que la estructura electrónica de los átomos situados en grupos de tamaño limitado diferirán en gran medida de aquellos encontrados a macroescala y, por lo tanto, originarán comportamientos y perfiles químicos inesperados (Narducci y col., 2007). Esta propiedad particular ya está siendo utilizada en aplicaciones farmacéuticas y se espera que sea crucial en la búsqueda de soluciones al cuidado de la salud basadas en terapia y diagnóstico (teragnosis). El tamaño en sí mismo es también una cualidad atractiva desde la perspectiva clínica (Boisseau y col., 2011) debido a que estas dimensiones son comparables al tamaño de células, virus, proteínas y genes (Figura 1.1). Esto significa que las nanopartículas pueden interactuar en un nivel fundamental con las entidades biológicas de interés (Pankhurst y col., 2003) permitiendo el uso de los procedimientos médicos a una escala nanométrica.

Figura 1.1. Tamaños de organismos celulares que pueden interactuar con las partículas.

Sin embargo, aunque las propiedades fisicoquímicas de los nanomateriales han tenido un impacto positivo en las aplicaciones biomédicas, también pueden tener un efecto negativo en el cuerpo humano ya que los nanomateriales se caracterizan por tener una relación superficie/volumen muy alta, lo que puede conducir a aumentar su reactividad biológica. Además, el diminuto tamaño de las NPMs les permite romper las células alcanzando sitios críticos dentro de éstas, tales como el núcleo, las mitocondrias y otros orgánulos celulares, causando posibles mutaciones o muerte celular (Oberdörster y col.,

2005a). Por otro lado, la exposición ambiental a los nanomateriales provenientes de otros sectores de aplicación (fuentes naturales y antropogénicas) aumenta el riesgo de exposición (Medina y col., 2007).

El aumento significativo en publicaciones y patentes demuestran que se han realizado grandes avances e inversiones en I+D para nuevas estrategias en nanomedicina. Sin embargo, la baja eficiencia en términos de transferencia tecnológica ha sido citada como un problema sistémico en la mayoría de las iniciativas de investigación de la nanotecnología en medicina. En consecuencia, muchos productos que permiten el diagnóstico y tratamiento de enfermedades no llegan a ser implementados comercialmente.

Uno de los factores determinantes en esta aparente desconexión entre la investigación y la industria es la falta de estudios y evaluación de riesgos nanotoxicológicos que son inherentes a los productos de la nanotecnología. Por esta razón, la nanomedicina y, hasta cierto punto, la nanotecnología en general aún se enfrenta a problemas importantes que deben ser resueltos en los próximos años.

1.3.2. Propiedades de los nanomateriales

Dentro de la nanotecnología, la fabricación de nuevos nanomateriales o nanopartículas (NPs) ha ido en constante aumento, así como la búsqueda de nuevas propiedades y aplicaciones de las mismas en diversas áreas. Las NPs poseen propiedades únicas como su pequeño tamaño y sus características estructurales y morfológicas que las hacen atractivas para un amplio rango de aplicaciones. Las NPs son un puente entre el material macroscópico o bulk y la estructura atómica o molecular. Un material bulk posee propiedades físicas constantes que no dependen del tamaño. Sin embargo, las propiedades de las NPs dependen de su tamaño. La preparación se realiza a partir de dos métodos: el método *top-down* y el *bottom-up*. El método *top-down* busca miniaturizar el tamaño del material bulk para conseguir sistemas a nanoescala. La nanotecnología *bottom-up*, se parte de átomos que se ensamblan hasta obtener partículas en la escala del nanómetro con una estructura cristalina. El interés por estudiar materiales a la escala del nanómetro, reside en que nuevas propiedades físicas asociadas al tamaño (Halperin, 1986) pueden conducir al desarrollo de novedosas aplicaciones y en especial en el campo de la medicina (Pankhurst y col., 2003). El origen de las propiedades que presentan las NPs se debe a los cambios en los niveles electrónicos y al incremento de

los átomos de superficie respecto a los de volumen. La energía superficial define la interacción con otros medios y es un factor dominante en diversas aplicaciones pero también, promueve la aglomeración de las NPs modificando sus propiedades y reduciendo las potenciales aplicaciones (Carabías y col., 2006). Los cambios en los niveles electrónicos de las NPs modifican las propiedades ópticas, luminiscentes y de transporte de carga.

1.3.3. Nanopartículas magnéticas

En la nanomedicina, las nanopartículas magnéticas (NPMs) han provocado un gran interés en la comunidad científica debido a sus propiedades fisicoquímicas. Sus propiedades magnéticas permiten que las nanopartículas puedan ser manipuladas por un campo magnético externo (Leslie-Pelecky, 1996) o excitadas por un campo magnético variante en el tiempo para generar calor (Pankhurst y col., 2003). Además, su pequeño tamaño comparable a los organismos celulares (10-100 μm) posibilita su interacción con estructuras subcelulares. Las propiedades físicas, químicas y multifuncionales de las nanopartículas magnéticas han permitido una gran selectividad de procedimientos médicos enfocados en diagnóstico y terapia "teragnosis" que requieren dirigir las nanopartículas dentro de los sistemas vivos, por lo que hacen de la nanomedicina un campo muy prometedor.

1.3.3.1. Núcleo

Las NPMs están formadas generalmente de elementos magnéticos, tales como Hierro (Fe), Níquel (Ni), Cobalto (Co) y sus aleaciones pero las más utilizadas en nanomedicina son las partículas de núcleo magnético formado por óxidos de hierro, generalmente magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), con tamaños que oscilan entre 5 y 100 nm de diámetro (Gupta y col., 2005; Tiwari, 2013).

Entre estas dos clases, la magnetita es la más usada en aplicaciones biomédicas debido a su alta magnetización y probada biocompatibilidad (Cheng y col., 2005; Hussain y col., 2005; Brunner y col., 2006; Berry y col., 2003). Debido a su biocompatibilidad y fácil metabolización dentro del organismo, los iones de hierro se depositan en el hierro endógeno y eventualmente son incorporados por los eritrocitos como parte de la hemoglobina (Weissleder y col., 1990). Sin embargo, algunas investigaciones ha reportado efectos negativos y citotoxicidad debido a la exposición de este tipo de nanopartículas a concentraciones superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Gojava y cols., 2007).

Los materiales ferromagnéticos (Apéndice A) tienen diferentes respuestas magnéticas dependiendo del tamaño: multidominio (MD), simple dominio (SD) y superparamagnéticas (SP). En las nanopartículas magnéticas, por debajo de un cierto tamaño (decenas de nanómetros), los momentos magnéticos de átomos adyacentes permanecen alineados actuando como un gran momento magnético para toda la partícula. Por lo tanto, cuando se aplica un campo magnético externo, toda la nanopartícula se alinea con el campo magnético. Por el contrario, si el campo magnético se remueve, la nanopartícula retorna a su estado original orientada aleatoriamente (superparamagnetismo). La ausencia de una magnetización remanente después de remover el campo magnético externo permite a la partícula mantener su estabilidad coloidal y evita la agregación, por lo que la hace adecuada para ser usada en aplicaciones biomédicas (Tong y col., 2011; Indira y col., 2010).

1.3.3.2. Recubrimiento

Generalmente en aplicaciones biomédicas, las NPMs poseen una envoltura biocompatible que les proporciona estabilidad en condiciones fisiológicas. En ausencia de estos recubrimientos, las NPMs son químicamente activas y se oxidan fácilmente en el aire produciendo pérdida del magnetismo y su capacidad para dispersarse. Además, presentan superficies hidrofóbicas que favorece la formación de agregados dando lugar a partículas de mayor tamaño (Lu y col., 2007). De igual manera, se observa esta característica dentro de fluidos biológicos debido a la presencia de sales y proteínas. Al formarse estos agregados, hay una reducción de la energía asociada a la relación superficie/volumen propia de las nanopartículas. La relación superficie a volumen maximiza la interacción biológica (Sharifi y col., 2012) y genera una alta magnetización de saturación (Karimi y col., 2013) las cuales son algunas de las propiedades deseables para enfoques biomédicos.

Las características asociadas a cualquier diseño de partículas en este ámbito son descritas a continuación (Karimi y col., 2013; Mornet y col., 2004).

- ❖ *Largos tiempos de circulación.* Uno de los obstáculos que las NPMs deben superar tras la inserción es el sistema reticuloendotelial (RE). Esta barrera inmune biológica está compuesta por líneas celulares de progenitores de médula ósea, monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares. Estos últimos son los responsables del reconocimiento in situ y remoción de patógenos invasores y

sustancias extrañas. El sistema RE tienen un componente humoral que consiste de proteínas disueltas conocidas como opsoninas que ayudan a la actividad de los macrófagos a través de la opsonización (adsorción sobre la superficie de la sustancia extraña). Las proteínas absorbidas serán reconocidas posteriormente por los macrófagos y los receptores de membrana de los monocitos que conducen a la fagocitosis de las partículas y su eliminación por el torrente sanguíneo. Por todo esto, un diseño de NPMs capaces de evadir la reacción del sistema inmune serían deseables para la implementación de terapias eficaces y controlables.

- ❖ *Especificidad:* A fin de aumentar la probabilidad de que las NPMs lleguen a las células diana o al tejido objetivo y, de esta manera, evitar interacciones no deseables con otras partes del cuerpo, su superficie debe poseer un ligando capaz de unirse específicamente a los receptores de membrana del objetivo terapéutico. Esta especificidad permitiría el tratamiento de enfermedades que afectan a un tipo de célula particular dentro de un tejido multicelular, así como la detección selectiva de las células tumorales en terapias contra el cáncer. La inmovilización directa de estas moléculas sobre la superficie del óxido de hierro no es factible; por lo que cada vez más se hace necesario el uso de recubrimientos con afinidad a estos ligados.
- ❖ *Resistencia a la oxidación:* Aunque generalmente son resistentes a este fenómeno, la magnetita y la maghemita pueden sufrir oxidación dentro de ciertas regiones corporales debido a sus vulnerables cationes Fe^{2+} , dando lugar a la formación de $\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$ (hematita) que no es magnético. En consecuencia, se necesitarán más revestimientos para aislar el óxido del medio reactivo.
- ❖ *Estabilidad coloidal:* Las NPMs tienen poca estabilidad coloidal debido a su hidrofobicidad y a las fuerzas netas que actúan sobre estas partículas, lo que conlleva a la aglomeración. Los revestimientos hidrófilos con alta estabilidad fisicoquímica para el pH del medio objetivo debería ser usado con el fin de asegurar una suspensión de partículas homogeneizada y completamente dispersa.
- ❖ *Carga superficial:* Las partículas con alta carga superficial presentan mejor estabilidad coloidal. Sin embargo, en aplicaciones biológicas estas

distribuciones de carga deberían ser negativas, de lo contrario aumentaría la activación de los macrófagos y la respuesta. El desarrollo de NPMs con carga negativa, mejoraría la formación del coloide y la absorción del sistema RE.

Es evidente que el diseño del recubrimiento es tan importante como las propiedades magnéticas del núcleo del material, ya que es esta la superficie exterior a través del cual una mayoría de las interacciones biológicas y químicas se llevarán a cabo. Quizás el reto más importante hasta la fecha es el diseño de los ligandos, principalmente debido a la inmensa cantidad de moléculas y mecanismos de unión disponibles, algunos de los cuales todavía están ni siquiera bien entendidos. La tabla 1.1 contiene los recubrimientos más utilizados hasta la fecha, junto con sus características más notables. Los revestimientos a base de polímero se aplican típicamente a través de adsorción y posterior polimerización de transferencia de átomo (Lu y col., 2007; Bychkova y col., 2012) aunque también es posible reticular los polímeros durante la síntesis del núcleo (Ma y col., 2007). En el caso del sílice, se prefieren los procesos de sol-gel y el método de Stöber (Bychkova y col., 2012).

Tabla 1.1. Características de los recubrimientos de las nanopartículas magnéticas.

<i>Características</i>	<i>Dextrano</i>	<i>PEG</i>	<i>Chitosan</i>	<i>SiO₂</i>
<i>Bioadhesivo</i>	Si	Si	Si	No
<i>Carga</i>	Negativo	Inerte	Positivo	Inerte
<i>Biocompatible</i>	Si	Si	Si	Si
<i>Biodegradable</i>	Si	No	Si	No
<i>Bioactivo</i>	Si	No	Si	No
<i>Hidrofílico</i>		Si	Bajo	Si
<i>Grupo funcional</i>	OH, NH ₂	OH	OH, NH ₂	OH, NH ₂
<i>Larga circulación</i>	Si	Si	Si	Si
<i>Estabilidad quím.</i>	Si	Si	Si	Si
<i>Ventajas</i>	Estabilidad coloidal, fácil funcionalización	Baja inhomogeneidad, buena solubilidad, fácil funcionalización	Bajo costo, citocompatible, efectos bacteriostáticos	Energía superficial alta y atracción dipolar
<i>Desventajas</i>	Degradación enzimática in vivo	No biodegradable	Baja solubilidad	No biodegradable

De los recubrimientos que se indican en la tabla 1.1, el dextrano se destaca debido a su carga superficial negativa, lo que permite evitar el sistema RE, y poseer buenas propiedades coloidales. En el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizan especialmente nanopartículas de magnetita con y sin recubrimiento. Para el estudio de

biodistribución y seguimiento de nanopartículas *in vivo*, se utilizan nanopartículas comerciales de magnetita de 50 nm con cubierta de dextrano. Para el estudio de las técnicas de adaptación del magnetómetro AGM se emplean nanopartículas comerciales de magnetita cubiertas de almidón y desnudas. Para el estudio del comportamiento magnético de las nanopartículas en fluidos viscosos y cultivos celulares, se utiliza generalmente nanopartículas de magnetita de 14 nm desnudas.

1.3.3.3. Citotoxicidad

La posible toxicidad asociada a la presencia de nanopartículas magnéticas (NPMs) en los tejidos, ha sido y sigue siendo objeto de numerosos estudios. Se sabe que estos nanomateriales se acumulan en las células y pueden depositarse en orgánulos subcelulares como la mitocondria y el núcleo, de manera que puede llegar a interferir en los procesos celulares (Jeng y col., 2006). Con el fin de incrementar la efectividad de las nanopartículas en los sistemas biológicos, diferentes materiales como albúmina, dextrano (Berry y col., 2003; Lacava y col., 2001) polietilenglicol (Gupta y col., 2004) y óxido de polietileno (Thunemann y col., 2006) entre otros, han sido usados para cubrir la superficie de las nanopartículas. La presencia de este revestimiento ayuda a la estabilidad de las nanopartículas en la circulación de la sangre y los tejidos disminuyendo sus efectos tóxicos (Shubayev y col., 2009).

La piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal están en contacto constante con el medio ambiente. Mientras que la piel es generalmente una barrera eficaz a las sustancias externas, los pulmones y el tracto gastrointestinal son más vulnerables. Estas tres formas son los puntos de entrada más probables para las nanopartículas naturales o antropogénicas. Las inyecciones o implantes son otras posibles vías de exposición, principalmente limitadas a los materiales de ingeniería.

Debido a su pequeño tamaño, las nanopartículas pueden trasladarse de estos portales de entrada a los sistemas circulatorio y linfático, y finalmente a los tejidos y órganos del cuerpo. Algunas nanopartículas, dependiendo de su composición y tamaño, pueden producir daño irreversible a las células por estrés oxidativo y/o lesión de orgánulos celulares.

En la figura 1.2, se resumen los posibles efectos adversos para la salud asociados con la inhalación, la ingestión y el contacto con las nanopartículas. Aunque no todas las nanopartículas producen efectos adversos para la salud, la toxicidad de las

nanopartículas depende de varios factores, como el tamaño, la agregación, la composición, la cristalinidad, la funcionalidad superficial entre otras.

Las enfermedades asociadas con nanopartículas inhaladas son asma, bronquitis, enfisema, cáncer de pulmón y enfermedades neurodegenerativas, como las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Las nanopartículas en el tracto gastrointestinal se han relacionado con la enfermedad de Crohn y el cáncer de colon. Las nanopartículas que entran en el sistema circulatorio están relacionadas con la aparición de arteriosclerosis, coágulos sanguíneos, arritmias, enfermedades del corazón y, en última instancia, muerte cardíaca. La translocación a otros órganos, como el hígado, el bazo, etc., puede conducir también a enfermedades de estos órganos. La exposición a algunas nanopartículas está asociada con la aparición de enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico, la esclerodermia y la artritis reumatoide.

Figura 1.2. Esquema del cuerpo humano con vías de exposición a las nanopartículas, órganos afectados y enfermedades epidemiológicas asociadas, in vitro e in vivo. (Buzea y col., 2007).

Los efectos de la endocitosis y la actividad inflamatoria y pro-oxidante, este último causado por un desbalance oxidante/antioxidante (estrés oxidativo, que puede conducir a la interrupción de la señalización redox) son extremadamente dependientes de la química de la superficie de la nanopartícula. En consecuencia, su modificación in vivo podría inducir una respuesta tóxica después de la inserción. El estrés oxidativo puede ser causado por el resultado de los radicales libres derivados de las interacciones de las células y nanopartículas. En la figura 1.3 se pueden observar las diferentes vías inflamatorias inducidas por las nanopartículas.

Mientras la interacción de las nanopartículas con el sistema inmune es aún pobremente entendida, algunos científicos creen que las nanopartículas podrían aumentar la respuesta autoinmune a través de la actividad hepteno. Por lo tanto, una gran relación superficie a volumen de las nanopartículas significa que ellas son más propensas a absorber proteínas in vivo.

Figura 1.3. Vías inflamatorias inducidas por las nanopartículas.

1.3.3.4. Bioacumulación y redistribución

Existe una necesidad imperante de comprender la biodistribución de las nanopartículas y los mecanismos de su eliminación (Zolnik y col., 2009). La biodistribución de las nanopartículas afecta su eficacia y seguridad, los cuales son factores decisivos a la hora de evaluar si una tecnología basada en nanopartículas puede ser utilizada con éxito en la

clínica (Almeida y col., 2011). Para comprender la seguridad de las nanopartículas administradas se requiere llevar a cabo el seguimiento y la acumulación potencial no deseada en otros tejidos y la caracterización del destino final de las nanopartículas a largo plazo (metabolismo y excreción). La biodistribución y el destino final de las nanopartículas son influenciadas por diversos factores, incluyendo las propiedades de las nanopartículas (material, tamaño y recubrimiento), las rutas de administración, la dosis y el ambiente fisiológico en el cual son introducidas.

Cuando las NPMs entran al torrente sanguíneo se exponen a un ambiente rico en proteínas, células y tejidos. Por consiguiente, las NPMs pueden acumularse en las células y depositarse en orgánulos subcelulares como la mitocondria y el núcleo, por lo que pueden llegar a interferir en los procesos celulares (Jeng y col., 2006).

El tamaño y el recubrimiento de las NPMs sumado a la morfología del endotelio de los vasos sanguíneos afectan el transporte de éstas a los tejidos circundantes. Mientras que el endotelio de los capilares pulmonares y musculares se caracteriza por una morfología continua que permite sólo pequeñas moléculas (<3 nm) para ser transportado a través de la pared capilar, los riñones poseen vasos sanguíneos con endotelio fenestrado y, el hígado y el bazo tienen vasos con endotelio discontinuo (Wolfsthal Ed., 2011; Chrastina y col., 2011). Estos dos últimos endotelios, permiten el paso de nanopartículas con un diámetro hidrodinámico menor a 60 nm (Li y col., 2010; Choi y col., 2010). Las características superficiales y el tamaño de las nanopartículas pueden afectar en gran medida la adsorción de proteínas a las nanopartículas mientras están en el torrente sanguíneo. Esta adhesión de proteínas puede incrementar el diámetro hidrodinámico, cambiar su carga superficial o facilitar la agregación provocando cambios en las propiedades fisicoquímicas. Uno de los obstáculos que las NPMs deben superar tras la inserción, es el sistema reticuloendotelial (RE). Esta barrera inmune biológica está compuesta por líneas celulares de progenitores de médula ósea, monocitos sanguíneos y macrófagos tisulares. Estos últimos son los responsables del reconocimiento in situ y remoción de patógenos invasores y sustancias extrañas. El sistema RE tiene un componente humoral que consiste de proteínas disueltas conocidas como opsoninas, que ayudan a la actividad de los macrófagos a través de la opsonización (adsorción sobre la superficie de la sustancia extraña). Las proteínas absorbidas serán reconocidas posteriormente por los macrófagos y los receptores de membrana de los monocitos que conducen a la fagocitosis de las partículas y su eliminación por el torrente sanguíneo.

Las nanopartículas de tamaños alrededor de 50 nm son susceptibles a alejarse de su lugar de destino previsto con el tiempo si no se controla en el interior del cuerpo, este comportamiento es obviamente perjudicial desde el punto de vista clínico, más aún si tenemos en cuenta que hasta la fecha muy pocos mecanismos para la eliminación de las nanopartículas han sido estudiados diseñados e implementados. Por lo tanto, las nanopartículas diseñadas para el tratamiento de un tejido u órgano en particular, podrían llegar a ser tóxicas al entrar en tejidos adyacentes a través de este fenómeno, e incluso terminar en regiones de mucha sensibilidad como lo es el sistema nervioso. Se cree que este movimiento dentro del cuerpo puede ser atribuido al desplazamiento caveolae (Figura 1.4).

Figura 1.4. Transporte caveolae en estado sano (A) y enfermo (B). (Oberdörster y col., 2005).

En los últimos años, parece que un pequeño sector de la comunidad científica ha empezado a reconocer los peligros potenciales para la salud de la nanotecnología, como se ve en los estudios anteriormente citados. Sin embargo, la investigación en este campo es aún muy pobre, con un enfoque predominante en las partículas ultrafinas en el aire que no satisface las necesidades de la nanomedicina. Sin embargo, todavía hay muchos cuestionamientos por esclarecer (Linkov y col., 2008). La falta de información general sobre los detalles de la toxicología de las nanopartículas, sumado a la ausencia de un marco normativo centrado en la nanomedicina, agrava las dificultades de la transferencia tecnológica en esta área.

Esta falta general de conocimiento de los aspectos específicos de la toxicología de las nanopartículas, junto con la ausencia de un marco regulador enfocado en la nanomedicina, dificulta el traslado de aplicaciones tecnológicas a la clínica. Para

abordar este estancamiento desde un punto de vista administrativo, múltiples estudios han propuesto una posible evaluación de riesgos y modelos de supervisión excepcionales (Oberdörster y col., 2005; Linkov y col., 2008; Wolf y col., 2011). Este último es quizás el más exhaustivo, con un profundo estudio de fondo y de regulación, y como tal el lector está dirigido a él si desea reunir más información y recursos sobre el asunto.

El problema de la seguridad de los nanomateriales y la nanotoxicidad deben ser estudiados con el fin de proporcionar tratamientos efectivos y seguros que conlleven a la mejora de la calidad de vida de la población.

Por lo tanto, en la última década surgió la nanotoxicología como producto de la preocupación de la comunidad científica para resolver estos planteamientos. La nanotoxicología podría definirse como “la ciencia de los nanodispositivos y nanoestructuras de la ingeniería que se ocupa de sus efectos en los organismos vivos” (Oberdörster y col., 2005b).

En la última década, una creciente preocupación debido a la seguridad en el uso de los nanomateriales ha surgido por parte de la comunidad científica. Muchos estudios sobre el hecho de que este aspecto particular de la nanotecnología ha sido excluido en muchas investigaciones (Chan y col., 2006; Wagner y col., 2008; Linkov y col., 2008; Savolainen y col., 2010; Wolf y col., 2011).

En línea con lo anterior, se hace cada vez más necesario que las nuevas investigaciones y desarrollos en la nanotecnología y nanomedicina incluyan estudios de toxicología para evaluar los riesgos potenciales con el fin de prevenir futuros problemas sanitarios. Los estudios toxicológicos deberían incluir la síntesis y caracterización del nanomaterial, estudios del nanomaterial en las células (in vitro), estudios de biodistribución y mecanismos de internalización (in vivo) y sus posibles efectos tóxicos en los tejidos, la evaluación de la aplicación y el estudio del efecto tóxico sobre el medio ambiente.

1.3.4. Ferrofluidos

Un fluido magnético o ferrofluido, es una dispersión coloidal compuesta de partículas ferromagnéticas o ferrimagnéticas ultra finas (generalmente de magnetita) suspendidas en un líquido portador el cual presenta una respuesta al aplicar un campo magnético externo. El líquido portador no magnético puede ser polar o no polar, generalmente, un solvente orgánico o agua. Las partículas tienen un diámetro promedio de 10 nm y están

cubiertas por un surfactante para evitar su aglomeración. Con este tamaño las nanopartículas se comportan como un solo dominio magnético, es decir, pueden ser tratados como pequeños imanes térmicamente agitados en el líquido portador (Scherer y col., 2005; Odenbach, 2003). Mientras la energía térmica impide eficientemente a las partículas de un tamaño de aproximadamente 10 nm de la sedimentación en un campo gravitacional o de la aglomeración debido a la interacción dipolar magnética, ésta no evita la coagulación debido a las fuerzas de atracción de Van der Waals. Para superar este problema, las partículas se recubren con surfactantes.

La suspensión se comporta como un medio paramagnético de elevada imanación o superparamagnético y su estabilidad coloidal está determinada por las fuerzas de atracción de Van der Waals que pueden provocar la agregación y la separación de fases en la suspensión.

Existen dos estrategias generales para estabilizar una dispersión coloidal y evitar su floculación: la *estabilización electrostática* y la *estabilización estérica*. La estabilización electrostática se basa en la fuerza repulsiva que surge entre cargas eléctricas de igual signo. En general, la estabilidad de las partículas se consigue cubriendo la superficie de las partículas con iones o grupos cargados positiva o negativamente, confiriendo una carga superficial neta a las partículas creando una fuerza repulsiva entre ellas y capaz de superar las fuerzas de Van der Waals. La estabilización estérica consiste en cubrir las partículas con moléculas suficientemente grandes (típicamente polímeros de bajo peso molecular) que impiden que las partículas se acerquen en el rango de las fuerzas atractivas (Rosensweig, Ed. 1985).

Se deben diferenciar entre los ferrofluidos y los fluidos magnetorreológicos (fluido MR). Los fluidos magnetorreológicos están compuestos por partículas de tamaño micrométrico dispersas en aceites viscosos con ayuda de algún surfactante. Un fluido MR, bajo la acción de un campo magnético externo, puede variar sus propiedades reológicas de flujo ocasionando un cambio de comportamiento de líquido normal Newtoniano de baja viscosidad, a un fluido con alta viscosidad provocando el comportamiento de un sólido. Sin embargo, los ferrofluidos conservan su fluidez al ser sometidos a un campo magnético externo hasta un orden de 10 kG.

El gran interés en los ferrofluidos reside principalmente en que estos poseen propiedades de líquidos (fluido base) y sólidos (nanopartículas magnéticas)

simultáneamente. Por consiguiente, un ferrofluido es un sistema de dos fases, debido a que en él coexisten una fase líquida y una fase sólida según sea el estímulo externo al que se somete (Scherer y col., 2005; Joannopoulos y col., 2011). A nivel macroscópico, el sistema se ve como un líquido ordinario. Sin embargo, a escala coloidal, el fluido parece constituido por pequeñas partículas sólidas suspendidas en el líquido portador. A este nivel nanométrico, cada partícula consiste de un núcleo que comporta como un monodominio magnético, y por lo tanto, tienen un momento magnético proporcional a su volumen. A pesar de que cada partícula es un ferromagneto, el sistema en su conjunto se comporta como un paramagneto, esto es, los ejes de fácil magnetización de cada coloide son aleatorios, generando un sistema, en principio, desordenado. Sin embargo, el momento magnético de cada partícula es mucho más grande que los momentos en un paramagneto con valores típicos del orden de 10^{-19} Am^2 para coloides magnéticos. Es decir, presentan un comportamiento que es conocido como superparamagnético (Apéndice A). Estos sistemas presentan una gran ventaja, debido a que su magnetización puede ser controlada fácilmente. Esta propiedad ha dado origen a numerosas aplicaciones (Scherer y col., 2005; Yang y col., 2002; Hong y col., 2006).

Un sistema superparamagnético presenta un momento dipolar en cada una de sus partículas que debe poder rotar libremente en la escala de tiempo de la medición. En coloides magnéticos existen básicamente dos modos de rotación, según esté asociado el eje de rotación con el eje de la magnetización: la rotación Browniana (τ_B) y la rotación de Néel (τ_N) (Apéndice A). Las rotaciones Brownianas y de Néel no influyen en las propiedades magnéticas una vez que el sistema está en equilibrio, sin embargo influyen fuertemente en su dinámica.

Debido al surfactante, los coloides son muy estables frente a la sedimentación y la aglomeración. Ésta es una propiedad muy importante que permite mantener un material bien definido en el tiempo, lo cual lo hace apropiado para investigación y aplicaciones. La sedimentación ocurre bajo la acción de un campo gravitacional o gradientes de campos magnéticos. La aglomeración ocurre principalmente por dos mecanismos: interacción magnética de tipo *dipolo-dipolo* y *fuerzas atractivas de Van der Waals*.

La interacción magnética de tipo dipolo-dipolo tiende a ordenar los momentos magnéticos en función de la geometría del sistema y está dada por (Scherer y col., 2005; Hong y col., 2006; Yang y col., 2002)

$$V_{dipolar} = \frac{\mu_0}{4\pi} \sum_{i \neq j}^N \left[\frac{\mu_i \cdot \mu_j}{r_{ij}^3} - \frac{3(\hat{\mu}_i \cdot \hat{r}_{ij})(\hat{\mu}_j \cdot \hat{r}_{ij})}{r_{ij}^5} \right] \quad (1.1)$$

Donde $\vec{r}_{ij} = \vec{r}_i - \vec{r}_j$ es la distancia entre las partículas i y j definidas por sus momentos magnéticos μ_i y μ_j .

El potencial de Van der Waals contiene dos términos, uno atractivo, y otro repulsivo, que crece rápidamente (con potencia inversa a la 12) a distancias pequeñas. Este potencial tiene la forma:

$$V_{Waals} = 2 \sum_{i \neq j}^N \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \varepsilon_{ij} \quad (1.2)$$

Donde ε y σ son constantes que dependen del material magnético que se utilice. El origen de la componente repulsiva reside en la superposición de las nubes de electrones de partículas cercanas y la parte atractiva se debe a la interacción de los dipolos eléctricos inducidos en cada una de las partículas (la llamada interacción de dispersión de London).

El término repulsivo permite que el sistema tenga un tamaño finito, es decir, una densidad volumétrica definida. Si este término no existiera, las partículas podrían colapsar unas con otras. En cambio, la parte atractiva es importante para la cohesión del sistema de partículas; sin ella las partículas se alejarían infinitamente unas de las otras. Bajo ciertas condiciones, la energía de agitación térmica $k_B T$ puede ser mucho mayor que estos potenciales, produciendo una aglomeración de las partículas. Para impedir este efecto, las partículas están cubiertas por un surfactante, como ácido oleico, con un grosor típico de 2 a 3 nm el cual impide que partículas vecinas se aglomeren (Scherer y col., 2005; Hong y col., 2006; Yang y col., 2002).

Para evitar la aglomeración, las partículas magnéticas son recubiertas por una nube de un material apropiado. De acuerdo al recubrimiento, los ferrofluidos se clasifican en dos grupos principales: *ferrofluido surfactado* (SFF) si el recubrimiento es un surfactante y, *ferrofluido iónico* (IFF) si el recubrimiento es una nube o capa eléctricamente cargada (Scherer y col., 2005). La tarea del surfactante es producir la repulsión entrópica necesaria para vencer la intensa atracción de Van der Waals de corto alcance que de otra forma resulta en una agregación de partículas y la consecuente inestabilidad coloidal

que da lugar a la precipitación (García Cerda y col., 2003; Holm y col., 2005; Eijkel y col., 2005; Rosensweig, 1985; Zhang y col., 2006).

1.3.4.1. Estabilidad de los fluidos magnéticos

A lo largo del tiempo, las nanopartículas dispersas en el fluido tienden a aglomerarse con el fin de reducir la alta energía libre de la superficie. Debido a que este proceso es lento, las propiedades de los fluidos se mantienen inalteradas por un largo periodo. Por lo tanto, esta estabilidad no se trata de una estabilidad termodinámica, sino que se trata de una agregación muy lenta, llamada *estabilidad coloidal*, y se refiere a un tipo de estabilización cinética. La estabilidad coloidal está determinada por el equilibrio entre diversas formas de energía, tales como la energía térmica $k_B T$, la energía magnética $\mu_0 M H V$ y la energía gravitacional $\Delta \rho V g L$, así como el balance entre las fuerzas atractivas (Van der Waals y dipolo-dipolo) y las interacciones repulsivas (Estérica y Coulombiana) (Scherer y col., 2005; García Cerda y col., 2003; Holm y col., 2005; Eijkel y col., 2005; Rosensweig y col., 1985; Zhang y col., 2006).

Estabilidad de un ferrofluido bajo un gradiente de campo magnético

Una suspensión de nanopartículas superparamagnéticas debe ser estable en el tiempo, inclusive cuando es sometida a un gradiente de campo magnético externo. La alta estabilidad del fluido magnético se debe a un balance entre las interacciones de tipo partícula-partícula y de la partícula con moléculas y otros iones del líquido portador o dispersante. Existen cuatro parámetros fundamentales para mantener la estabilidad del fluido magnético: Agitación térmica (movimiento Browniano), interacción entre dipolos magnéticos (dipolo-dipolo), interacción de Van der Waals, repulsión estérica (contacto entre las partículas) y repulsión electrostática.

Cuando un campo magnético se aplica a un ferrofluido, las nanopartículas son atraídas a las regiones de mayor intensidad del campo magnético, mientras que la energía térmica contrarresta la fuerza del campo y proporciona movimientos aleatorios que permiten a las partículas permanecer dispersas en el volumen del líquido portador. Con el fin de que el ferrofluido permanezca estable y para evitar la aglomeración de las partículas en un gradiente de campo magnético, la relación entre la energía térmica y la energía magnética debe ser alta, es decir:

$$\frac{k_B T}{\mu_0 M H} > 1 \quad (1.3)$$

Y al evaluar el diámetro típico de la partícula (D) para evitar la aglomeración magnética se compara la energía térmica con la energía del par dipolo – dipolo o la energía magnética del sistema, la cual está dada por:

$$D \leq \left(\frac{6k_B T}{\pi \mu_0 M H} \right)^{1/3} \quad (1.4)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura absoluta, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío, H es la intensidad de campo magnético y M es la intensidad de magnetización. Para valores típico se encuentra que $D \cong 10$ nm.

Experimentalmente, se puede decir que un ferrofluido es estable cuando las nanopartículas espontáneamente se redistribuyen en todo el volumen de líquido portador durante un período de tiempo después de que el campo es eliminado.

Estabilidad de un ferrofluido en un campo gravitacional

Las nanopartículas magnéticas en un ferrofluido constantemente son atraídas hacia abajo por efecto de la gravedad, pero siguen siendo dispersas en el líquido portador debido a la agitación térmica. La razón entre la energía gravitacional y la energía magnética que indica el mecanismo a favor de la aglomeración de las partículas. Si:

$$\frac{\Delta \rho g L}{\mu_0 M H} \ll 1 \quad (1.5)$$

Entonces, la aglomeración de las nanopartículas se debe principalmente al campo magnético.

Estabilidad del ferrofluido contra la aglomeración magnética

Un fluido magnético o ferrofluido típico contiene del orden de 10^{23} partículas por metro cúbico, de ahí que las colisiones entre partículas son muy frecuentes. Si las partículas se adhieren entre ellas después de la colisión habría una rápida aglomeración, por lo que se genera la posible inestabilidad con respecto a la agregación en un gradiente de campo magnético. Sin embargo, la adherencia de partícula–partícula se puede impedir por diversos fenómenos, dependiendo del tipo de dispersante utilizado. Cuando dos

partículas están en contacto, estas pueden ser separadas mediante la aplicación de una energía denominada energía de contacto dipolo-dipolo, dada por:

$$U_{dd} = \frac{1}{12} \mu_0 M^2 V \quad (1.6)$$

Estos aglomerados se pueden romper por agitación térmica, la estabilidad contra la aglomeración, por lo tanto, es dada por la razón entre la energía térmica y la energía de contacto dipolo-dipolo, la cual se escribe como:

$$\frac{12k_B T}{\mu_0 M^2 V} \geq 1 \quad (1.7)$$

Por lo tanto, el tamaño de las partículas para evitar la aglomeración debe obedecer la siguiente relación (Scherer y col., 2005; García Cerda y col., 2003; Holm y col., 2005; Eijkel y col., 2005; Rosensweig, 1985; Zhang y col., 2006).

$$D \leq \left(\frac{72k_B T}{\pi \mu_0 M^2} \right)^{1/3} \quad (1.8)$$

1.3.4.2. Interacciones atractivas y repulsivas

Interacciones atractivas

Existen básicamente dos interacciones atractivas importantes entre las partículas magnéticas en un ferrofluido, las interacciones dipolo-dipolo (dipolar magnética) y la interacción de Van der Waals.

Interacción dipolo-dipolo: Si se considera dos cargas con la misma intensidad y signos iguales, separadas una distancia $s + d$ donde s es la distancia entre las superficies de cada una de las nanopartículas, y d es el diámetro de las nanopartículas (Figura 1.5).

Figura 1.5. Representación de dos partículas con diámetro d en un líquido con una capa protectora de espesor δ , s es la separación entre superficies y r es la distancia entre los centros de las partículas.

Entonces la energía de interacción dipolo-dipolo entre las dos partículas con momentos magnéticos es una interacción de largo alcance y está dada por:

$$U_{dd} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{r^3} - \frac{3}{r^5} (\mu_1 \cdot \vec{r})(\mu_2 \cdot \vec{r}) \right) \quad (1.9)$$

Cuando los momentos están alineados de tal forma que $\mu_1 = \mu \hat{r}$, $\mu_2 = \mu \hat{r}$ y sustituyendo $r = r \hat{r}$ se tiene que:

$$U_{dd} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left(\frac{\mu^2}{r^3} - \frac{3}{r^5} (\mu)(\mu) \right) \quad (1.10)$$

$$U_{dd} = \mu_0 \frac{\mu^2}{2\pi r^3} \quad (1.11)$$

Si se considera que $r = s + d$ y que $\mu = \frac{\mu_0 M \pi d^3}{6}$ donde M es la magnetización, μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío y d es el diámetro de las partículas sustituyendo en la ecuación anterior (1.11) se tiene:

$$U_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 \pi d^3}{9(l+2)^3} \quad (1.12)$$

Donde $l = \frac{2s}{d}$

Si se considera el caso de dos partículas en contacto, es decir $l = 0$ y con un volumen de nanopartículas dado por $V = \frac{\pi d^3}{6}$ entonces se tiene que:

$$U_{dd} = \frac{\mu_0 M^2 V}{12} \quad (1.13)$$

Esta ecuación rige la energía de contacto entre las nanopartículas.

Interacción de Van der Waals: La interacción atractiva de Van der Waals, es la facilidad con la que los átomos neutros o moléculas se atraen o son atraídos por cargas eléctricas debido a fluctuaciones de energía de fuerzas dipolo-dipolo que siempre están presentes. La interacción de Van der Waals ocurre por causa de varios tipos de interacciones, como las interacciones dipolo inducidos y dipolos permanentes.

Interacciones repulsivas

Para obtener ferrofluidos magnéticos estables, es necesario introducir interacciones repulsivas que se opongan a las interacciones atractivas.

Interacción estérica: se utiliza para evitar que la atracción de Van der Waals prevalezca sobre las partículas cuando estas están cerca una de la otra. Esto se logra por la presencia de moléculas de cadena larga que son adsorbidas en la superficie de las partículas magnéticas.

Interacción electrostática: cuando las partículas poseen carga o potenciales superficiales iguales y del mismo signo, ellas tienden a repelerse creando de esta forma una barrera de potencial que impide la aglomeración.

1.3.4.3. Propiedades magnéticas de los ferrofluidos

En un ferrofluido, cada partícula tiene un momento magnético $\vec{m}$ asociado. En ausencia de un campo externo aplicado, las nanopartículas están orientadas aleatoriamente, por lo que el fluido no tiene una magnetización neta. Sin embargo, al aplicar un campo magnético débil, los momentos magnéticos se alinean en la dirección del campo aplicado en detrimento de la agitación térmica (Yusuf, 1989; Arulmurugan y col., 2006; Bahadur y col., 2005; Pérez-Castillejos y col., 2000; Piso, 1999; Atkins, 2013).

Con el aumento de la magnitud del campo, los momentos magnéticos de las nanopartículas se tornan cada vez más alineados con la dirección del campo y adquieren un momento magnético atómico gigante y, la energía de interacción magnética entre las partículas es minimizada si éstas se alinean en la dirección del campo magnético. Esta es una característica del comportamiento superparamagnético de un ferrofluido. Para estudiar este efecto, se utiliza la teoría clásica de Langevin.

$$L(\alpha) = \coth\alpha - \frac{1}{\alpha} \quad (1.14)$$

Donde $\alpha = \frac{\mu_0 m_i H}{k_B T}$

1.3.4.4. Efecto de la concentración y la viscosidad en un ferrofluido

Un campo aplicado externamente induce el ordenamiento de los momentos magnéticos de las partículas, dando lugar a la magnetización de la muestra en su conjunto a escala

macroscópica. En los ferrocoloides diluidos (menor concentración de nanopartículas), la energía de las interacciones dipolo-dipolo entre partículas es pequeña en comparación con la energía calorífica. Bajo el efecto de un campo magnético externo, la estructura del ferrofluido se reorganiza. Cuando la concentración del componente sólido es suficientemente alta y la intensidad del campo magnético es suficientemente fuerte para estimular la formación de clúster o grupos de cadenas, la rigidez del ferrofluido aumenta (Skumiel y col., 2003).

Usualmente, en un ferrofluido hay dos mecanismos de relajación: Néel y Brown (Apéndice A). En la práctica, en un ferrofluido los dos mecanismos pueden tomar lugar simultáneamente y entonces, el tiempo de relajación efectiva estará dado por:

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (1.15)$$

Como se mencionó anteriormente, estos mecanismos dependen del tamaño de las nanopartículas. En un ferrofluido dado, el mecanismo de magnetización cuyo tiempo de relajación sea más corto es el que domina. En un ferrofluido polidisperso, el mecanismo de Néel puede dominar para algunas partículas o tamaño por debajo de cierto valor mientras que para las otras, el mecanismo de Brown puede ser dominante (Skumiel y col., 2003).

Cuando las nanopartículas están inmersas en un fluido altamente viscoso, las nanopartículas están prácticamente inmovilizadas, por consiguiente, sólo el momento magnético interno de las partículas pueden responder a un campo magnético alternante externo (Relajación de Néel) mientras que la rotación de las partículas es imposible. Por el contrario, en un medio menos viscoso, las partículas pueden girar en conjunto (Relajación de Brown) bajo la influencia del torque asociado por las interacciones magnéticas y debido a las fluctuaciones térmicas en el líquido circundante. La pérdida de magnetización de las nanopartículas suspendidas en un fluido altamente viscoso es originada por el incremento de la viscosidad del medio, las interacciones dipolares y la formación de anillos, agregados o clústers.

En un campo magnético externo alto y baja viscosidad del fluido portador, estos anillos pueden romperse y formar cadenas cortas en la dirección del campo (Jund y col., 1995; Kun y col., 2001) que contribuyen a la magnetización (Taketomi y col., 2002; Gao y col., 2012). Sin embargo, la alta viscosidad de un medio líquido impide que los anillos se muevan fácilmente disminuyendo la probabilidad de su rotura. Tales agregados

existen bajo campo magnético externo cero y no contribuyen a la magnetización del ferrofluido y pueden denominarse "agregados muertos" (Li y col., 2014). De esta manera, cuando el campo externo se aplica al clúster y su intensidad se incrementa gradualmente, el momento magnético de cada partícula en el clúster es orientado gradualmente en la dirección del campo.

Al mismo tiempo, el clúster puede cambiar su forma a una cadena orientada a lo largo de la dirección del campo. En este caso, la magnetización del ferrofluido es menor que la magnetización en un sistema de partículas monodispersas en el cual cada momento magnético de las partículas interactúan independientemente con el campo magnético externo (Taketomi y col., 2011). Estas pequeñas cadenas en la dirección del campo magnético formadas debido al rompimiento de los anillos a altos campos (Jund y col., 1995; Kun y col., 2001), podrían contribuir a la magnetización (Taketomi y col., 2002).

Las dispersiones de coloides superparamagnéticos requieren la aplicación de un campo magnético externo para inducir la estructuración (agregación o formación de cadenas) ya que los coloides no tienen dipolo magnético en ausencia de campo externo. Por el contrario, los coloides ferromagnéticos exhiben estructuras agregadas en ausencia de un campo magnético externo como consecuencia de su dipolo magnético permanente.

En ausencia de un campo magnético aplicado, las nanopartículas superparamagnéticas no tienen dipolo magnético neto, de modo que la fuerza magnética entre ellas es cero. Por lo tanto, una dispersión coloidal superparamagnética bien estabilizada es homogénea sin agrupación de partículas. Cuando un campo magnético está presente, los coloides superparamagnéticos adquieren una magnetización inducida apuntando a lo largo del campo magnético externo aplicado y entonces, la agregación es posible. En general, la fuerza entre dos partículas dipolares está representada por la interacción dipolo-dipolo magnético anisotrópico que depende de la orientación de los momentos dipolares de cada partícula y su distancia relativa.

1.3.4.5. Efecto Magnetoviscoso

El fenómeno de los cambios de viscosidad dependiente del campo de una suspensión de nanopartículas magnéticas se conoce desde hace más de 30 años. En 1968 (McTague, 1969), descubrió un incremento en la viscosidad de un ferrofluido, que contenía nanopartículas de cobalto, en presencia de un campo magnético. El efecto fue explicado

por un impedimento en la rotación de las partículas suspendidas debido a la acción del campo magnético.

Asumiendo un ferrofluido bajo la influencia de un flujo de tensiones (Figura 1.6), las partículas magnéticas rotarán en el fluido con el eje de rotación paralelo a la vorticidad del fluido debido a la acción de un torque mecánico producido por la fricción viscosa en el fluido. Si un campo magnético externo $\vec{H}$ se aplica al fluido, el momento magnético $\vec{m}$ de las partículas se alinearán con la dirección del campo magnético. En una situación en donde la dirección del campo y la vorticidad del flujo son colineales (Figura 1.6A), la alineación magnética sólo conducirá al hecho de que el momento magnético de las partículas se vuelve colineal con la dirección de la vorticidad. Por consiguiente, las partículas rotarán en la dirección del campo magnético y ninguna influencia en el flujo aparecerá. Por el contrario, si el campo magnético es perpendicular a la vorticidad (Figura 1.6B), el torque mecánico inclinará el momento magnético de la partícula contra la dirección del campo, si el momento está fijado espacialmente en la partícula. El ángulo finito resultante entre el momento magnético y la dirección del campo dará lugar a un torque magnético contrarrestando el torque viscoso (mecánico) y tratando de realinear el momento magnético con el campo. La contrarreacción de los torques causa un impedimento de la rotación libre de las partículas en el flujo, y por lo tanto, incrementa la resistencia del flujo y el fluido exhibe un incremento en la viscosidad (Odenbach, 2002; Odenbach, 2003).

Figura 1.6. Origen del cambio de viscosidad dependiente del campo en una suspensión de nanopartículas magnéticas (Odenbach, 2002).

1.4. Estado del arte

En esta sección se resumen las investigaciones previas respecto a la detección y biodistribución de las Nanopartículas Magnéticas (NPMs) en modelos animales a través de diferentes técnicas. Así mismo, se señalan los estudios de la influencia de la viscosidad del medio, el ambiente intracelular, la concentración y la agregación de NPMs en el magnetismo.

1.4.1. Técnicas de detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas

Tras ser inyectadas dentro un sistema biológico, las Nanopartículas Magnéticas (NPMs) son transportadas por el torrente sanguíneo y depositadas en los órganos. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas permiten el monitoreo y la determinación cuantitativa de su biodistribución en el organismo. Sin embargo, la medición de la señal magnética de las nanopartículas dentro de los tejidos biológicos puede resultar una tarea desafiante debido a la dispersión de las partículas. Sumado a esto, la contribución de la señal de la matriz diamagnética de las células y tejidos, dificulta obtener una precisión y exactitud en las medidas ya que la señal magnética general con frecuencia disminuye (Hautot y col., 2005). En algunos casos de muestras biológicas, es posible concentrar el material magnético utilizando técnicas de extracción magnética o mediante la deshidratación de la muestra de tejido (Schultheiss-Grassi y col., 1999; Kirschvink y col., 1992). Sin embargo, esto no siempre es posible y puede afectar a la oxidación del material debido al largo tiempo de experimentación.

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de determinar la biodistribución y el destino final de las NPMs tras su administración en modelos animales. La gran diversidad en los parámetros asociados a cada estudio y la variedad de técnicas utilizadas para la detección de las NPMs hacen que cada experimento obtenga resultados ligeramente diferentes unos de otros. A continuación se detallan las investigaciones más relevantes en este tópico.

La biodistribución final típica de las nanopartículas, de entre 10-100 nm de diámetro, tras la administración vía intravenosa está entre el 80-90% en el hígado y 5-8% en el bazo (Duguet y col., 2006). Por otro lado, Kwon y col., (2008) demostraron que a través de la vía de inhalación, las NPMs de diámetros menores a 100 nm, tienden a acumularse en el cerebro, bazo, hígado y pulmones, concluyendo que las NPMs de este tamaño tienen la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE).

Estudios de toxicidad llevados a cabo en animales de experimentación concluyeron que, el hierro es acumulado en los tejidos sin producir alteraciones considerables sobre las células (Duguet y col., 2006). Sin embargo una dosis de 400 mg/kg de NPMs recubiertas de dextrano, provoca efectos citotóxicos en los linfocitos, neutrófilos y células del peritoneo (Lacava y col., 1999; Lacava y col., 2004).

Desde hace varias décadas el espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha sido utilizado en diversos estudios de biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro en modelos animales. Weissleder y col., (1989), analizaron los órganos ex vivo de ratas a través de la medida del tiempo de relajación trasversal (T2) usando un PC 20 Minispec (IBM). Las mediciones se realizaron a 37°C y 0.47 Teslas (frecuencia de resonancia del protón de 20 MHz). Posteriormente, Pouliquen y col., (1991) publicaron los resultados de la biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro en ratones a través de las medidas de T2. Las mediciones se realizaron a 4°C y 20 MHz. Los dos estudios detectaron acumulación de hierro en sangre, hígado y bazo dentro de las primera horas después de administrada la dosis. Sin embargo, Weissleder y col., (1989) observaron que los valores de T2 en el hígado y el bazo retornaron a los valores normales basales 30 días después de la inyección, mientras que Pouliquen y col., (1991) no observaron diferencias en T2 para el hígado y el bazo comparados con los tejidos control a partir de las 72 horas. Considerando que el recubrimiento de las nanopartículas fue el mismo (dextrano) en los dos experimentos, las diferencias en los resultados obtenidos con la misma técnica podrían ser causadas por el tamaño de las NPMs, la dosis inyectada, duración y temperatura del desarrollo experimental.

Lacava y col., (2002) emplearon la espectroscopia de Resonancia de Spin Electrónico (ESR) para investigar la cinética y subsecuente biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano. Los resultados mostraron un decaimiento en la concentración de hierro en sangre en los primeros 10 minutos y la eliminación completa a los 90 minutos tras la inyección. Posteriormente, la magnetita se concentró en el hígado y el bazo. El resto de tejidos no indicó señal de resonancia durante los tiempos estudiados.

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa. Jain y col., (2008) utilizaron un espectrómetro de masas acoplado inductivamente (ICP-MS) para estudiar la biodistribución de nanopartículas de óxido de hierro en animales de experimentación.

De manera similar, Lévy y col., (2011a), Gu y col., (2012) y Jaiswal y col., (2014), emplearon un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Estas similares técnicas (ICP-MS y ICP-OES) son capaces de determinar y cuantificar elementos inorgánicos. Sin embargo, tienen algunas diferencias en cuanto a los tipos de muestras a analizar, la precisión, detección de isótopos, entre otras. A pesar de la sensibilidad, estas tecnologías carecen de especificidad porque son incapaces de distinguir entre el hierro de la inyección exógena del hierro endógeno del organismo. Por esta razón, los autores se apoyaron en otra u otras técnicas para contrastar los resultados de las mediciones a través de la espectrometría. Los resultados de estas investigaciones a través de la espectroscopia revelaron ligeras diferencias entre los estudios. En general, los autores detectan niveles de hierro en las muestras de hígado, bazo y pulmón comparado con las muestras control tras finalizar el tiempo de experimentación (2 semanas a 3 meses). El nivel de hierro en el bazo es mayor que en el pulmón y el hígado. No se detectaron niveles de hierro en el cerebro en comparación con la muestra control. Cabe señalar que la ventana de experimentación, el tamaño de las partículas, el recubrimiento y la dosis fueron diferentes en cada experimento, lo que conlleva a la variación en los resultados. Como se mencionó anteriormente, los investigadores utilizaron otras técnicas de detección para contrastar los resultados de las medidas de espectroscopia. Los autores emplearon técnicas de magnetometría (AGM, SQUID y VSM) y Resonancia FerroMagnética (FMR).

Lévy y col. (2011a) utilizaron la FMR y un SQUID como técnicas alternativas a su estudio. Los autores obtuvieron resultados similares a través de las dos técnicas, lo que les llevó a verificar que tanto el SQUID como la RFM proporcionan una evaluación cuantitativa de la concentración de hierro proveniente de las NPMs. Las técnicas fueron capaces de detectar hierro no endógeno en los tejidos biológicos (bazo e hígado) 30 días después de administrada la dosis, siendo superior la acumulación de hierro en el bazo que en el hígado.

Gu y col., (2012) emplearon un SQUID y sus resultados son similares a los de Lévy y col., (2011a) aunque el tamaño de las partículas, el recubrimiento y la ventana de tiempo fueron diferentes en cada investigación. Gu y col., (2012), concluyeron que 30 días después de la administración de la dosis, el nivel de hierro en el bazo y el hígado es estadísticamente significativo respecto de la muestra control. Sin embargo, el nivel de hierro en bazo es mayor que en el hígado. Los autores no estudiaron otros tejidos.

Jaiswal y col., (2014) utilizaron un VSM para contrastar sus resultados de espectroscopia. Los autores señalan que la detección de hierro en las muestras mediante las dos técnicas tiene un comportamiento o tendencia similar, observando acumulación de NPMs en el pulmón, el bazo y el hígado al finalizar el estudio (14 días). La señal magnética es similar en el bazo y en el pulmón y es superior a la señal magnética detectada en el hígado. No encontraron diferencias significativas en el cerebro a lo largo del estudio.

Por otro lado, Jain y col., (2008) utilizaron un AGM para comparar los resultados obtenidos en la ICP-MS. Para realizar las medidas con el AGM, los autores liofilizan y sellan las muestras con parafina. Los resultados con el AGM mostraron una pérdida de la magnetización en las muestras en el periodo de 1 semana y una alta variación en las medidas fue observada. Los autores sugieren que la disminución de la señal magnética podría ser causa de la biodegradación de las nanopartículas de óxido de hierro por parte de las células Kupffer del hígado y su incorporación a la ferritina (Briley-Saebo y col. 2004). En el reporte, los autores indican que la muestra es liofilizada y posteriormente sellada con parafina con el fin de analizarla mediante el AGM. Aunque el proceso de sellado con parafina no es claro, se puede intuir que este tratamiento es realizado con el fin de obtener una muestra sólida capaz de ser medida en el AGM. En consecuencia, es posible que la disminución de la señal magnética esté provocada por la oxidación del material y/o por la señal diamagnética aportada por la parafina. Si los autores poseen una señal magnética muy débil (debido a la biodistribución de las NPMs en el cuerpo), la señal diamagnética no será despreciable. Por consiguiente, es necesario realizar medidas independientes del portamuestra, la muestra control y la parafina con el fin de eliminar estas señales en el procesamiento de los datos. Por último, la variación observada en los valores de magnetización en los tejidos posiblemente sea causada por la distribución heterogénea de las NPMs en los órganos debido a la falta de homogenización de las muestras antes de ser medidas.

El estudio de Chertok y col., (2010) sugiere que la Resonancia de Espín Electrónico (ESR) puede detectar el contenido de NPMs dentro de los tejidos a concentraciones (10-55 nmol Fe/g) por debajo de la sensibilidad de la ICP-OES. Dado que los tejidos contienen especies endógenas que contienen hierro (Hb y transferrina), a parte de las NPMs introducidas a través de la inyección (exógena), este tipo de espectroscopias (ESR, ICP-EOS y ICP-MS) requieren que la señal de fondo de la muestra control se

eliminen de la señal de la muestra de ensayo con el fin de determinar el contenido de NPMs exógenas. La ESR es intrínsecamente más sensible a las NPMs que al hierro endógeno en el tejido debido a que las NPMs tienen susceptibilidades más grandes. Como resultado, en las mediciones mediante ESR, la señal de fondo con hierro endógeno (muestras control) es relativamente más baja, lo que permite incluso pequeñas cantidades de NPMs en un tejido para ser detectado. Debido a su alta sensibilidad, se puede emplear una pequeña cantidad de tejido, permitiendo que la muestra se caracterice por otros métodos.

Varios grupos han propuesto el uso de imágenes de fluorescencia en el infrarrojo cercano (NIRF) como una alternativa a los métodos tradicionales de radioetiquetado (Bourrinet y col., 2006; Lawaczeck y col., 1977). La conjugación de nanopartículas de óxido de hierro con fluoróforos NIR permite las mediciones basadas en imágenes de fluorescencia rápida de la biodistribución de las nanopartículas en los órganos *in vivo*. El principal inconveniente de este método es que la imagen NIRF es menos cuantitativa y, etiquetar las nanopartículas con un fluoróforo NIR puede alterar su biodistribución.

Otras investigaciones han empleado el AGM para estudiar el comportamiento magnético en tejidos o bacterias. Brem y col., (2005), caracterizaron la ferritina y magnetita/maghemita en muestras de tejido cerebral por combinación de diferentes métodos magnéticos. Un año más tarde, Brem y col., (2006), estudiaron y compararon las propiedades magnéticas de muestras de meningiomas tumorales con muestras de hipocampo no tumoral. Farzan y col., (2010), investigaron el comportamiento magnético de los magnetosomas indicando que estas bacterias tienen un comportamiento superparamagnético.

1.4.2. Comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos e internalizadas en cultivos celulares

Los resultados experimentales de aplicaciones biomédicas *in vivo* basadas en las propiedades magnéticas de las nanopartículas señalan variaciones substanciales en sus propiedades después de la interacción con las células y los tejidos biológicos. Estas alteraciones podrían ser causadas por diversos factores como la viscosidad del medio, el ambiente celular, la concentración o la agregación del material magnético. El entendimiento de los cambios en las propiedades magnéticas de los nanomateriales

cuando se sumergen en el entorno biológico es, por lo tanto, necesario para mejorar las aplicaciones *in vivo* y manejar los problemas de toxicidad.

1.4.2.1. Variación de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro suspendidas en fluidos viscosos

La dinámica magnética de un conjunto de nanopartículas dispersas en un líquido viscoso (no magnético) difiere significativamente del comportamiento del mismo conjunto de nanopartículas inmovilizadas en una matriz sólida o en polvo. Es decir, las propiedades magnéticas son influenciadas por la viscosidad del medio, la concentración y la agregación de las partículas.

Cuando las nanopartículas están inmovilizadas debido a un medio altamente viscoso, sólo el momento magnético interno de las partículas pueden responder a un campo magnético alternante externo (Relajación de Néel). Por el contrario, en un medio menos viscoso, las partículas pueden girar en conjunto (Relajación de Brown) bajo la influencia del torque asociado con las interacciones magnéticas y debido a las fluctuaciones térmicas en el líquido circundante. Por consiguiente, la pérdida de magnetización de las nanopartículas se origina por el incremento de la viscosidad del medio, las interacciones dipolares y la formación de agregados o clústers.

Extensos trabajos teóricos y experimentales están de acuerdo que las interacciones entre partículas magnéticas juegan un rol fundamental en el comportamiento magnético en un ferrofluido (Dormann y col., 1988; Knobel y col., 2004). Sin embargo, varias inconsistencias han sido discutidas desde la década de los 80's tratando de conciliar la teoría y los diferentes datos experimentales. Para los sistemas con alta densidad de partículas, el panorama es muy complejo ya que el proceso de bloqueo de cada nanopartícula es altamente dependiente de su vecindario. Algunos trabajos relevantes son citados a continuación.

A medida que la concentración del componente sólido en un ferrofluido se incrementa, la distancia entre las partículas disminuye por lo que la alineación de los momentos magnéticos de las partículas a lo largo del campo externo se obstaculiza ocasionando una disminución en la magnetización del sistema de nanopartículas.

En los años 80's, Chantrell y col., (1980) estudiaron los efectos de las interacciones interpartículas repulsivas y magnetostáticas en fluidos magnéticos con nanopartículas de Cobalto de 15 nm. Los autores utilizaron un modelo bidimensional basado en el método

Monte Carlo. El modelo predijo que el efecto de las interacciones reduce la susceptibilidad magnética inicial en la región del campo magnético débil ($H < 10$ kA/m) del sistema. Los resultados teóricos predijeron exitosamente el fenómeno observado en la estructura de bucle abierto para las partículas en el campo cero, la cual se rompe en cadenas de longitud creciente bajo la influencia de un campo magnético aplicado de magnitud creciente.

Por el contrario, Taketomi y col., (2002) aseguraron que si existe interacción entre los dipolos magnéticos de un conjunto de partículas, la susceptibilidad magnética inicial debería ser más grande que para el sistema de partículas que no interactúan. Los autores afirmaron que los momentos magnéticos de un sistema de partículas con interacción son más fáciles de orientar en la misma dirección que el campo magnético.

Años más tarde, Taketomi y col., (2011) estudiaron la pérdida de magnetización en tres tipos de ferrofluidos y advirtieron la formación de clústers o micelas inducidas por la aplicación de un campo magnético externo. Estos clústers observados tenían una forma alargada; por consiguiente, éstas aparecían o desaparecían con la aplicación o eliminación del campo magnético externo. Los autores afirmaron que la magnetización en un sistema de partículas conformado de clústers es menor que la de un ferrofluido con partículas monodispersas donde el momento magnético de cada partícula interactúa independientemente con el campo.

Li y col., (2014) modificaron la viscosidad del medio donde yacían suspendidas un conjunto de nanopartículas superparamagnéticas para estudiar el efecto viscoso en el magnetismo de las partículas usando un VSM. Los autores sugirieron que el incremento de la viscosidad facilita la formación agregados en forma de anillo, el cual es similar a la configuración de un flujo magnético cerrado y es difícil de romper incluso a alto campo magnético cuando la viscosidad del fluido portador se incrementa.

Skumiel y col., (2003) estudiaron la influencia de la concentración de las partículas en la formación de cadenas y en sus propiedades magnéticas. Los resultados revelaron que la formación de cadenas se observó en la muestra con menor concentración de partículas y, atribuyen este extraño resultado a la preparación de la muestra. Los autores señalaron que la magnetización de las nanopartículas suspendidas en los fluidos no era linealmente dependiente de la concentración, indicando la presencia de interacciones dipolares y la formación de clúster de cadenas.

Vargas y col., (2005) investigaron las interacciones dipolares en un sistema de nanopartículas de magnetita (7.1 nm), a diferentes concentraciones, recubiertas con moléculas de oleoyl-sarcosina para evitar las aglomeraciones. Las mediciones se realizaron en un SQUID a 300K. Los autores observaron que la susceptibilidad magnética inicial de la muestra en fase sólida era menor que para el sistema de partículas en un fluido, señalando el efecto de la interacción dipolar entre las partículas.

Por otro lado, Urtizberea y col., (2010) investigaron las propiedades magnéticas de los ferrofluidos y la tasa de absorción específica (SAR) en relación a la interacción dipolar a baja concentración de nanopartículas. Los autores reportaron que las interacciones dipolares originaron una disminución del SAR con el incremento de la concentración y, esta disminución estaba relacionada con dos efectos. En primer lugar, la susceptibilidad magnética inicial de las NPMs disminuye con la concentración, es decir que interacciones dipolares crecientes hacen que el alineamiento de los momentos magnéticos de las nanopartículas a lo largo del campo externo sea obstaculizado. En segundo lugar, los tiempos de relajación disminuyen con el incremento de las interacciones dipolares que causan que las nanopartículas se relajen más rápido.

Serantes y col., (2010) estudiaron los efectos de las interacciones dipolares en sistemas monodispersos (tamaño de partícula uniforme) sobre la hipertermia magnética a través de evidencias experimentales y simulaciones por el método Monte Carlo. Los resultados coincidieron con los publicados por Urtizberea y col., (2010) pero contrario a los encontrados en ferrofluidos polidispersos reportado por Jeun y col., (2009). Esta discrepancia puede ser consecuencia del sistema polidisperso analizado.

Salas y col., (2014) estudiaron las propiedades magnetotérmicas de un sistema de nanopartículas monodispersas variando la viscosidad del medio dispersante, el tamaño de las partículas y la concentración. Los autores señalaron que los mecanismos de calentamiento no estuvieron influenciados significativamente por la viscosidad del medio en los sistemas de nanopartículas con tamaños entre 14 y 18 nm. Sin embargo, para el sistema de nanopartículas de 22 nm, se reflejó la influencia de la viscosidad del medio en los valores del SAR. Por otro lado, a bajas concentraciones de nanopartículas, el valor del SAR era comparable a diferentes viscosidades. No obstante, cuando se incrementa la concentración, los valores del SAR difieren de acuerdo a la viscosidad del líquido portador, llegando a ser más alto en el sistema de nanopartículas con menor viscosidad. Por consiguiente, el incremento de la concentración de partículas favoreció

las interacciones dipolares mejorando el calor liberado del sistema de NPMs en el fluido con baja viscosidad.

1.4.2.2. Variación de las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro internalizadas en cultivos celulares

Los resultados experimentales acumulados evidencian variaciones en las propiedades magnéticas de las nanopartículas (Amiri y col., 2013; Lévy y col., 2011b; Di Corato y col., 2014) tras la interacción con proteínas y otras moléculas fuera o dentro de las células y tejidos.

Numerosas investigaciones se han llevado a cabo para estudiar las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro en el entorno celular. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en la modificación de la eficiencia térmica de las nanopartículas magnéticas.

Lévy y col., (2011b) estudiaron los clúster intracelulares de las nanopartículas de óxido de hierro y su efecto en el magnetismo usando un SQUID. Las evidencias experimentales indicaron que las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro son modificadas por la internalización celular debido a las interacciones magnéticas entre las nanopartículas secuestradas dentro de los organelos celulares (lisosomas).

Di Corato y col., (2014) investigaron la eficiencia de calor en el ambiente celular para diferentes tamaños y diseños de partículas. La disminución de la eficiencia de calor registrada fue atribuida a las interacciones magnéticas entre partículas como consecuencia del confinamiento en las células o por el aumento de la viscosidad celular circundante demostrando una completa inhibición de la relajación Browniana en condiciones celulares.

Lévy y col., (2012) investigaron los efectos de la internalización celular de las nanopartículas en su comportamiento magnético. Los autores sugirieron que las propiedades magnéticas de las nanopartículas son afectadas por el confinamiento en los lisosomas. Por otro lado, el grado de libertad de rotación de las partículas es probablemente impedido y, en consecuencia, ralentiza el proceso de relajación Browniano. El estudio de Soukup y col., (2015), ha demostrado que la relajación de Brown es inhibida cuando las nanopartículas son internalizadas por las células.

1.5. Planteamiento del problema

La aplicación de la nanotecnología en la medicina a través del empleo de las nanopartículas magnéticas (NPMs) ha abierto un abanico nuevo de aplicaciones de terapia y de diagnóstico. Sin embargo, uno de los retos más grandes de las aplicaciones biomédicas radica en la transferencia de la tecnología de ambientes controlados en laboratorios a ambientes reales donde se interactúa con el cuerpo humano, ya sea de forma externa o interna (Pankhurst y col., 2003). Por consiguiente, es fundamental estudiar las propiedades magnéticas de las nanopartículas y los fenómenos físicos que interactúan en entornos que imitan las condiciones que se presentan en aplicaciones *in vivo*.

Un mayor conocimiento del comportamiento magnético de las NPMs contribuiría al desarrollo de terapias y diagnósticos más seguros y eficaces. Por esta razón, este estudio surge de la necesidad de explorar y profundizar el potencial y los fenómenos asociados a las NPMs en aplicaciones biomédicas *in vivo*.

En el desarrollo de esta tesis doctoral se implementa un protocolo de medidas que permita detectar y hacer seguimiento de pequeñas cantidades de NPMs en los tejidos biológicos *ex-vivo* provenientes de animales de experimentación. Así mismo, se busca establecer las diferencias del comportamiento magnético de las NPMs cuando se encuentran suspendidas en fluidos inertes e internalizadas en cultivos celulares. Para ello, se requiere implementar la adaptación del magnetómetro AGM con el fin de llevar a cabo la caracterización magnética de las nanopartículas en entornos inertes y en cultivos celulares.

CAPÍTULO

2

Hipótesis

*“¡Ánimo! No tengas miedo de especular.
No hay ciencia sin hipótesis”
- Carla Montero*

2. HIPÓTESIS

Dentro de los materiales utilizados en investigaciones biomédicas, las Nanopartículas Magnéticas (NPMs) de óxido de hierro exhiben características fisicoquímicas que son de gran interés. Su comportamiento magnético y su pequeño tamaño facilitan el desarrollo de un gran número de aplicaciones biológicas permitiendo interferir, de manera altamente localizada y específica, con virus, bacterias o células. Esto hace de las NPMs un nanomaterial con potencial para ser empleado en terapias y diagnóstico (teragnosis) de diversas patologías.

Algunas de las aplicaciones que han empleado NPMs en la última década son la hipertermia magnética, los agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética Nuclear (MRI) y el guiado y focalización de fármacos. Sin embargo, la utilización de las NPMs en nanomedicina trae dos problemas asociados.

En primer lugar, las propiedades magnéticas de las nanopartículas son alteradas al interactuar con el entorno biológico. Los resultados experimentales de aplicaciones *in vitro* e *in vivo* sugieren que la efectividad de estos tratamientos es menor que la obtenida en experimentos donde se emplean "fluidos ideales" o fantasmas que recrean propiedades específicas de las células, fluidos o tejidos. Tales evidencias experimentales ponen en duda la fiabilidad de las propiedades de las nanopartículas para proporcionar una exposición controlada de calor o señales de contraste en cualquier entorno biológico, una preocupación de la comunidad científica acerca de su uso en aplicaciones biomédicas. Las razones físicas responsables de los cambios en las propiedades magnéticas de las nanopartículas aún no están totalmente claras. Por lo tanto, es

importante estudiar el efecto que ejerce el proceso biológico sobre la respuesta de las nanopartículas magnéticas. Por consiguiente, la comprensión de las propiedades magnéticas de las nanopartículas como las interacciones dipolares o la agregación de las mismas en fluidos viscosos o ambientes intracelulares que modifican el comportamiento magnético colectivo, es un gran desafío desde el punto de vista experimental y teórico.

En segundo lugar, la biodistribución y el destino final de las NPMs dentro del cuerpo ha despertado una gran inquietud relacionada con la citotoxicidad a largo plazo, por lo que entender la cinética de la biodistribución y la citotoxicidad asociada a las NPMs es un requisito indispensable en el desarrollo de terapias más seguras y eficaces.

En los últimos años diversos dispositivos han sido utilizados para investigar las propiedades de las NPMs en fluidos y en cultivos celulares, y al mismo tiempo, realizar estudios de biodistribución evaluando la citotoxicidad. Sin embargo, las investigaciones de la distribución dentro del cuerpo a través de medidas directas *in vivo* son muy escasas. Mientras que la caracterización de NPMs comerciales es posible y relativamente sencilla debido a su alta concentración y localización, sin embargo, dentro del cuerpo, las nanopartículas se dispersan después de la inserción reduciendo en gran medida su señal magnética y su detección y seguimiento.

Los fundamentos físicos asociados a los dispositivos que componen la Unidad CFNPMs (sección 1.2) podrían posibilitar la detección y el seguimiento de pequeñas cantidades de NPMs en el organismo. Por consiguiente, a través de la caracterización magnética de las nanopartículas inmersas en los tejidos ex-vivo es factible estudiar la cinética de biodistribución y la posible citotoxicidad asociada a las NPMs. De igual manera, es posible estudiar la influencia que ejercen la viscosidad del medio, el ambiente intracelular y la concentración de NPMs sobre el magnetismo de las nanopartículas.

Hasta hace muy pocos años, el uso del AGM solo se limitaba a la caracterización magnética de rocas e investigaciones en geomagnetismo. Sin embargo, en el Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina (LBN) pensamos que, gracias a su alta sensibilidad, este dispositivo es capaz de servir como una herramienta para la detección y seguimiento de nanomateriales presentes en tejidos biológicos y, de esta manera, obtener información acerca de la biodistribución de las nanopartículas y la citotoxicidad asociada a los nanomateriales. Así mismo, es posible estudiar el comportamiento magnético y las interacciones dipolares magnéticas de las

nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos y las interacciones en los sistemas "células-nanopartículas".

Esta investigación estudia las propiedades magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro Fe_3O_4 (magnetita) en aplicaciones *in vivo* e *in vitro* mediante magnetometría y relajometría. Para este propósito se plantea desarrollar un protocolo de medidas que permita detectar y realizar seguimiento *in vivo* de pequeñas cantidades de NPMs en tejidos biológicos. Así mismo, se pretende realizar una adaptación para el sensor del AGM con el fin de servir como una herramienta para el estudio de las propiedades magnéticas de las NPMs suspendidas en fluidos viscosos y cultivos celulares.

CAPÍTULO

3

Objetivos

*“Un deseo presupone la posibilidad de la acción
necesaria para su logro, una acción presupone
un objetivo digno de ser alcanzado”*

- Ayn Rand

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos

3.1.1. Objetivo general

El objetivo general de esta tesis doctoral es validar el uso del equipamiento que compone la Unidad de *Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas* (Unidad 15 de la infraestructura de investigación NANBIOSIS-ICTS del CIBER-BBN) como una herramienta alternativa en la detección y seguimiento de nanopartículas magnéticas (NPMs) en tejidos biológicos ex-vivo. Además, estudiar las propiedades magnéticas de las nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos e internalizadas en cultivos celulares.

3.1.2. Objetivos específicos

El objetivo principal de esta tesis doctoral puede ser alcanzado a través de una serie de requerimientos intermedios que definen los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Desarrollar destrezas en el manejo del equipamiento que hace parte de la Unidad CFNPMs (Unidad 15 de NANBIOSIS-ICTS) dedicada a la Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas.
- ❖ Desarrollar un protocolo de medidas que permita la detección y el seguimiento de las nanopartículas magnéticas *in vivo* a través de las mediciones de la magnetización y el tiempo de relajación longitudinal de los tejidos ex-vivo utilizando el Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM

System) y el Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR) de la Unidad CFNPMs.

- ❖ Analizar los efectos sobre el comportamiento magnético de las NPMs en relación con su concentración, la viscosidad del medio en suspensión, el ambiente celular y la agregación misma de las nanopartículas.
- ❖ Realizar el crecimiento de cultivos celulares incubados con nanopartículas de óxido de hierro que permitan estudiar el comportamiento magnético de las nanopartículas en el entorno celular.
- ❖ Realizar la caracterización de NPMs suspendidas en un entorno emulado a través de fantasmas con el fin de estimar la respuesta magnética de las nanopartículas cuando el medio de suspensión sea un fluido biológico real.
- ❖ Determinar un tratamiento apropiado de los datos resultantes de las mediciones de la respuesta magnética de los tejidos ex-vivo y de los cultivos celulares que logre atenuar el efecto que ejercen los componentes diamagnéticos sobre la señal magnética medida.
- ❖ Definir una adaptación para el sensor del AGM con el fin de utilizar este equipo para la caracterización de NPMs suspendidas en fluidos viscosos. El nivel de funcionamiento de esta adaptación debe ser comprobado a través de un método de medición reproducible.
- ❖ Diseñar e implementar portamuestras que permitan la caracterización de NPMs que se encuentran inmersas en diferentes clases de fluidos viscosos. El material de los portamuestras deben ser biocompatible para permitir el crecimiento de cultivos celulares y que faciliten la manipulación de la muestra experimental.

CAPÍTULO

4

Caracterización y detección de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo

*“No basta saber, se debe también aplicar.
No es suficiente querer, se debe también hacer”
- Johann Wolfgang Goethe*

4. CARACTERIZACIÓN Y DETECCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN TEJIDOS EX-VIVO

El objetivo de este capítulo es exponer la experimentación realizada con el fin de validar el uso de los dispositivos que forman parte de la Unidad 15: *Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas* de NANBIOSIS-ICTS como herramientas eficaces en el estudio de la biodistribución y la posible citotoxicidad asociada a las nanopartículas magnéticas (NPMs).

Para este propósito, se lleva a cabo un estudio preliminar de la biodistribución de las NPMs en animales de experimentación a través de un protocolo de medidas de la magnetización y de los tiempos de relajación longitudinal, que permitan la detección y seguimiento de las NPMs dentro de los tejidos y fluidos biológicos ex-vivo recolectados en diferentes periodos de tiempo a lo largo de un mes. Los resultados de las dos técnicas son comparados y evaluados con estudios previos de biodistribución.

4.1. Materiales y Métodos

4.1.1. Preparación de las muestras biológicas

Con el fin de evaluar la distribución de las NPMs, se han empleado ratones macho C57/BL6 de 9 meses de edad como modelo animal de experimentación. Cabe señalar que la experimentación se lleva a cabo en base a las normas establecidas por la Society

for Neuroscience (USA), el National Institute of Health (NIH) y la directiva Europea referente a la experimentación animal (86/609/EEC).

Los ratones tienen libre acceso de comida y agua y son mantenidos en un ciclo de 12 horas de oscuridad y luz en una habitación con temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). NPMs comerciales de núcleo de óxido de hierro (magnetita (Fe_3O_4)) con cubierta de dextrano y un diámetro total de 50 nm (Kisker # PMP-50, 25 mg/mL), se administraron vía intravenosa siguiendo el protocolo de inyección retro-orbital (Yardeni y col., 2011). Los especímenes seleccionados se pesan antes de la inyección con el fin de optimizar la dosimetría de NPMs. Una vez conocida la dosis ($4 \mu\text{g/g}$ de peso del animal), el volumen de la solución comercial de NPMs calculada se centrifuga durante 15 minutos a 13,000 rpm. Finalizada la centrifugación se observa que la muestra se ha separado en dos fases, de esta manera el sobrenadante se elimina y las NPMs se resuspenden en una solución salina de 0,9% (B. Braun Medical S.A) usando un volumen máximo de 200 μL (Yardeni y col., 2011). Posteriormente, la muestra se homogeniza usando una sonda ultrasónica (LABSONIC M, Sartorius) mediante una sucesión de pulsos con máxima amplitud con el fin de eliminar la agregación de las NPMs y facilitar la formación coloidal. De la misma manera, se preparan las muestras de control con solución salina al 0.9%.

La inyección retro-orbital es llevada a cabo en los animales anestesiados de manera inhalatoria mediante un sistema de mascarilla que expulsa una mezcla de oxígeno e isoflurano (isoflurano USP, Baxter) y se mantienen anestesiados durante toda la inyección. Para la administración de la dosis calculada anteriormente, se utilizan jeringas para insulina 29G (BD Micro-FineTM 1 mL U 100 con aguja 0.33 mm, ref: 320924), en el orificio del lacrimal. Con el fin de acceder adecuadamente a la vasculatura del seno retro-orbital (Figura 4.1), se aplica una presión manual y suavemente sobre la piel circundante al ojo con cuidado de no dañar el globo ocular del ratón de tal forma que éste sobresalga sólo parcialmente de su cuenca (Figura 4.2).

Figura 4.1. Vasos sanguíneos en el seno retro-orbital. (Yardeni y col., 2011).

A continuación, se inyecta la dosis directamente en el seno retro-orbital desde donde se puede acceder rápidamente al torrente sanguíneo gracias a la confluencia de los vasos hacia esta región. Es importante evitar ejercer una presión excesiva a los vasos ventrales cervicales durante la operación, ya que esto puede impedir el flujo de sangre y obstaculizar la entrega de la dosis. Del mismo modo, la presión no debe ser aplicada a la tráquea con el fin de evitar la asfixia del animal.

Figura 4.2. Inyección retro-orbital. (Yardeni y col., 2011).

Una vez inyectada la dosis de NPMs, los animales son retornados a sus cajas. En diferentes periodos de tiempo (media hora, 1 hora, 24 horas, 1 semana y 1 mes) después de la inyección, los ratones son sacrificados a través de la perfusión transcardial utilizando solución salina de 0,9% paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en buffer fosfato (PB) 0,2M a pH 7,4. Las muestras de sangre se extraen de la vena mandibular a 0.5 horas antes de la muerte del animal y se almacenan en tubos eppendorf heparinizados que son congelados posteriormente para garantizar las buenas condiciones de almacenamiento. Las muestras de orina se obtienen de manera análoga 1 hora antes de que el animal es sacrificado. Todas las muestras de tejido restantes son colectadas después de sacrificar los animales. El bazo, el cerebro, el hígado y el pulmón son extraídos de los ratones y post-fijados durante 24 horas en PFA 4% diluido en PB 0,2M (50%) y sacarosa (50%). Posterior a este procedimiento, las muestras se almacenan utilizando una solución de sacarosa al 30% diluido en PB crioprotector durante 2-3 días. Las muestras son seccionadas en 10 series de 30 μm de espesor utilizando un micrótopo de congelación para realizar estudios histológicos.

La localización de las NPMs dentro de los tejidos es determinada por tinción de las secciones de los tejidos utilizando el ensayo de peroxidasa-NPMs (Zhuang y col., 2012). Las secciones seriadas de los tejidos son tratadas para teñir el tejido y posteriormente, se analizan las muestras mediante un microscopio Leica DM IRB equipado con una cámara digital Leica DC100 (Nussloch, Alemania). Finalmente, 20 secciones de cada órgano se depositan en tubos eppendorf donde se mezclan con 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X y Triton X-100 1%. Las secciones son resuspendidas en PBS dentro de tubos eppendorf y son sonicados durante 10-15 minutos usando pulsos de 30 segundos con una amplitud máxima (100%) con el fin de conseguir una disgregación total de la muestra. Las muestras se almacenan a temperaturas entre 4 °C y 8 °C para asegurar la conservación de la muestra. En la figura 4.3, se pueden observar las muestras procesadas y almacenadas en tubos eppendorf.

La preparación de las muestras biológicas se ha llevado a cabo en el Laboratorio de Modelos Animales y Celulares del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) en colaboración con la Doctora Milagros Ramos y Tamara Fernández.

Figura 4.3. Muestras procesadas de (A) Sangre, (B) orina, (C) bazo, (D) hígado, (E) pulmón y (F) cerebro.

4.1.2. Detección de nanopartículas magnéticas

4.1.2.1. Análisis magnetométrico

Para estudiar la biodistribución de las NPMs en los tejidos de los animales de experimentación extraídos en distintos periodos de tiempo, se lleva a cabo la caracterización magnética mediante un Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag™ 2900 (AGM System) de Princeton Measurements Corporation empleando la sonda P1 Parallel Silica. Este dispositivo está diseñado para medir la magnetización (M) de las NPMs en función de la intensidad del campo magnético a través de las medidas de los ciclos de histéresis. El portamuestras de cristal de la sonda del AGM es capaz de albergar pequeñas cantidades de muestra líquida (1-5 μ l) que posteriormente debe ser secada para su caracterización.

El AGM provee información del momento magnético ($\vec{m}$) de la muestra a través de la medición de las curvas de magnetización. El valor de la magnetización (M) se obtiene al dividir el valor del momento magnético entre la masa de las partículas (m) o entre el volumen (V). Para el caso en el que el momento magnético se divide por la masa (ecuación 4.1), la unidad de medida estará dada en Am^2/kg (Sistema Internacional) o emu/g (Sistema CGS) y es definida como el momento magnético por unidad de masa (magnetización específica). Por el contrario, si se divide por el volumen, la unidad de medida es dada en A/m o $Am^2/\mu l$ (Ecuación 4.2).

El valor neto de la masa de las NPMs contenida en cada tejido biológico no fue posible especificarlo. Por esta razón, el valor de la magnetización es obtenida al normalizar el momento magnético por el volumen (Ecuación 4.2) de la muestra extraída (5 μ l).

$$M = \frac{\vec{m}}{m} \quad (4.1)$$

$$M = \frac{\vec{m}}{V} \quad (4.2)$$

El dispositivo se calibra diariamente mediante un material estándar de referencia (SRM 2853 Magnetic Moment Standard Yttrium Iron Garnet Sphere YIG). Los ciclos de histéresis en un AGM pueden ser realizados bajo dos modos de operación: modo en resonancia y el modo fuera de resonancia. El modo en resonancia es seleccionado en este experimento con el fin de mejorar la relación Señal/Ruido (Harrell y col., 1999).

Las mediciones de los ciclos de histéresis (curvas M-H) se llevan a cabo con el fin de obtener la M de las nanopartículas magnéticas contenidas en los tejidos biológicos analizados y de las muestras control, es decir, las muestras de tejidos provenientes de los ratones a los cuales se les inyecta solamente solución salina al 0.9%. Un valor de M más grande en comparación con la muestra control indicaría la presencia o acumulación de NPMs en el tejido analizado. Se lleva a cabo la caracterización magnética de una media de 4 extracciones por cada tejido y fluido biológico. Las mediciones se realizan a temperatura ambiente.

Para llevar a cabo el proceso de medición, inicialmente se corta un cubrevidrio de diámetro de 5mm (*Thermo Scientific*) y se pesa en una balanza de precisión (*Serie Discovery DV215CDM* de *Ohaus*) con el fin de asegurar no superar el peso máximo que soporta la sonda del AGM empleada. El cubrevidrio se adhiere, mediante una capa delgada de grasa de silicona no magnética (Dow Corning # 112), a la sonda P1 Parallel Silica y se caracteriza el conjunto con el objetivo de conocer su respuesta diamagnética. Posteriormente, la muestra se sonica durante 15 minutos en un equipo de ultrasonidos para con el fin de homogenizar la muestra. Mediante una pipeta P10 (10µl de *Gilson*) se extraen 5µl de la muestra a caracterizar y se deposita sobre el cubrevidrio. Con cuidado de no derramar la muestra, el cubrevidrio que contiene el tejido biológico se sitúa en una placa calefactora a 70°C durante 10 minutos con el fin de secar la muestra y asegurar que las propiedades magnéticas de la magnetita no se alteran. Es bien conocido que la oxidación y transformación térmica de la magnetita (Fe₃O₄, estructura espinela) en hematita (α-Fe₂O₃, estructura hexagonal) se lleva a cabo a temperaturas superiores entre 370-600°C (Nasrazadani y col., 1993; Islam y col., 2012).

La sonda del AGM se ubica de manera vertical en el dispositivo lo que impide la caracterización de muestras líquidas. Por consiguiente, la estrategia de secado de la muestra permite superar la principal limitación del AGM. Aunque existen otras técnicas más complejas de secado, tales como el secado al vacío y la liofilización, el método por secado en placa, el cual se ha utilizado en este protocolo experimental, es sencillo y requiere poco tiempo de implementación (10 minutos).

4.1.2.2. Análisis Relajométrico

Para estudiar la biodistribución y acumulación de las NPMs en los órganos extraídos a diversos periodos de tiempo, se llevan a cabo las mediciones a través de un Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR) SMARTracer de Stelar (Schlachter y col., 2011). Esta técnica permite detectar las NPMs depositadas en una muestra mediante la relajación magnética de las nanopartículas (Relajación de Néel y Relajación de Brown) por la aplicación de los campos magnéticos alternos.

Las mediciones de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) de las NPMs acumuladas en los diferentes órganos y las de los órganos control, se realizan usando el FFCR y un electroimán BRUKER de intensidad de campo variable desde 0.23 hasta 1.9 Teslas. Este dispositivo está diseñado para medir la Relajación Magnética Nuclear (Transversal y Longitudinal) en función de la intensidad de campo magnético.

Para llevar a cabo las mediciones, las muestras son sonicadas nuevamente durante 10-15 minutos con pulsos de 30 segundos y una amplitud de 100% hasta su total homogenización.

El relajómetro es calibrado y ajustado a una temperatura de 37°C. Posteriormente, 150 μ l del tejido biológico a analizar, es extraído mediante una pipeta Pasteur de cristal (Labolan # 74770230, 230 mm) y depositado en tubos especiales de relajometría para una frecuencia máxima de 100 MHz (NMR Tubes 10x203mm y 5x230mm de Kimble Chase). El tubo conteniendo la muestra, se sitúa en el interior de las bobinas de transmisión-recepción. Las mediciones de las muestras de los tejidos con NPMs y de los controles se llevan a cabo a una intensidad de campo magnético de 0.47 T, correspondiente a la frecuencia de resonancia del protón de 20MHz, con el fin de reducir la intensidad del haz y mejorar la relación Señal/Ruido. Se emplea una secuencia de Recuperación de Saturación (SR), especificado por el fabricante, para medir los tiempos de relajación T_1 .

Esta secuencia se realiza mediante la consola digital NMR del SMATracer y consiste de un pulso de 90° seguido de un tiempo de recuperación. Posteriormente, un segundo pulso de 90° se aplica para reenfocar y adquirir la curva de decadencia de inducción libre (FID). El tiempo de relajación de las NPMs es inversamente proporcional a la concentración de las partículas en el tejido, lo que significa que a mayor concentración de partículas, el tiempo de relajación es menor.

Estas mediciones se han realizado en colaboración con el Doctor Nazario Félix del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM).

4.1.2.3. Estudio histológico

La detección de NPMs en el tejido se realiza mediante un protocolo en el cual se localizan los núcleos de óxido de hierro de las nanopartículas en los órganos diseccionados. Las secciones de los tejidos se tiñeron primero mediante el ensayo de NPMs-peroxidasa y luego se lleva a cabo una contratinción del tejido con hematoxilina-eosina para hacer la estructura celular más visible.

El estudio histológico se ha realizado en el Laboratorio de Modelos Animales y Celulares del Centro de Tecnología Biomédica (CTB) de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM) en colaboración con la Doctora Milagros Ramos y Tamara Fernández.

4.1.3. Procesado de datos experimentales

4.1.3.1. Datos obtenidos de la caracterización magnetométrica

El valor del momento magnético de las NPMs acumuladas en los tejidos biológicos analizados tiene en el mismo orden de magnitud que el componente diamagnético de la matriz de los tejidos control y de los cubrevidrios. En consecuencia, los componentes diamagnéticos no son despreciables, por lo que el esfuerzo en la medición y en el procesado de los datos se ha enfocado en la determinación correcta del valor del momento magnético neto en cada tejido. Por esta razón, el componente diamagnético de las muestras control y de los cubrevidrios son medidos de manera independiente y posteriormente son sustraídos, en el procesado de los datos, del valor del momento magnético de las NPMs acumuladas en los tejidos biológicos ex-vivo.

El momento magnético neto se normaliza por la cantidad de volumen con el fin de obtener el valor de magnetización por unidad de volumen (Ecuación 4.2) debido a la importancia de este parámetro para la interpretación de los datos. La sustracción del aporte diamagnético es una aproximación a la "verdadera" relación entre M y H de las nanopartículas en el tejido biológico. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la magnetización de las NPMs es afectada por el ambiente intracelular y la disminución de la movilidad de las NPMs, tópico que se tratará más adelante en el capítulo 6.

El test de ANOVA se emplea con el fin de determinar la homogeneidad de las extracciones y además, para comprobar si existe una diferencia estadísticamente significativa en la evolución temporal de la magnetización (medida en $Am^2/\mu l$) en las muestras de tejido biológico.

El procesamiento de los datos se realiza con el software de estadística Origin 8.0 y SigmaPlot. Sin embargo, debido a la gran cantidad de datos y procesos a realizar, se ha implementado un script con el software Matlab 8.0 (1012b) con el fin de agilizar este proceso.

4.1.3.2. Datos obtenidos de la caracterización relajométrica

El test de ANOVA se utiliza para determinar si existe una disminución estadísticamente significativa en la evolución temporal del tiempo de relajación longitudinal T1 (medida en segundos) en las muestras de tejido biológico. Una disminución del T1 significa que existe una mayor cantidad de NPMs en la muestra.

El análisis estadístico de todos los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar de la media (MSE). Para determinar la significancia de los datos se utiliza un valor de probabilidad de 95% ($p < 0.05$).

4.2. Resultados

4.2.1. Detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas a través de la medida de la magnetización (M)

Para estudiar la biodistribución de las NPMs a lo largo de un mes se inyecta vía intravenosa NPMs de 50 nm con cubierta de dextrano en ratones de experimentación. A periodos de tiempo específico los especímenes se sacrifican y se extraen el bazo, el cerebro, el hígado, el pulmón y se recolectan muestras de sangre y orina. Las muestras y

los órganos son tratados y almacenados para su conservación y posterior caracterización magnética.

Inicialmente, se realiza la caracterización magnética de las NPMs Kisker #PMP-50 empleadas para la inyección retro-orbital en los animales de experimentación, con el fin de conocer el comportamiento magnético de las mismas. La figura 4.4 indica que las NPMs empleadas en este estudio poseen un comportamiento típico superparamagnético, es decir, no poseen magnetización remanente ni campo coercitivo y por lo tanto, no se observa histéresis. Este tipo de comportamiento es idóneo para trabajar en aplicaciones biomédicas ya que al no presentar histéresis, la aglomeración de las NPMs se minimiza y el material se elimina del cuerpo con mayor facilidad.

Figura 4.4. Comportamiento magnético de las NPMs Kisker #PMP-50.

A pesar de que la misma cantidad de volumen de cada tejido biológico (5µl) se ha extraído para realizar la caracterización magnética, el valor de la magnetización de algunos tejidos varía ligeramente. Estas variaciones indican que las NPMs no se encuentran distribuidas homogéneamente dentro de cada muestra o que el volumen extraído es levemente diferente. En consecuencia, se genera a una dispersión en las medidas.

El test de ANOVA se utiliza para estudiar y comprobar la homogeneidad de cada muestra. Los resultados de los valores de magnetización demostraron que las muestras de bazo, hígado, pulmón y cerebro (en todos los espacios temporales); orina (1 hora, 1 semana y 1 mes) y sangre (24 horas y 1 mes) son significativamente homogéneos. Por el contrario, el valor de magnetización de las muestras de sangre a 0.5 horas y orina a 24 horas no resultaron ser estadísticamente homogéneos.

El valor del momento magnético neto de los tejidos se obtiene mediante la substracción de las señales diamagnéticas, procedente de la muestra control y del cubrevidrio, a la señal magnética proveniente de las NPMs acumuladas en los tejidos biológicos. Los datos experimentales se ajustan a una función sigmoideal tipo Boltzmann:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (4.3)$$

Donde A_1 es el valor del momento magnético más pequeño, A_2 es el valor del momento magnético más alto, x_0 es el punto de inflexión y dx es el ancho de la curva de histéresis. Mediante el ajuste de Boltzmann se determina el valor del momento magnético para cada medida y este valor es contrastado con el valor del momento magnético entregado por el magnetómetro AGM resultando ser valores similares. La Figura 4.5 representa el ajuste de la función sigmoideal de Boltzmann para la muestra de sangre a media hora.

Cuando se realiza un ajuste de datos a una función, *el coeficiente de determinación (R^2)* describe la calidad del modelo para replicar los resultados y adquiere valores entre 0 y 1. Por consiguiente, el coeficiente de determinación indica que a medida que el valor de R^2 esté más próximo a 1, los datos se ajustarán mejor a la función.

Los resultados del ajuste revelaron que los valores de R^2 para las curvas de magnetización (M-H) de todos los tejidos biológicos se encontraron muy cercanos a 1, indicando que el modelo de Boltzmann ajustó bien los datos a dicha función.

Figura 4.5. Ajuste de la señal magnética de los tejidos biológico mediante la función sigmoideal de Boltzmann. Ajuste mediante la función sigmoideal de Boltzmann para la muestra de sangre a 0.5 horas. $R^2=0.99579$.

La biodistribución y el metabolismo de las NPMs a través del cuerpo de los animales de experimentación es dinámica debido a que las NPMs de óxido de hierro pueden ser rápidamente eliminadas de la sangre por el sistema RE y permanecer en el hígado y el bazo por un periodo largo de tiempo (Almeida y col., 2011; Prijic y col., 2011). Como consecuencia, la cantidad de NPMs en los órganos analizados varía en distintos espacios de tiempo.

Los resultados del análisis estadístico de la magnetización y su evolución temporal se observan en la Figura 4.6. Los valores de las muestras control oscilan entre $1.16E10^{-11}$ $Am^2/\mu L$ y $1.72E10^{-11}$ $Am^2/\mu L$.

De los datos se puede deducir que, tras media hora de la administración de la dosis, se detectan NPMs a través del torrente sanguíneo ($26.1 E10^{-11}$ $Am^2/\mu L$) y, con el paso del tiempo son distribuidas y acumuladas en algunos órganos o son excretadas a través de la orina.

A las 24 horas, el valor de magnetización de las NPMs en sangre ($1.75 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) disminuye llegando a valores cercanos a las del control. Por el contrario, una cantidad significativamente estadística de NPMs se detecta en las muestras de orina ($3.51 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$), hígado ($2.65 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$), pulmón ($2.94 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) y bazo ($2.6 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$).

Una semana después, la señal magnética proveniente de las NPMs acumuladas en el hígado ($2.21 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) y en la orina ($2.72 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) se reduce pero sigue siendo estadísticamente significativa; mientras que en el bazo ($2.63 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$), la señal magnética de las nanopartículas no es significativamente alterada.

Tras un mes de la inyección, la señal magnética proveniente de las nanopartículas en el pulmón ($2.2 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) se reduce en comparación con la misma muestra analizada a las 24 horas, aunque sigue siendo estadísticamente significativa. Sin embargo, en el bazo ($2.53 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$), la señal magnética de las nanopartículas disminuye ligeramente en comparación con la misma muestra analizada una semana después de administrada la dosis. Mientras tanto, la magnetización en el hígado ($1.43 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) y en la orina ($1.66 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) disminuye hasta alcanzar los valores control. Estos resultados están en correspondencia con los encontrados en la literatura (Múzquiz-Ramos y col., 2013).

Con respecto a las muestras de cerebro, los valores de magnetización permanecen en el rango basal a lo largo del tiempo ($1.3 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$ a $1.69 \times 10^{-11} \text{ Am}^2/\mu\text{L}$) sugiriendo que las NPMs no logran atravesar la barrera hematoencefálica y no hay presencia de material magnético en este órgano. Estos resultados muestran congruencia con algunos estudios realizados previamente a través de otras técnicas (Chouly y col., 1996; Lacava y col., 2002; Jain y col., 2008, Gu y col., 2012; Jaiswal y col., 2014).

Figura 4.6. Biodistribución de nanopartículas magnéticas en tejidos biológicos de ratón C57/BL6 mediante magnetometría. La presencia de las nanopartículas se ha determinado a través de las medidas de la magnetización (M) en $\text{Am}^2/\mu\text{L}$. Los tejidos analizados: (A) sangre, (B) cerebro, (C) hígado, (D) pulmón, (E) bazo y (F) orina. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de $n=4$ experimentos independientes. $*p<0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

4.2.2. Detección y seguimiento de las nanopartículas magnéticas a través de la medida del tiempo de relajación longitudinal (T1)

En la Figura 4.7 se pueden observar los resultados del test de ANOVA de los datos de los tiempos de relajación longitudinal (T1) para los diferentes tejidos extraídos en los tiempos indicados.

Los resultados señalan que existe una disminución estadísticamente significativa en T1 en sangre una hora después (1.37 s) de administrada la dosis de NPMs en comparación con la muestra control (1.64 s). Sin embargo, 1 semana (1.68 s) y 1 mes (1.60 s) después de la inyección, no existe una disminución estadísticamente significativa de T1 con respecto a las muestras control. Esto indica que sólo se ha detectado acumulación de NPMs en sangre 1 hora después de administrada la dosis.

En el cerebro no se observa una disminución estadísticamente significativa de T1 con respecto al control (1.73 s) en todos los tiempos estudiados (1.91 s y 1.79 s), lo cual indica que las nanopartículas no atravesaron la barrera hematoencefálica (BHE).

En el hígado se observa una disminución estadísticamente significativa de T1 a las 24 horas (2.21 s) después de la inyección de las NPMs en relación a la muestra control (2.37 s). Es decir que existe acumulación de NPMs en este determinado periodo de tiempo. Sin embargo, 1 mes (2.44 s) después de la inyección, el T1 aumenta indicando que no se detecta acumulación de NPMs. Es posible que la eliminación de NPMs en el hígado hubiese empezado justo después de las 24 horas tras la inyección o que se hubiese acumulado una mayor cantidad de nanopartículas en los días posteriores a las 24 horas y después empezara su liberación.

En la muestra de pulmón se observa una disminución estadísticamente significativa a las 24 horas (1.78 s) y a 1 mes (1.82 s) tras la inyección con respecto a la muestra control (2.00 s) indicando que existe acumulación de NPMs en este tejido. Sin embargo, se puede observar que el valor de T1 es ligeramente menor a las 24 horas en comparación con el valor de T1 a 1 mes. Esto significa que hay mayor acumulación de NPMs a las 24 horas y que, posteriormente empiezan a disminuir con el tiempo sin llegar a eliminarse por completo al finalizar el experimento.

En el bazo se produce una disminución estadísticamente significativa de T1 a las 24 horas (2.34 s) y a 1 mes (2.29 s) tras la inyección de NPMs con respecto al control (2.44 s). Este resultado indica que existe acumulación de material magnético en el tejido

después de las 24 horas y este valor aumenta con el tiempo. La señal magnética es detectada al finalizar el periodo experimental indicando acumulación de NPMs.

Figura 4.7. Biodistribución de nanopartículas magnéticas en tejidos biológicos de ratón C57/BL6 mediante relajometría. La presencia de las nanopartículas se ha determinado a través de las medidas de los tiempos de relajación longitudinal (T1) en segundos. Los tejidos analizados: (A) sangre, (B) cerebro, (C) hígado, (D) pulmón y (E) bazo. Cada valor representa la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc HSD de Tukey).

4.2.3. Histología del tejido

En la figura 4.8 se visualiza la presencia de NPMs en el bazo a través del análisis histológico. La Figura 4.8A representa la histología de la muestra control del bazo en la cual no se observa la presencia de NPMs. Sin embargo, en la figura 4.8B se observa un cambio significativo de color en el tejido con respecto a su control. Las flechas negras señalan pequeñas aglomeraciones de NPMs de óxido de hierro en el bazo 30 días después de administrada la inyección. Los resultados obtenidos de la histología están en correspondencia con los resultados de las mediciones de magnetometría y relajometría.

Figura 4.8. Análisis histológico del bazo obtenido 1 mes después de la inyección de (A) suero salino y (B) nanopartículas magnéticas de óxido de hierro. Las secciones se tiñen inicialmente mediante el ensayo de peroxidasa y posteriormente se tiñen con hematoxilina-eosina para revelar la presencia de NPMs en el bazo. Las flechas negras señalan la acumulación de NPMs. (Barra de escala= 100 μ m)

CAPÍTULO

5

Técnicas de caracterización magnética y adaptación del magnetómetro AGM

*“La disciplina que aprendes y el carácter que construyes
por establecer y lograr una meta pueden ser más
valiosas que el logro de la misma meta.”*

- Bo Bennett

5. TÉCNICA DE CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA Y ADAPTACIÓN DEL MAGNETÓMETRO AGM

En este capítulo se abordará el estudio de la técnica de magnetometría empleando un Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM System) para llevar a cabo la caracterización magnética de las nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos. Para realizar este tipo de caracterización, la sonda del AGM System ha sido adaptada a través de la fabricación de diferentes tipos de portamuestras. En este capítulo se detalla la caracterización preliminar de las NPMs suspendidas en fluidos viscosos.

5.1. Técnicas de magnetometría

Las técnicas empleadas para la medición de las propiedades magnéticas de los materiales a través de la medición de la magnetización pueden ser divididas en dos categorías:

- a) La medición de la fuerza experimentada por una muestra inmersa en un campo magnético no uniforme. El Magnetómetro por Gradiente de Fuerza Alternante (AGFM) pertenece a esta clase.
- b) La medición de la inducción magnética debido al movimiento relativo entre un arreglo de bobinas detectoras y una muestra. El magnetómetro de muestra vibrante (VSM: Vibrating Sample Magnetometer), el magnetómetro de bobinas vibrantes (MBV), y el dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID:

Superconducting Quantum Interference Device) hacen parte de esta clase. En el Apéndice B se revisará con más detalle el funcionamiento de estos dispositivos.

El estudio de la respuesta magnética de las partículas a través de la medición de la magnetización para experimentos relacionados con nanomedicina, generalmente se lleva a cabo en dispositivos SQUID o Magnetómetros VSM. Sin embargo, El AGM es 1000 veces más sensible que el VSM convencional con un espacio de trabajo relativamente similar y puede acomodar muestras de menor tamaño, en consecuencia, la medición del momento magnético también es menor. El VSM puede trabajar con una mayor cantidad de muestra y caracterizar partículas suspendidas en fluidos acuosos. Por otro lado, el SQUID tiene una sensibilidad similar a la del AGM, no obstante, está limitado por su velocidad de medición y su alto costo de adquisición y operación (Graham., 2000; Flanders, 1988).

El empleo del Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM (AGM System) se ha limitado generalmente al estudio de rocas, paleomagnetismo y caracterización del comportamiento magnético de distintos minerales. En la tabla 5.1 se detalla el uso que se le está dando a este dispositivo actualmente.

Tabla 5.1. Revisión de las aplicaciones e instituciones que emplean el Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM System)

Institución/Universidad	País	Aplicación del AGM
<i>MichiganTech University Earth Magnetism Laboratory</i>	Estados Unidos	Investigación en las siguientes áreas: * Magnetización de minerales, rocas y materiales sintéticos. * Biomagnetismo y procesos de biomineralización. * Desarrollo de nuevas técnicas e instrumentación para investigación de rocas magnéticas.
<i>University of York Department of Electronics</i>	Reino Unido	* Desarrollo de investigación en nano electrónica cuántica.
<i>Eberhard Karls Universitat Tübingen. Geophysics WorkingGroup.</i>	Alemania	* Estudio de la magnetización de rocas.
<i>Université Paris-Sud. Croissance, Transport et Magnetisme Group.</i>	Francia	* Investigación y desarrollo de nuevos dispositivos aprovechando las propiedades magnéticas de los materiales.
<i>University Of Rochester. Paleomagnetic Laboratory.</i>	Estados Unidos	Investigación en las siguientes áreas: * Paleointensidad de campo magnético de la tierra. * El campo magnético del planeta tierra en las primeras etapas de la formación del planeta * Desplazamiento polar. * Fidelidad de los sedimentos de los registradores paleomagnéticos
<i>ETH Zurich. Laboratory for Natural Magnetism</i>	Suiza	Investigación en las siguientes áreas: * Anisotropía magnética de minerales y rocas. * Magnetismo ambiental. * Propiedades magnéticas de nanopartículas de hierro * Paleomagnetismo y deformaciones tectónicas. * Biomagnetismo.
<i>University of California. Department of Geology.</i>	Estados Unidos	Investigación en las siguientes áreas: * Análisis magnético del ambiente y de rocas. * Paleomagnetismo en la Antártica. * Desplazamiento polar. * Propiedades magnéticas de los basaltos Oceánicos.
<i>Texas A&M University</i>	Estados Unidos	Estudio de minerales y muestras oceánicas de materiales
<i>Universidad Politécnica de Madrid.(UPM) Centro de Tecnología Biomédica (CTB) Laboratorio de Bioinstrumentación y Nanomedicina.</i>	España	* Caracterización de las propiedades magnéticas de nanopartículas de óxido de hierro en tejidos biológicos y cultivos celulares.

En esta tabla se muestra una lista de instituciones que utilizan el Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag Model 2900 (AGM System) de Princeton Measurements Corporation y las diferentes aplicaciones en las que le dan uso.

5.1.1. Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag™ 2900 (AGM System)

El AGM es un desarrollo realizado a los magnetómetros de fuerza convencionales en el cual se utiliza un gradiente de campo magnético para producir una fuerza alternante sobre una muestra con un momento magnético neto. La fuerza o el desplazamiento producidos por la fuerza del gradiente alternante de campo pueden ser cuantificados a través es un instrumento muy sensible para medir momentos magnéticos (O'Grady y col., 1993). El AGM detecta la magnetización a través de la fuerza ejercida sobre una muestra magnetizada en un gradiente de campo.

El AGM fue inventado por Zijlstra (1970) quien medía la amplitud de la vibración utilizando un microscopio. Posteriormente Reeves (1972) introdujo el uso de un detector piezoeléctrico para medir la magnitud de la vibración, mientras que Roos y col., (1980) utilizaron un sensor bimórfico piezoeléctrico para construir una máquina con una sensibilidad de 10^{-10} emu. Posteriormente, Richter y col., (1988) mejoraron el equipo para lograr una sensibilidad de 10^{-11} emu. Este sistema fue desarrollado para medir las propiedades magnéticas de las partículas microscópicas de medios de almacenamiento, por tal motivo, su uso estaba limitado al empleo de altos gradientes de campo (O'Grady y col., 1993). Un sistema de uso más general fue desarrollado posteriormente por Flanders (1988), con una sensibilidad de 10^{-8} emu, este sistema era capaz de medir muestras a temperatura variable en un rango de los 77-500 °K. Posteriormente, Flanders realizó algunas mejoras y desarrolló un AGM de fuerza vertical para medir la fuerza vertical con una muestra montada sobre un sensor bimórfico horizontalmente. Estos cambios permitieron al sensor bimórfico ser situado a mayor distancia de la muestra y poder manejar un mayor rango de temperatura (O'Grady y col., 1993).

El primer magnetómetro comercialmente disponible fue desarrollado por Princeton Measurements Corporation. el cual permite realizar medidas de rutina de forma rápida y sencilla. Utiliza una sonda que es excitada en la dirección del campo aplicado (eje x) por un gradiente alternante de campo a su frecuencia de resonancia mecánica, lo cual permite mejorar la razón señal-ruido y discriminar artefactos indeseados. La frecuencia de resonancia de la sonda y la muestra depende de la masa de la muestra, y generalmente esta en un rango de 100 a 1000 Hz (O'Grady y col., 1993). El gradiente alternante de campo es generado por dos bobinas de gradiente de aproximadamente 4,

0.4 y 0.04 Oe/mm. El sistema tiene una sensibilidad de 10^{-8} emu utilizando un tiempo de medida de 1s, y puede soportar una muestra con una masa de hasta 100mgr (O'Grady y col., 1993).

El dispositivo AGM está compuesto por tres partes principales:

- ❖ Un campo magnético de corriente directa (DC) conocido.
- ❖ Una fuente controlable capaz de producir un gradiente alternante de campo.
- ❖ Un sistema capaz de medir el desplazamiento resultante de aplicar una fuerza oscilatoria sobre la muestra.

El Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM System) es un instrumento cuya alta sensibilidad (10^{-9} emu) permite la detección de pequeñas cantidades de micro/nanopartículas magnéticas (50 pg de hierro) con una alta exactitud y velocidad de medida (10 ms/punto). El portamuestras de la sonda del sistema puede acomodar muestras sólidas, films ultra delgados y en polvo de hasta 5x5x2 mm y un peso máximo de 200 mg de masa dependiendo del tipo de sonda que se emplee.

5.1.2. Funcionamiento

El AGM (Figura 5.1) emplea un gradiente de campo alterno para producir una fuerza periódica sobre la muestra magnetizada. La muestra es ubicada en la punta de una varilla de extensión vertical de cuarzo (tipo cantilever) que descansa a lo largo del eje z, mientras que el gradiente de campo está a lo largo del eje x. El extremo superior del vástago de la muestra está unido al extremo inferior de un elemento piezoeléctrico. El extremo superior del elemento piezoeléctrico está rígidamente acoplado. La muestra es magnetizada por un campo magnético de corriente directa (DC) variable en magnitud. Simultáneamente, la fuerza del gradiente de campo en la muestra magnetizada produce un momento de flexión sobre el elemento piezoeléctrico que genera un voltaje proporcional a la fuerza en la muestra. La salida del elemento piezoeléctrico es detectada sincrónicamente a la frecuencia del gradiente de campo. La amplitud de este voltaje es proporcional al momento magnético de la muestra y se puede variar cambiando el campo DC aplicado (H) y es aplicado a lo largo del eje x (Flanders, 1988).

Figura 5.1. Diagrama esquemático del Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMag™ 2900 (AGM System).

5.1.3. Adaptación del magnetómetro AGM

Como se mencionó en el capítulo 3, uno de los principales objetivos de este proyecto es estudiar el comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos y cultivos celulares de manera sencilla, fiable y reproducible mediante el MicroMag™ 2900 AGM System. Sin embargo, la posición vertical de la sonda que es (Figura 5.1) dificulta la caracterización de materiales magnéticos suspendidos en fluidos acuosos. A pesar de que el fabricante del AGM indica que el dispositivo es capaz de caracterizar nanopartículas inmersas en fluidos, el sistema viene diseñado para caracterizar las propiedades magnéticas de una amplia gama de materiales magnéticos sólidos, lo que dificulta la caracterización de muestras líquidas sin una adaptación previa de la sonda del dispositivo.

Por esta razón, a lo largo de esta tesis doctoral se han fabricado cinco tipos de portamuestras de diferentes materiales diamagnéticos y dimensiones con el objetivo de albergar y caracterizar nanopartículas suspendidas en líquidos acuosos y cultivos celulares.

A continuación se detalla la fabricación de cada portamuestra, la caracterización de las nanopartículas realizadas y las características de tales adaptaciones.

5.1.3.1. Portamuestras de aro de plástico flexible

El primer diseño (Figura 5.2) consiste de un pequeño aro de plástico flexible de 2 mm de longitud adherido a un cristal base, empleando un cubreobjetos de 5mm de diámetro (*Thermo Scientific*), recortado al tamaño del cristal de la sonda del AGM (3 x 3 mm). El aro se pega al cristal base mediante un polímero de Sililo Modificado de alta densidad (Poly Max) y se deja secar durante 48 horas. Un segundo cristal de la misma dimensión es incorporado a la parte superior del portamuestra con la grasa de silicona (Dow Corning # 112) para sellar la muestra dentro del aro evitando el derramamiento de la misma. Su tediosa fabricación, la difícil manipulación de la muestra y la baja capacidad volumétrica (2 μ L) condujeron a que este diseño de portamuestras fuera inviable en la adaptación del AGM.

Figura 5.2. Fotografía del Portamuestra fabricado con un aro de plástico flexible.

5.1.3.2. Portamuestras de Policarbonato

El segundo diseño (Figura 5.3) se fabrica con policarbonato incoloro de 3 mm de espesor. La forma del portamuestras de la sonda es cuadrada y tiene dimensiones de 3 x 3 mm. Un cubreobjetos de 5mm de diámetro (*Thermo Scientific*) recortado a la forma del portamuestras de la sonda se adhiere a la parte superior mediante una pequeña capa de grasa de silicona diamagnética (Dow Corning # 112) para evitar el derrame de la muestra líquida. Este diseño se desecha debido a la difícil construcción y manipulación de la muestra. Además, la capacidad volumétrica es pequeña (2-3 μ L).

Figura 5. 3. Fotografía del portamuestra fabricado con Policarbonato.

5.1.3.3. Portamuestras tubulares de plástico rígido

El tercer diseño (Figura 5.4) se fabrica empleando tubos de plástico rígido transparente de 5 mm de longitud. Posteriormente, uno de los orificios se sella con pegamento epoxi (UHU®) y se deja secar durante 24 horas. Con el fin de que el cilindro se fije al cristal de la sonda, una parte del éste se pule con una lima de vidrio hasta obtener una superficie plana. Para evitar el derramamiento de la muestra, el portamuestra se sella con Parafilm M y se fija a la sonda mediante grasa de silicona diamagnética (Dow Corning # 112). Este tercer diseño es relativamente sencillo de fabricar, puede albergar aproximadamente 17 μ l y permite manipular la muestra con facilidad. Sin embargo, este diseño no puede ser utilizado en el crecimiento de cultivos celulares debido a que los materiales utilizados para su fabricación no son biocompatibles.

Figura 5.4. Fotografía del portamuestra tubular diseñado con plástico rígido.

5.1.3.4. Portamuestras de Politetrafluoroetileno (PTFE)

El cuarto diseño (Figura 5.5) ha sido elaborado con Politetrafluoroetileno (PTFE), conocido comercialmente como Teflón. El PTFE es un material polimérico altamente biocompatible (Fernández Cossío, 2007) y ha sido estudiado desde 1949 (LeVeen y col.). Sus propiedades biomecánicas de baja resistencia a la tensión y compresión lo hacen apto para ser usado como complemento de partes blandas, injertos vasculares y la rehabilitación de cuerdas vocales (Fernández Cossío., 2007). Sin embargo, el bajo coeficiente de fricción del PTFE (aproximadamente 0.08) evita que las células se proliferen exitosamente. Por esta razón, se requiere un revestimiento de la superficie del material para garantizar que los cultivos celulares se adhieran, se desarrollen y proliferen (Kaehler y col., 1989; Clowes y col., 1985; Sbarbati y col., 1991).

La flexibilidad del PTFE facilita la fabricación de los portamuestras y su bajo coeficiente de fricción permite que el ferrofluido pueda deslizarse fácilmente sobre sus superficies internas. Lo anterior evita que las nanopartículas se adhieran a las paredes permitiendo una fácil limpieza y la reutilización del portamuestra.

Aunque el PTFE presenta ventajas en la fabricación de los portamuestras para el AGM, el PTFE es un material no transparente lo que imposibilita la detección de las células mediante el microscopio óptico.

Por otro lado, el bajo coeficiente de fricción provoca que el parafilm no se adhiera suficientemente fuerte a las paredes del portamuestra ocasionando el derramamiento de la muestra. Además, puede provocar el deslizamiento del portamuestra (conteniendo la muestra) cuando está adherido a la sonda del AGM. Por estas razones, la manipulación de la muestra con este portamuestra requiere precisión y destreza.

Los portamuestras se fabrican con dos capacidades volumétricas: 10 μl y 16 μl . Realizando un balance general de los portamuestras fabricados con PTFE, se puede afirmar que resultan ser de gran utilidad en la caracterización de ferrofluidos siempre que se adquiera la habilidad en su manipulación.

Figura 5.5. Fotografía del portamuestras diseñado con Politetrafluoroetileno (PTFE) o Teflón.

5.1.3.5. Portamuestras de PolimetilMetacrilato (PMMA)

El quinto diseño (Figura 5.6) se ha fabricado con PolimetilMetacrilato (PMMA). El PMMA es un polímero termoplástico altamente transparente utilizado generalmente como material de relleno en aplicaciones biomédicas debido a su alta biocompatibilidad

(Hollick y col., 1998; Becker y col., 2008; Jensen y col., 1997; Ito y col., 1991; Hollick y col., 1999).

Este material se empleó en la primera placa de Plexiglás para cubrir un defecto craneal (1940). Durante 1947 se introdujo en la primera prótesis de cadera y ha servido como cemento óseo para prótesis (1960). En 1971, El PMMA demostró su utilidad como medio portador de antibióticos como la gentamicinas (Lemperle y col., 1995). Hollick y col. (1998) usaron este material en lentes intraoculares determinando que era suficientemente biocompatible para funcionar en ojos afectados por cataratas. Otros investigadores (Becker y col., 2008; Jensen y col., 1997; Ito y col., 1991; Hollick y col., 1999) también han obtenido resultados positivos de la biocompatibilidad del PMMA en aplicaciones biomédicas.

La complejidad y el tiempo de fabricación de los portamuestras de PMMA disminuyeron en comparación con los primeros tres diseños de portamuestras (aro flexible, tubo de plástico rígido y policarbonato incoloro). El PMMA es un material que no necesita un recubrimiento adicional para garantizar la proliferación celular ya que las células se adhieren con facilidad debido a su coeficiente de fricción (aproximadamente 0.53). Adicionalmente, los portamuestras de este material facilitan la manipulación de las muestras estudiadas.

Al ser un material altamente transparente, los portamuestras resultaron adecuados para la observación de los cultivos celulares mediante el microscopio. Sin embargo, su dureza dificulta la fabricación de los portamuestras y el tiempo de producción de una placa de 121 unidades en comparación con los fabricados con PTFE. Diferentes capacidades de volumen se pueden obtener dependiendo del espesor del material, la profundidad y el diámetro del agujero. Los portamuestras se fabricaron con tres capacidades volumétricas: 2.5 μL , 10 μL y 16 μL .

Para el crecimiento de los cultivos celulares empleados en esta tesis doctoral se emplean los portamuestras fabricados en PMMA (en adelante, portamuestras_{PMMA-AGM}) debido a su alta biocompatibilidad, la posibilidad de observar las células en el microscopio, el innecesario recubrimiento de la superficie y la manipulación de las muestras.

Figura 5.6. Fotografía de los portamuestras diseñados con PolimetilMetacrilato (PMMA). A) Placa de 121 portamuestras. B). Fotografía de la vista frontal y lateral del portamuestras_{PMMA-AGM} usando un sistema Leica EZ4 W. C) Fondo del portamuestras_{PMMA-AGM} (Barra de escala=0.5 mm).

5.1.4. Proceso de fabricación de los portamuestras PTFE y PMMA

En la fabricación de los portamuestras de PTFE y de PMMA se utilizan láminas de estos dos materiales con dimensiones de 500x500x2.5 mm y de 500x500x5 mm. Una fresadora CNC (Control Numérico Computarizado) marca *Heiz* de tres ejes modelo HIG-LS-1000/T permite elaborar las unidades de portamuestras de acuerdo a las medidas requeridas con un alto nivel de precisión (± 0.05 mm). El mecanizado CNC es un sistema que permite controlar en todo momento la posición de una herramienta que moldea, corta y perfila un material para realizar una reproducción del diseño que se encuentra especificado en los esquemas CAD (Diseño Asistido por Ordenador) del Software que controla la máquina de mecanizado. Este Software controla la posición de la herramienta, su velocidad y todos los aspectos necesarios para reproducir la forma deseada en la pieza de material base.

El punto inicial de la fabricación del portamuestras es el diseño CAD de la cuadrícula a mecanizar. La cuadrícula contiene 121 portamuestras y el diseño se observa en la figura 5.7.

Figura 5.7. Esquema de la cuadrícula empleada para la fabricación de 121 portamuestras PTFE y PMMA.

El fichero en AutoCad es empleado por el Software de la fresadora CNC para transformar la lámina de material en una cuadrícula real que contiene 121 portamuestras mediante un proceso de mecanizado que utiliza una herramienta de 1 mm de diámetro. Empleando el software Cut2D se prepara una estrategia de mecanizado para la pieza. De esta manera se obtienen varios ficheros de mecanizado que son traducidos por el Software de mecanizado WinPC-NC, el cual se encarga de convertir estos ficheros en los movimientos de corte de alta precisión del equipo CNC.

Finalmente, se cargan los ficheros en el equipo CNC y se ubica una fresa plana de 1 mm de diámetro y el equipo por sí solo fabrica la placa de 121 pocillos. Este proceso de manufactura CNC requiere de lubricación con agua para que las virutas del material no se peguen y obstaculicen el proceso de corte.

Los volúmenes de los portamuestras obtenidos no son exactamente iguales debido al error intrínseco de la fresadora especialmente para los portamuestras fabricados en PMMA debido a la dureza del material. Comparando los dos materiales, la mecanización del PMMA genera una mayor cantidad de material residual en el fondo de cada portamuestras que produce una variación del volumen de los portamuestras PMMA ligeramente mayor que la obtenida en aquellos fabricados con PTFE.

Para realizar la caracterización magnética de nanopartículas suspendidas en fluidos viscosos e internalizadas en cultivos celulares mediante los portamuestras PTFE o PMMA, es necesario sellar éstos con Parafilm M para evitar el derramamiento del líquido. Una vez sellados los portamuestras, éstos se instalan en posición vertical sobre el cristal de la sonda del AGM utilizando para su adhesión una capa delgada de grasa (Silicone Grease Dow Corning # 112).

5.1.5. Resultados

Los resultados del estudio de las interacciones dipolares magnéticas de las nanopartículas, la influencia de la viscosidad del fluido (agua bidestilada, agar-agar y goma arábica) sobre el magnetismo de nano y micropartículas se lleva a cabo con el fin de validar la adaptación del AGM mediante diferentes portamuestras.

5.1.5.1. Caracterización de NPMs suspendidas en soluciones de agar-agar empleando el portamuestras de aro de plástico flexible

En estos experimentos se ha trabajado con fluidos viscosos a base de agar-agar. El agar-agar es un hidrocoloide extraído de diversos géneros y especies de algas marinas rojas. Actualmente el agar-agar es empleado en investigación con el objetivo de simular los fluidos corporales debido a su versatilidad para generar hidrogeles.

Las principales propiedades del agar-agar son: la solubilidad, que permite que se disuelva fácilmente a altas temperaturas con bajas concentraciones; la gelificación termorreversible obtenida con muy bajas concentraciones; la viscosidad que varía ampliamente dependiendo de la concentración del soluto, la temperatura y el punto de fusión (Armisen y col., Ed.2, 2009).

Para preparar las soluciones de agar-agar que imiten la viscosidad del humor vítreo (2-3 mPa.s) y el plasma sanguíneo (4-5 mPa.s) (Viswanath y col., 2007) se ha empleado agar bacteriológico Europeo (*Cat. 1800.00 de Laboratorios Conda*).

El agar en polvo se pesa en una balanza de precisión (*Serie Discovery DV215CDM de Ohaus*). En un vaso de precipitado se agrega 100 mL (aprox. 100gr) de agua desionizada. Un agitador magnético (*AGIMATIC-ND de JP-Selecta*) es empleado para realizar la mezcla de agua desionizada con el polvo de agar el cual debe ser adicionado gradualmente para evitar que se formen grumos y lograr la completa homogenización de la mezcla. Esta mezcla se lleva a cabo a 900 rpm, sin temperatura y durante 5 minutos. Posteriormente, la potencia del agitador es ajustada al 90% con el fin de calentar la muestra hasta alcanzar una temperatura determinada. Una vez obtenida la temperatura deseada (60°C) se retira la mezcla y se deja enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se retiran 18 mL de la solución de agar para caracterizar la viscosidad. El resto del hidrocoloide es guardado en frascos de vidrio y almacenado en refrigeración a temperatura de 4°C a 8°C para su correcta conservación.

En la figura 5.8 se presentan las curvas de viscosidad de los fantasmas fabricados con agar-agar. La caracterización de los fluidos se ha realizado con un viscosímetro rotacional (*Alpha Series* de *Fungilab*) y los valores de viscosidad para el humor vítreo y el plasma sanguíneo son 2.65 mPa.s y 4.98 mPa.s, respectivamente. De las gráficas se puede identificar que estos fantasmas tienen un comportamiento no-newtoniano dependiente del tiempo, es decir, que este tipo de fluidos muestran un cambio en la viscosidad en función de la temperatura y la tensión cortante (Viswanath y col., 2007). Este comportamiento es típico de algunos fluidos corporales como la sangre, la mucosa, el humor vítreo y el líquido sinovial (Viswanath y col., 2007).

Figura 5.8. Caracterización de la viscosidad de las soluciones de agar-agar que simulan la viscosidad de dos fluidos corporales. A) humor vítreo y B) la sangre.

Para preparar las muestras, se han empleado dos tipos de NPMs comerciales (Chemicell), con núcleo de magnetita (100 nm) y suspendidas en agua bidestilada: FluidMAG-D (superparamagnéticas con cubierta de almidón) y FluidMAG-UC/A (ferromagnéticas sin recubrimiento). Aunque ambos tipos de nanopartículas poseen un núcleo del mismo tamaño, la forma de fabricación permite que estas nanopartículas posean un comportamiento magnético diferente.

El valor de la magnetización obtenida es aproximadamente $62 \text{ Am}^2/\text{kg}$ (Figura 5.9) el cual está de acuerdo con los valores de magnetita reportados en la literatura (Martínez-Boubeta y col., 2012; García-Cerda y col., 2003; Piñeiro y col., 2016).

Figura 5.9. Caracterización magnética de nanopartículas FluidMAG-UC/A en suspensión y en fase sólida.

La normalización de las curvas de magnetización (M/M_s vs H) se utiliza para estudiar los fenómenos de interacción dipolar magnética, donde M_s es la magnetización de saturación, la cual es originada cuando todos los dipolos magnéticos en las partículas sólida están mutuamente alineados con el campo magnético externo.

La figura 5.10 representa la normalización de las NPMs FluidMAG-UC/A comerciales en suspensión y en fase sólida. En la figura se observa que la susceptibilidad magnética inicial ($H < 10$ kA/m) es menor en las nanopartículas en fase sólida (Figura 5.10, línea negra) que en las que se encuentran suspendidas (Figura 5.10, línea azul). Este hecho sugiere que en ferrofluidos muy concentrados o en nanopartículas sólidas, la alineación de los momentos magnéticos de las nanopartículas a lo largo del campo magnético externo se obstaculiza debido a la disminución de la distancia entre las mismas, indicando que la interacción entre las partículas es más fuerte (Ota y col., 2015). En la figura 5.10B, se puede notar que el campo coercitivo (H_c) es menor cuando las NPMs están en suspensión que cuando están en fase sólida. Esta diferencia en los ciclos de histéresis está asociada a la ligera desviación del momento magnético de las partículas en el líquido cuando el campo magnético está próximo a la fuerza coercitiva de la partícula (Usov y col., 2012).

Figura 5.10. Curvas M/M_s en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas ferromagnéticas FluidMAG-UC/A. A) En fase líquida y sólida. B) Magnificación de A.

Para estudiar el efecto de la viscosidad del medio en el magnetismo de las NPMs, el ferrofluido FluidMAG-D es centrifugado a 14 mil RPM para separar las dos fases (nanopartículas y agua bidestilada). Una vez separadas las fases se elimina el agua bidestilada para realizar una nueva resuspensión con los fantasmas de humor vítreo y plasma sanguíneo. Posteriormente se homogenizan las muestras en un baño de ultrasonidos durante una hora. La concentración empleada para la preparación de estas muestras es de 10 mg/mL.

Los resultados de la caracterización magnética de las nanopartículas suspendidas en soluciones de agar-agar indican que la magnetización (M) disminuye con el aumento de la viscosidad del medio. La figura 5.11 señala una pérdida en la magnetización (7.9%) en la muestra de NPMs suspendida en soluciones de agar con mayor viscosidad ($\eta=4.98$ mPa.s) con respecto a la de menor viscosidad ($\eta=2.65$ mPa.s). Este resultado es debido a la reducción del movimiento Browniano de las partículas cuando la viscosidad del fluido portador se incrementa. Resultados similares han sido reportados por Li y col., (2014).

En el capítulo 7 se profundizará en el estudio de la influencia de la viscosidad del fluido y la concentración de las nanopartículas sobre el magnetismo de las mismas.

Figura 5.11. Curvas de magnetización en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas FluidMAG-D suspendidas en soluciones de agar-agar a concentraciones de 2.65 mPa.s y 4.98 mPa.s.

El efecto de las interacciones dipolares magnéticas se puede analizar mediante la normalización de las curvas de magnetización (Van Ewijk y col., 2002). La figura 5.12 representa las curvas de magnetización normalizadas de las nanopartículas magnéticas en suspensiones de agar con dos viscosidades diferentes y cuando están en sólido. Cuando las nanopartículas están en fase sólida los momentos dipolares magnéticos se alinean menos fácilmente con el campo magnético externo debido a que la distancia interpartícula es más corta. En consecuencia, en la región de campo magnético débil ($H < 10$ kA/m), la susceptibilidad magnética inicial es menor (Figura 5.12B línea negra). Así mismo, cuando las nanopartículas están en el seno de un fluido, al aumentar la viscosidad de dicho fluido, existe un impedimento adicional propio de la resistencia del líquido a que los momentos dipolares sigan al campo magnético externo ocasionando una disminución en la susceptibilidad magnética inicial (Figura 5.12B línea roja).

Figura 5.12. Curvas de magnetización normalizadas M/M_s en función del campo externo aplicado (H) de nanopartículas FluidMAG-D suspendidas en soluciones de Agar-Agar. A) En soluciones de Agar-Agar a 2.65 mPa.s y 4.98 mPa.s en fase líquida y sólida. B) Magnificación de A.

5.1.5.2. Caracterización de NPMs suspendidas empleando el portamuestras de Policarbonato

Para realizar la caracterización magnética con este tipo de portamuestras se emplean las NPMs comerciales FluidMAG-UC/A (Chemicell) suspendidas en agua bidestilada.

El valor de la magnetización de las nanopartículas suspendidas es $63.7 \text{ Am}^2/\text{Kg}$ y en fase sólida es $62.4 \text{ Am}^2/\text{Kg}$ (Figura 5.13A). Este resultado es similar al obtenido con el portamuestras de aro de plástico flexible.

Las curvas de magnetización normalizada (Figura 5.13B) indican que, al igual que con el portamuestras anterior, los momentos dipolares magnéticos se alinean más fácilmente cuando las nanopartículas están en suspensión que cuando están fijas o en estado sólido debido a que la distancia entre las partículas es más grande. Por consiguiente, la susceptibilidad magnética inicial es mayor en nanopartículas en suspensión (Figura 5.13B línea azul).

Por otra parte, en la figura 5.13B se puede observar que H_c es menor en las nanopartículas en suspensión que cuando están fijas. Este mismo resultado es obtenido con el primer portamuestras y en publicaciones previas (Usov y col., 2012; Ota y col., 2015).

Figura 5.13. Curvas de magnetización de nanopartículas FluidMAG-UC/A. A) Valor de magnetización de las nanopartículas en suspensión y en fase sólida. B) Curvas normalizadas (M/Ms vs H) en las dos fases (líquida y sólida).

5.1.5.3. Caracterización de NPMs suspendidas empleando los portamuestras tubulares de plástico rígido

En este experimento se ha trabajado con fluidos viscosos a base de goma arábica. La goma arábica es un polisacárido de origen natural que se extrae de la resina de árboles subsaharianos (Acacia senegal y Acacia seyal) como parte de su proceso de cicatrización (gummosis). Químicamente es un polisacárido con cantidades variables de D-galactosa, L-arabinosa, L-ramnosa y algunos ácidos derivados como el ácido D-glucorónico o el 4-O-metil-D-ácido glucorónico. Es una sustancia de color pardo o amarillo, con un elevado punto de inflamación ($>250\text{ }^{\circ}\text{C}$) y muy soluble en agua (aprox. 500 g/L) (Effiong y col., 2004). Generalmente se utiliza en la industria alimentaria para fijar aromas, estabilizar espumas y emulsiones, modificar la consistencia de alimentos o clarificar vinos. También se emplea en la fabricación de algunos medicamentos.

Las soluciones de goma arábica se preparan a tres concentraciones (0.125 g/mL, 0.25 mg/mL y 0.5 mg/mL). Los valores de viscosidad obtenidos fueron 10.3 mPa.s, 40.8 mPa.s y 354.2 mPa.s.

En la preparación de las muestras se emplean micropartículas ferromagnéticas de núcleo de magnetita de 2 μm y recubierta con sílica (Chemicell SiMAG/MP-DNA, 200mg/mL).

Para preparar las muestras se extraen 400 μL de goma arábica de cada una de las concentraciones y se añaden 10 μL de las micropartículas magnéticas SiMAG/MP-DNA, obteniendo una concentración aproximada de 4.88 mg/mL. La mezcla se deposita en tubos eppendorf y se homogeniza en un equipo de ultrasonidos *Ultrasons-H* (Selecta) durante 1 hora.

El valor de la magnetización de las micropartículas suspendidas en las soluciones de goma arábica a distintas viscosidades no fue posible obtener debido a la elevada viscosidad y a la característica pegajosa de la goma arábica (similar a la miel). Sin embargo, los datos son presentados en la forma reducida o normalizada para todas las muestras con el fin de evitar resultados erróneos debido a las incertidumbres en la determinación de la masa de las micropartículas presentes en las muestras.

La figura 5.14 representa las curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de las micropartículas de magnetita suspendidas en soluciones de goma arábica a tres diferentes viscosidades y una única concentración (4.88 mg/mL).

La figura 5.14B indica que, al igual que con los portamuestras anteriores, cuando las nanopartículas están en fase sólida o fijas, la susceptibilidad magnética inicial es menor (Figura 5.14B curva negra) en comparación con las nanopartículas en suspensión (Figura 5.14B curvas roja, azul y verde). Para el caso de las nanopartículas en suspensión, no existe una diferencia estadísticamente significativa en la susceptibilidad magnética inicial indicando que a esta concentración (4.88 mg/mL) las interacciones dipolares magnéticas son mínimas o nulas.

Por otro parte, el valor de H_c es menor cuando las nanopartículas se encuentran suspendidas en comparación a cuando están fijas (Usov y col., 2012; Ota y col., 2015) y, este valor tiende a disminuir a medida que la viscosidad es menor.

Figura 5.14. Curvas de magnetización normalizadas M/M_s en función del campo externo aplicado (H) de micropartículas SiMAG/MP-DNA suspendidas en soluciones de goma arábiga. A) Soluciones con viscosidades a 10.3 mPa.s, 40.8 mPa.s y 354.2 mPa.s y en fase sólida. B) Gráfica magnificada de A.

5.1.5.4. Caracterización de NPMs suspendidas empleando los portamuestras PTFE y PMMA

Los resultados de la caracterización de las NPMs con los portamuestras de Politetrafluoroetileno (PTFE) han sido similares, en cuanto a la magnetización y la forma de las curvas de magnetización (M - H), a los resultados obtenidos con los portamuestras PolimetilMetacrilato (PMMA). A su vez, estos resultados están en correspondencia con los obtenidos con los portamuestras anteriores. En el capítulo 7 se detallará los resultados obtenidos con los portamuestras PMMA los cuales fueron empleados para caracterizar el comportamiento magnético de las NPMs suspendidas en fluidos e internalizadas en cultivos celulares.

Aunque en esta memoria no se presentan los resultados obtenidos con los portamuestras de PTFE, dichos portamuestras fueron empleados para la caracterización de nanopartículas suspendidas en aceites de origen vegetal y mineral. Tales ferrofluidos fueron suministrados por el Departamento de Ingeniería Eléctrica y Energética de la Universidad de Cantabria que actualmente investiga la utilidad de estos ferrofluidos en los transformadores de potencia.

CAPÍTULO

6

Influencia de la viscosidad del medio, el ambiente intracelular y la concentración de nanopartículas en sus propiedades magnéticas

*“Cuando los obstáculos surjan, cambia tu dirección
para alcanzar tu meta, no cambies tu
decisión de llegar allí”
- Zig Ziglar*

6. INFLUENCIA DE LA VISCOSIDAD DEL MEDIO, EL AMBIENTE INTRACELULAR Y LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN SUS PROPIEDADES MAGNÉTICAS

El objetivo que persigue el presente experimento es el estudio de la influencia de la viscosidad del medio, el ambiente celular y la concentración de material magnético en el magnetismo de las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs). En este trabajo se han empleado concretamente SPIONs de magnetita (Fe_3O_4) de 14 nm de diámetro sin recubrimiento en dos casos. El primer caso consiste en la suspensión de las SPIONs en dos fluidos inertes (agua desionizada y en soluciones de fibroína de seda de gusano). En el segundo caso, las SPIONs se incuban en cultivos celulares de fibroblastos de ratón (NIH/3T3 ATCC NCRL-1658).

Caso 1: SPIONs suspendidas en fluidos inertes.

Cuando el fluido inerte son las soluciones de fibroína, la viscosidad se modifica a través de cambios en la cantidad del soluto (fibroína liofilizada). Una viscosidad específica ($\eta=4.12$ mPa.s) se utilizó como fantoma de citoplasma celular (Jeun y col., 2013). Este caso también trata diferentes concentraciones de material magnético.

Las SPIONs suspendidas en los fluidos inertes fueron caracterizadas a temperatura ambiente mediante el Magnetómetro por Gradiente Alternante MicroMagTM 2900 (AGM System) y el Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCNMR).

Caso 2: SPIONs incubadas en cultivos celulares de fibroblastos de ratón (NIH/3T3 ATCC NCRL-1658).

Para llevar a cabo la internalización de las SPIONs en los cultivos celulares, se empleó una sola concentración de material magnético (2.5 mg/mL) y su caracterización fue realizada únicamente con el AGM System debido a que las dimensiones físicas del tubo RMN del relajómetro no permitieron el crecimiento ni la observación microscópica de los cultivos celulares.

Según la documentación consultada, la caracterización del comportamiento magnético de las nanopartículas suspendidas en fluidos e internalizadas en cultivos celulares a través del AGM no ha sido realizada anteriormente debido al inconveniente que presenta AGM para caracterizar ferrofluidos. Por esta razón, fue necesario el diseño específico del portamuestras de PMMA con el fin de adaptar el sensor del AGM para albergar fluidos viscosos y permitir el crecimiento de cultivos celulares (capítulo 5).

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Síntesis de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro (SPIONs)

Las Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Hierro (SPIONs) utilizadas en esta tesis doctoral han sido proporcionadas por el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico de la Universidad Politécnica de Valencia. Estas nanopartículas se sintetizan según el método descrito por (Giri y col., 2005). Las SPIONs sintetizadas se caracterizaron por difracción de rayos X (XRD) y Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM) (Figura 6.1). Las reflexiones típicas del óxido de hierro tuvieron un patrón de XRD en el intervalo de $25^{\circ} < 2\theta < 65^{\circ}$. Los picos de Bragg corresponden al arreglo cúbico de la Magnetita (Figura 6.1A). La imagen del TEM señala nanopartículas bien definidas con un diámetro promedio de 14 ± 3 nm (Figura 6.1B).

Las SPIONs de Magnetita (Fe_3O_4) en polvo y sin recubrimiento son seleccionadas con el fin de estudiar la biocompatibilidad con respecto a los cultivos celulares NIH/3T3 utilizados en este experimento. Algunos estudios previos de la biocompatibilidad y toxicidad de las nanopartículas de óxido de hierro (con recubrimiento y sin él) en sus dos formas cristalinas (Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) han reportado que la viabilidad celular se

mantiene en un nivel de 100% dentro de la precisión experimental. Además, han demostrado ser biocompatibles con este tipo de línea celular (Safi y col., 2010; Lewinski y col., 2008; Singh y col., 2009; Hussain y col., 2005). Sin embargo, Brunner y col., (2006) han reportando citotoxicidad y muerte celular aguda causada por las nanopartículas de óxido de hierro.

Figura 6.1. Caracterización de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm sin recubrimiento. A) Gráfica de la difracción de rayos X para las nanopartículas de óxido de hierro en polvo. B) Imagen representativa TEM de la nanopartículas de óxido de hierro sintetizadas.

6.1.2. Experimentos con muestras inertes

6.1.2.1. Soluciones de fibroína de seda de gusano

En esta experimentación se utiliza generalmente fibroína de seda de gusano para fabricar soluciones homogéneas y estables a diversas viscosidades. Se decidió el empleo de la fibroína gracias a su probada biocompatibilidad (Rajkhowa y col., 2011; Zhao y col., 2014), su fácil uso en la preparación de soluciones viscosas y su alta versatilidad (Chen y col., 2015). El material liofilizado fue proporcionado por el Laboratorio de Biomateriales (CTB-UPM) y su síntesis se describe en (Rockwood y col., 2011).

Con la fibroína liofilizada se preparan tres soluciones acuosas cuya viscosidad es modificada mediante la variación de la concentración del soluto. En este experimento se han utilizado tres concentraciones: 0.062, 0.075 y 0.125 g/mL.

La fibroína liofilizada se pesa en una balanza de precisión (*Serie Discovery DV215CDM* de *Ohaus*). Un frasco de vidrio pyrex de 100 mL es utilizado para depositar un volumen determinado de agua desionizada y, posteriormente, se agregan poco a poco pequeñas porciones de fibroína mientras se realizan movimientos circulares con el fin de evitar la formación de espuma en la superficie de la mezcla. Esta mezcla se deposita en tubos

tipo Falcon estériles de 50 mL y se lleva a una Centrifugadora (*Rotina 380* de *Hettich*) a 5000 rpm y 24°C durante 10 minutos para inducir la decantación de las piezas de fibroína no disueltas. Estas soluciones se depositan en nuevos contenedores tipo Falcon y se almacenan a una temperatura de 8°C.

La caracterización de la viscosidad de las muestras se realiza a temperatura ambiente a través de un Viscosímetro rotacional (*Serie Alpha* de *Fungilab*). Las viscosidades obtenidas son $\eta=3.31$; $\eta=4.12$ y $\eta=7.97$ mPa.s. La viscosidad de $\eta=4.12$ mPa.s es usada como fantoma del citoplasma celular (Jeun y col., 2013).

6.1.2.2. Soluciones de fibroína de seda de gusano con SPIONs

Las nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) en polvo se depositan en tubos eppendorf pesados previamente mediante una Balanza de Precisión (*Discovery* de *Ohaus*). Posteriormente se obtiene el peso del material magnético y se adiciona una pequeña cantidad de agua desionizada para formar una suspensión homogénea. Finalmente, la solución de fibroína es vertida en la solución anterior. Se preparan muestras a concentraciones de 0.05, 2.5 y 10 mg/mL. Las suspensiones de SPIONs con agua desionizada se preparan de la misma manera. La muestra de menor concentración (0.05 mg/mL) se prepara empleando una solución de stock madre debido a que la resolución de la balanza de precisión no garantiza mediciones por debajo de 0.1 mg.

Las muestras de fibroína se mezclan usando un Agitador (*Vortex Reax-Control* de *Heidolph*) durante 20 minutos con el objetivo de conseguir un coloide estable y prevenir la formación de espuma y cambios físicos en ellas. Estas muestras no se sometieron al baño de ultrasonidos debido a que se comprobó que este procedimiento produce gelificación (Fernández-García y col., 2016). Sin embargo, el baño de ultrasonidos resultó útil para lograr la homogeneidad en las suspensiones compuestas de agua desionizada y nanopartículas de magnetita en polvo. Los baños de ultrasonidos se realizaron con un equipo *Ultrasons* de *JP Selecta*.

6.1.2.3. Caracterización coloidal

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de Dynamic Light Scattering) es una técnica físico-química empleada para la determinación de la distribución de tamaños de partículas en suspensión. Las partículas cuyo tamaño se encuentra en la región submicrométrica emplean con mayor frecuencia la DDL, sin

embargo, esta técnica también puede ser utilizada para medir partículas con tamaños inferiores a 1 nm. La DDL analiza la distribución de la velocidad del movimiento de partículas midiendo fluctuaciones dinámicas de la intensidad de dispersión de la luz causada por el movimiento browniano de la partícula. Esta técnica calcula el diámetro hidrodinámico (D_H) y la medida global de la partícula en posición perpendicular a la fuente de luz. (Murdocky col., 2008).

Un *Zetasizer Nano ZS* de *Malvern* es empleado para medir el tamaño hidrodinámico de las SPIONs suspendidas en agua y de las soluciones acuosas de fibroína. Una concentración de 0.5 mg/mL fue utilizada en ambos casos teniendo como base una cantidad de muestra de 1 mL. La estabilidad coloidal de las dispersiones de partículas se logró preservar durante 24 horas. Las medidas se realizan a 25°C y se obtienen unos índices de refracción de la magnetita y del material dispersante de 2 y 1.33 respectivamente. Estas medidas se han realizado en colaboración con el Departamento de Tecnología Alimentaria de la Universidad Técnica de Valencia.

6.1.2.4. Caracterización de la magnetización (M) de las SPIONs

Para estudiar el comportamiento magnético de las SPIONs de 14 nm inmersas en agua desionizada y en soluciones de fibroína, se caracteriza la muestra en el AGM a través de las curvas de magnetización (M - H) en función del campo magnético aplicado. Estas mediciones requieren que el AGM se calibre diariamente. Para este propósito, el dispositivo dispone de un material de referencia estándar (2853 Magnetic Moment Standard-Yttrium Iron Garnet Sphere-YIG) cuya curva de magnetización es conocida por el AGM.

El AGM cuenta con 2 tipos de operación para medir los ciclos de histéresis, en resonancia y fuera de resonancia. Esta caracterización se realiza en temperatura ambiente y se selecciona el modo de medición en resonancia para mejorar la calidad en la relación señal/ruido (Harrell y col., 1999). Además, se emplea la sonda P2 Parallel Silica debido a que el peso del portamuestras_{PMMA-AGM} es superior a 50 gramos.

Los portamuestras_{PMMA-AGM} se pesan mediante una balanza de precisión (*Discovery DV215CDM* de *Ohaus*) antes de las mediciones. Después se realiza la caracterización magnética de la sonda P2 Parallel Silica junto con el portamuestras_{PMMA-AGM} sin muestra con el objetivo de conocer su aporte total diamagnético. Este aporte se sustrae de las

mediciones que contienen la muestra con SPIONs con el fin de obtener el momento magnético neto de las SPIONs.

Para el caso de las soluciones de fibroína, teniendo ya la muestra homogenizada, se utiliza una pipeta de viscosidad (*Transferpettor 10-50 μ L de Brand*) para extraer aproximadamente 14.5 μ L de la suspensión a medir. Esta cantidad se deposita en el portamuestras_{PMMA-AGM}, se sella con Parafilm M para evitar el derramamiento del líquido, se adhiere nuevamente a la sonda y, se lleva a cabo una segunda caracterización. Finalizada esta nueva caracterización, se retira cuidadosamente el Parafilm M y la muestra se aloja en un horno de secado (*DigiTheat de JP Selecta*) durante 24 horas para evaporar el líquido de la muestra. Pasado este tiempo, la muestra se sella con parafilm y se realiza una tercera caracterización con el fin de determinar el momento magnético de las SPIONs en sólido. Finalizada la tercera caracterización, los pocillos con el material magnético se pesan nuevamente para confirmar la masa final ya que, al retirar el parafilm M en la fase de secado, existe una pérdida de material magnético que se adhiere al parafilm M.

El valor de la magnetización se obtiene a partir de la ecuación 4.1 y las unidades de medida están dadas en el Sistema Internacional (Am^2/kg). La normalización de los datos de momento magnético a través del cálculo de la magnetización específica permite la comparación cuantitativa de curvas de magnetización entre muestras con diferente masa (Li y col. 2014). Sin embargo, los efectos generados por la incertidumbre en la determinación de la masa de las nanopartículas han hecho que otro tipo de normalización de los datos sea aplicado en este tipo de estudios. Esta normalización surge de dividir la magnetización específica M entre la magnetización de saturación M_s (Vargas y col., 2005). De esta manera, se disminuye el efecto de la incertidumbre de la masa y los datos de las curvas de magnetización pueden ser tratados en el rango de 0 a 1 (sin unidades). A partir de esta normalización a la unidad, los resultados de las muestras se pueden presentar en su forma reducida (M/M_s vs H) y las interacciones dipolares pueden ser estudiadas (Van Ewijk y col., 2002).

6.1.2.5. Caracterización del tiempo de relajación longitudinal (T_1) de las SPIONs

Las SPIONs suspendidas de fibroína y agua desionizada también fueron empleadas para realizar la caracterización de los tiempos de relajación longitudinal T_1 . En este caso, la

concentración de la muestra fue de 2 mMol y la caracterización se realizó mediante el Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR) que conforma la Unidad CFNPMs. Este relajómetro cuenta con un electromagneto de intensidad de campo variable desde 0.23 T hasta 1.9 T.

En esta caracterización se emplea la Secuencia de Saturación-Recuperación (SR) predeterminada por el fabricante STELAR. Esta secuencia consiste de un pulso de 90° seguido de un tiempo de recuperación. Un segundo pulso de 90° se aplica posteriormente para reorientar y adquirir la curva de caída de inducción libre (FID). Las mediciones se llevaron a cabo a diferentes intensidades de campo: 3 MHz, 5MHz, 7MHz, 9MHz, 20MHz y 40MHz. Las medidas realizadas a intensidades de bajo campo magnético (3 MHz hasta 9MHz) se miden en la consola SMARTracer, mientras que las de alto campo (20MHz y 40MHz) se miden en el electromagneto BRUKER.

Para la toma de medidas con el electromagneto BRUKER, se depositan muestras de 150 µl en tubos RMN de 5mm x 203mm (Kimble Chase) mediante una pipeta de vidrio Pasteur de 230 mm (Labolan # 74770230). Las suspensiones con agua desionizada se homogenizan en un equipo de ultrasonido durante 10 minutos, mientras que las suspensiones con fibroína se agitan en un mezclador vortex durante 15 minutos con el objetivo de homogenizar nuevamente las muestras. El tubo RMN se ubica dentro de la bobina de la sonda del electromagneto. De la misma manera, muestras de 2 mL se depositan en tubos de RMN (10 mm x 203 mm) y se sitúan en el SMARTracer. Las medidas de relajometría se llevan a cabo a una temperatura de 21°C.

Una vez conocido el tiempo de relajación longitudinal (T1) es posible hallar la relajatividad longitudinal (r1) (Apéndice B, sección B.2.3).

6.1.3. Experimentos in vitro

6.1.3.1. Cultivos celulares de fibroblastos de ratón NIH/3T3

En este estudio se utilizó fundamentalmente la línea celular de fibroblastos de ratón (NIH/3T3; ATCC NCRL-1658) y los portamuestras^{PMMA-AGM} para el crecimiento del cultivo celular. Para asegurar la proliferación celular, las células 3T3 se mantienen en un medio de cultivo que está compuesto de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con Glucosa (*w/o L-Glutamine w/25mM Hepes w/o Sodium Pyruvate* de Biowest), que contienen además un 10% de Suero Bobino Fetal (FBS-South American

Origin de Biowest) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (*Life Technologies, Grand Island, NY #15140122*). Los cultivos celulares en crecimiento permanecen en una atmosfera humidificada al 95% en 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas mediante un incubador (*FORMA Series II Water Jacket CO₂ de Thermo Scientific*). Finalizado este tiempo, los cultivos son observados a través de un Microscopio óptico (*DMIL LED de Leica*) con el fin de verificar el crecimiento y la adherencia celular en el fondo de los portamuestras_{PMMA-AGM}. La línea celular se recoge mediante tripsinización y centrifugación dos veces por semana y se lleva a cabo un cambio de medio de cultivo parcial cada 3 días. Los cultivos se siembran a una densidad inicial de 5x10³ células/portamuestras_{PMMA-AGM} y 2.5x10⁴ células/pocillo en placas P24 (X50 24- well Multidish PS Traited, ref: 11874235).

6.1.3.2. Viabilidad celular

Desde el punto de vista cualitativo, el marcaje con calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) es uno de los métodos usados en la determinación de la viabilidad en cultivos celulares. Este marcaje es un test colorimétrico que utiliza la tinción fluorescente simultánea.

En esta tesis doctoral, el marcaje con calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) es utilizado en los cultivos celulares NIH/3T3 para comprobar la biocompatibilidad en los portamuestras_{PMMA-AGM} y en las nanopartículas de óxido de hierro sin recubrimiento.

La calceína-AM es un colorante que penetra en la célula. En las células vivas, la calceína AM no fluorescente se convierte en calceína verde fluorescente (λ_{ex} 490 nm, λ_{em} 515nm) tras la hidrólisis del acetoximetil ester por las esterasas intracelulares (Wan y col., 1994; Bratosin y col., 2005). El Ioduro de Propidio (IP) es un colorante impermeable a la membrana celular intacta que tiñe los núcleos de las células muertas y no penetra la membrana celular de las células vivas. Esta molécula fluorescente llega al núcleo pasando por áreas desordenadas de la membrana celular muerta e intercala con la doble hélice del ADN de la célula para emitir fluorescencia roja (λ_{ex} 535 nm, λ_{em} 617 nm).

El porcentaje de viabilidad celular se lleva a cabo mediante la siguiente expresión:

$$V_c = \frac{\text{Número células vivas}}{\text{Número de células vivas} + \text{Número de células muertas}} \times 100 \quad (6.1)$$

6.1.3.3. Viabilidad celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}

Este experimento se realiza con el fin de evaluar la biocompatibilidad de los portamuestras_{PMMA-AGM} con los cultivos celulares NIH/3T3. Los portamuestras_{PMMA-AGM} se lavan con agua doblemente destilada y se esterilizan con luz ultravioleta en una campana de extracción (*LabGard® Class II Biological Safety Cabinet*) durante 20 minutos. Posteriormente, las células 3T3 se siembran en los portamuestras_{PMMA-AGM} a una densidad celular inicial de 5×10^3 células/portamuestras_{PMMA-AGM} como se describe en la sección 6.1.3.1, y se ubican en una placa multipocillo P24 (Figura 6.2) con el objetivo de facilitar el almacenamiento y la manipulación de la muestra. Trascurrido el tiempo de incubación (24 horas), se elimina el medio de cultivo y las células se lavan dos veces con PBS (*Phosphate-Buffered Saline* de *Gibco*) para remover las células no adheridas al fondo del portamuestras_{PMMA-AGM}. Inmediatamente, se añade nuevamente medio de cultivo para evitar que las células se deshidraten y mueran.

La viabilidad celular es determinada mediante el ensayo de doble tinción de Calceína/Ioduro de Propidio (IP) (Invitrogen-Molecular Probes). Para este ensayo, se prepara una solución añadiendo 0.5 μL de Calceína y 0.5 μL de Ioduro de Propidio en 1 mL de medio de cultivo celular. Una cantidad de aproximada de 14.5 μL de esta solución preparada se adiciona a los cultivos celulares sembrados en los portamuestras_{PMMA-AGM} y se incuban a 37°C durante 20 minutos. La fluorescencia se evalúa mediante un microscopio invertido (*Leica DMIRB*) equipado con cámara digital (*Leica DC100* (Nussloch, Germany)) y las fotografías se toman a 10X y 20X. Este experimento se repite a las 48 y 72 horas.

Figura 6.2. Células NIH/3T3 cultivadas en portamuestras_{PMMA-AGM} y ubicadas en una placa multipocillo P24 para facilitar su almacenamiento y manipulación.

Cabe señalar que para todos los experimentos de viabilidad celular se realizan cuatro réplicas para cada concentración o condición experimental y se consideran los controles de muerte basal de la línea celular (sin SPIONs).

6.1.3.4. Adherencia celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}

Este experimento se lleva a cabo con el objetivo de conocer la cantidad de células que se fijan en los portamuestras_{PMMA-AGM}. Para ello, se siembran las células 3T3 (sección 6.1.3.1) y se realiza el ensayo de viabilidad celular como se describió anteriormente. Las fotografías se toman con bajo aumento (2.5X) con el fin de observar el pocillo completo y realizar el conteo de células vivas y muertas. Posteriormente, las fotografías se llevan al software Photoshop Cs6 y mediante la cuadrícula propia del programa se realiza el conteo de las células.

6.1.3.5. Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs

Para evaluar la biocompatibilidad de las SPIONs en los cultivos celulares, las células 3T3 se sembraron en placas multipocillo P24 con una densidad inicial de 2.5×10^4 células/pocillo (procedimiento descrito en la sección 6.1.3.1). Posteriormente las células se incuban, durante 24 horas, empleando SPIONs suspendidas en medio de cultivo y

con dos concentraciones: 1 mg/mL y 2.5 mg/mL. Pasado el tiempo de incubación, se elimina el medio de cultivo que contiene las SPIONs, se lavan las células dos veces con PBS para eliminar restos de las nanopartículas no fagocitadas y, se añade medio de cultivo para evitar la muerte de las células por deshidratación. Finalmente, se lleva a cabo el ensayo de doble tinción de Calceína/Ioduro de Propidio (IP). El experimento se repite a las 48 horas.

6.1.3.6. Tiempo de vida celular fuera del incubador

Con el objetivo de evaluar el tiempo de vida celular fuera de las condiciones idóneas para el mantenimiento de las células (temperatura, humedad y CO₂) se sembraron células 3T3 en los portamuestras_{PMMA-AGM} con una densidad celular de 5×10^3 células/portamuestra_{PMMA-AGM} (procedimiento descrito en la sección 6.1.3.1). Posteriormente, las SPIONs son incubadas a una concentración de 2.5 mg/mL durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se elimina el medio de cultivo que contiene las SPIONs. Las células se lavan dos veces con PBS y se adiciona 14.5 µL de medio de cultivo para prevenir la muerte celular por deshidratación. Los portamuestras se sellan inmediatamente con Parafilm M para evitar el derrame de la muestra. Luego se realiza la caracterización en el AGM para validar el protocolo de medida y estudiar la viabilidad celular transcurridos 30 minutos, 1 hora y 2 horas fuera del incubador. Finalmente, se realiza el ensayo de doble tinción de Calceína/Ioduro de Propidio (IP) después de transcurrir cada uno de los periodos de tiempo mencionados. Los portamuestras se manipulan uno por uno, es decir, sólo uno está fuera del incubador mientras se realiza la medida.

6.1.3.7. Localización intracelular de las SPIONs

La localización intracelular de SPIONs se determina mediante microscopía de fluorescencia usando una tinción de lisosomas con marcadores fluorescentes específicos de estos orgánulos. Para ello, las células 3T3 son sembradas en placas multipocillo P24 con una densidad de 2.5×10^4 células/pocillo como se explica en la sección 6.1.3.1. 24 horas después de la siembra de las células, éstas son incubadas durante otras 24 horas con una suspensión de SPIONs y medio de cultivo a una concentración de 2.5 mg/mL. Finalizado este tiempo, las células se lavan 3 veces con PBS para eliminar el exceso de nanopartículas y se incuban durante 10 minutos con LysoTracker® Red DND-99 (*Life Technologies*) a 40 nM en medio de cultivo celular. Finalmente, las fotografías de las

muestras tinturadas con fluorescencia se toman usando un microscopio (*Leica DMIRB*) equipado con una cámara digital (*Leica DC100, Nussloch - Germany*).

6.1.3.8. Análisis de la magnetización (M) de las SPIONs libres y unidas a las células

Una vez se ha comprobado la biocompatibilidad de los portamuestras_{PMMA-AGM} y las SPIONs con los cultivos celulares NIH/3T3, se lleva a cabo la caracterización magnética mediante el equipo de magnetometría con el fin de analizar el comportamiento de las SPIONs cuando están internalizadas y cuando son liberadas de las células. Para este propósito, se incuban las células NIH/3T3 (5×10^3 células/portamuestra_{PMMA-AGM}) con una suspensión de SPIONs (2.5 mg/mL) como se explicó anteriormente. Empleando un tiempo no superior a una hora, se realiza la primera caracterización magnética (procedimiento descrito en la sección 6.1.2.4) que corresponde a las SPIONs internalizadas en las células. Finalizada esta caracterización, el medio de cultivo celular se retira cuidadosamente, se adicionan 14.5 μ L de Trypsin-EDTA y se incuba durante 10 minutos para despegar las células. Transcurrido este tiempo, el portamuestras_{PMMA-AGM} se sella nuevamente con parafilm y se sonica en un baño de ultrasonido para romper las membranas celulares y liberar el material magnético. Una segunda caracterización magnética se realiza a las SPIONs liberadas de las células. De esta manera, se obtienen los valores del momento magnético dentro y fuera de las células. Finalmente, las SPIONs liberadas y las células muertas se extraen del portamuestras y se realiza una tercera caracterización para conocer el valor residual del momento magnético proveniente de las SPIONs posiblemente adheridas a las paredes del portamuestras_{PMMA-AGM}.

Con el fin de conocer el valor del momento magnético neto de las SPIONs internalizadas y liberadas de las células, el valor residual del momento magnético debe ser sustraído (en el procesamiento de los datos) del resultado de la caracterización obtenida de las SPIONs tanto dentro como fuera de las células.

Algunos portamuestras se seleccionan al azar para realizar el ensayo de Calceína/Ioduro de Propidio (IP).

6.1.3.9. Curva de calibración

Para averiguar si existe diferencia entre el comportamiento magnético de las SPIONs cuando han sido fagocitadas por las células y cuando han sido liberadas al medio, es

necesario conocer el valor aproximado de la masa de material magnético en el interior de las células y, de esta manera, conocer su magnetización. A través de una curva de calibración es posible deducir el valor de la masa de manera indirecta.

La curva de calibración se obtiene midiendo el momento magnético de suspensiones que contienen cantidades conocidas de SPIONs. Así, cada masa conocida de nanopartículas sirve para obtener un valor de momento magnético. Este conjunto de datos (masa vs momento magnético) se utiliza para construir una curva de calibración. Para generar la curva de calibración, se prepara una suspensión madre homogénea o "stock" que contiene 2.5 mg de SPIONs en 1 mL de Trypsin-EDTA y, a partir de ésta se realizan 10 diluciones con concentraciones crecientes desde 0.05 mg/mL hasta 2.5mg/mL. Cada muestra (con una masa conocida) es caracterizada en el AGM obteniendo un valor de momento magnético específico. Se caracterizan por lo menos tres réplicas para cada concentración.

Una vez obtenidos los datos de la curva de calibración, el valor del momento magnético obtenido cuando las SPIONs fueron liberadas de las células se localiza en la curva. Este valor tendrá asociado una cantidad de masa. El dato de la masa se emplea para conocer el valor de la magnetización (ecuación 4.1) de las SPIONs internalizadas y liberadas de las células ya que la masa de las SPIONs es la misma en estos dos estados.

6.1.4. Análisis Estadístico

Los resultados de los experimentos realizados en esta tesis doctoral se cuantifican utilizando la media $\pm$ el error estándar de la media (SEM) proveniente de al menos 4 experimentos independientes. Los datos se analizan con los programas Origin 8 y SigmaPlot (v 12.5, Systat Software Inc.). El análisis paramétrico se realiza mediante el test de varianza de ANOVA. El nivel de significancia estadística se establece con $p < 0.05$.

6.2. Resultados

6.2.1. Nanopartículas de óxido de hierro (SPIONs)

Un patrón típico de Difracción de Rayos X se presenta en la Figura 6.1A indicando que las muestras son monofásicas con la estructura de espinela cúbica inversa de la magnetita (Fe_3O_4). La imagen TEM (Figura 6.1B) revela que las partículas son bastante

esféricas y tienen un tamaño uniforme de aproximadamente 14 ± 3 nm. El diámetro determinado mediante TEM está en buen acuerdo con el calculado a partir de la imagen de Difracción de Rayos X indicando que las partículas son altamente cristalinas.

6.2.2. Diámetro hidrodinámico

La figura 6.3 muestra la distribución del tamaño de partículas (SPIONs de 14 nm) dispersas en agua desionizada y soluciones de fibroína. El tamaño hidrodinámico (D_H) revelado por DSL indica una ligera tendencia a la agregación de las nanopartículas suspendidas en el agua (40 nm) debido a las fuerzas de Van der Waals. Esta agregación se incrementa en presencia de fibroína (<100 nm) lo que indica que la fibroína podría formar múltiples capas en las nanopartículas y, de esta manera, ser empleadas como agente de recubrimiento debido a su biocompatibilidad y fácil internalización en células.

Figura 6.3. Medidas de la Dispersión Dinámica de Luz (DDL). Medida del diámetro hidrodinámico (D_H) de dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm inmersas en agua desionizada (azul) y suspensiones de fibroína (roja) a 0.5 mg/mL.

6.2.3. Influencia de la viscosidad del medio y la concentración de SPIONs en el nanomagnetismo

La figura 6.4 muestra los ciclos de magnetización cuasi-estática (M-H) en función del campo magnético aplicado a dos concentraciones de SPIONs (2.5 y 10 mg/mL)

suspendidas en fluidos inertes: agua desionizada y soluciones de fibroína. Esta última a tres diferentes viscosidades ($\eta=3.31$; $\eta=4.12$ y $\eta=7.97$ mPa.s), una de las cuales simula la viscosidad del citoplasma celular (Jeun y col., 2013).

Figura 6.4. Curvas de magnetización como función del campo magnético (H) de SPIONs suspendidas en fluidos inertes con dos diferentes concentraciones de nanopartículas. A) 2.5 mg/mL y B) 10 mg/mL.

En la figura 6.5 se muestran las curvas de magnetización (M-H), tomadas a temperatura ambiente, de los fluidos viscosos en los que se suspendieron las SPIONs: agua desionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades. Se observa que el comportamiento de todos los fluidos es diamagnético.

Figura 6.5. Caracterización magnética de los fluidos inertes. Curvas de magnetización en función del campo (H) realizadas a temperatura ambiente de los fluidos inertes (agua desionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades).

En la figura 6.6 se presenta la normalización (M/M_s) de las SPIONs cuando están suspendidas en agua desionizada con dos concentraciones (2.5 y 10 mg/mL) y cuando las SPIONs se encuentran en fase sólida. Esta normalización es importante para estudiar los fenómenos de interacción dipolar magnética de las SPIONs suspendidas en fluidos bajo la acción de un campo magnético externo aplicado.

Figura 6.6. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y SPIONs en sólido tomadas a temperatura ambiente. Las SPIONs fueron suspendidas a diferente concentración (2.5 mg/mL y 10 mg/mL).

En la figura 6.7 se presenta la normalización de las curvas de magnetización (M/M_s) de las SPIONs cuando están suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína (diferentes viscosidades) y cuando se encuentran en fase sólida.

Figura 6.7. Curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) de SPIONs suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a una concentración de 2.5 mg/mL. Las curvas de magnetización se llevaron a cabo también a las SPIONs en sólido y todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

Los resultados experimentales muestran una disminución en la magnetización (M) de las suspensiones coloidales magnéticas a medida que la viscosidad del líquido portador aumenta (Figura 6.4B). Este resultado está en concordancia con investigaciones previas (Jeun y col., 2013; Li y col., 2014).

El valor M de las SPIONs en estado sólido es aproximadamente $65 \text{ Am}^2/\text{kg}$ alcanzado a una intensidad de campo magnético $H=\pm 8.0\text{E}^5 \text{ A/m}$ a temperatura ambiente. Los valores de campo coercitivo (H_c) y magnetización remanente (M_r) próximos a cero (material magnéticamente blando) corroboran el comportamiento superparamagnético, es decir que las partículas son monodominio. Investigaciones previas han obtenido resultados similares a través de un Vibrating Sample Magnetometer (VSM) y un Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) (Salas y col., 2014; Li y col., 2011; Soares y col., 2014).

Cuando las suspensiones tienen baja concentración de SPIONs, el valor de M es similar independientemente del medio de dispersión (Figura 6.4A). Sin embargo, para alta concentración (Figura 6.4B) se observa una clara diferencia de los valores de M .

Por otro lado, la forma de la curva de magnetización varía con la concentración de las partículas y la viscosidad del líquido portador, llegando a ser un poco más inclinada en soluciones de fibroína que en agua desionizada. Además, esta curva es más pronunciada cuando se incrementa la concentración de las nanopartículas. Esta ligera inclinación de la pendiente de M se debe a que los ejes de anisotropía se orientan de manera aleatoria con respecto a la dirección del campo magnético externo (Poperechny y col., 2010; Mehdaoui y col., 2013; Salas y col., 2014).

Las nanopartículas magnéticas dispersas en soluciones de fibroína se comportan como pequeños magnetos con sus ejes de anisotropía orientados al azar con respecto a la dirección del campo magnético externo o al vector de magnetización. Como consecuencia, el ángulo (θ) entre el eje de fácil imanación y el vector de magnetización es finito en las soluciones donde las SPIONs están casi inmovilizadas. Por otro lado, cuando las nanopartículas están dispersas en agua desionizada, donde las partículas son libres de rotar, se favorece el alineamiento entre el eje fácil y el vector magnetización ($\theta = 0$). Es decir que, las interacciones magnéticas y la viscosidad del medio portador favorecen o afectan el alineamiento del eje de fácil imanación con el vector de

magnetización de las partículas cuando ellas están idealmente libres o idealmente inmovilizadas.

6.2.4. Influencia de la viscosidad del medio en la relajatividad (r_1) de las SPIONs

La figura 6.8 muestra la relajatividad (r_1) como función de la frecuencia de Larmor en suspensiones coloidales inertes con SPIONs de 14 nm a 2mM. A bajas intensidades de campo magnético se observa un incremento en la relajatividad inducida por la viscosidad del líquido portador que incrementa el tiempo de correlación rotación y produce una alta relajatividad. Por el contrario, a bajas viscosidades, el incremento en la relajatividad es despreciable. El hecho de que en las muestras de agua y en soluciones acuosas de baja viscosidad la velocidad de relajación sea menor que en soluciones de mayor viscosidad indica una alta accesibilidad de las moléculas de agua a la superficie de las SPIONs. Por el contrario, a altas viscosidades, la superficie de las SPIONs estaba, en parte, protegida contra el agua libre por la matriz de fibroína. Este proceso que implica la accesibilidad del agua libre a la superficie de las partículas es el origen de la dependencia de los valores de relajación en la viscosidad del fluido de la muestra, a valores de relajación elevados de alta viscosidad.

Figura 6.8. Perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD). Medida de los perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (NMRD) para diferentes intensidades de campo magnético en dispersiones de nanopartículas de óxido de hierro de 14 nm suspendidas en agua desionizada y soluciones de fibroína a distintas viscosidades y una concentración de 2 mM.

6.2.5. Influencia de la internalización celular de las SPIONs en la magnetización

Para conocer la influencia que ejerce la internalización celular de las nanopartículas en su comportamiento magnético, es necesario estudiar la biocompatibilidad de los portamuestras_{PMMA-AGM} y de las SPIONs con los cultivos celulares empleados en esta investigación. Así mismo, se requiere conocer la localización de las nanopartículas en el entorno celular con el objetivo de comparar el comportamiento magnético de las SPIONs cuando están internalizadas en las células y cuando están fuera de ellas.

6.2.5.1. Viabilidad celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}

La evaluación de la biocompatibilidad de los portamuestras_{PMMA-AGM} (Figura 6.9) se realiza mediante el ensayo de marcaje de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Se utilizan cultivos celulares de fibroblastos de ratón NIH/3T3 a una densidad inicial de 5×10^3 células/portamuestras_{PMMA-AGM} (confluente) incubadas durante 24, 48 y 72 horas. La misma cepa celular es incubada en placas estándar de poliestireno P24 con una densidad inicial de 2.5×10^4 células/pocillo, durante 24 horas. Por consiguiente, se puede comparar el crecimiento celular en los portamuestras_{PMMA-AGM} y en los pocillos estándar. La cepa celular NIH/3T3 se ha utilizado debido a su rápida proliferación celular.

Los resultados muestran que la incubación de las células en los portamuestras_{PMMA-AGM}, para garantizar su crecimiento, no afecta significativamente a la viabilidad de las células 3T3 a las 24 (86.45%) y 48 horas (87.60%) sugiriendo que los portamuestras_{PMMA-AGM} no inducen toxicidad celular aguda en los tiempos analizados. Una reducción en la viabilidad celular de 73.21% se observa a las 72 horas (Figura 6.9A). Esta ligera disminución podría ser causada por la inherente no uniformidad de los portamuestras_{PMMA-AGM} debido al proceso de fabricación generando posiblemente que las células dejen de proliferarse, se despeguen y mueran. Por otro lado, la viabilidad celular en los pocillos estándar P24 después de 24 horas de incubación es de 96.38%. La comparación del porcentaje de la viabilidad celular después de las 24 horas en los portamuestras_{PMMA-AGM} y los pocillos estándar P24 es de ~10% (Figura 6.9B).

Cabe resaltar que los experimentos se llevaron a cabo durante las primeras 48 horas, lo que permite tener una viabilidad celular suficiente para realizar el trabajo experimental. Las fotografías de microscopía de fluorescencia de las células cultivadas en los

portamuestras_{PMMA-AGM}, muestran imágenes difusas debido a la ligera concavidad del portamuestras_{PMMA-AGM} ocasionado en la fabricación.

Figura 6.9. Viabilidad celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}. A) Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células NIH/3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras_{PMMA-AGM}. B) Comparación de la viabilidad celular de los portamuestras_{PMMA-AGM} y las placas multipocillos P24 a 24 horas. Los datos están expresados como la media $\pm$ SEM, el error estándar de la media, en inglés (Standar Error Medium) de n=4 experimentos independientes. *p<0.05; (Test de ANOVA).

6.2.5.2. Adherencia celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}

La evaluación de la adherencia de las células NIH/3T3 a los portamuestras_{PMMA-AGM} se realiza mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Las células se incuban a una densidad de 5×10^3 células/portamuestras_{PMMA-AGM} durante 24, 48 y 72 horas.

La figura 6.10 muestra los resultados de la adherencia de las células en los portamuestras_{PMMA-AGM}. El porcentaje de viabilidad celular procedente de la adherencia es de 83.92 a las 24 horas y, una disminución no significativa se observa a las 48 horas (81.13%). No obstante, se observa un disminución significativa a las 72 horas (70.39%).

Figura 6.10. Adherencia celular en los portamuestras_{PMMA-AGM}. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24, 48 y 72 horas en los portamuestras_{PMMA-AGM}. Los datos representan la cuantificación de la adherencia celular. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=3 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

6.2.5.3. Viabilidad celular después de la incubación con SPIONs

La evaluación de la biocompatibilidad de las SPIONs de magnetita (Fe_3O_4) incubadas durante 24 horas en células NIH/3T3 se ha realizado mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Se utiliza una suspensión de nanopartículas con núcleo de hierro desnudas (14 nm) y medio de cultivo a concentraciones de 1 y 2.5 mg/mL. Los resultados del ensayo (Figura 6.11) revelan que el porcentaje de viabilidad durante la incubación de SPIONs a una concentración de 1 mg/mL (93.03%) en comparación con la células control (99.29%) no afecta significativamente a la viabilidad de las células 3T3. Para una concentración de 2.5 mg/mL, se observa una reducción en la viabilidad celular (88.57%) con respecto al control. Esta diferencia de la viabilidad con respecto al control es 10.72% (Figura 6.11A-D). En general, la incubación de células 3T3 con SPIONs no perjudicó la viabilidad celular. Los resultados sugirieron que los niveles de acumulación de hierro resultantes de la incubación con las SPIONs no indujeron toxicidad celular aguda en el tiempo y las concentraciones analizadas. Resultados acordes encontrados en informes anteriores indican que, las nanopartículas de óxido de hierro han sido biocompatibles con células 3T3 (Safi y col., 2010; Lewinski y col., 2008; Singh y col., 2009).

Figura 6.11. Viabilidad de células NIH/3T3 incubadas con SPIONs. Imágenes de microscopía de fluorescencia para el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas durante 24 horas con SPIONs de 14 nm a 0 (A), 1 mg/mL (B) y 2.5 mg/mL (C). Barra de escala= 50 μm . (D) Representa la cuantificación de la viabilidad celular para cada condición. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=4 experimentos independientes. * $p < 0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

6.2.5.4. Tiempo de vida celular fuera del incubador

La viabilidad de las células NIH/3T3 incubadas con SPIONs en portamuestras_{PMMA-AGM} durante 24 horas y posteriormente situadas fuera de su entorno idóneo de humedad y temperatura durante diferentes periodos de tiempo (Figura 6.12), se realiza mediante el ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP). Los portamuestras_{PMMA-AGM} que contienen las células cultivadas con SPIONs se retiran del incubador, se sellan con parafilm y se exponen a condiciones externas de temperatura ambiente durante un periodo de 0.5, 1 y 2 horas en el cual se lleva a cabo la caracterización del comportamiento magnético mediante el AGM. Al finalizar la caracterización magnética, se realiza el ensayo de doble tinción.

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de viabilidad celular de las células 3T3 fuera del incubador durante un periodo de media hora (86.74%) en comparación con las expuestas a las mismas condiciones ambientales externas durante 1 hora (84.51%) no afecta significativamente a la viabilidad de las células 3T3. Sin embargo, una reducción en la viabilidad celular se observa en las células 3T3 expuestas durante 2 horas (75.32%) a las mismas condiciones ambientales (Figura 6.12). En general, la exposición de los cultivos celulares 3T3 a condiciones ambientales externas (25°C) no perjudicó significativamente a la viabilidad celular en un tiempo no superior a 1 hora. Vale la pena mencionar que la caracterización del comportamiento magnético se realiza en un tiempo inferior a 1 hora.

Figura 6.12. Porcentaje de viabilidad celular respecto al tiempo de vida fuera de las condiciones ambientales óptimas de crecimiento celular. Ensayo de doble tinción de calceína-AM/Ioduro de Propidio (IP) realizado en células 3T3 incubadas con SPIONs durante 24 y posteriormente expuestas a condiciones ambientales externas durante 0.5, 1 y 2 horas. Los datos representan el porcentaje de viabilidad celular para en los diferentes tiempos. Cada valor indica la media $\pm$ SEM de $n=4$ experimentos independientes. * $p<0.05$; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

6.2.5.5. Localización intracelular de las SPIONs

La localización celular de las SPIONs de magnetita 14 nm se determina mediante microscopía de fluorescencia usando una tinción de lisosomas con sustratos fluorogénicos. Los resultados experimentales muestran que cuando las células NIH/3T3 se incuban con SPIONs durante 24 horas, la mayoría de las nanopartículas son internalizadas por las células y acumuladas en las vesículas intracelulares, especialmente en los lisosomas, según se determina por microfluorescencia usando un

marcador fluorescente específico para etiquetar lisosomas. Como se observa en la figura 6.13, la presencia de SPIONs, visualizadas bajo transmisión de luz como puntos negros (Figura 6.13A), muestra una acentuada localización con el marcador fluorescente de lisosomas (Figura 6.13B), lo que indica que la mayoría de las SPIONs se almacenan en las células dentro de estos orgánulos (Figura 6.13C).

Figura 6.13. Localización intracelular de SPIONs de 14 nm de tamaño en células NIH/3T3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de SPIONs de 14 nm sin recubrimiento. Las nanopartículas han sido incubadas en células NIH/3T3 durante 24h. Las SPIONs se muestran bajo transmisión de luz (A). Las células se tiñen con un marcador específico para lisosomas (B). Barra de escala= 50 μ m.

6.2.5.6. Análisis del magnetismo de las SPIONs dentro de las células NIH/3T3

Para demostrar que las partículas magnéticas internalizadas en orgánulos celulares, como lisosomas, inducen cambios en su comportamiento magnético, se incuban SPIONs de 14 nm de diámetro en células NIH/3T3 durante 24 horas y se compara la magnetización obtenida a través de las mediciones de los ciclos de histéresis (M-H) cuando las nanopartículas se encuentran en el interior celular y posteriormente, cuando

ellas han sido liberadas de las células mediante procesos bioquímicos y mecánicos (tripsinización y sonicación respectivamente).

La figura 6.14 muestra los valores del comportamiento magnético de SPIONs dentro de las células 3T3 y una vez que son liberadas. Se observa una disminución en el valor de la magnetización de aproximadamente $6.31 \text{ Am}^2/\text{kg}$ (aproximadamente 14.2%) cuando las nanopartículas están internalizadas en las células en comparación con el valor de la magnetización obtenido cuando las mismas SPIONs están fuera del entorno celular, es decir en suspensión libre.

Figura 6. 14. Comparación del comportamiento magnético de SPIONs internalizadas en células NIH/3T3 y fuera del interior celular. Comportamiento magnético de SPIONs de 14 nm incubadas en células NIH/3T3 durante 24 horas. Se llevan a cabo las mediciones de las curvas de histéresis (M-H) cuando las SPIONs están internalizadas en los orgánulos celulares y posteriormente cuando son liberadas de las células. Cada valor representan la media $\pm$ SEM de n=6 experimentos independientes. *p<0.05; (ANOVA, contraste post-hoc de Tukey).

6.2.5.7. Curva de calibración

Para determinar la variación de la respuestas magnética de una suspensión de SPIONs en Trypsin-EDTA como función de la concentración, se determina el momento magnético de concentraciones crecientes de SPIONs que van desde 0.05 mg/mL hasta 2.5 mg/mL. Con estos datos se realiza una curva en la que la variable independiente es

la masa conocida de las SPIONs en las disoluciones y, la variable dependiente es el momento magnético medido (Figura 6.15). Esta curva permite cuantificar la masa (que es la misma cantidad) para las SPIONs cuando están internalizadas en las células y para las SPIONs cuando son liberadas de ellas (procedimiento descrito en la sección 6.1.3.9).

Con este valor de masa es posible determinar la magnetización de las SPIONs cuando están internalizadas y cuando son liberadas de las células NIH/3T3.

Así mismo, mediante la curva de calibración es posible determinar la cantidad de material magnético por célula. Este valor se estimó en 145 pg después de 24 horas de incubación.

Figura 6.15. Curva de calibración para una suspensión de SPIONs y Trypsin-EDTA a diferentes concentraciones. Curva de masa vs. momento magnético de una suspensión de SPIONs y Trypsin-EDTA en función de la concentración de nanopartículas. Se emplean concentraciones crecientes de SPIONs que van desde 0.05 mg/mL hasta 2.5 mg/mL.

La tabla 6.1 presenta la comparación de los resultados más relevantes obtenidos de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes (agua desionizada y soluciones de fibroína) y de las SPIONs en los cultivos celulares NIH/3T3.

En la tabla 6.1 se puede observar que el error estándar de la media (SEM) de la magnetización de las SPIONs liberadas de las células ($0.08 \text{ Am}^2/\text{kg}$) es menor que la magnetización de las SPIONs internalizadas ($1.44 \text{ Am}^2/\text{kg}$). Esto se debe a que el valor de la masa se obtuvo a partir de la curva de calibración de las suspensiones de SPIONs y Trypsin-EDTA el cual es un ambiente semejante a las SPIONs liberadas de las células.

El test de ANOVA indicó que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre el valor de la magnetización cuando las SPIONs están internalizadas en las células y cuando están suspendidas en la solución de fibroína que imita la viscosidad media del citoplasma (4.12 mPa.s).

Tabla 6.1. Valores de la magnetización de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes e internalizadas en cultivos celulares NIH/3T3.

Muestra	Magnetización (M) [Am^2/kg]		
	Concentración 0.05 mg/mL	Concentración 2.5 mg/mL	Concentración 10 mg/mL
SPIONs y Fibroína $\eta=3.31\text{mPa.s}$	40.60 $\pm$ 0.45	55.14 $\pm$ 0.11	59.63 $\pm$ 0.19
SPIONs y Fibroína $\eta=4.12\text{mPa.s}$	39.20 $\pm$ 0.42	54.40 $\pm$ 0.08	58.36 $\pm$ 0.15
SPIONs y Fibroína $\eta=7.97\text{mPa.s}$	36.86 $\pm$ 0.50	53.33 $\pm$ 0.05	55.47 $\pm$ 0.08
SPIONs internalizadas en células NIH/3T3	38.02 $\pm$ 1.44	-	-
SPIONs no internalizadas en células NIH/3T3	44.33 $\pm$ 0.08	-	-

CAPÍTULO

7

Discusión

*“En el campo de la ciencia aprendemos cuán
grande es la extrañeza del mundo”
-J.Robert Oppenheimer*

7. DISCUSIÓN

En este capítulo se detalla la interpretación y el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación. Se comentará a través de dos secciones, la relación entre las observaciones realizadas en este trabajo de investigación y los resultados encontrados en la literatura. La sección 7.1 corresponde a la discusión del estudio de la caracterización de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo y la sección 7.2 la correspondiente al estudio de la influencia de la viscosidad del medio, el ambiente celular y la concentración de las nanopartículas magnéticas en su magnetismo.

7.1. Estudio de la caracterización de nanopartículas magnética en tejidos ex-vivo

7.1.1. Dosis de nanopartículas magnéticas inyectada en ratones C57/BL6

Los resultados obtenidos del estudio de la bioacumulación de NPMs de 50 nm con cubierta de dextrano para determinar la biodistribución a lo largo de 1 mes señalan que, la dosis administrada (4 μg NPMs/g peso del animal) es detectable mediante magnetometría y relajometría en los tejidos y, en las muestras de sangre y orina extraídas post mortem.

Algunos estudios que evalúan los efectos citotóxicos de las nanopartículas magnéticas confirman que la dosis letal que induce toxicidad aguda mediante las nanopartículas de óxido de hierro basadas en dextrano es de 5 g/kg (Brusentsov y col., 2004), la cual es superior a la dosis utilizada en esta experimentación (sección 4.1.1.). Así mismo, Jeng y

col., (2006) señalan que los efectos citotóxicos observados por la exposición de estas nanopartículas ocurre a concentraciones superiores a 100 µg/mL.

En cuanto al recubrimiento de las nanopartículas magnéticas, algunos estudios que han evaluado la toxicidad potencial que provocan las nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano confirman que este tipo de NPMs, independientemente del tamaño, no disminuye la viabilidad celular. De hecho, la viabilidad celular es superior en los cultivos celulares donde se utilizan NPMs recubiertas con dextrano frente a las nanopartículas de óxido de hierro sin recubrimiento (Jordan y col., 1996).

7.1.2. Estudio de magnetometría

La homogeneidad de las muestras extraídas se analiza con el test de ANOVA. Los resultados del test de los datos de la magnetización (M) demostraron que las NPMs no estaban homogéneamente distribuidas en las muestras de sangre a 0.5 horas y orina a 24 horas. Sin embargo, los valores de magnetización entre muestras del mismo tipo fueron similares entre sí. La inhomogeneidad encontrada en las muestras de sangre (0.5 horas) y orina (24 horas) es causada principalmente por la insuficiente agitación de la muestra.

El análisis de los datos obtenidos a través los valores de la magnetización (M) sugiere que una mayor cantidad de NPMs se detecta en la sangre media hora después de la administración de la dosis. Sin embargo, después de las primeras 24 horas el valor de M disminuye a un valor cercano al control. Esto indica que las NPMs han sido metabolizadas, excretadas o distribuidas a los diferentes órganos de los especímenes.

Transcurridas 24 horas desde el momento de la inyección, se detecta acumulación de NPMs en las muestras de orina, pulmón, hígado y bazo. En este periodo de tiempo, la mayor acumulación se presenta en la orina, sugiriendo así una mayor cantidad de NPMs excretadas a través del riñón. Así mismo, después de una semana de la inyección, las NPMs se siguen detectando en la orina, pulmón, hígado y bazo según indica la figura 4.6.

La interpolación de los datos señala acumulación de NPMs en los tejidos mencionados anteriormente 14 días después de la administración de la dosis. Sin embargo, Múzquiz-Ramos y col., (2013), encontraron que las NPMs de magnetita (8 ± 2 mm de diámetro) cubiertas con apatita no se mantuvieron en el hígado tras dos semanas de administrada la dosis. Los autores mencionan que la acumulación de hierro en el hígado ocurre durante las primeras horas después de la administración de la dosis y, la biodegradación

de las nanopartículas puede ocurrir sobre un periodo de una semana. La diferencia de resultados puede ser debido al tamaño, el recubrimiento y la cantidad de nanopartículas administrada (2.5 µg NPMs/ g peso del animal) que los autores emplean en su experimentación en comparación con las nanopartículas y la dosis utilizada en esta tesis doctoral.

Después de 1 mes de administrada la inyección, la acumulación de nanopartículas es observada en el pulmón y el bazo (Figura 4.6). Sin embargo, en este periodo de tiempo no se detectan NPMs en el hígado ni en la orina sugiriendo que las NPMs acumuladas en el hígado se metabolizaron o excretaron progresivamente a través del riñón.

Los resultados de la cinética de biodistribución de las NPMs en los tejidos mediante la técnica de magnetometría (sección 4.2.1) se pueden observar en la figura 4.6. De manera general, este estudio sugiere que en el transcurso de un mes, las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro de 50 nm con cubierta de dextrano se acumulan en el pulmón y en el bazo. Sin embargo, se requiere un estudio a largo plazo para conocer el destino final o eliminación de las NPMs.

Estudio de biodistribución mediante magnetometría AGM y espectroscopía ICP-MS

Hasta la fecha se ha reportado un sólo estudio de biodistribución de NPMs utilizando el AGM. En dicho estudio, Jain y col., (2008) utilizan nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) de 11 nm cubiertas de ácido oleico y Plurónico y tamaño hidrodinámico de 193 nm en ratas de experimentación empleando una dosis de 10 mg Fe/kg peso del animal. Los animales son sacrificados y sus órganos (bazo, cerebro, corazón, hígado, pulmón y riñón) son extraídos en diferentes puntos de tiempo durante 3 semanas. Los tejidos son analizados con un AGM y una espectroscopía de masas por plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Las muestras analizadas con el AGM (hígado, riñón y bazo) se liofilizan y se sellan con parafina. Los autores observan una disminución gradual en la magnetización 1 semana después de la administración de la dosis. Por consiguiente, sugieren que la disminución podría ser causada por la biodegradación de las nanopartículas por parte de las células Kupffer del hígado que pueden degradar las nanopartículas de óxido de hierro e incorporar la mayor parte de éstas a la ferritina (Briley-Saebo y col. 2004). Además, los autores observan variaciones en los valores de la magnetización de los tejidos. Es posible que la liofilización y el tratamiento de la muestra con parafina afecten la señal

magnética. Aunque el proceso de sellado no es claro, se puede percibir que el tratamiento con parafina se realiza con el fin de obtener una muestra sólida capaz de ser medida en el AGM. Si las NPMs dentro de los tejidos poseen una señal magnética muy débil (debido a la biodistribución de las NPMs en el cuerpo), la señal diamagnética de la parafina no será despreciable. Por consiguiente, es necesario realizar medidas independientes del portamuestra, la muestra control y la parafina con el fin de eliminar estas señales en el procesamiento de los datos. Por otro lado, la variación observada en los valores de magnetización en los tejidos podría ser debido a la distribución heterogénea de las NPMs en los órganos y/o a la falta de homogenización de las muestras antes de las mediciones. Como técnica de apoyo, los autores utilizan una ICP-MS detectando niveles de hierro en todos los órganos estudiados tres semanas después de ser administrada la inyección.

Comparando los resultados del ICP-MS de Jain y col., (2008) con los obtenidos en esta tesis doctoral mediante magnetometría (sección 4.2.1) cuando los datos son interpolados a las tres semanas de ser administrada la dosis (Figura 4.6), indicaría acumulación de NPMs en el pulmón, bazo y orina pero no en el hígado. Por otro lado, Jain y col., (2008) señala que el nivel de hierro en el cerebro aumenta progresivamente después de 1 semana de la inyección. Este aumento podría ser causado por el hierro liberado de las NPMs degradadas y transportado por la Transferrina, la cual sirve como sistema de transporte del hierro a células y tejidos. Por lo tanto, el incremento detectado por Jain y col., (2008) podría ser debido a la unión hierro-Transferrina que penetra la barrera hematoencefálica (BHE). Sin embargo, los resultados de esta tesis doctoral no señalan aumento de hierro en cerebro durante el estudio. Esta diferencia podría ser causada por el tipo de nanopartículas y la dosis empleada por Jain y col., (2008) en su experimento.

Estudio de biodistribución mediante Resonancia Ferromagnética, espectroscopía ICP-OES y magnetometría SQUID

La técnica espectroscópica de Resonancia Ferromagnética (FMR), la espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) y la magnetometría mediante un SQUID han sido utilizadas para estudiar la biodistribución de NPMs de maghemita (8nm) cubiertas con glucosa hidrofílica (Lévy y col., 2011a) en ratones. Los resultados del FMR revelan que se observa una disminución significativa en los niveles de NPMs en el bazo y el hígado tras 90 días de la administración de la dosis (50 $\mu\text{mol/kg}$), sin embargo, no hay una eliminación completa de la misma. A pesar de la alta

sensibilidad de la ICP-OES, esta técnica por sí sola no es capaz de determinar la cantidad de hierro endógeno de la inyección exógena. Por consiguiente, ésta compara la concentración total de hierro en los órganos de la concentración de las NPMs administradas y cuantificadas por el FMR debido a que el FMR proporciona una medida de la cantidad de NPMs en una muestra. La utilidad del FMR y el ICP-OES resulta imprescindible si se desea averiguar la degradación y biotransformación de las NPMs a lo largo del tiempo.

Los resultados del FMR obtenidos por Lévy y col., (2011a) indican que 30 días después de ser administrada la inyección se detectan niveles de hierro exógeno en el hígado y el bazo (2.5% de la dosis administrada) y, finalizado los 90 días sólo detectan niveles de hierro en el bazo. En cuanto al SQUID, las medidas reportadas por estos autores confirman que transcurrido 90 días de la administración de la dosis, la acumulación de NPMs en el bazo es mayor que en el hígado.

Los resultados obtenidos mediante magnetometría AGM en esta tesis doctoral (sección 4.2.1) señalan acumulación de hierro en el bazo después de 1 mes de la administración de la dosis. Sin embargo, en el hígado a 1 mes no es posible detectar acumulación de NPMs. Es posible que la diferencia del resultado en la muestra de hígado encontrado por Lévy y col., (2011a) con el obtenido en esta tesis doctoral sea debido a que Lévy y col., (2011a) emplearon dispositivos más sensibles y específicos (FMR y SQUID) y administraron una cantidad de dosis de NPMs superior (11.55 mg Fe/kg) a la empleada en esta tesis.

Estudio de biodistribución mediante magnetometría VSM y espectroscopía ICP-AES

Jaiswal y col., (2014) emplearon un Magnetómetro por Muestra Vibrante (VSM) en conjunto con la técnica espectrométrica (ICP-AES) para estudiar la biocompatibilidad y biodistribución de nanohidrogeles de magnetita (250 nm) cubiertas con quitosan inyectados en ratones. Sus resultados revelan que después de administrada la dosis, la cantidad de hierro disminuye gradualmente sin eliminarse por completo del pulmón, el bazo y el hígado al final del estudio (2 semanas). Sin embargo, en el cerebro y el riñón no se detecta acumulación de hierro. Los hallazgos encontrados Jaiswal y col., (2014) revela resultados similares a los encontrados en nuestra investigación (Figura 4.6), cuando interpolamos los datos a dos semanas. Sin embargo, el tamaño de las

nanopartículas, el recubrimiento, la dosis administrada y las técnicas empleadas para su detección son diferentes en nuestro experimento.

Estudio de biodistribución mediante un medidor de susceptibilidad magnética

Okon y col., (1994), reportan un estudio de biodistribución y metabolismo realizado en ratas de experimentación empleando nanopartículas de magnetita (10 nm) cubiertas con dextrano. Después de administrada la dosis (2 mg Fe/ kg peso del animal), las ratas se sacrifican en diferentes espacios tiempo durante 14 días. El bazo se analiza por histología y a través de un medidor de la susceptibilidad magnética (Barlington Instruments) con un sensor tipo MS2B operando a una frecuencia de 0.5 KHz. La susceptibilidad magnética inicial del bazo disminuye drásticamente durante el primer día y luego más lentamente hasta el día 14 después de la inyección conservando una ligera acumulación de hierro. El estudio histológico del bazo se realiza mediante tinción por hematoxilina-eosina mostrando numerosas características granulares marrones en el citoplasma de los macrófagos localizados. Aunque el tamaño de las NPMs y la dosis administrada de dicho estudio son diferentes a las empleadas en el nuestro, los resultados del bazo encontrados en nuestra experimentación (Figura 4.6) se correlacionan los de Okon y col., (1994).

7.1.3. Estudio de relajometría

El análisis de datos del tiempo de relajación longitudinal (T1) de las NPMs en los tejidos ex-vivo (Figura 4.7) revela que la cinética de las NPMs dentro del organismo es similar a la obtenida por la técnica de magnetometría (Figura 4.6) verificando la congruencia entre las dos técnicas. La acumulación de NPMs tras 1 mes de administrada la dosis, es detectada en las muestras de bazo y pulmón. Aunque las muestras de orina y cerebro no son caracterizadas mediante relajometría debido a la cantidad de muestra requerida para su medición, la concordancia entre estas dos técnicas avalan los resultados obtenidos con el AGM cuando se caracterizan las NPMs presentes en los tejidos biológicos utilizando una pequeña cantidad de muestra (5µl).

Estudio de biodistribución mediante un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear

Otros estudios sugieren el uso de otras técnicas de detección de NPMs y obtienen diversos resultados. El espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ha sido utilizado para estudiar la biodistribución de NPMs de óxido de hierro de 80 nm con

recubrimiento de dextrano (AMI-25) en ratas de experimentación (Weissleder y col., 1989). Los órganos estudiados (hígado, bazo, pulmón, cerebro y riñón) se analizan a través de la medida del tiempo de relajación trasversal (T2) y mediante estudios histológicos. Los resultados obtenidos por Weissleder y col., (1989) indican acumulación de NPMs en el hígado y el bazo dentro de las 4 horas siguientes a la administración de la dosis (18 $\mu\text{mol/kg}$). Posteriormente, la acumulación de hierro disminuye gradualmente por lo que, los valores de T2 para hígado y el bazo retornan a los valores normales basales 30 días después de administrada la inyección. Además, no señalan cambios significativos de T2 en las muestras de pulmón, riñón y cerebro a lo largo del estudio (90 días). El estudio histológico de los autores reveló que en el parénquima hepático no se evidencia cantidades incrementadas de hierro 16 días después de administrada la dosis, indicando biodegradación.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral mediante magnetometría (sección 4.2.1) y relajometría (sección 4.2.2) indican que 1 mes después de ser administrada la dosis se detecta acumulación de NPMs en el pulmón y el bazo. Al igual que en el estudio de Weissleder y col., (1989), nuestros resultados (Figuras 4.6 y 4.7) no indican acumulación de NPMs en el hígado a 1 mes y en el cerebro durante todo el estudio.

Lacava y col., (2002) estudiaron la biodistribución de NPMs de magnetita (9.4 nm) con cubierta de dextrano en ratones empleando una dosis de 100 μL mediante Resonancia Magnética (RM). De los órganos analizados (hígado, bazo, pulmón, corazón, cerebro, páncreas y riñón), el resultado en sangre indica la eliminación completa de las NPMs a los 90 minutos. Sin embargo en el hígado y en el bazo se detecta acumulación de hierro en el mismo espacio de tiempo. El resto de los órganos no muestran señal de resonancia durante el tiempo analizado. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral señalan acumulación de NPMs en sangre a los 30 y 60 minutos después de aplicada la dosis (Figuras 4.6 y 4.7). Sin embargo, para el resto de los tejidos no se estudió la acumulación de NPMs en esta ventana de tiempo.

Schlachter y cols., (2011) analizaron la biodistribución de SPIONs en diferentes órganos mediante la relajometría IRM y el análisis histológico después de una implantación de nanopartículas de maghemita (15 nm sin recubrimiento) contenidas en un parche a diferentes concentraciones (0.01 $\mu\text{g/mL}$ a 5 mg/mL). Los órganos de las ratas de experimentación se analizaron en diferentes periodos de tiempo durante 6 meses. Los resultados de T2 señalan que después de 1 y 6 meses de administrada la

dosis no se detecta acumulación de nanopartículas en los riñones, el hígado o el núcleo caudado. En cuanto al análisis histológico, los autores indican que ninguno de los órganos estudiados (cerebro, hígado y bazo) mostró evidencia directa de excesiva acumulación de hierro o alteraciones de los tejidos debido a sobrecarga de hierro.

Los resultados reportados por Schlachter y cols., (2011) difieren de los hallazgos encontrados en nuestro estudio (Figura 4.6 y 4.7) probablemente causados porque los implantes que contienen las nanopartículas no inducen cambios estructurales en los órganos analizados.

7.1.4. Estudio histológico

El resultado del análisis histológico (sección 4.2.3) muestra acumulaciones de NPMs visibles en el bazo tras 1 mes de administrada la dosis (Figura 4.8B), donde aparecen diseminadas por todo el tejido (señaladas con flechas). Además, se puede observar un cambio de color significativo en el tejido en comparación con el bazo control (Figura 4.8A). En el resto de órganos, las NPMs no son apreciables al microscopio. El resultado de la histología del bazo está en correspondencia con el estudio histológico de Okon y col., (1994).

En general, los resultados de la acumulación de las NPMs señalan que tales nanopartículas se excretan, metabolizan o acumulan en el pulmón y el bazo al finalizar el estudio (1 mes). A pesar de que el estudio histológico indica que la dosis de nanopartículas administrada (4 µg Fe/g de peso del animal) no produce daños tisulares que revele toxicidad de las nanopartículas, algunos estudios previos han mostrado toxicidad. Hanini y col., (2011) señalan que al administrar 0.8 mg/kg de nanopartículas (10nm de diámetro) en ratas, las nanopartículas puede provocar daño celular en el hígado, los pulmones y el riñón. Sin embargo, Schlachter y cols., (2011) indican que tras administrar una dosis de 1.53 mg/g de nanopartículas (15 nm de diámetro) en ratas, no se encontró acumulación de nanopartículas o alteraciones histológicas en el cerebro, el bazo o el hígado transcurrido 6 meses de la administración de la dosis.

Las diversas diferencias que se encuentran con los estudios de bioacumulación previos están relacionadas con las propiedades de las NPMs incluyendo el material, el diámetro y el recubrimiento de las NPMs, la concentración de la dosis administrada y los periodos de tiempo analizados después de la inyección. En consecuencia, los resultados discordantes encontrados en los diferentes estudios guardan relación con las variables

mencionadas anteriormente. Dichas variables son importantes en el estudio de la biodistribución, la bioacumulación y en el desarrollo de un posible efecto citotóxico. Por lo anterior, es importante realizar estudios de la biodistribución, metabolización y eliminación de NPMs *in vivo* y a largo plazo, empleando un amplio rango de diámetros, recubrimientos, dosis de nanopartículas y periodos de tiempo tras la administración de la inyección. El uso de diversas técnicas de detección de NPMs, un protocolo de medidas y un tratamiento adecuado de las muestras son herramientas de vital importancia para el establecimiento de conclusiones relativas al destino final de las NPMs.

7.2. Influencia de la viscosidad del medio, el ambiente celular, la concentración y agregación de las SPIONs en su magnetismo

7.2.1. Nanopartículas de óxido de hierro

Esta sección describe los resultados provenientes de la caracterización de la estructura, el tamaño y la morfología de las nanopartículas empleadas para este experimento. Un patrón típico de difracción de rayos X (Figura 6.1A) indica que las nanopartículas en polvo son monofásicas con una estructura de espinela cúbica inversa de Fe_3O_4 (magnetita). La imagen TEM (Figura 6.1B) revela que las nanopartículas son esféricas y tienen un tamaño uniforme de aproximadamente 14 ± 3 nm. El diámetro determinado por la imagen TEM coincide con el calculado por la imagen de difracción de rayos X indicando que las partículas son altamente cristalinas. Es importante considerar que para aplicaciones biomédicas, las nanopartículas deben tener un tamaño por debajo de 100 nm. Además, para que estas nanopartículas sean superparamagnéticas su tamaño no puede exceder unas pocas decenas de nanómetros (Laurent y col., 2008).

7.2.2. Tamaño hidrodinámico

La distribución del tamaño de las SPIONs dispersadas en agua desionizada y soluciones de fibroína se observa en la figura 6.3. Las nanopartículas suspendidas en agua desionizada presentan un diámetro hidrodinámico (D_H) de aproximadamente 40 nm, sugiriendo una leve tendencia a la agregación de SPIONs. Esta agregación se incrementa en presencia de fibroína ($D_H < 100$ nm). Debido a que el tamaño final es inferior a 100 nm, la fibroína podría ser utilizada como un agente de revestimiento

superficial debido a su biocompatibilidad (Rajkhowa y col., 2011; Zhao y col., 2014; Fernández-García y col., 2016) y a su facilidad de internalización en las células.

7.2.3. Influencia de la viscosidad y concentración de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes

7.2.3.1. Influencia de la concentración en la magnetización de las nanopartículas magnéticas

Los resultados demuestran que el valor de la magnetización (M) de las muestras individuales aumenta a medida que se incrementa la cantidad de SPIONs en el ferrofluido (Figura 6.4). La magnetización de las SPIONs dispersas en fluidos no es linealmente dependiente de la concentración de partículas magnéticas, lo cual indica la presencia de interacciones entre las partículas y la formación de clústers (Skumiel y col., 2003). El incremento de la concentración de partículas favorece las interacciones magnéticas dipolares, lo que conduce a una modificación significativa de su relajación magnética y por consiguiente a una disminución en la señal de contraste (Lévy y col., 2012), en la magnetización y en la eficiencia de calor (Chantrell y col., 2000; Haase y col., 2012; Lévy y col., 2011b; Di Corato y col., 2014). La presencia de interacciones dipolares entre las partículas es indicada por la normalización de las curvas de magnetización (Van Ewijk y col., 2002).

Las figuras 6.6 y 6.7 muestran las curvas de magnetización normalizadas (M/M_s vs H) en función de la concentración (tomadas a temperatura ambiente) revelando el efecto de la interacción dipolar de los momentos magnéticos de las NPMs en una suspensión y cuando las nanopartículas están en fase sólida (inmóviles).

En la región de campo magnético débil ($H < 10$ kA/m), la susceptibilidad inicial es mayor para suspensiones con baja concentración de NPMs (Figura 6.6, línea verde) que para suspensiones con alta concentración de nanopartículas (Figura 6.6, línea azul) y en fase sólida (Figura 6.6, línea negra). Esto es debido a que los momentos magnéticos de las nanopartículas se alinean con más facilidad al campo magnético externo aplicado cuando las NPMs están inmersas en suspensiones de menor concentración.

Este hecho sugiere que a medida que aumenta la concentración del material magnético en el ferrofluido, la alineación de los momentos magnéticos de las nanopartículas a lo largo del campo externo se ve obstaculizada debido a la escasa distancia interpartícula

(Hansen y col., 1998; García-Otero y col., 2000; Ota y col., 2015). Por consiguiente, la interacción de las partículas en polvo o en coloides más concentrados es mayor y la rotación de las partículas es inhibida. Considerando el caso contrario, cuando la concentración del material magnético disminuye, la distancia entre las partículas es más grande y las interacciones dipolares se reducen. Por lo tanto, el tiempo de relajación de Brown es corto para bajas concentraciones de NPMs debido al estado rotatorio de las partículas con bajas interacciones dipolo-dipolo.

En la figura 6.7 se observa que en la región del campo débil, existe una similitud en la susceptibilidad magnética inicial de las nanopartículas a una concentración de 2.5 mg/mL suspendidas en agua y soluciones de fibroína (con diferentes viscosidades). Esto indica que a tal concentración, las interacciones dipolares podrían ser despreciables. Sin embargo, cuando las nanopartículas están inmóviles, la susceptibilidad magnética inicial es menor que para las nanopartículas en suspensión. A diferencia de lo que ocurre con nanopartículas fijas, este hecho sugiere la ausencia de las interacciones dipolares de los momentos magnéticos de las nanopartículas suspendidas en los fluidos inertes.

Estos hallazgos coinciden con los datos publicados por Vargas y col., (2005), Urtizberea y col., (2010), Serantes y col., (2010), Salas y col., (2014), Taketomi y col., (2002) y Taketomi y col., (2003). Sin embargo, Taketomi y col., (2002) realizan una interpretación diferente de sus datos asegurando que, de existir interacciones entre los dipolos magnéticos de las partículas, los momentos magnéticos se orientarían fácilmente en la misma dirección del campo magnético. En consecuencia, la susceptibilidad magnética inicial debería de ser mayor que para el caso de los ferrofluidos con baja concentración (no interacción). Taketomi y col., (2002) explican que este resultado paradójico se debe a que en dichas muestras deben existir clústers, incluso en campo cero, que no contribuyen a la magnetización del ferrofluido. Además, los autores señalan que al observar las muestras mediante el microscópio óptico, dichos clústers no se formaron en los ferrofluidos cuyos ciclos que histéresis no mostraron diferencias en la susceptibilidad magnética inicial (no interacción).

Algunos modelos teóricos basados en métodos Monte Carlo (Chantrell y col., 1980; Chantrell y col., 1982; Serantes y col., 2010) han investigado los efectos de las interacciones dipolares corroborando los resultados experimentales expuestos en esta tesis doctoral. Sin embargo, Serantes y col., (2014) presentan un análisis experimental y teórico de los ciclos de histéresis en ensambles de nanopartículas magnéticas de acople

dipolar en función de la longitud, la geometría y la orientación de la anisotropía magnética de nanopartículas de magnetita de 44 nm. Este modelo señala que las interacciones dipolares más fuertes, es decir un número más grande de partículas, producen pendientes M-H más pronunciadas (susceptibilidades y coercitividades más grandes). Esta discordancia con su investigación anterior (Serantes y col., 2010) es consecuencia de la propia formación de cadenas de nanopartículas que favorecen el alineamiento longitudinal de los ejes fáciles magnetocristalina durante el establecimiento de las cadenas.

Resultados contrarios a los encontrados en esta tesis doctoral son descritos en la publicación de Skumiel y col., (2003). Los autores señalan que la susceptibilidad magnética inicial es mayor cuando la concentración de nanopartículas es mayor. Esta afirmación estaría de acuerdo con lo expresado por Taketomi y col., (2002) y Serantes y col., (2014).

El estudio de Ota y col., (2015) concluye que la magnetización (M) de un conjunto de NPMs fijas con un epoxy es menor que el valor de M producido por la misma concentración de nanopartículas (37 mg/mL) en un fluido. Cuando las nanopartículas están fijas no existe rotación física de las mismas (relajación de Brown), por lo que la magnetización se debe sólo a la rotación del vector o momento magnético dentro de la partícula (relajación de Néel). Por el contrario, la magnetización de las nanopartículas suspendidas en fluidos de baja viscosidad es causada por la rotación del momento magnético interno y de las nanopartículas. Sin embargo, en nuestros resultados experimentales, el valor de M para la muestra de 10 mg/mL en agua desionizada ($64.07 \text{ Am}^2/\text{kg}$) es ligeramente menor que la M producida por la misma muestra en fase sólida ($65.59 \text{ Am}^2/\text{kg}$). Este último valor podría ser sutilmente superior debido a las minúsculas gotas de material magnético (no cuantificable) que quedaron adheridas en el parafilm cuando fue extraído de los portamuestras con el fin de secar la muestra. Por lo tanto, este resultado contradictorio podría ser causado por la formación de estructuras (clústers no visibles) en el ferrofluido que no contribuyen en la magnetización global del material. Esta formación de clústers puede ser más propensa a producirse en nanopartículas sin recubrimiento. El recubrimiento de las nanopartículas puede minimizar o evitar tal aglomeración.

7.2.3.2. Influencia de la viscosidad en la magnetización de las nanopartículas magnéticas

Respecto a la viscosidad del fluido, los resultados señalan que el magnetismo de las nanopartículas en el seno de un fluido es influenciado por la viscosidad del líquido portador, indicando que la magnetización disminuye significativamente con el incremento de la viscosidad (η).

La figura 6.4 señala que la pérdida de magnetización es más pronunciada en las muestra con mayor viscosidad (fibroína $\eta=7.97$ mPa.s) que en las de menor viscosidad (agua desionizada $\eta=1$ mPa.s). La disminución de la magnetización del ferrofluido generada por el incremento en la viscosidad del líquido ha sido observada y reportada en los estudios de Li y col., (2014) y Jeun y col., (2013). Este resultado es consecuencia de la reducción del movimiento Browniano de las partículas debido al incremento de la viscosidad del fluido que induce la agregación y formación de anillos (Blanco-Mantecon y col., 2006; Li y col., 2014) o micelas de forma alargada (Taketomi y col., 2011) entre las partículas. Las nanopartículas inmersas en fluidos viscosos de baja viscosidad y en el seno de un campo magnético suficientemente alto, estos anillos pueden romperse y formar cadenas cortas en la dirección del campo (Jund y col., 1995; Kun y col., 2001) que contribuyen a la magnetización (Taketomi y col., 2002; Gao y col., 2012). Sin embargo, la alta viscosidad del medio líquido impide que los anillos se muevan fácilmente disminuyendo la probabilidad de su rotura. Estos anillos o agregados existen bajo campo magnético externo cero y no contribuyen a la magnetización del ferrofluido (Li y col., 2014).

En la figura 6.4B se puede observar que la forma de las curvas de magnetización (M-H) no se saturan en la región del campo magnético alto ($H=8.0E^5$ A/m). Esta apariencia es típica de las nanopartículas inmersas en un fluido, las cuales se comportan como diminutos magnéticos con un eje de anisotropía orientado al azar con respecto a la dirección del campo magnético externo o vector magnetización (Odenbach, 2003; Poperechny y col., 2010; Mehdaoui y col., 2013; Salas y col., 2014). Por consiguiente, el ángulo (θ) entre el eje fácil de anisotropía y el vector de magnetización tiene un valor finito en las soluciones donde las SPIONs están casi inmovilizadas (Salas y col., 2014). Este efecto se puede notar en los resultados de las curvas de magnetización provenientes de las nanopartículas suspendidas en soluciones de fibroína.

Por el contrario, para sistemas de partículas inmersas en fluidos menos viscosos donde pueden rotar con mayor libertad, la baja viscosidad favorece el alineamiento entre el eje de fácil imanación y la dirección del campo magnético ($\theta=0$) (Salas y col., 2014). Sin embargo, los resultados de las curvas de magnetización obtenidos de la suspensión de SPIONs en el fluido menos viscoso (agua desionizada) con mayor concentración de nanopartículas (Figura 6.4B línea azul), se observa una inclinación ligeramente más pronunciada que en las muestras con mayor viscosidad (soluciones de fibroína). Este resultado podría ser debido a la formación de anillos los cuales pueden romperse en la región del campo magnético alto y formar pequeñas cadenas que contribuye a la magnetización. Aunque la formación de anillos o cadenas no ha sido observada a simple vista en la experimentación, no es descartada su formación debido a la ausencia de surfactantes en las muestras que evitarían la agregación de las partículas. Resultados similares han sido encontrados en la literatura (Salas y col., 2014; Li y col., 2014).

El componente diamagnético del fluido portador, en algunos casos, podría aportar a la pérdida de la magnetización del ferrofluido (Kim y col., 2001; Soares y col., 2014). Sin embargo, en las soluciones de fibroína y agua desionizada (Figura 6.5), el valor de la señal diamagnética es suficientemente pequeña en comparación con la señal magnética aportada por el ferrofluido. Por consiguiente, la señal diamagnética no afecta significativamente a la magnetización de las nanopartículas suspendidas.

De manera general, se puede concluir que los resultados estuvieron de acuerdo con la teoría clásica que explica la influencia de la viscosidad del medio, la concentración de NPMs y el efecto magnetoviscoso producido por el impedimento de la rotación libre de las partículas debido al torque magnético que alinea sus momentos magnéticos con la dirección del campo. De esta manera, las interacciones magnéticas favorecen o afectan el alineamiento del eje de fácil imanación con el vector de magnetización de las partículas cuando ellas están idealmente libres o idealmente inmovilizadas.

La modulación de la interacción dipolar en relación con la viscosidad del medio de dispersión, el tamaño, la concentración y agregación de las partículas es de gran importancia para controlar y mejorar la generación del calor suministrada por las NPMs para producir hipertermia magnética.

7.2.4. Influencia de la viscosidad en la relajatividad de las SPIONs suspendidas en fluidos inertes

La relajatividad (r_1) en función de la frecuencia de Larmor de SPIONs (14 nm) suspendidas en fluidos inertes (agua desionizada y soluciones de fibroína) a una concentración de 2mM demuestran la relación existente entre la viscosidad y r_1 (Figura 6.8).

A bajas intensidades de campo magnético un incremento en la relajatividad es inducido por la viscosidad del líquido portador que incrementa el tiempo de correlación rotacional y produce una alta relajatividad (Fatin-Rouge y col., 2004). Por el contrario, el incremento en la relajatividad es despreciable a bajas viscosidades. El hecho de que en las muestras de agua y en soluciones de fibroína de baja viscosidad la velocidad de relajación sea menor que en las soluciones de mayor viscosidad indica una alta accesibilidad de las moléculas de agua a la superficie de las SPIONs. Por el contrario, a altas viscosidades, la superficie de las SPIONs está, en parte, protegida contra el agua libre por la matriz de fibroína. Este proceso que implica la accesibilidad del agua libre a la superficie de las partículas es el origen de la dependencia de los valores de relajación en la viscosidad del fluido de la muestra. En consecuencia, a altos valores de viscosidad se obtienen valores más elevados de relajatividad.

7.2.5. Influencia de la internalización de las SPIONs en las células NIH/3T3

Respecto al comportamiento magnético de las nanopartículas en cultivos celulares es necesario señalar que, hasta la fecha, no se tiene conocimiento de investigaciones previas que utilicen un magnetómetro AGM para estudiar la influencia de la internalización celular de nanopartículas magnéticas sobre el magnetismo de las mismas. Menos aún se han encontrado resultados de la viabilidad celular para portamuestras distintos a los que pueden conseguirse en el mercado.

A escala microscópica, las células las cuales poseen un espacio lleno de sustancias químicas (Trepap y col., 2007), son sistemas dinámicos viscoelásticos que bajo ciertos estímulos físicos, pueden desencadenar señalizaciones intermedias y cambiar drásticamente sus condiciones fisicoquímicas (Trepap y col., 2009; Baek y col., 2014).

En la macroescala, otros efectos surgen de las características específicas de los tejidos (regiones tumorales) donde la arquitectura imperfecta de los vasos, presentando vacíos y escaso drenaje, favorece la extravasación de grandes partículas (60 a 400 nm) que son

retenidas dentro (Minelli y col., 2010). Por consiguiente, la heterogeneidad del ambiente celular y el entorno químico variable afectan la eficacia de las aplicaciones biomédicas *in vivo* y debe tenerse en cuenta en el diseño de una aplicación biomédica. Por esta razón, los resultados obtenidos con los cultivos celulares son menos previsibles que aquellos que utilizan "fluidos ideales" o fantasmas. Tales resultados dependen esencialmente de parámetros que surgen de la interacción nanopartícula-célula como el impedimento de los grados mecánicos de libertad de las nanopartículas (rotación y traslación) en medios altamente viscosos y la internalización de éstas en vesículas intracelulares (Etheridge y col., 2014).

Como se detalló en la sección 6.2.5, el primer requisito para realizar este experimento es valorar la biocompatibilidad de las células NIH/3T3 empleando los portamuestras_{PMMA-AGM} y las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro SPIONs (14 nm sin recubrimiento). La línea celular NIH/3T3 se ha utilizado como un modelo celular debido a su fácil proliferación, adquisición y manipulación.

7.2.5.1. Biocompatibilidad celular respecto a los portamuestras_{PMMA-AGM}

Los resultados obtenidos de la evaluación de la biocompatibilidad de la línea celular NIH/3T3 con los portamuestras_{PMMA-AGM} (Figura 6.9A) indican que la incubación de las células en los portamuestras_{PMMA-AGM} no afecta significativamente a la viabilidad celular a las 24 y 48 horas. Sin embargo, a las 72 horas se observa una disminución en la viabilidad celular que podría estar relacionada con la inherente no uniformidad causada en la fabricación de los portamuestras_{PMMA-AGM} y a la densidad inicial de células sembradas, conduciendo a que las células dejen de proliferarse, se despeguen y mueran.

La comparación del porcentaje de viabilidad celular a las 24 horas entre los portamuestras_{PMMA-AGM} y los portamuestras estándar P24 (Figura 6.9B) indica una diferencia aproximada de 10%. Este resultado indica la inexistencia de toxicidad aguda causada por los portamuestras_{PMMA-AGM} durante las primeras 48 horas.

Respecto a la adhesión celular en los portamuestras_{PMMA-AGM} (Figura 6.10), los resultados obtenidos (sección 6.2.5.2) son similares a los de la biocompatibilidad celular (sección 6.2.5.1) en los mismos periodos de tiempo. Una ligera concavidad en el centro del portamuestra_{PMMA-AGM} puede causar que las células se acumulen y, por consiguiente,

las células apiladas no se fijan y mueren ocasionando la disminución en la adherencia celular a las 72 horas.

Considerando que el experimento global, el cual busca estudiar la influencia de internalización celular de las SPIONs sobre su magnetismo, se realiza en un periodo de tiempo no superior a 48 horas, los resultados de la de viabilidad y adhesión celular debido a los portamuestras^{SPMMA-AGM} no afecta significativamente a la viabilidad celular durante el tiempo que dura el estudio.

7.2.5.2. Biocompatibilidad celular respecto a las SPIONs

Los resultados de la biocompatibilidad de las SPIONs incubadas durante 24 horas en las células NIH/3T3 con concentraciones de 1 mg/mL y 2.5 mg/mL (Figura 6.11) indican que el porcentaje de viabilidad celular a la concentración de 1 mg/mL, en comparación con las células control, no afecta significativamente a la viabilidad de las células. Sin embargo, se observa una ligera reducción (5%) de la viabilidad celular respecto a la muestra control para la concentración de 2.5 mg/mL.

Estudios previos sobre la biocompatibilidad de nanopartículas de óxido de hierro incubadas en células 3T3 revelaron resultados similares a los obtenidos en nuestra investigación. Safi y col., (2010) reportan la toxicidad e internalización de nanopartículas de óxido de hierro de 10 nm con concentraciones entre 10 μ M y 50 mM (con y sin recubrimiento) incubadas durante 24 horas en células NIH/3T3. Los autores señalan que la viabilidad celular se mantuvo a un nivel del 100% dentro de la precisión experimental conservando una actividad mitocondrial normal para sus cultivos celulares. Así mismo, Hu y col., (2009) reportan la viabilidad celular de nanopartículas de magnetita cubiertas con dietilenglicol (DEG) y polietilenglicol (PEG) a concentraciones de entre 8.75 mg/mL y 70 mg/mL incubadas durante 24 horas en células NIH/3T3. Los autores indican que la viabilidad celular se mantuvo entre el 90 y el 97%.

Otras investigaciones también han demostrado que las formas cristalinas de óxido de hierro (maghemita y magnetita) son biocompatibles en lo referente a cultivos celulares (Lewinski y col., 2008; Oberdörster y col., 2005; Singh y col., 2009). Sin embargo, Brunner y col., (2006) reportaron toxicidad con este tipo de partículas.

Los estudios previos de la viabilidad celular mencionados anteriormente emplean portamuestras comerciales estándar, idóneos para cultivos celulares. Por el contrario, la

experimentación realizada en esta tesis doctoral utiliza portamuestras específicos (en tamaño y forma) con el objetivo de adaptarlos al dispositivo de medida (AGM).

Comparando los resultados de la viabilidad celular obtenidos en esta tesis doctoral respecto a los estudios previos, se puede inferir que la disminución en la viabilidad celular se debe al portamuestras_{PMMA-AGM}, no al tipo, ausencia de recubrimiento o concentración de las nanopartículas magnéticas. De manera general, se puede señalar que al tratarse de nanopartículas magnéticas sin recubrimiento y portamuestras_{PMMA-AGM} no comerciales, el crecimiento de las células 3T3 y su posterior incubación con nanopartículas de óxido de hierro desnudas, no inducen toxicidad celular aguda durante las primeras 48 horas.

7.2.5.3. Alteración de la viabilidad celular en condiciones ambientales

Otra variable a tener en cuenta en este experimento es el tiempo de vida celular, es decir, el tiempo en el cual las células NIH/3T3 incubadas durante 24 horas con SPIONs en los portamuestras_{PMMA-AGM} viven fuera de su entorno idóneo de oxígeno, humedad y temperatura. Esta información influye directamente en el éxito de la experimentación. Los resultados obtenidos de la viabilidad celular respecto a las condiciones ambientales mencionadas (Figura 6.12) revelan que, durante periodos de 0.5 y 1 hora, las condiciones externas no perjudicaron significativamente la viabilidad celular. Sin embargo, a las 2 horas y bajo las mismas condiciones, se observa una reducción significativa de la viabilidad celular.

El tiempo empleado en realizar la caracterización del comportamiento magnético de las SPIONs incubadas en las células NIH/3T3 no es superior a 1 hora. Los resultados obtenidos de la viabilidad celular en los diferentes experimentos señalan que las condiciones ambientales a las que se han expuesto las células NIH/3T3 no afectan significativamente su viabilidad.

7.2.5.4. Localización intracelular de las SPIONs

Resulta importante conocer la localización celular de las SPIONs debido a que algunos estudios previos sugieren que el comportamiento magnético de las nanopartículas de óxido de hierro es influenciado por la internalización celular. Sin embargo, la mayoría de estas investigaciones se han enfocado en la modificación de la eficiencia de calor en hipertermia magnética (Guardia y col., 2012; Di Corato y col., 2014). Aunque las

razones físicas de tal variación magnética intracelular aún no están clara, Lévy y col., (2011c) han sugerido que esta alteración parece estar relacionada con las interacciones dipolares que podrían generarse por la formación intracelular de agregados de nanopartículas. Sin embargo, Di Corato y col., (2014) atribuyen este cambio a los efectos de la viscosidad.

Estas investigaciones revelaron que los nanomateriales fueron predominantemente confinados en los compartimentos endosomales y lisosomales. En línea con lo anterior, los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que una gran mayoría de SPIONs son fagocitadas por las células y acumuladas en las vesículas intracelulares, especialmente en los lisosomas (Figura 6.13C), manifestando concordancia con las investigaciones mencionadas anteriormente.

7.2.5.5. Comportamiento magnético de las SPIONs internalizadas o adheridas y liberadas de las células

En relación a la variación del comportamiento magnético de las SPIONs dentro de las células NIH/3T3, la evidencia experimental demuestra que existe una reducción en la magnetización (M) de las SPIONs cuando están confinadas en los lisosomas en comparación con el valor de M obtenido cuando las nanopartículas son liberadas del entorno celular, es decir, en suspensión libre (Figura 6.14).

Para obtener la cantidad aproximada de material magnético (en masa) ingerida por las células y, de esta manera, calcular el valor de la M en ambas situaciones (inmovilizadas y libres), se emplea una curva de calibración (Figura 6.15) como método indirecto para cuantificar el valor aproximado. Tal pérdida de las propiedades magnéticas originales ($M = 6.31 \text{ Am}^2/\text{kg}$) podría ser consecuencia de las interacciones entre las propias SPIONs que han formando clústeres o entre las nanopartículas y el ambiente intracelular, el impedimento de los grados de libertad de las nanopartículas cuando son internalizadas en las vesículas intracelulares o como resultado del incremento de viscosidad en los lisosomas.

El test de ANOVA señaló que no hay una variación estadísticamente significativa entre el valor de la M cuando las SPIONs están internalizadas en las células (Tabla 6.1) y cuando están suspendidas en la solución de fibroína con una viscosidad similar a la viscosidad media del citoplasma (4.12 mPa.s) (Jeun y col., 2013).

Con base en estos resultados y en la teoría previamente expuesta se puede afirmar que, al carecer de una alta concentración de material magnético que genere interacciones dipolares y, al estar embebidas en un ambiente de alta viscosidad, la reducción del valor de M probablemente se deba a la pérdida de grados de libertad de las SPIONs encapsuladas en los lisosomas que conlleva a la generación de grandes agregados (Lévy y col., 2011c).

Respecto a la curva de calibración, la cantidad de masa de material magnético por célula se estima en 145 pg después de 24 horas de incubación. Sin embargo, Safi y col., (2010) estiman una acumulación de masa de 250 pg de nanopartículas de maghemita recubiertas con Citrato por célula NIH/3T3 en el mismo periodo de tiempo. Por otro lado, Jordan y col., (1999) mencionan una captación de 250 pg de nanopartículas de óxido de hierro recubiertas con dextrano en fibroblastos humanos.

Las investigaciones anteriores obtienen una mayor captación celular de material magnético que la indicada en esta tesis doctoral debido a que los autores emplearon nanopartículas con recubrimiento. Algunos estudios han demostrado que el recubrimiento y la funcionalización de la superficie de las nanopartículas mejora la captación e internalización de NPMs en las células (Brunner y col., 2006; Chung y col., 2007; Villanueva y col., 2009).

CAPÍTULO

8

Conclusiones

*“La conclusión es que sabemos muy poco y
sin embargo es asombroso lo
mucho que conocemos”
-Bertrand Arthur William Russell*

8. CONCLUSIONES

A continuación se describen las conclusiones que proporcionan una visión global del trabajo de investigación en relación al planteamiento del problema, los objetivos establecidos y el análisis de resultados obtenidos. Este capítulo se ha dividido en dos apartados. En la sección 8.1 se detallan las conclusiones del estudio de la caracterización de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo y en la sección 8.2 las conclusiones correspondientes al estudio de la influencia de la viscosidad del medio, el ambiente celular y la concentración de nanopartículas magnéticas en su magnetismo.

8.1. Caracterización y detección de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo

- ❖ Los experimentos descritos en esta tesis doctoral han comprobado que los equipos AGM (Magnetómetro por Gradiente Alternante) y FFCR (Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo) que componen la Unidad de Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas (Unidad 15 de NANBIOSIS-ICTS del CIBER-BBN) son alternativas viables para caracterizar nanopartículas magnéticas (NPMs) empleadas en aplicaciones biomédicas. Generalmente, los estudios de biodistribución de NPMs se llevan a cabo a través de tecnologías como ICP-MS, ICP-OES y RFM o mediante equipos de magnetometría como el VSM y SQUID. Sin embargo, esta investigación ha demostrado la capacidad del AGM y del FFCR para estudiar la biodistribución de las NPMs utilizando tejidos homogenizados y muestras deshidratadas en horno o en placa calefactora

a temperatura de 70°C para evitar una posible oxidación y transformación térmica de las NPMs.

- ❖ La magnetización (M) y el tiempo de relajación longitudinal (T1) de las NPMs acumulados en los tejidos biológicos ex-vivo medidos en el Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM) y en el Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo (FFCR) mostraron un comportamiento magnético similar. Adicionalmente, estos resultados obtenidos por medio de magnetometría y relajometría fueron confirmados por el estudio histológico.
- ❖ Los resultados de las dos técnicas concluyeron que las nanopartículas de óxido de hierro (50 nm) con recubrimiento de dextrano se detectan en el pulmón y en el bazo 24 horas después de administrada la dosis. Finalizado el tiempo del estudio (1 mes), estos dos órganos siguen presentando acumulación de NPMs. Por otro lado, en el cerebro no se detecta acumulación de NPMs en ningún tiempo analizado, sugiriendo que las NPMs no atravesaron la barrera hematoencefálica.
- ❖ Las diferencias encontradas en los resultados de estudios previos de bioacumulación están relacionadas con las propiedades de las NPMs incluyendo el material, el diámetro y el recubrimiento de las NPMs, la concentración de la dosis administrada y los periodos de tiempo analizados después de la inyección.
- ❖ El Magnetómetro por Gradiente Alternante (AGM), a través de un protocolo de medidas reproducible y un procesamiento adecuado de datos, puede ser utilizado para detectar señales magnéticas muy pequeñas dentro de tejidos biológicos ex-vivo. Lo anterior fue comprobado durante el estudio de la detección y seguimiento de NPMs cuando una dosis de NPMs de 4 µg/g se inyecta en ratones y se logra detectar una señal magnética proveniente de una cantidad de sólo 5 µL de muestra de tejido.

8.2. Influencia de la viscosidad del medio, el entorno celular y la concentración de las NPMs.

- ❖ La fabricación de nuevos diseños de portamuestras como método de adaptación del AGM permitió realizar la caracterización magnética de nanopartículas de óxido de hierro suspendidas en fluidos viscosos. Estos portamuestras fueron

fabricados empleando dos tipos de materiales biocompatibles, el Politetrafluoroetileno (PTFE) y el PolimetilMetacrilato (PMMA). Los portamuestras basados en PMMA resultaron idóneos para el crecimiento de cultivos celulares debido a sus características físicas.

- ❖ Los resultados del estudio de las propiedades magnéticas de las nanopartículas suspendidas en fluidos indican que la magnetización es influenciada por la viscosidad del medio, la concentración y la agregación de las NPMs.
- ❖ En un sistema de nanopartículas inmersas en un fluido, la viscosidad del medio afecta significativamente a la magnetización (M) y a la relajatividad longitudinal (r_1). El incremento de la viscosidad del fluido disminuye la magnetización y aumenta la relajatividad longitudinal (r_1) de las nanopartículas.
- ❖ Las interacciones dipolares de las nanopartículas suspendidas en un fluido pueden ser estudiadas mediante la normalización de las curvas de magnetización (M/M_s vs H). El aumento en la concentración de nanopartículas favorece las interacciones dipolares magnéticas y por consiguiente, la susceptibilidad magnética inicial ($H < 10$ kA/m) es menor lo que provoca a una disminución significativa de la relajación magnética y de la magnetización.
- ❖ La fibroína puede formar múltiples capas alrededor de las nanopartículas utilizadas en este estudio, por lo tanto, este material puede ser empleado como agente de recubrimiento debido a su biocompatibilidad.
- ❖ Los portamuestras_{PMMA-AGM} utilizados en el crecimiento de la línea celular NIH/3T3 no afectaron significativamente a la viabilidad celular durante las primeras 48 horas. La viabilidad celular a las 24 horas con los portamuestras_{PMMA-AGM} respecto a la alcanzada con las placas multipocillos estándar P24 sólo se redujo en aproximadamente 10%. En consecuencia, no existe toxicidad aguda debido al material del portamuestra. Además, la adhesión celular y la viabilidad celular en los portamuestras_{PMMA-AGM} resultó ser similar para los cultivos celulares de 24 h, 48 h y 72 h.
- ❖ La incubación de las SPIONs con la línea celular NIH/3T3 indica que las concentraciones de nanopartículas utilizadas en este estudio no producen toxicidad celular aguda y por lo tanto son citocompatibles.

- ❖ La permanencia de los cultivos celulares NIH/3T3 fuera del incubador por un periodo de tiempo no superior a 1 horas, no afectó significativamente a la viabilidad celular cuando fueron incubadas con SPIONs de 14 nm (sin recubrimiento) en los portamuestras^{SPMMA-AGM}.
- ❖ Los resultados experimentales señalan que la mayor parte de las SPIONs se internalizan en las células NIH/3T3 y resultan acumuladas en las vesículas intracelulares, especialmente en los lisosomas.
- ❖ Los resultados del comportamiento magnético de las SPIONs en el entorno celular indican que la señal magnética se reduce (aproximadamente 14.2%) cuando las nanopartículas están confinadas en los compartimientos subcelulares.
- ❖ La cantidad aproximada de material magnético por célula de los cultivos de 24 horas de incubación descritos en esta tesis doctoral pudo ser estimada mediante el uso de una curva de calibración.

CAPÍTULO

9

Trabajos futuros

*“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un
descubrimiento real. Es un viaje,
nunca una llegada”
-Karl Raimund Popper.*

9. TRABAJOS FUTUROS

A continuación se describen algunas acciones para continuar la investigación de NPMs mediante el uso de los equipos que componen la Unidad de Caracterización Funcional de Nanopartículas Magnéticas (Unidad 15) de NANBIOSIS-ICTS.

Caracterización y detección de nanopartículas magnéticas en tejidos ex-vivo.

- ❖ La cuantificación de la masa de las NPMs presente en los tejidos puede obtenerse con mayor precisión mediante el empleo de un dispositivo de Resonancia Ferromagnética o un SQUID con el fin de conocer la cinética cuantitativa de la biodistribución de las NPMs en un organismo vivo.
- ❖ El estudio de la biodistribución de NPMs con el fin de detectar y hacer seguimiento a los materiales magnéticos administrados en los especímenes puede mejorar la confiabilidad de sus resultados si es realizada sobre una muestra mayor de individuos. De esta manera, se utilizaría una población estadísticamente significativa. Adicionalmente, este estudio debería de prolongarse durante un tiempo superior a 4 meses, ya que la presente investigación ha señalado que las NPMs siguen presentes en algunos órganos al finalizar el experimento (1 mes). La realización de estudios histológicos en todos los órganos durante todo el experimento contribuiría también al estudio de los efectos de la citotoxicidad a largo plazo.
- ❖ El AGM puede ser comparado con un equipo que permita distinguir los porcentajes de hierro endógeno y de hierro exógeno (NPMs) presentes en una

muestra con el fin de comprobar si las medidas del AGM, mediante el protocolo diseñado en esta tesis doctoral, pueden ser utilizadas en la cuantificación de hierro exógeno de la muestra.

- ❖ Los tejidos pueden ser caracterizados a través de los tiempos de relajación transversal (T2) con el objetivo de realizar su comparación con los resultados obtenidos mediante el tiempo de relajación longitudinal (T1).
- ❖ Un mayor volumen de tejido a caracterizar y un aumento en la señal de magnetización podrían ser obtenidos mediante el uso de muestras liofilizadas en los portamuestras^{PMMA-AGM}.

Estudio de la influencia de la concentración de NPMs, la viscosidad del medio en que se suspenden, el entorno celular, y la agregación de las nanopartículas.

- ❖ El uso de nanopartículas con revestimiento de la superficie (surfactantes) permitiría evitar aglomerados y obtener una mayor estabilidad en la suspensión. Empleando diferentes concentraciones de NPMs y diversas viscosidades para el fluido, es posible realizar un estudio más detallado de la influencia de la viscosidad del medio, la concentración y aglomeración de NPMs en los ferrofluidos con el fin de investigar los fenómenos de interacción dipolo-dipolo. El uso de un microscopio óptico podría favorecer la visualización de los agregados o clústers presentes en las muestras. De esta manera, se podrían confirmar las diferentes teorías de las interacciones dipolares con relación al comportamiento magnético de un sistema de partículas inmersas en un fluido.
- ❖ Un estudio más detallado de la influencia de la internalización celular de las nanopartículas en sus propiedades magnéticas puede ser llevado a cabo mediante el uso de nanopartículas con recubrimiento. El empleo de una línea celular más resistente y el cultivo de una menor cantidad inicial de células podría mejorar la viabilidad celular asociada al portamuestras^{PMMA-AGM}. De esta manera, el tiempo del estudio podría prolongarse.
- ❖ La disminución de la ligera concavidad de los actuales portamuestras^{PMMA-AGM} podría favorecer la viabilidad celular y la observación de las células al microscopio. Así mismo, el empleo de otro tipo de materiales biocompatibles y

transparentes para fabricar nuevos portamuestras^{SPMMA-AGM} podrían mejorar la viabilidad celular.

- ❖ La pérdida de calor generado por las nanopartículas magnéticas cuando se aplica un campo magnético alterno (hipertermia magnética) está asociado a la viscosidad del medio, el ambiente intracelular, la concentración y agregación de las NPMs. Por esta razón, es necesario realizar un estudio de hipertermia magnética que investigue el calor generado por las NPMs cuando están suspendidas en fluidos viscosos y cuando están internalizadas en cultivos celulares. Los resultados podrían ser vinculados con los hallazgos encontrados en esta tesis doctoral.

REFERENCIAS

- Aharoni, A. (2000). *Introduction to the Theory of Ferromagnetism* (Vol. 109). Clarendon Press.
- Almeida, J. P. M., Chen, A. L., Foster, A., & Drezek, R. (2011). In vivo biodistribution of nanoparticles. *Nanomedicine*, 6(5), 815-835.
- Amiri, H., Bordonali, L., Lascialfari, A., Wan, S., Monopoli, M. P., Lynch, I., ... & Mahmoudi, M. (2013). Protein corona affects the relaxivity and MRI contrast efficiency of magnetic nanoparticles. *Nanoscale*, 5(18), 8656-8665.
- Andrä, W., Nowak, H. *Magnetism in Medicine: a Handbook*. Weinheim: Wiley-Vch, 2007.
- Anoardo, E., Galli, G., & Ferrante, G. (2001). Fast-field-cycling NMR: applications and instrumentation. *Applied Magnetic Resonance*, 20(3), 365-404.
- Armisen, R., Galatas, F., & Hispanagar, S. A. Spain. (2009). Agar. *Phillips, GO, Williams, PA (2th edn). A Handbook of hydrocolloids. Cambridge, UK*, 82-107.
- Arruebo, M., Fernández-Pacheco, R., Ibarra, M. R., & Santamaría, J. (2007). Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano today*, 2(3), 22-32.
- Arulmurugan, R., Vaidyanathan, G., Sendhilnathan, S., & Jeyadevan, B. (2006). Mn-Zn ferrite nanoparticles for ferrofluid preparation: Study on thermal-magnetic properties. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 298(2), 83-94.
- Atkins, P., & De Paula, J. (2013). *Elements of physical chemistry*. Oxford University Press, USA.
- Baek, S., Quan, X., Kim, S., Lengner, C., Park, J. K., & Kim, J. (2014). Electromagnetic fields mediate efficient cell reprogramming into a pluripotent state. *ACS nano*, 8(10), 10125-10138.
- Bahadur, D., Giri, J., Nayak, B. B., Sriharsha, T., Pradhan, P., Prasad, N. K., ... & Ambashta, R. D. (2005). Processing, properties and some novel applications of magnetic nanoparticles. *Pramana*, 65(4), 663-679.
- Becker, W. T., Dohle, J., Bernd, L., Braun, A., Cserhati, M., Enderle, A., ... & Tunn, P. U. (2008). Local recurrence of giant cell tumor of bone after intralesional treatment with and without adjuvant therapy. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 90(5), 1060-1067.
- Berry, C. C., Wells, S., Charles, S., & Curtis, A. S. (2003). Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, 24(25), 4551-4557.
- Berry, C. C., & Curtis, A. S. (2003). Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R198.
- Blanco-Mantecon, M., & O'Grady, K. (2006). Interaction and size effects in magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 296(2), 124-133.
- Boisseau, P., & Loubaton, B. (2011). Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Physique*, 12(7), 620-636.
- Bourrinet, P., Bengéle, H. H., Bonnemain, B., Dencausse, A., Idée, J. M., Jacobs, P. M., & Lewis, J. M. (2006). Preclinical safety and pharmacokinetic profile of ferumoxtran-10, an

ultrasmall superparamagnetic iron oxide magnetic resonance contrast agent. *Investigative radiology*, 41(3), 313-324.

Bratosin, D., Mitrofan, L., Palii, C., Estaquier, J., & Montreuil, J. (2005). Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging. *Cytometry Part A*, 66(1), 78-84.

Brem, F., Hirt, A. M., Simon, C., Wieser, H. G., & Dobson, J. (2005). Characterization of iron compounds in tumour tissue from temporal lobe epilepsy patients using low temperature magnetic methods. *Biometals*, 18(2), 191-197.

Brem, F., Hirt, A. M., Winklhofer, M., Frei, K., Yonekawa, Y., Wieser, H. G., & Dobson, J. (2006). Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue. *Journal of the Royal Society Interface*, 3(11), 833-841.

Briley-Saebo, K., Bjørnerud, A., Grant, D., Ahlstrom, H., Berg, T., & Kindberg, G. M. (2004). Hepatic cellular distribution and degradation of iron oxide nanoparticles following single intravenous injection in rats: implications for magnetic resonance imaging. *Cell and tissue research*, 316(3), 315-323.

Brunner, T. J., Wick, P., Manser, P., Spohn, P., Grass, R. N., Limbach, L. K., ... & Stark, W. J. (2006). In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. *Environmental science & technology*, 40(14), 4374-4381.

Brusentsov, N. A., Kuznetsov, V. D., Brusentsova, T. N., Gendler, T. S., Novakova, A. A., Volter, E. R., ... & Danilkin, M. I. (2004). Magnetisation of ferrifluids and effects of intracellular deposition of ferrite nanoparticles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 272, 2350-2351.

Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.

Bychkova, A. V., Sorokina, O. N., Rosenfeld, M. A., & Kovarski, A. L. (2012). Multifunctional biocompatible coatings on magnetic nanoparticles. *Russian Chemical Reviews*, 81(11), 1026.
Callister, W. D. *Material Science and Engineering: An Introduction*. John Wiley and Sons, Inc., 2007.

Campbell, P. (1996). *Permanent magnet materials and their application*. Cambridge University Press.

Carabías, I., Venta, J. D. L., Quesada, A., García, M. A., Kolodziejczyk, L., Martínez de la Fuente, J., ... & Hernando, A. (2006). AFM characterization of small metallic nanoparticles.

Chan, V. S. (2006). Nanomedicine: an unresolved regulatory issue. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 46(3), 218-224.

Chantrell, R. W., Bradbury, A., Popplewell, J., & Charles, S. W. (1980). Particle cluster configuration in magnetic fluids. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 13(7), L119.

Chantrell, R. W., Bradbury, A., Popplewell, J., & Charles, S. W. (1982). Agglomerate formation in a magnetic fluid. *Journal of Applied Physics*, 53(3), 2742-2744.

Chantrell, R. W., Walmsley, N., Gore, J., & Maylin, M. (2000). Calculations of the susceptibility of interacting superparamagnetic particles. *Physical Review B*, 63(2), 024410.

- Chen, A. Z., Chen, L. Q., Wang, S. B., Wang, Y. Q., & Zha, J. Z. (2015). Study of magnetic silk fibroin nanoparticles for massage-like transdermal drug delivery. *International journal of nanomedicine*, 10, 4639.
- Chen, C. W. (2013). *Magnetism and metallurgy of soft magnetic materials*. Courier Corporation.
- Cheng, F. Y., Su, C. H., Yang, Y. S., Yeh, C. S., Tsai, C. Y., Wu, C. L., ... & Shieh, D. B. (2005). Characterization of aqueous dispersions of Fe₃O₄ nanoparticles and their biomedical applications. *Biomaterials*, 26(7), 729-738.
- Chertok, B., Cole, A. J., David, A. E., & Yang, V. C. (2010). Comparison of electron spin resonance spectroscopy and inductively-coupled plasma optical emission spectroscopy for biodistribution analysis of iron-oxide nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*, 7(2), 375-385.
- Choi, H. S., & Frangioni, J. V. (2010). Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Molecular imaging*, 9(6), 7290-2010.
- Chouly, C., Pouliquen, D., Lucet, I., Jeune, J. J., & Jallet, P. (1996). Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of microencapsulation*, 13(3), 245-255.
- Chrastina, A., Massey, K. A., & Schnitzer, J. E. (2011). Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 3(4), 421-437.
- Chung, T. H., Wu, S. H., Yao, M., Lu, C. W., Lin, Y. S., Hung, Y., ... & Huang, D. M. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 28(19), 2959-2966.
- Clowes, A. W., Gown, A. M., Hanson, S. R., & Reidy, M. A. (1985). Mechanisms of arterial graft failure. 1. Role of cellular proliferation in early healing of PTFE prostheses. *The American journal of pathology*, 118(1), 43.
- Coey, J. M. D. (1988). Magnetic properties of iron in soil iron oxides and clay minerals. In *Iron in soils and clay minerals* (pp. 397-466). Springer Netherlands.
- Corti, M., Lascialfari, A., Marinone, M., Masotti, A., Micotti, E., Orsini, F., ... & Sangregorio, C. (2008). Magnetic and relaxometric properties of polyethylenimine-coated superparamagnetic MRI contrast agents. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 320(14), e316-e319.
- Cullity, B. D., & Graham, C. D. (2011). *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons.
- Dale, B. M., Brown, M. A., & Semelka, R. C. (2015). *MRI: basic principles and applications*. John Wiley & Sons.
- Di Corato, R., Espinosa, A., Lartigue, L., Tharaud, M., Chat, S., Pellegrino, T., ... & Wilhelm, C. (2014). Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*, 35(24), 6400-6411.
- Dormann, J. L., Bessais, L., & Fiorani, D. (1988). A dynamic study of small interacting particles: superparamagnetic model and spin-glass laws. *Journal of Physics C: Solid State Physics*, 21(10), 2015.

Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., & Devoisselle, J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine.

Effiong, U., Williams, D., Otto, W., & Anderson, W. (2004, April). Gum Arabic surface-modified magnetic nanoparticles for cancer therapy. In *Bioengineering Conference, 2004. Proceedings of the IEEE 30th Annual Northeast* (pp. 243-244). IEEE.

Eijkel, J. C., & Van Den Berg, A. (2005). Nanofluidics: what is it and what can we expect from it?. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(3), 249-267.

Etheridge, M. L., Hurley, K. R., Zhang, J., Jeon, S., Ring, H. L., Hogan, C., ... & Bischof, J. C. (2014). Accounting for biological aggregation in heating and imaging of magnetic nanoparticles. *Technology*, 2(03), 214-228.

Farzan, F., Shojaosadati, S. A., & Abdul Tehrani, H. (2010). A preliminary report on the isolation and identification of Magnetotactic bacteria from Iran environment. *Iranian Journal of Biotechnology*, 8(2), 98-102.

Fatin-Rouge, N., Tóth, E., Meuli, R., & Bünzli, J. C. G. (2004). Enhanced imaging properties of a Gd III complex with unusually large relaxivity. *Journal of alloys and compounds*, 374(1), 298-302.

Félix-González, N., Urbano-Bojorge, A. L., Mina-Rosales, A., Pozo-Guerrero, F., & Serrano-Olmedo, J. J. (2015). Assessment of a Heuristic Model for Characterization of Magnetic Nanoparticles as Contrast Agent in MRI. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 44(5), 279-286.

Fernández Cossío, S. (2007). *Respuesta tisular a materiales de relleno. Estudio experimental*. Univ. Santiago de Compostela.

Fernández-García, L., Marí-Buyé, N., Barrios, J. A., Madurga, R., Elices, M., Pérez-Rigueiro, J., ... & González-Nieto, D. (2016). Safety and tolerability of silk fibroin hydrogels implanted into the mouse brain. *Acta Biomaterialia*, 45, 262-275.

Ferrante, G., & Sykora, S. (2005). Technical aspects of fast field cycling. *Advances in inorganic chemistry*, 57, 405-470.

Feynman, R. P. (1959). There's plenty of room at the bottom: An invitation to enter a new field of physics, lecture presented at the annual meeting of the American Physical Society. *California Institute of Technology, December 29th*.

Flanders, P. J. (1988). An alternating-gradient magnetometer. *Journal of Applied Physics*, 63(8), 3940-3945.

Foner, S., Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. *Review of Scientific Instruments* **1959**, 30, (7), 548-557.

Freitas, R. A. (2005). What is nanomedicine?. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 1(1), 2-9.

Frenkel, J., & Dorfman, J. (1930). Spontaneous and induced magnetisation in ferromagnetic bodies. *Nature*, 126(3173), 274-275.

- Gao, R., Li, J., Han, S., Wen, B., Zhang, T., Miao, H., & Zhang, Q. (2012). Magnetisation behaviour of mixtures of ferrofluids and paramagnetic fluids with same particle volume fractions. *Journal of Experimental Nanoscience*, 7(3), 282-297.
- García Cerda, L. A., Rodríguez Fernández, O. S., Betancourt Galindo, R., Saldívar Guerrero, R., & Torres Torres, M. A. (2003). Síntesis y propiedades de ferrofluidos de magnetita. *Superficies y vacío*, 16(1).
- García-Otero, J., Porto, M., Rivas, J., & Bunde, A. (2000). Influence of dipolar interaction on magnetic properties of ultrafine ferromagnetic particles. *Physical review letters*, 84(1), 167.
- Giri, S., Trewyn, B. G., Stellmaker, M. P., & Lin, V. S. Y. (2005). Stimuli-responsive controlled-release delivery system based on mesoporous silica nanorods capped with magnetic nanoparticles. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(32), 5038-5044.
- Gojova, A., Guo, B., Kota, R. S., Rutledge, J. C., Kennedy, I. M., & Barakat, A. I. (2007). Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environmental health perspectives*, 115(3), 403.
- Graham, C. D. (2000). High-sensitivity magnetization measurements. *Journal of Materials Science & Technology*, 16(2), 97-101.
- Gu, L., Fang, R. H., Sailor, M. J., & Park, J. H. (2012). In vivo clearance and toxicity of monodisperse iron oxide nanocrystals. *ACS nano*, 6(6), 4947-4954.
- Guardia, P., Di Corato, R., Lartigue, L., Wilhelm, C., Espinosa, A., Garcia-Hernandez, M., ... & Pellegrino, T. (2012). Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment. *ACS nano*, 6(4), 3080-3091.
- Gupta, A. K., & Curtis, A. S. (2004). Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 15(4), 493-496.
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- Haase, C., & Nowak, U. (2012). Role of dipole-dipole interactions for hyperthermia heating of magnetic nanoparticle ensembles. *Physical Review B*, 85(4), 045435.
- Halperin, W. P. (1986). Quantum size effects in metal particles. *Reviews of Modern Physics*, 58(3), 533.
- Hanini, A., Schmitt, A., Kacem, K., Chau, F., Ammar, S., & Gavard, J. (2011). Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility. *International journal of nanomedicine*, 6, 787.
- Hansen, M. F., & Mørup, S. (1998). Models for the dynamics of interacting magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 184(3), L262-274.
- Harrell, J. W. (1999). Effect of AC gradient field on magnetic measurements with an alternating gradient magnetometer. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 205(1), 121-129.
- Hautot, D., Pankhurst, Q. A., & Dobson, J. (2005). Superconducting quantum interference device measurements of dilute magnetic materials in biological samples. *Review of scientific instruments*, 76(4), 045101.

- Hollick, E. J., Spalton, D. J., Ursell, P. G., & Pande, M. V. (1998). Biocompatibility of poly (methyl methacrylate), silicone, and AcrySof intraocular lenses: randomized comparison of the cellular reaction on the anterior lens surface. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 24(3), 361-366.
- Hollick, E. J., Spalton, D. J., Ursell, P. G., Pande, M. V., Barman, S. A., Boyce, J. F., & Tilling, K. (1999). The effect of polymethylmethacrylate, silicone, and polyacrylic intraocular lenses on posterior capsular opacification 3 years after cataract surgery. *Ophthalmology*, 106(1), 49-55.
- Holm, C., & Weis, J. J. (2005). The structure of ferrofluids: A status report. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 10(3), 133-140.
- Hong, R. Y., Zhang, S. Z., Han, Y. P., Li, H. Z., Ding, J., & Zheng, Y. (2006). Preparation, characterization and application of bilayer surfactant-stabilized ferrofluids. *Powder Technology*, 170(1), 1-11.
- Hu, F., MacRenaris, K. W., Waters, E. A., Liang, T., Schultz-Sikma, E. A., Eckermann, A. L., & Meade, T. J. (2009). Ultrasmall, water-soluble magnetite nanoparticles with high relaxivity for magnetic resonance imaging. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(49), 20855-20860.
- Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., & Schlager, J. J. (2005). In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19(7), 975-983.
- Indira, T. K., & Lakshmi, P. K. (2010). Magnetic nanoparticles—a review. *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol*, 3(3), 1035-1042.
- Islam, M. S., Kusumoto, Y., Kurawaki, J., Abdulla-Al-Mamun, M. D., & Manaka, H. (2012). A comparative study on heat dissipation, morphological and magnetic properties of hyperthermia suitable nanoparticles prepared by co-precipitation and hydrothermal methods. *Bulletin of Materials Science*, 35(7), 1047-1053.
- Ito, Y., Liu, S. Q., & Imanishi, Y. (1991). Enhancement of cell growth on growth factor-immobilized polymer film. *Biomaterials*, 12(5), 449-453.
- Jacinto, G. V., Brolo, A. G., Corio, P., Suarez, P. A., & Rubim, J. C. (2009). Structural investigation of MFe₂O₄ (M= Fe, Co) magnetic fluids. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(18), 7684-7691.
- Jain, T. K., Reddy, M. K., Morales, M. A., Leslie-Pelecky, D. L., & Labhasetwar, V. (2008). Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular pharmaceutics*, 5(2), 316-327.
- Jaiswal, M. K., Gogoi, M., Sarma, H. D., Banerjee, R., & Bahadur, D. (2014). Biocompatibility, biodistribution and efficacy of magnetic nanohydrogels in inhibiting growth of tumors in experimental mice models. *Biomaterials Science*, 2(3), 370-380.
- Jeng, H. A., & Swanson, J. (2006). Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 41(12), 2699-2711.
- Jensen, M. E., Evans, A. J., Mathis, J. M., Kallmes, D. F., Cloft, H. J., & Dion, J. E. (1997). Percutaneous polymethylmethacrylate vertebroplasty in the treatment of osteoporotic vertebral body compression fractures: technical aspects. *American Journal of Neuroradiology*, 18(10), 1897-1904.

- Jeun, M., Bae, S., Tomitaka, A., Takemura, Y., Park, K. H., Paek, S. H., & Chung, K. W. (2009). Effects of particle dipole interaction on the ac magnetically induced heating characteristics of ferrite nanoparticles for hyperthermia. *Applied physics letters*, 95(8), 082501.
- Jeun, M., Kim, Y. J., Park, K. H., Paek, S. H., & Bae, S. (2013). Physical contribution of Néel and Brown relaxation to interpreting intracellular hyperthermia characteristics using superparamagnetic nanofluids. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(8), 5719-5725.
- Jiles, D. (1998). *Introduction to Magnetism and Magnetic Materials*, Second ed. ed. Taylor & Francis.
- Joannopoulos, J. D., Johnson, S. G., Winn, J. N., & Meade, R. D. (2011). *Photonic crystals: molding the flow of light*. Princeton university press.
- Jordan, A., Wust, P., Scholz, R., Tesche, B., Fähling, H., Mitrovics, T., ... & Felix, R. (1996). Cellular uptake of magnetic fluid particles and their effects on human adenocarcinoma cells exposed to AC magnetic fields in vitro. *International journal of hyperthermia*, 12(6), 705-722.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Schirra, H., Schiestel, T., Schmidt, H., & Felix, R. (1999). Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1), 185-196.
- Jund, P., Kim, S. G., Tománek, D., & Hetherington, J. (1995). Stability and fragmentation of complex structures in ferrofluids. *Physical review letters*, 74(15), 3049.
- Kaehler, J., Zilla, P., Fasol, R., Deutsch, M., & Kadletz, M. (1989). Precoating substrate and surface configuration determine adherence and spreading of seeded endothelial cells on polytetrafluoroethylene grafts. *Journal of vascular surgery*, 9(4), 535-541.
- Karimi, Z., Karimi, L., & Shokrollahi, H. (2013). Nano-magnetic particles used in biomedicine: core and coating materials. *Materials Science and Engineering: C*, 33(5), 2465-2475.
- Kasap, S. O. *Principles of Electronic Materials and Devices*. Singapore: McGraw Hill International Edition, 2006.
- Kim, D. K., Zhang, Y., Voit, W., Rao, K. V., & Muhammed, M. (2001). Synthesis and characterization of surfactant-coated superparamagnetic monodispersed iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225(1), 30-36.
- Kirschvink, J. L., Kobayashi-Kirschvink, A., & Woodford, B. J. (1992). Magnetite biomineralization in the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7683-7687.
- Kittel, C. (1946). Theory of the structure of ferromagnetic domains in films and small particles. *Physical Review*, 70(11-12), 965.
- Kittel, C. *Introduction to Solid State Physics*. 7.ed. New York: JohnWiley & Sons, 1996.
- Knobel, M., Socolovsky, L. M., & Vargas, J. M. (2004). Propiedades magnéticas y de transporte de sistemas nanocristalinos: conceptos básicos y aplicaciones a sistemas reales. *Revista Mexicana de Física*, 50(En1), 8-28.
- Knobel, M., Nunes, W. C., Brandl, A. L., Vargas, J. M., Socolovsky, L. M., & Zanchet, D. (2004). Interaction effects in magnetic granular systems. *Physica B: Condensed Matter*, 354(1), 80-87.

- Kun, F., Wen, W., Pál, K. F., & Tu, K. N. (2001). Breakup of dipolar rings under a perpendicular magnetic field. *Physical Review E*, 64(6), 061503.
- Kwon, J. T., Hwang, S. K., Jin, H., Kim, D. S., Minai-Tehrani, A., Yoon, H. J., ... & Yoon, B. I. (2008). Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice. *Journal of occupational health*, 50(1), 1-6.
- Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Martins, E. V., Lacava, L. M., Freitas, M. L. L., Garcia, V. A. P., ... & Da Silva, M. F. (1999). Biological effects of magnetic fluids: toxicity studies. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 201(1), 431-434.
- Lacava, L. M., Lacava, Z. G. M., Da Silva, M. F., Silva, O., Chaves, S. B., Azevedo, R. B. D., ... & Morais, P. C. (2001). Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophysical journal*, 80(5), 2483-2486.
- Lacava, L. M., Lacava, Z. G. M., Azevedo, R. B., Chaves, S. B., Garcia, V. A. P., Silva, O., ... & Morais, P. C. (2002). Use of magnetic resonance to study biodistribution of dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 252, 367-369.
- Lacava, L. M., Garcia, V. A. P., Kückelhaus, S., Azevedo, R. B., Sadeghiani, N., Buske, N., ... & Lacava, Z. G. M. (2004). Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272, 2434-2435.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, 108(6), 2064-2110.
- Lawaczek, R., Bauer, H., Frenzel, T., Hasegawa, M., Ito, Y., Kito, K., ... & Weinmann, H. J. (1997). Magnetic iron oxide particles coated with carboxydextran for parenteral administration and liver contrasting: pre-clinical profile of SH U555A. *Acta Radiologica*, 38(4), 584-597.
- Lemperle, G., Hazan-Gauthier, N., & Lemperle, M. (1995). PMMA microspheres (Artecoll) for skin and soft-tissue augmentation. Part II: Clinical investigations. *Plastic and reconstructive surgery*, 96(3), 627-634.
- Leslie-Pelecky, D. L., & Rieke, R. D. (1996). Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of materials*, 8(8), 1770-1783.
- LeVeen, H. H., & Barberio, J. R. (1949). Tissue reaction to plastics used in surgery with special reference to Teflon. *Annals of surgery*, 129(1), 74.
- Lévy, M., Luciani, N., Alloyeau, D., Elgrabli, D., Deveaux, V., Pechoux, C., ... & Factor, C. (2011). Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32(16), 3988-3999.
- Lévy, M., Gazeau, F., Bacri, J. C., Wilhelm, C., & Devaud, M. (2011). Modeling magnetic nanoparticle dipole-dipole interactions inside living cells. *Physical Review B*, 84(7), 075480.
- Lévy, M., Wilhelm, C., Luciani, N., Deveaux, V., Gendron, F., Luciani, A., ... & Gazeau, F. (2011). Nanomagnetism reveals the intracellular clustering of iron oxide nanoparticles in the organism. *Nanoscale*, 3(10), 4402-4410.

- Lévy, M., Wilhelm, C., Devaud, M., Levitz, P., & Gazeau, F. (2012). How cellular processing of superparamagnetic nanoparticles affects their magnetic behavior and NMR relaxivity. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 7(4), 373-383.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *small*, 4(1), 26-49.
- Li, C. H., Hodgins, P., & Peterson, G. P. (2011). Experimental study of fundamental mechanisms in inductive heating of ferromagnetic nanoparticles suspension (Fe₃O₄ Iron Oxide Ferrofluid). *Journal of Applied Physics*, 110(5), 054303.
- Li, J., Gong, X. M., Lin, Y. Q., Liu, X. D., Chen, L. L., Li, J. M., ... & Li, D. C. (2014). Investigation into loss in ferrofluid magnetization. *AIP Advances*, 4(7), 077123.
- Li, M., Al-Jamal, K. T., Kostarelos, K., & Reineke, J. (2010). Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles. *ACS nano*, 4(11), 6303-6317.
- Linkov, I., Satterstrom, F. K., & Corey, L. M. (2008). Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4(2), 167-171.
- Lu, A. H., Salabas, E. E., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
- Nanomedicine, E. T. P. (2005). Vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine. *Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg*.
- Narducci, D. (2007). An Introduction to Nanotechnologies: What's in it for Us?. *Veterinary research communications*, 31, 131-137.
- Nasrazadani, S., & Raman, A. (1993). The application of infrared spectroscopy to the study of rust systems—II. Study of cation deficiency in magnetite (Fe₃O₄) produced during its transformation to maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α-Fe₂O₃). *Corrosion Science*, 34(8), 1355-1365.
- Ma, Z., & Liu, H. (2007). Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*, 5(1), 1-10.
- Martinez-Boubeta, C., Simeonidis, K., Serantes, D., Conde-Leborán, I., Kazakis, I., Stefanou, G., ... & Baldomir, D. (2012). Adjustable Hyperthermia Response of Self-Assembled Ferromagnetic Fe-MgO Core-Shell Nanoparticles by Tuning Dipole-Dipole Interactions. *Advanced Functional Materials*, 22(17), 3737-3744.
- McTague, J. P. (1969). Magnetoviscosity of magnetic colloids. *The Journal of Chemical Physics*, 51(1), 133-136.
- Medina, C., Santos-Martinez, M. J., Radomski, A., Corrigan, O. I., & Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British journal of pharmacology*, 150(5), 552-558.
- Mehdaoui, B., Tan, R. P., Meffre, A., Carrey, J., Lachaize, S., Chaudret, B., & Respaud, M. (2013). Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results. *Physical Review B*, 87(17), 174419.
- Minelli, C., Lowe, S. B., & Stevens, M. M. (2010). Engineering nanocomposite materials for cancer therapy. *Small*, 6(21), 2336-2357.

- Mornet, S., Vasseur, S., Grasset, F., & Duguet, E. (2004). Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2161-2175.
- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, 101(2), 239-253.
- Múzquiz-Ramos, E. M., Cortés-Hernández, D. A., Escobedo-Bocardo, J. C., Zugasti-Cruz, A., Ramírez-Gómez, X. S., & Osuna-Alarcón, J. G. (2013). In vitro and in vivo biocompatibility of apatite-coated magnetite nanoparticles for cancer therapy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(4), 1035-1041.
- Odenbach, S., & Thurm, S. (2002). Magnetoviscous effects in ferrofluids. *LECTURE NOTES IN PHYSICS-NEW YORK THEN BERLIN*, 185-201.
- Odenbach, S. (2003). Ferrofluids—magnetically controlled suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 217(1), 171-178.
- O'Grady, K., Lewis, V. G., & Dickson, D. P. E. (1993). Alternating gradient force magnetometry: applications and extension to low temperatures. *Journal of applied physics*, 73(10), 5608-5613.
- Okon, E., Pouliquen, D., Okon, P., Kovaleva, Z. V., Stepanova, T. P., Lavit, S. G., ... & Jallet, P. (1994). Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 71(6), 895-903.
- Oberdörster, G., Maynard, A., Donaldson, K., Castranova, V., Fitzpatrick, J., Ausman, K., ... & Olin, S. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and fibre toxicology*, 2(1), 8. (a)
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839. (b)
- Ota, S., Yamada, T., & Takemura, Y. (2015). Dipole-dipole interaction and its concentration dependence of magnetic fluid evaluated by alternating current hysteresis measurement. *Journal of Applied Physics*, 117(17), 17D713.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167.
- Perez-Castillejos, R., Plaza, J. A., Esteve, J., Losantos, P., Acero, M. C., Cané, C., & Serra-Mestres, F. (2000). The use of ferrofluids in micromechanics. *Sensors and Actuators A: Physical*, 84(1), 176-180.
- Piñeiro, Y., Vargas-Osorio, Z., Bañobre-López, M., Kolen'ko, Y. V., López-Quintela, M. A., & Rivas, J. (2016). Relevant Parameters for Magnetic Hyperthermia in Biological Applications: Agglomeration, Concentration, and Viscosity. *IEEE Transactions on Magnetics*, 52(7), 1-4.
- Piso, M. I. (1999). Applications of magnetic fluids for inertial sensors. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 201(1), 380-384.
- Poperechny, I. S., Raikher, Y. L., & Stepanov, V. I. (2010). Dynamic magnetic hysteresis in single-domain particles with uniaxial anisotropy. *Physical Review B*, 82(17), 174423.

- Poperechny, I. S., Raikher, Y. L., & Stepanov, V. I. (2010). Dynamic magnetic hysteresis in single-domain particles with uniaxial anisotropy. *Physical Review B*, 82(17), 174423.
- Pouliquen, D., Le Jeune, J. J., Perdrisot, R., Ermias, A., & Jallet, P. (1991). Iron oxide nanoparticles for use as an MRI contrast agent: pharmacokinetics and metabolism. *Magnetic resonance imaging*, 9(3), 275-283.
- Prijic, S., & Sersa, G. (2011). Magnetic nanoparticles as targeted delivery systems in oncology. *Radiology and oncology*, 45(1), 1-16.
- Raikher, Y. L., & Shliomis, M. I. (1974). Limiting viscosity of ferromagnetic suspensions in a strong magnetic field. *Journal of Applied Mechanics and Technical Physics*, 15(4), 470-475.
- Rajkhowa, R., Levin, B., Redmond, S. L., Li, L. H., Wang, L., Kanwar, J. R., ... & Wang, X. (2011). Structure and properties of biomedical films prepared from aqueous and acidic silk fibroin solutions. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97(1), 37-45.
- Reeves, R. (1972). An alternating force magnetometer. *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 5(6), 547.
- Richter, H. J., Hempel, K. A., & Pfeiffer, J. (1988). Improvement of sensitivity of the vibrating reed magnetometer. *Review of scientific instruments*, 59(8), 1388-1393.
- Rockwood, D. N., Preda, R. C., Yücel, T., Wang, X., Lovett, M. L., & Kaplan, D. L. (2011). Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin. *Nature protocols*, 6(10), 1612-1631.
- Roos, W., Hempel, K. A., Voigt, C., Dederichs, H., & Schippan, R. (1980). High sensitivity vibrating reed magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 51(5), 612-613.
- Rosensweig, R.E. Ferrohydrodynamics. 1.ed. New York: Dover, 1985.
- Safi, M., Sarrouj, H., Sandre, O., Mignet, N., & Berret, J. F. (2010). Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. *Nanotechnology*, 21(14), 145103.
- Salas, G., Camarero, J., Cabrera, D., Takacs, H., Varela, M., Ludwig, R., ... & Teran, F. J. (2014). Modulation of magnetic heating via dipolar magnetic interactions in monodisperse and crystalline iron oxide nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(34), 19985-19994.
- Savolainen, K., Pylkkänen, L., Norppa, H., Falck, G., Lindberg, H., Tuomi, T., ... & Brouwer, D. (2010). Nanotechnologies, engineered nanomaterials and occupational health and safety—a review. *Safety science*, 48(8), 957-963.
- Sbarbati, R., Giannessi, D., Cenni, M. C., Lazzerini, G., Verni, F., & De Caterina, R. (1991). Pyrolytic carbon coating enhances Teflon and Dacron fabric compatibility with endothelial cell growth. *The International journal of artificial organs*, 14(8), 491-498.
- Scherer, C., & Figueiredo Neto, A. M. (2005). Ferrofluids: properties and applications. *Brazilian Journal of Physics*, 35(3A), 718-727.
- Schlachter E.K., Widmer H.R., Bregy A., Lönnfors-Weitzel T., Vajtai I., Corazza N., Bernau J.P., Weitzel T., Mordasini P., Slotboom J., Herrmann G., Bogni S., Hofmann H., Frenz M., and

Reinert M. (2011), "Metabolic pathway and distribution of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: in vivo study", *Int. J. Nanomedicine*, 6: 1793-1800.

Schultheiss-Grassi, P. P., Wessiken, R., & Dobson, J. (1999). TEM investigations of biogenic magnetite extracted from the human hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1426(1), 212-216.

Sellmyer, D. J., & Skomski, R. (Eds.). (2006). *Advanced magnetic nanostructures*. Springer Science & Business Media.

Serantes, D., Baldomir, D., Martinez-Boubeta, C., Simeonidis, K., Angelakeris, M., Natividad, E., ... & Balcells, L. I. (2010). Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles. *Journal of Applied Physics*, 108(7), 073918.

Serantes, D., Simeonidis, K., Angelakeris, M., Chubykalo-Fesenko, O., Marciello, M., Morales, M. D. P., ... & Martinez-Boubeta, C. (2014). Multiplying magnetic hyperthermia response by nanoparticle assembling. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(11), 5927-5934.

Sharifi, I., Shokrollahi, H., & Amiri, S. (2012). Ferrite-based magnetic nanofluids used in hyperthermia applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(6), 903-915.

Shubayev, V. I., Pisanic, T. R., & Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 467-477.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G. J., Griffiths, S. M., Williams, P. M., Maffei, T. G., ... & Doak, S. H. (2009). NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30(23), 3891-3914.

Skumiel, A., Józefczak, A., Hornowski, T., & Łabowski, M. (2003). The influence of the concentration of ferroparticles in a ferrofluid on its magnetic and acoustic properties. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(24), 3120.

Smith, W.F. Fundamentos de la Ciencia e Ingeniería de Materiales. 2da. Edición. Edit McGraw-Hill. 683-734 (1993).

Soares, P. I., Alves, A. M., Pereira, L. C., Coutinho, J. T., Ferreira, I. M., Novo, C. M., & Borges, J. P. (2014). Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids. *Journal of colloid and interface science*, 419, 46-51.

Soukup, D., Moise, S., Céspedes, E., Dobson, J., & Telling, N. D. (2015). In situ measurement of magnetization relaxation of internalized nanoparticles in live cells. *Acs Nano*, 9(1), 231-240.

Spaldin, N. A., & Mathur, N. D. (2003). Magnetic Materials: Fundamentals and Device Applications. *Physics Today*, 56(12), 62-63.

Spiegel, P. K. (1995). The first clinical X-ray made in America--100 years. *AJR. American journal of roentgenology*, 164(1), 241-243.

Stoner, E. C., & Wohlfarth, E. P. (1948). A mechanism of magnetic hysteresis in heterogeneous alloys. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 240(826), 599-642.

Taketomi, S., & Shull, R. D. (2002). Experimental study of magnetic interactions between colloidal particles in magnetic fluids. *Journal of applied physics*, 91(10), 8546-8548.

- Taketomi, S., & Shull, R. D. (2003). Experimental verification of interactions between randomly distributed fine magnetic particles. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 266(1), 207-214.
- Taketomi, S. (2011). Aggregation of magnetic fluids under an external field: micelle formation: a review. *Jordan Journal of Physics*, 4(1), 1-37.
- Thanh, N. T. (2012). *Magnetic nanoparticles: from fabrication to clinical applications*. CRC press.
- Thünemann, A. F., Schütt, D., Kaufner, L., Pison, U., & Möhwald, H. (2006). Maghemite nanoparticles protectively coated with poly (ethylene imine) and poly (ethylene oxide)-b block-poly (glutamic acid). *Langmuir*, 22(5), 2351-2357.
- Tiwari, A., & Kobayashi, H. (Eds.). (2013). *Responsive Materials and Methods: State-of-the-art Stimuli-responsive Materials and Their Applications*. John Wiley & Sons.
- Tong, L., Zhao, M., Zhu, S., & Chen, J. (2011). Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer. *Frontiers of medicine*, 5(4), 379-387.
- Tomar, M. S., Singh, S. P., Perales-Perez, O., Guzman, R. P., Calderon, E., & Rinaldi-Ramos, C. (2005). Synthesis and magnetic behavior of nanostructured ferrites for spintronics. *Microelectronics journal*, 36(3), 475-479.
- Tóth, É., Helm, L., & Merbach, A. E. (2002). Relaxivity of MRI contrast agents. In *Contrast Agents I* (pp. 61-101). Springer Berlin Heidelberg.
- Trepat, X., Deng, L., An, S. S., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Gerthoffer, W. T., ... & Fredberg, J. J. (2007). Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447(7144), 592-595.
- Trepat, X., Wasserman, M. R., Angelini, T. E., Millet, E., Weitz, D. A., Butler, J. P., & Fredberg, J. J. (2009). Physical forces during collective cell migration. *Nature physics*, 5(6), 426-430.
- Urtizberea, A., Natividad, E., Arizaga, A., Castro, M., & Mediano, A. (2010). Specific absorption rates and magnetic properties of ferrofluids with interaction effects at low concentrations. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(11), 4916-4922.
- Usov, N. A., & Liubimov, B. Y. (2012). Dynamics of magnetic nanoparticle in a viscous liquid: Application to magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Applied Physics*, 112(2), 023901.
- Van Ewijk, G. A., Vroege, G. J., & Philipse, A. P. (2002). Susceptibility measurements on a fractionated aggregate-free ferrofluid. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14(19), 4915.
- Vargas, J. M., Nunes, W. C., Socolovsky, L. M., Knobel, M., & Zanchet, D. (2005). Effect of dipolar interaction observed in iron-based nanoparticles. *Physical Review B*, 72(18), 184428.
- Villanueva, A., Canete, M., Roca, A. G., Calero, M., Veintemillas-Verdaguer, S., Serna, C. J., ... & Miranda, R. (2009). The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*, 20(11), 115103.

- Viswanath, D., et al. Viscosity of Liquids - Theory, Estimation, Experiment, and Data. Springer Editorial. Holanda. 2007. ISBN:1-4020-5481-5.
- Wagner, V., Hüsing, B., Gaisser, S., & Bock, A. K. (2008). Nanomedicine: Drivers for development and possible impacts. *JRC-IPTS, EUR*, 23494.
- Wan, C. P., Sigh, R. V., & Lau, B. H. (1994). A simple fluorometric assay for the determination of cell numbers. *Journal of immunological methods*, 173(2), 265-272.
- Weissleder, R., Stark, D. D., Engelstad, B. L., Bacon, B. R., Compton, C. C., White, D. L., ... & Lewis, J. (1989). Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity. *American Journal of Roentgenology*, 152(1), 167-173.
- Weissleder, R., Elizondo, G., Wittenberg, J., Rabito, C. A., Bengel, H. H., & Josephson, L. (1990). Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology*, 175(2), 489-493.
- Wolf, S. M., & Jones, C. M. (2011). Designing oversight for nanomedicine research in human subjects: systematic analysis of exceptional oversight for emerging technologies. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(4), 1449-1465.
- Wolfsthal, S. (Ed.). (2011). *NMS medicine* (Vol. 7). Lippincott Williams & Wilkins.
- Yang, S. Y., Horng, H. E., Hong, C. Y., & Yang, H. C. (2002). Structures, optical properties and potentially electro-optical applications of magnetic fluid films. *淡江理工學刊*, 5(2), 85-93.
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., & Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab animal*, 40(5), 155.
- Yu, T., Shen, Z. X., Shi, Y., & Ding, J. (2002). Cation migration and magnetic ordering in spinel CoFe₂O₄ powder: micro-Raman scattering study. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 14(37), L613.
- Yusuf, N. A. (1989). Field and concentration dependence of chain formation in magnetic fluids. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 22(12), 1916.
- Zhang, L., He, R., & Gu, H. C. (2006). Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253(5), 2611-2617.
- Zhao, H., Heusler, E., Jones, G., Li, L., Werner, V., Germershaus, O., ... & Meinel, L. (2014). Decoration of silk fibroin by click chemistry for biomedical application. *Journal of structural biology*, 186(3), 420-430.
- Zhuang, J., Fan, K., Gao, L., Lu, D., Feng, J., Yang, D., ... & Yan, X. (2012). Ex vivo detection of iron oxide magnetic nanoparticles in mice using their intrinsic peroxidase-mimicking activity. *Molecular pharmaceutics*, 9(7), 1983-1989.
- Zijlstra, H. (1970). A vibrating reed magnetometer for microscopic particles. *Review of Scientific Instruments*, 41(8), 1241-1243.
- Zolnik, B. S., & Sadrieh, N. (2009). Regulatory perspective on the importance of ADME assessment of nanoscale material containing drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 422-427.

APÉNDICE

A

Fundamentos de magnetismo

A. FUNDAMENTOS DE MAGNETISMO

A.1. Introducción

El magnetismo es un fenómeno que se manifiesta en los materiales como una fuerza atractiva o repulsiva. Las propiedades magnéticas de un material son el resultado de la interacción de su estructura atómica con el campo magnético. Los dipolos magnéticos atómicos presentes en un material inducen los fenómenos magnéticos en éste. Estos dipolos son el resultado del movimiento de los electrones alrededor de su núcleo atómico, y debido a los momentos magnéticos de los núcleos atómicos. El campo exterior alinea los dipolos magnéticos según su dirección y por consiguiente, es posible caracterizar el grado de alineación de los dipolos por el momento magnético total por unidad de volumen del material, siendo este momento magnético total la suma vectorial de los momentos individuales. Esta magnitud se denomina *magnetización* M del material.

A.2. Comportamiento magnético

El comportamiento magnético de un material depende básicamente de los electrones de los átomos que están compuestos por el número de electrones desapareados que posea cada átomo, así como del orbital en el que se encuentre. Los efectos magnéticos surgen del movimiento de las partículas cargadas eléctricamente. Una partícula con carga eléctrica crea, cuando gira, un dipolo magnético (Figura A.1) o magnetrón de Born (Kasap, 2006). Esta propiedad física es análoga al dipolo eléctrico, y puede ser visualizada como un bucle con una corriente I circulando en un área A cerrada (Figura A.1A). Si se define un vector unitario U_n como un vector normal unitario al plano en el

cual el bucle está contenido, entonces el dipolo magnético puede ser expresado como de la siguiente manera:

$$U_m = IAU_n \quad (A.1)$$

Los dipolos magnéticos pueden ser alineados a través de un campo magnético alineado externamente (Figura A.1B), que ejerce un torque sobre los dipolos con el fin de orientarlos a lo largo del eje del campo (Kasap, 2006; Callister, 2007).

Figura A.1. Momento dipolar magnético (A), y su interacción un campo magnético aplicado externamente (B). (Kasap, 2006).

Un electrón que orbita en un átomo se comporta de manera similar a los dipolos magnéticos, de manera que al aplicar el campo magnético externo al material, los dipolos magnéticos se ordenan con el campo dando lugar a un momento magnético dentro del material. Por lo tanto, las propiedades magnéticas macroscópicas de los materiales son derivadas de los momentos magnéticos de sus electrones individuales (Callister, 2007). Estos momentos magnéticos poseen dos tipos de momentos angulares: Un **momento orbital** que resulta del movimiento del electrón alrededor del núcleo y se define como:

$$\mu_l = -\frac{e}{2m_e}L \quad (A.2)$$

Y un **momento de espín** (Figura A.2) que surge del momento angular intrínseco del electrón alrededor de su eje y es determinado por:

$$\mu_s = -\frac{e}{m_e}S \quad (A.3)$$

Ambos momentos pueden interactuar como cualquier par de dipolos y producir un acoplamiento espín-orbital. Sin embargo, la suma de estas contribuciones requiere cálculos complejos debido a su naturaleza cuántica y las interacciones que experimentan los momentos magnéticos del electrón individual. No obstante, se puede deducir intuitivamente que solo los materiales con subniveles sin llenar, mostrarán una respuesta magnética apreciable.

Figura A.2. Momento magnético de Spin (Kasap, 2006).

A.3. Inducción magnética y magnetización

Si un material es sometido a un *campo magnético externo de intensidad H*, cada uno de sus átomos responderá a este estímulo y desarrollará una precesión de los momentos magnéticos de sus electrones sobre la dirección del campo aplicado. En consecuencia, su respuesta es la *inducción magnética B*. La relación entre *B* y *H* es una propiedad del material. En algunos materiales (y en el espacio vacío) *B* es una función lineal de *H*. La relación de *B* y *H* está dada por (Pankhurst y col., 2003):

$$B = \mu_0(H + M) \quad (A.4)$$

Donde μ_0 es la permeabilidad en el espacio libre y *M* es la magnetización o imanación. La *magnetización M* se caracteriza cuantitativamente por un vector y es definida como el total de momentos magnéticos por unidad de volumen de un sólido, de acuerdo a:

$$M = m/V \quad (A.5)$$

Donde m es el momento magnético y V es el volumen del material.

M es una propiedad del material, y depende de los momentos magnéticos individuales de los iones constituyentes, átomos o moléculas y sobre cómo estos momentos dipolares interactúan entre sí (Spaldin y col., 2003).

A.4. Susceptibilidad y permeabilidad magnética

Todos los materiales son magnéticos en alguna medida, sin embargo, su respuesta depende de su estructura atómica y la temperatura (Thanh, 2012). Las propiedades de un material están definidas no solo por la magnetización, o la inducción magnética, sino por la forma como estas cantidades varían con el campo magnético aplicado externamente. La relación entre la magnetización y el campo aplicado se conoce como *susceptibilidad magnética* (χ). La susceptibilidad magnética es una constante de proporcionalidad adimensional y se define como el grado de magnetización que presenta un material, en respuesta a un campo magnético, y se expresa de la siguiente manera:

$$M = \chi H \quad (A.6)$$

En el Sistema Internacional de medidas, tanto M como H se expresan en A/m.

La relación entre la inducción magnética B y el campo magnético aplicado H , se conoce como *permeabilidad magnética* (μ) y viene dada por:

$$\mu = \frac{B}{H} \quad (A.7)$$

La permeabilidad magnética indica que tan permeable es un material en presencia de un campo magnético. Un material que concentra una gran cantidad de densidad de flujo en su interior tiene una alta permeabilidad. La relación entre la permeabilidad y la susceptibilidad está dada por:

$$\mu = \mu_0(1 + \chi) \quad (A.8)$$

Donde μ_0 es la permeabilidad del espacio libre. Las gráficas de M o B vs H son denominadas curvas de magnetización (M - H), y su comportamiento depende de cada tipo de material (Jiles, 1998; Cullity, 2008).

A.5. Materiales magnéticos de acuerdo a su respuesta

Como se explicó anteriormente, cuando se aplica un campo magnético externo al material, los dipolos magnéticos se alinean con el campo magnético dando lugar a un momento magnético dentro del material. Un acoplamiento espín-orbital es generado cuando ambos momentos (orbital y de espín) interactúan. Las características de este acoplamiento originan las propiedades magnéticas de los átomos y las moléculas, de esta manera, el material puede ser clasificados según la respuesta al campo magnético externo en: *diagnético*, *paramagnético*, *ferromagnético* y *superparamagnético* (Figura A.3). Los materiales magnéticos se clasifican tradicionalmente de acuerdo a la susceptibilidad magnética, χ , (Jilles, 1998).

Figura A.3. Curva de magnetización de los materiales. Magnetización M frente al campo magnético aplicado H característica típica de nanopartículas ferromagnéticas y superparamagnéticas. Como comparación, también se muestra el comportamiento diamagnético y paramagnético (Arruebo y col., 2007).

En los materiales **diamagnéticos**, parte de los pequeños campos magnéticos inducidos por el movimiento de rotación de los electrones del propio material, en presencia de un campo magnético externo, se orientan de forma opuesta al campo. Por consiguiente, un material diamagnético tiende a desplazarse a la zona donde el campo magnético externo es más débil. Estos materiales tienen la susceptibilidad magnética negativa ($\chi < 0$) y repelen débilmente el campo magnético aplicado. El comportamiento diamagnético no tiene aplicaciones importantes en materiales o dispositivos. Sin embargo, el agua y

muchos tejidos biológicos (las células y las proteínas) pertenecen a este grupo (Pankhurst y col., 2003). El resto de comportamientos magnéticos se observan en materiales que tienen algún otro electrón desapareado en sus capas atómicas, a menudo en las capas $3d$ o $4f$ de cada átomo.

En los materiales **paramagnéticos**, parte de los pequeños campos magnéticos inducidos por el movimiento de rotación de los electrones del propio material, en presencia de un campo magnético externo se alinean en la misma dirección que éste. Como consecuencia, el campo magnético en el interior se hace más intenso, y el material tiende a desplazarse al lugar donde el campo magnético externo es más intenso. Las dos propiedades que definen a los materiales paramagnéticos son: una susceptibilidad magnética ligeramente positiva ($\chi \sim 0$), que es directamente proporcional al campo magnético, y una magnetización nula en la ausencia del campo magnético externo. La causa de que estos materiales no presenten una magnetización remanente se debe a que, en un campo magnético, los espines se orientan en la dirección del campo magnético por ser el estado de más baja energía. Sin embargo, en ausencia del campo magnético, la agitación térmica fuerza a los espines a disponerse en una orientación aleatoria. Por esta razón, a bajas temperaturas no se observa paramagnetismo, debido al comportamiento cooperativo entre los espines, que se produce por debajo de la temperatura de transición específica denominada Temperatura de Curie (transición entre ferromagnetismo y paramagnetismo, debido a las fluctuaciones térmicas). Por debajo de la temperatura de Curie, el acoplamiento de los espines produce uno de los tres tipos diferentes de magnetismo colectivo: ferromagnetismo, ferrimagnetismo y antiferrimagnetismo.

En los materiales **ferromagnéticos** (hierro, níquel y cobalto) la susceptibilidad magnética es positiva y mucho mas grande ($\chi \gg 1$). Estos materiales presentan, por debajo de la temperatura de Curie (T_c), momentos magnéticos atómicos de igual magnitud y alineados de manera paralela (en la misma dirección del campo externo, pero incluso en ausencia de un campo magnético externo) debido a que sus estructuras cristalinas permiten un acoplamiento directo de las interacciones entre los momentos magnéticos. Los electrones interactúan mediante un mecanismo de intercambio (Coey, 1988) originando un fuerte incremento de la densidad de flujo magnético. Los fuertes acoplamientos de los espines persisten después de eliminar el campo magnético externo, dando lugar a una magnetización permanente. Otra importante característica de los ferromagnéticos es la aparición espontánea de paredes de dominios dentro de su

volumen. Las paredes de dominio son las regiones de frontera donde se lleva a cabo un cambio en el alineamiento de los momentos magnéticos de los átomos individuales (Figura A.4).

Figura A.4. Paredes de dominio en un material ferromagnético. (Kasap, 2006).

Esta disposición segmentada de momentos magnéticos se esfuerza por minimizar la energía magnetostática del material (Figura A.5).

Figura A.5. Minimización de la energía magnetostática a través de la formación de las paredes de dominio (Kasap, 2006).

Tal disposición significa que siempre que un campo externo es aplicado a un material ferromagnético, éste debe primero superar la barrera de energía necesaria para activar el movimiento relativo o el deslizamiento de las paredes de dominio de modo que la muestra pueda estar completamente magnetizada en una sola dirección.

Esto implica necesariamente pérdidas de energía mientras el material se mueve gradualmente a través de varios estados magnéticos metaestables (Andrä, 2007). En la figura A.6, puede observarse la evolución de las paredes de dominio en un material

ferromagnético. En consecuencia, la respuesta magnética de un material ferromagnético a un campo externo resulta en un ciclo de histéresis característico (Figura A.3).

Figura A.6. Evolución de las paredes de dominio de un material ferromagnético bajo la influencia de un campo magnético aplicado. (Kasap, 2006).

Analizando la figura A.6 se tiene que, si se aplica un campo magnético externo H muy pequeño a lo largo de $+x$, las paredes de dominio dentro de varios granos comienzan a moverse distancias pequeñas, y los dominios orientados favorablemente crecen a expensas de los dominios no alineados (a). Las paredes de dominio que están atrapadas en imperfecciones tienden a inclinarse. El campo magnético aplicado proporciona la fuerza requerida para que las paredes logren desplazarse (Oa). A medida que el campo magnético se incrementa, los dominios crecen y aumenta la magnetización neta (b). La magnetización continúa aumentando por los movimientos de la pared de dominio y por consiguiente, los dominios crecen y la magnetización neta aumenta. Eventualmente, los movimientos de la pared del dominio dejan cada grano de cristal con un solo dominio y la magnetización en una de las direcciones fáciles (c). Finalmente, cuando el campo magnético es suficientemente fuerte para alinear M a lo largo de H , la muestra alcanza la magnetización de saturación (M_s) dirigida a lo largo de H (d). Cuando el campo magnético externo es eliminado (e), la resistencia de las paredes de los dominios impide el nuevo crecimiento de los dominios en orientaciones aleatorias. Como resultado, muchos de los dominios permanecen orientados en la dirección del campo original generando una magnetización residual en el material conocido como **magnetización remanente (M_r)** que actúa como un imán permanente. Si un campo magnético externo

se aplica en la dirección opuesta ($-x$), los dominios crecen ahora con una alineación en dicha dirección. Por lo tanto, para forzar a los dominios a orientarse aleatoriamente y cancelar los efectos entre sí, es necesario aplicar un campo opuesto llamado ***campo coercitivo (H_c)*** (f), este campo es requerido para desmagnetizar totalmente la muestra y representa la resistencia de la muestra a la desmagnetización. Finalmente, un mayor incremento en la intensidad del campo magnético, alinea los dominios hacia la saturación en dirección opuesta. Si el campo aplicado se alterna continuamente, la relación de magnetización con el campo magnético traza una curva de histéresis. La histéresis tiene su origen en la estructura atómica de un material ferromagnético. La causa de este ciclo es la dificultad que presenta el desplazar las paredes entre dominios. Las imperfecciones del cristal tienden a anclar las paredes, que como consecuencia no se mueven suavemente con el campo aplicado. Esta histéresis, cuando es muy grande, permite la existencia de imanes permanentes.

Existen otros tipos de materiales magnéticos muy relacionados con los ferromagnéticos porque están magnéticamente ordenados: antiferromagnéticos, helimagnéticos y superparamagnéticos. En la mayoría de medidas magnéticas los ferrimagnéticos son indistinguibles de los ferromagnéticos, mientras que los antiferromagnéticos y helimagnéticos fueron, durante muchos años, confundidos con los paramagnéticos.

Los materiales que tienen momentos magnéticos atómicos de igual magnitud y dispuestos de manera antiparalela exhiben, por debajo de la temperatura de Néel (temperatura a la cual los materiales antiferromagnéticos pierden el orden de largo alcance debido a las fluctuaciones y se observa el comportamiento paramagnético), son denominados materiales ***antiferromagnéticos***. Estos materiales se caracterizan por poseer una magnetización neta nula. Por encima de la temperatura de Néel, la energía térmica es suficiente para producir que los momentos magnéticos atómicos alineados de manera opuesta fluctúen de manera aleatoria, conduciendo a la desaparición de su ordenamiento. En este estado, los materiales exhiben un comportamiento paramagnético. Si los electrones, por debajo de la temperatura de Curie, están alineados de forma antiparalela, pero el momento magnético resultante no se anula, el material es ***ferrimagnético*** (Raikher y col., 1974). Por encima de la temperatura de Curie, el material se comporta como un paramagnético.

A.6. Materiales magnéticos blandos

Los materiales magnéticos blandos son fácilmente imanables y desimanables presentando curvas de histéresis de apariencia estrecha con bajos campos coercitivos y alta saturación y teniendo por tanto altas permeabilidades magnéticas μ . Este hecho es debido a la presencia de pocas imperfecciones y defectos que constituyen obstáculos al movimiento de paredes de los dominios magnéticos ó al giro de la imanación dentro de un dominio. Igualmente, y para favorecer estos movimientos, se requieren bajas constantes de anisotropía y de magnetostricción. El uso de estos materiales está centrado en núcleos para transformadores, motores, generadores, equipos de comunicación de alta sensibilidad, etc. En la figura A.7 se muestra la curva de histéresis para materiales blandos y duros (Cullity, 2008; Smith, 1993).

Figura A.7. Curvas de magnetización de materiales magnéticos blandos y duros. (Kasap, 2006).

En el proceso de imanación-desimanación del material magnético ocurren unas pérdidas energéticas básicamente causadas por dos fenómenos.

- ❖ *Pérdidas por histéresis:* son debidas a la disipación de energía requerida para desplazar las paredes de los dominios magnéticos durante la imanación y desimanación del material. Estas pérdidas aumentan por la presencia de impurezas, imperfecciones, precipitados, dislocaciones entre otras, que actúan como barreras que impiden el desplazamiento de las paredes de dominios durante el ciclo de imanación, incrementando las pérdidas de energía de histéresis. El área encerrada por la curva de histéresis es una medida de la energía perdida debida a la histéresis magnética.
- ❖ *Pérdidas por corrientes parásitas:* son corrientes inducidas por variaciones en el flujo magnético, y se pueden reducir con un aumento de la resistividad del material. Esto se consigue por ejemplo añadiendo impurezas sustitucionales.

Otro modo de reducir las corrientes parásitas a nivel macroscópico en los núcleos de los transformadores consiste en utilizar una estructura laminar o de hojas, aplicando una capa aislante entre una hoja y la siguiente.

A.7. Estructura de los dominios

La estructura de dominios de un material ferro-ferrimagnético está determinada por varios tipos de energía (Kittel, 1996). La estructura más estable se alcanza cuando la energía potencial del conjunto es mínima. La energía magnética total del material es la suma de las siguientes contribuciones:

- ❖ *Energía de anisotropía:* En un cristal ferromagnético existe una energía denominada *energía maneto-cristalina* o de anisotropía que hace que la imanación se oriente preferiblemente a lo largo de ciertos ejes cristalográficos definidos llamados direcciones de fácil imanación. Esta energía es debida a las interacciones electrostáticas asociadas a distribuciones electrónicas. Para materiales ferromagnéticos policristalinos, los granos a diferentes orientaciones alcanzarán imanación de saturación a diferentes intensidades de campo. Los granos cuyas orientaciones están en la dirección de fácil imanación se saturarán a bajos campos, mientras que los orientados en las direcciones difíciles, deberán rotar su momento resultante en la dirección del campo, de manera que alcanzarán la saturación a campos con intensidad más alta. El trabajo realizado para rotar los dominios debido a esta anisotropía se denomina energía de anisotropía magnetocristalina. La energía de anisotropía tiene su origen en el hecho de que la distribución de cargas de iones próximos no es esférica sino esferoidal, debido a la interacción spin-órbita. La asimetría en la distribución de carga está ligada a la dirección de spin provocando que la rotación de la dirección de los spines con respecto a los ejes cristalinos cambia la energía de canje y la energía de interacción electrostática entre átomos vecinos (Kittel, 2006; Campbell, 1999; Chen, 2013).
- ❖ *Energía de la pared el dominio:* La variación completa de spín no ocurre de un salto discontinuo en un solo plano atómico, sino de forma gradual sobre un número de planos atómicos. La energía de canje es menor cuando se reparte sobre un gran número de spines.

- ❖ *Energía magnetoestrictiva:* cuando un material se imana, sus dimensiones cambian ligeramente y la muestra se expandirá o contraerá en la dirección de imanación. Esta deformación elástica reversible inducida magnéticamente se denomina magnetostricción y es del orden de 10^{-6} . La energía debida a los esfuerzos mecánicos de la magnetoestricción se llama energía magnetoestrictiva. El origen de la magnetoestricción está relacionado con el cambio en la longitud de enlace entre átomos, cuando el momento dipolar de su espín electrónico está rotando para la alineación durante la imanación. Los dipolos pueden atraerse o repelerse uno a otro, dando lugar a la contracción o expansión del material durante la imanación. En una distribución de dominios, los cambios dimensionales de los respectivos dominios harán que éstos no encajen exactamente dando lugar a una energía elástica de elongación. Este aumento de energía del sistema es una limitación a la formación de dominios magnéticos (Kittel, 1996).
- ❖ *Energía magnetoestática o energía de forma:* Es la energía potencial magnética de un material ferromagnético debida al campo magnético externo generado (Kittel, 1996). Esta energía magnetostática es la energía requerida por una partícula para crear su campo.

A.8. Magnetismo de pequeñas partículas

La mayoría de los magnetos bulk consisten de un gran número de dominios magnéticos (Figura A.8) que se forman en un esfuerzo para minimizar la energía magnetostática del material. Un esquema de una configuración de un dominio simplificado se muestra en la figura A.8A. Por esta razón, la microestructura de la mayoría de los materiales magnéticos juega un papel importante en la determinación de las propiedades magnéticas. Como el tamaño de la partícula se reduce a nanoescala, el tamaño de la partícula y el cambio de longitud convergen permitiendo estados de dominio simple para estabilizarse (Figura A.8B). El magnetismo, y por lo tanto las propiedades magnéticas de las nanopartículas, son esencialmente dictadas por las propiedades intrínsecas del material tal como la anisotropía y la magnetización de saturación.

Figura A.8. Esquema de configuración de dominio magnéticos para A. multidominio y B. dominio simple. (Sellmyer, 2006).

La transición de dominios múltiples a dominio simple se hace muy evidente cuando se considera la coercitividad como una función del tamaño de la partícula (Figura A.9).

Figura A.9. Esquema de la coercitividad en función del tamaño de la partícula. (Sellmyer, 2006).

En la figura A.9 se distinguen básicamente dos zonas: la zona multidominio (MD) en donde cada grano presenta en su interior varios dominios magnéticos, y la zona de dominio único o mono dominio (SD) en donde cada grano está asociado a un único dominio. Los materiales magnéticos en la zona MD presentan campos coercitivos y remanencias bajas dado que la imanación está asociada a movimientos de paredes de dominios, proceso energéticamente sencillo y realizable a campos magnéticos bajos. En cambio en la zona SD, la imanación está asociada a rotaciones de la imanación en el dominio, proceso energéticamente costoso, dando lugar a remanencias y coercitividades altas. Para la magnetita, el tamaño de grano de transición entre la zona SD y MD está en

torno a los 80 nm. Si dentro de la zona SD el tamaño de grano sigue disminuyendo, entramos en la zona superparamagnética (SPM) en donde tanto la coercitividad como la remanencia se hacen cero. El tamaño superparamagnético depende estrictamente de la anisotropía magnetocristalina del material (Sellmyer, 2006).

A.8.1. Superparamagnetismo

El efecto del tamaño del material se analiza en la figura A.10. Cuando el tamaño del sólido es inferior al tamaño del dominio magnético (D_{CRIT}), el sólido posee todos sus momentos magnéticos orientados en la misma dirección cuando se le aplica un campo magnético. Esto da lugar a un dipolo permanente dentro del sólido de una magnitud similar a la de los sólidos ferromagnéticos y unas 100 veces mayor que los paramagnéticos (Frenkel, 1930; Kittel, 1946). En ausencia de campo magnético, este dipolo se mantiene (comportamiento ferromagnético dentro de monodominio) hasta bajar a un tamaño (D_{S-F}) a partir del cual los dipolos se orientan al azar y por tanto el momento magnético resultante es nulo, al igual que los sólidos paramagnéticos. Este comportamiento es típico de sólidos superparamagnéticos (Figura A.3, color azul).

Figura A.10. Estructura magnética de los sólidos ferromagnéticos en función del tamaño de la partícula. A) Multidominio. B) Monodominio. C) Superparamagnético.

Las propiedades superparamagnéticas están directamente ligadas con el tamaño de las nanopartículas magnéticas. Solamente partículas con diámetro menor a 30 nm son consideradas como superparamagnéticas. Cuanto más próximo a la forma esférica y mayor uniformidad exista entre las formas, mayor será la eficiencia de las nanopartículas. En este caso, a temperaturas inferiores a la de Curie, la energía térmica es suficiente para cambiar la dirección de la magnetización de estas partículas

monodominio. Las fluctuaciones resultantes en la dirección de la magnetización causan que el campo magnético se promedie a cero. De este modo, el material se comporta de manera similar a un paramagneto, solo que en vez de ser cada átomo individual independientemente influenciado por el campo magnético externo, aquí es el momento magnético de la partícula monodominio el que tiende a alinearse con el campo aplicado. Vamos a considerar las propiedades magnéticas de un conjunto de partículas no interactuantes (con una distribución amplia de tamaños y con una distribución aleatoria de ejes de fácil magnetización). Tal sistema puede ser estudiado dentro de la teoría para el superparamagnetismo. La primera suposición de la teoría superparamagnética es la de considerar que los momentos magnéticos atómicos en el interior de una partícula se mueven coherentemente, es decir, que el momento magnético total puede ser representado por un único vector clásico de magnitud (Tomar y col., 2005; Jacintho y col., 2009; Yu y col., 2002):

$$\mu = \mu_{atom}N \quad (A.9)$$

Donde, μ_{atom} es el momento magnético atómico y N es el número de átomos magnéticos que conforman dicha partícula. En el caso más simple, la dirección del momento magnético es determinada por una anisotropía uniaxial (de origen magnetocristalina, de forma o magnetoelástica), y por el campo magnético externo. Es decir, una partícula muy pequeña presentará una dirección preferencial llamada eje de fácil magnetización (eje fácil), que es la dirección donde preferentemente se hallará el vector momento magnético. La relajación temporal de estas partículas consistentes de un monodominio puede ser descrito por una ley de tipo Arrhenius, expresado de la siguiente forma:

$$M(t) = M_0 e^{-t/\tau} \quad (A.10)$$

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. Este tiempo característico de la partícula es función de la barrera de energía y de la temperatura, y está dado por:

$$\tau = \tau_0 e^{\frac{K_a V}{k_B T}} \quad (A.11)$$

Donde, τ_0 es 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. Su valor puede ser determinado experimentalmente y también puede ser predicho a través de modelos teóricos. Los valores aceptados hoy en día para τ_0 están comprendidos entre 10^{-9} - 10^{-11} s. k_B es la constante de Boltzman, V es el volumen de la partícula y k_a es la constante de anisotropía magnética. El producto $K_a V$ se denomina energía de anisotropía E_B o barrera de energía y es la que separa los dos estados de equilibrio y, es necesaria superarla para invertir el momento magnético (Figura A.11). En estos sistemas, el comportamiento magnético observado depende del valor del tiempo típico de medición τ_m de la técnica experimental utilizada con respecto al tiempo de relajación τ propio del sistema asociado a la barrera de energía.

Figura A.11. Esquema de la variación de la energía de una partícula monodominio con anisotropía uniaxial en función del ángulo de magnetización.

Si $\tau_m \gg \tau$, la relajación ocurre más rápido que el promedio temporal de la orientación de la magnetización observado en esa ventana temporal, dejando que el sistema llegue al equilibrio termodinámico. Lo que se observa es que el conjunto de partículas se comporta de modo análogo a un sistema paramagnético. Si por el contrario, $\tau \gg \tau_m$, la relajación del sistema resulta muy lenta y se observan propiedades cuasiestáticas como en los sistemas magnéticamente ordenados. Este régimen se denomina *bloqueado*. La temperatura que separa estos regímenes se denomina temperatura de bloqueo T_B y depende del tiempo característico de medición τ_m . La temperatura de bloqueo, que se define como aquella en la que $\tau_m = \tau$, está asociada a la barrera de energía, y por ello se incrementa con el aumento del tamaño de la partícula. Por el contrario, para un

tamaño dado, T_B disminuye con el incremento del tiempo característico de medición. Para una partícula de simetría uniaxial, la anisotropía magnética puede ser escrita como sigue:

$$E_\theta = E_B \sin^2 \theta \quad (A.12)$$

Donde, θ es el ángulo entre la magnetización y el eje de fácil magnetización, y $E_B = k_a V$ es la barrera de energía. Si se aplica un campo magnético H en la dirección del eje z , la energía magnética se reescribirá de la siguiente manera:

$$E_\theta = E_B \sin^2 \theta - \mu H \cos \theta \quad (A.13)$$

Donde μ es el momento magnético de la partícula.

Si se define un volumen crítico V_c a una cierta temperatura constante T_0 , requiere que $\tau_m = \tau$

$$\ln \tau = \ln \tau_0 + \frac{k_a V_c}{k_B T_0} \quad (A.14)$$

y, por lo tanto, para $\tau_m = 100$ s, se tiene que:

$$V_c \approx \frac{25 k_B T}{k_a} \quad (A.15)$$

Para un tiempo dado de medida es posible definir la temperatura que separa ambos regímenes, conocida como la temperatura de bloqueo T_B . Ahora, para un cierto volumen fijo $V = V_0$ y $\tau_m = \tau$, de esta manera se obtiene:

$$\ln \tau = \ln \tau_0 + \frac{k_a V_0}{k_B T_0} \quad (A.16)$$

y para $\tau_m = 100$ s, se obtiene un resultado conocido:

$$T_B \approx \frac{k_a V_0}{25 k_B} \quad (A.17)$$

Este resultado indica aspectos importantes. El volumen crítico para el superparamagnetismo es directamente proporcional a la temperatura, es decir, cuanto mayor sea la temperatura, mayor será el tamaño crítico de las partículas y todas aquellas que tengan un tamaño menor o igual al crítico estarán en el régimen superparamagnético. También se puede observar que la temperatura de bloqueo es directamente proporcional al volumen de las partículas y a su constante de anisotropía,

es decir, partículas mayores van a ser superparamagnéticas a temperaturas más elevadas. Para altas temperaturas o partículas extremadamente pequeñas, el tiempo característico τ de relajación térmica resulta ser mucho menor que cualquier tiempo característico utilizado en los equipos de medición, y por lo tanto el momento magnético puede “saltar” de un pozo de potencial al otro varias veces durante la medición y el sistema se encontrara en el régimen superparamagnético. Por otro lado, cuando la temperatura es suficientemente baja, la escala temporal τ se torna muy grande, mucho mayor que cualquier tiempo de observación, y por lo tanto los momentos magnéticos permanecen “congelados”, sin poder explorar nuevos estados (la activación térmica no es suficiente para superar la barrera de energía) con lo que el estado magnético que se mide depende de la historia previa del sistema. Ahora consideremos un conjunto formado por partículas monodominio cada una con un momento magnético μ y una anisotropía despreciable. A pesar de que el magnetismo es un fenómeno puramente cuántico, se puede considerar al momento magnético μ como un vector clásico, considerando que los momentos magnéticos de cada átomo dentro de cada partícula están acoplados ferromagnéticamente. De este modo, todos estos momentos magnéticos estarán acoplados fuertemente, aun durante una rotación del momento total μ (*rotación coherente*). Por lo tanto, el tratamiento estadístico de este sistema puede seguir la misma formulación clásica del paramagnetismo, solo que con momentos magnéticos mucho mayores que el de los iones. Ahora, se considera que el sistema se encuentra a una temperatura T , en presencia de un campo magnético H , y ya habiendo alcanzando el equilibrio térmico. A esa temperatura todas las partículas se encontraran en el estado superparamagnético. De esta manera, se tiene una distribución de Boltzmann de los momentos μ con relación al campo H , de modo análogo al caso del paramagnetismo clásico. Cada momento magnético tiene una cierta energía potencial U_p dada por:

$$U_p = -\mu \cdot H = \mu H \cos \theta \quad (A.18)$$

El número de momentos entre θ y $\theta + d\theta$ es proporcional a dA multiplicado por el factor de Boltzmann:

$$dn = K dA e^{\frac{U_p}{k_B T}} = 2\pi K e^{\frac{\mu H \cos \theta}{k_B T}} \sin \theta d\theta \quad (A.19)$$

Donde K es un factor de proporcionalidad, determinado por la condición

$$\int_0^n dn = n \quad (A.20)$$

Si

$$a = \frac{\mu H}{k_B T} \quad (A.21)$$

entonces,

$$n = 2\pi K \int_0^\pi e^{a \cos \theta} \sin \theta d\theta \quad (A.22)$$

Multiplicando el número de momentos magnéticos dn por la contribución $\mu \cos \theta$ de cada momento, e integrando sobre el número total de momentos, obtenemos la magnetización total M :

$$M = \int_0^n \mu \cos \theta dn \quad (A.23)$$

$$M = 2\pi K \mu \int_0^\pi e^{a \cos \theta} \sin \theta \cos \theta d\theta \quad (A.24)$$

$$M = \frac{n\mu \int_0^\pi e^{a \cos \theta} \sin \theta \cos \theta d\theta}{\int_0^\pi e^{a \cos \theta} \sin \theta d\theta} \quad (A.25)$$

$$M = n\mu \left(\coth a - \frac{1}{a} \right) \quad (A.26)$$

Donde $n\mu$ es el máximo valor posible del momento que el material puede tener y corresponde al alineamiento perfecto de todos los momentos magnéticos con el campo. Esa magnetización corresponde a la magnetización de saturación M_0 (Spaldin, 2003; Jiles, 1991; Cullity, 2008; Kittel, 1996; Knobel y col., 2004):

$$\frac{M}{M_0} = \coth \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) - \frac{\mu H}{k_B T} = L \left(\frac{\mu H}{k_B T} \right) \quad (A.27)$$

Donde L es la conocida función de Langevin. De la ecuación (A.26) se puede ver que es relativamente simple analizar si un sistema es superparamagnético o no. Basta con realizar medidas de magnetización vs campo magnético a diversas temperaturas. Al realizar la gráfica de M/M_0 vs H/T se espera que todas las curvas converjan a una única curva universal (curva de Langevin). En los sistemas reales uno de los motivos principales por los que no se tiene un buen ajuste de la curva experimental se debe a que existe una distribución de tamaños, o una distribución aleatoria de ejes de anisotropía (con lo que se pueden tener momentos magnéticos bloqueados, o que dada su orientación no ven la barrera de energía) y las interacciones entre partículas. Los sistemas de partículas con los que se trabaja comúnmente presentan una distribución de tamaños de partículas. Sea $f(\mu)$ la función distribución de tamaños de partículas, la magnetización macroscópica estará dada por:

$$M(H, T) = \int_0^\infty \mu L\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu \quad (A.28)$$

Para aplicar la ecuación (A.28) a datos experimentales se debe considerar una función de distribución apropiada. Generalmente, observaciones a través de microscopia electrónica indican que la distribución de tamaños en sistemas granulares sigue una función de distribución del tipo log-normal:

$$f(\mu) = \frac{N}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\ln^2(\mu/\mu_0)}{2\sigma^2}} \quad (A.29)$$

De acuerdo con la definición dada, el momento magnético medio está dado por:

$$\langle \mu \rangle = \mu_0 e^{\frac{\sigma^2}{2}} \quad (A.30)$$

De este modo, los parámetros μ_0 y σ pueden ser determinados a través de un ajuste apropiado a la curva de magnetización experimental. Además de eso, si consideramos que las partículas poseen simetría esférica, es posible obtener la distribución de tamaños, densidad de partículas y distancia media entre ellas. Existen otras medidas magnéticas que pueden ser utilizadas para estudiar sistemas superparamagnético, como la espectroscopia Mössbauer, las medidas magnéticas macroscópicas en función de la temperatura son muy importantes y aportan considerable información fundamental al estudio de partículas finas. En este tipo de medidas podemos destacar las mediciones de magnetización de enfriado sin campo magnético aplicado (Zero Field Cooling, ZFC) y

enfriado con campo magnético aplicado (Field Cooling, FC), que indican con precisión la temperatura media de bloqueo y también dan información acerca del perfil de la distribución de tamaños de partículas.

A.8.2. Anisotropía

La anisotropía es la ruptura de la simetría esférica del entorno del momento magnético en direcciones privilegiadas. Existen 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 manera, 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. Por consiguiente, 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). La anisotropía magnetostática o energía de forma, es la energía requerida por una partícula para crear su campo. La de superficie, es causada por las distorsiones del cristal que modifican la anisotropía magnetocristalina. La anisotropía por interacción, es la 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:

$$E_a = K_a V \sin^2 \theta \quad (A.31)$$

Donde θ es el ángulo entre el momento magnético de la partícula y el eje de anisotropía paralelo a la dirección z (Figura A.12).

Figura A.12. Esquema del eje de anisotropía (línea punteada) de una partícula monodominio, junto con el vector magnetización y de un campo magnético aplicado..

El campo de anisotropía tiene cuatro contribuciones. La anisotropía magnetocristalina que depende de la composición química y la estructura cristalográfica del material, el campo demagnetizante determinado por la forma de la partícula, la constante de anisotropía la cual depende de la estructura superficial de la partícula y la interacción dipolar entre dos partículas vecinas para estructuras aglomeradas (Laurent y col., 2008). Generalmente, la anisotropía tiene simetría uniaxial en sistemas de más alta simetría basados en modelos cúbicos.

A.8.3. 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 un campo magnético externo, 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 con el fin de vencer la barrera de energía generada principalmente por la anisotropía para alinearse con el campo.

La rotación de los momentos magnéticos puede darse de dos maneras 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 magnético sobre el momento, de manera que su rotación física permite que se produzca una alineación.

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

Para partículas de pequeño tamaño, 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 más 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:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (A.32)$$

Donde, τ_N y τ_B son el tiempo de relajación de Néel y el tiempo de relajación de Brown respectivamente. En la figura A.13, se representa esquemáticamente los mecanismos de relajación de las nanopartículas.

El modelo de Stoner-Wohlfarth (Stoner y col., 1948), describe sistemas magnéticos que satisfacen ciertas propiedades. Los elementos que constituyen estos sistemas deben ser monodominio, poseer anisotropía con simetría uniaxial y no presentar interacción entre ellos. Además, se asume que la rotación del momento magnético de cada uno de los elementos se presenta en forma global.

Figura A.13. Mecanismos de relajación de Néel y de Brown.

Modelo de Néel

En la ecuación (A.11) 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 muestra una fuerte dependencia con el tamaño, la forma y la composición química de las nanopartículas (Vargas y col., 2005).

Si se considera un conjunto de átomos ordenados magnéticamente con $T < T_{curie}$ o $T < T_{Néel}$, se tiene que la energía magnética de una partícula con anisotropía uniaxial puede expresarse como la ecuación (A.31). Como la energía E_a 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. La figura A.14A, representa la energía definida por la ecuación (A.31). Cuando se aplica un campo magnético H se presentan cambios en el nivel energético en cada una de estas orientaciones, generando una descompensación en una de ellas, y en la otra el sistema permanece en estado metaestable. En este caso, la energía magnética cambia y resulta dada por:

$$E = K_a V \sin^2 \theta - H \mu \cos(\theta_n - \theta) \quad (A.33)$$

Donde, θ_n es el ángulo entre el campo magnético y el eje de anisotropía, H es la magnitud del campo magnético aplicado y μ es el momento de la partícula. Este cambio que genera la presencia de H desequilibra la simetría en la inversión de la magnetización, originando que la altura de la barrera de energía cambie y por consiguiente se tengan probabilidades diferentes según la dirección de salto de la barrera, con tiempos característicos τ_+ , asociado a la menor barrera, y τ_- , asociado a la barrera más grande (Figura A.14B).

Figura A.14. Energía magnética de una nanopartícula con anisotropía uniaxial. A) En función del ángulo θ en el eje de magnetización y el eje de anisotropía. B) Energía magnética para una nanopartículas con anisotropía uniaxial que es sometido a un campo magnético externo.

El tiempo de relajación observable queda dado por:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_+} + \frac{1}{\tau_-} \quad (\text{A. 34})$$

El equilibrio puede volverse inestable para cierto valor del campo aplicado, lo que genera una rotación irreversible de la magnetización en la dirección del campo. Sin embargo, justo antes de alcanzar ese valor crítico de campo, la barrera de energía entre los dos estados se hace cada vez más pequeña, de esta manera, la agitación térmica puede producir una transición espontánea durante un intervalo de tiempo comparable al tiempo de medición. En el caso de que el tiempo de relajación sea mucho menor que el tiempo de medida, se obtiene un comportamiento superparamagnético.

El tiempo de relajación de Néel a campo magnético aplicado nulo está dado por:

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{K_u V}{k_B T}} \quad (\text{A. 35})$$

Modelo de Brown

El modelo para el mecanismo de relajación propuesto por Brown contempla que el momento magnético está sujeto al eje del cristal. Por consiguiente, cuando la partícula interactúa con un campo magnético externo, como producto del torque que se genera,

ésta rota para que se produzca un alineamiento del momento magnético con el campo magnético externo aplicado.

El tiempo de relajación de Brown está dado por:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (A.36)$$

Donde, η es la viscosidad dinámica del líquido transportador y V_H es el volumen hidrodinámico de las nanopartículas. El volumen hidrodinámico contempla el volumen de la partícula con el surfactante.

APÉNDICE

B

Técnicas instrumentales

B. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

B.1. Técnicas Magnetométricas

Para medir el comportamiento magnético de nanopartículas comúnmente son utilizadas las técnicas magnetométricas Vibrating Sample Magnetometer (VSM) y el Superconducting Quantum Interference Device (SQUID) debido a su versatilidad y alta sensibilidad para caracterizar pequeñas muestras o con bajos momentos magnéticos. Estos sistemas modernos pueden ser capaces de medir momentos magnéticos de 10^{-6} a 10^{-8} emu. En el SQUID se emplea un campo magnético homogéneo que es aplicado sobre una muestra mediante un imán superconductor mientras se mide el cambio en el flujo inducido con una bobina de detección a través del cambio gradual del campo.

En el VSM, la muestra oscila a una frecuencia fija (alrededor de 80Hz), y la bobina de detección mide el voltaje inducido. Con esta técnica es posible conseguir una alta precisión, sensibilidad y velocidad de medición. No obstante, las corrientes de Foucault inducidas en la muestra o en el acoplamiento acústico entre el motor de control y el sistema de detección pueden afectar los resultados obtenidos de diversas formas. De tal forma que el VSM puede resultar beneficioso para caracterizar el comportamiento magnético de las nanopartículas, tratando de mantener alejados todos los posibles artefactos que pudieran afectar la medida y tomando en cuenta que se debe realizar una escrupulosa preparación de la muestra. De la misma manera, la alta sensibilidad del SQUID lo hace especialmente propenso a ser afectado por numerosos artefactos.

B.1.1. Magnetómetro de muestra vibrante (VSM)

El Magnetómetro por muestra vibrante (VSM) (Figura B.1), puede ser considerado el precursor de las técnicas actuales de AGM. El VSM permite evaluar las propiedades magnéticas de las nanopartículas en polvo y en líquido.

Este dispositivo consta de un electroimán (para campos menores de 3 T) o una bobina superconductora (para campos magnéticos altos) que se encargan de generar el campo magnético sobre la muestra, un sistema oscilador que hace vibrar la muestra mediante una varilla a una frecuencia constante (~ 80 Hz), en un sentido perpendicular al campo aplicado, entre las piezas polares del mismo, dos bobinas de detección que son las encargadas de registrar la fuerza electromotriz generada por el movimiento de la muestra, una cámara de temperatura que está rellena de He (protegida por una camisa de N₂ para evitar su rápida evaporación) que se ocupa de alcanzar y mantener la temperatura deseada en la medida, un dispositivo de vibración de la muestra que se ocupa de hacerla vibrar a una frecuencia y amplitud deseadas, un amplificador de señal para aumentar la sensibilidad de la medida y por último un ordenador desde el cual se controla el estado del magnetómetro, las variables y el registro de las distintas medidas realizadas por el magnetómetro (Cullity, 1972; Foner, 1959).

Cuando la muestra está magnetizada, es decir, tiene un momento dipolar magnético no nulo, el campo dipolar vibrante produce un flujo que varía en el tiempo e induce una fuerza electromotriz (FEM) en las bobinas captoras, esta señal es comparada con la señal que simultáneamente es provista por un imán permanente en las bobinas de referencia. Ambas señales se comparan en un amplificador *lock-in* obteniéndose un valor para el momento magnético total de la muestra (emu) en la dirección del campo. Un gaussímetro, permite además obtener el valor del campo magnético aplicado por las piezas polares en forma directa para una dada magnetización. El sistema se calibra con una muestra patrón de Ni cuya magnetización de saturación es bien conocida.

Figura B.1. Diagrama del magnetómetro por muestras vibrante (VSM).

B.1.2. SQUID

Un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID) es un complejo dispositivo de medición basado en el efecto Josephson. Un circuito SQUID consiste en un bucle superconductor con dos uniones Josephson (eslabones débiles tales como aisladores delgados, restricciones físicas que permiten el acoplamiento superconductor) está acoplado a una conjunto de bobinas similares superconductoras, denominado gradiómetro de segundo orden (Graham, 2000). Ambas disposiciones de circuito pueden observarse en la Figura B.2. El circuito SQUID actúa como un detector nulo mediante la adición de un circuito de realimentación que proporciona una tensión de salida de corriente continua (DC) proporcional a las variaciones de flujo magnético inducidas por la inserción de la muestra (Graham, 2000).

Figura B.2. Diagrama del magnetómetro SQUID.

B.2. Técnicas relajométricas

B.2.1. Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo

El ciclado de campo magnético en experimentos de RMN ha sido usado desde el inicio de la RMN. Originalmente estos experimentos de campo magnético dependientes del tiempo fueron utilizados para estudiar la relajación transversal, la termodinámica de sistemas de spin y detección indirecta de resonancia cuadripolar. El primer aparato utilizó sistemas mecánicos o neumáticos para disparar la muestra entre dos magnetos, el típico “tiempo de flujo” siendo unos pocos cientos de milisegundos. Como una evolución natural de la técnica experimental y la necesidad de extender esta aplicación a muestras con altas tasas de relajación, dispositivos de conmutación con campos magnéticos más rápidos fueron desarrollados durante los siguientes años. Redes eléctricas especiales combinados con magnetos sofisticados de núcleo de aire permitió un cambio de campos magnéticos entre 0 y 0,5T en pocos milisegundos. Hoy en día esta nueva generación de instrumentos se les ha denominado dispositivos “fast-fiel-cycling” (ciclado rápido de campo-FFC) (Figura B.3).

Figura B.3. Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo para la obtención de los tiempos de relajación a diversas intensidades de campo magnético. SMARTracer (Stelar Magnetic Tracer, Italy).

La técnica ha sido utilizada satisfactoriamente durante los últimos años para obtener información de la dinámica molecular y el orden en diferentes materiales, que van desde los sólidos orgánicos, metales, polímeros, cristales líquidos, medios porosos a sistemas biológicos. En el presente también se emplea como una herramienta importante para el diseño de agentes de contraste para imagen por Resonancia Magnética Nuclear.

La FFC incluye todas las técnicas experimentales de RMN que involucran conmutación rápida de campos magnéticos externos de corriente continua (DC) con la radiación asociada de radiofrecuencia (RF) y secuencias de pulso DC, con el objetivo de producir algún tipo de manipulación de uno o más sistemas de spin electrónico o nuclear. Tales campos son usados para crear reservorios Zeeman, definir o modificar las temperaturas de los spines o conseguir una codificación espacial (Anoardo y col., 2001).

En un instrumento convencional de RMN, la inducción magnética resonante de un núcleo en un campo con inducción magnética, ocurre en la frecuencia de Larmor $\omega_L = \gamma B$, donde γ , donde es la razón giromagnética del núcleo (Ferrante y col., 2005).

Los Perfiles de Dispersión de la Relajación Magnética Nuclear (NMRD) cubren varios órdenes de magnitud de valores de campo B , ellos necesariamente incluyen secciones con muchos valores de B bajos.

Desafortunadamente, la detección de las señales inducidas por un núcleo dado se hace difícil cuando B llega a ser pequeña debido a la disminución progresiva de la relación señal a ruido (S/N). A menudo se indica que la sensibilidad disminuye con el cuadrado del campo o, de acuerdo a las estimaciones más realistas. El uso de métodos de medidas de ciclado de campo es una buena forma de evitar todos los problemas de la RMN de bajo campo y permitir medir las tasas de relajación del orden de 50 veces las magnitudes del campo de relajación sin cambiar la excitación de RF. En principio, esto hace que sea aún posible medir las tasas de relajación a campo cero que podría ser completamente imposible hacer por algún otro camino.

Un experimento de ciclado de campo requiere que la muestra sea sometida a un campo magnético B con diferentes intensidades en un tiempo variable. Instrumentalmente es posible lograr este objetivo por dos caminos:

- ❖ El primer método consiste en la translación mecánica de la muestra entre áreas de diferentes intensidades de campo. Este método mecánico “shuttling” es lento. De ello se deduce que son aplicables sólo a muestras con tiempos de relajación

largos, limitada esencialmente por el menor tiempo posible que se necesita para mover la muestra de una posición a otra, típicamente 50 ms.

- ❖ El segundo método de ciclado de campo usa modulación electrónica de una corriente que fluye a través de una bobina de un electromagneto. Esta técnica, llamada Fast Field Cycling NMR Relaxometry (FFC), permite variaciones mucho más rápidas de la inducción del campo y, por lo tanto, ampliar la aplicabilidad de las aproximaciones del ciclado de campo para tiempos de relajación más cortos $T1$, actualmente, hasta fracciones de un milisegundo.

B.2.2. Procesos de relajación

La relajación es un proceso por el cual los protones liberan la energía que absorben del pulso de RF. En la resonancia, la energía de RF es absorbida por los protones solo cuando estos emiten en la frecuencia correcta. La energía adicional perturba el equilibrio del arreglo de spines paralelo y antiparalelo al campo B. Después de la excitación, ocurre la relajación en la cual los protones liberan esta energía adicional y retornan a su configuración original a través de procesos naturales.

B.2.2.1. Relajación longitudinal ($T1$)

El tiempo de relajación $T1$ es el tiempo requerido para que la componente z de M retorne al 63% de su valor original después de un pulso de excitación. Esto se conoce como *tiempo de relajación spin-red* o *tiempo de relajación longitudinal*. La relajación $T1$ proporciona el mecanismo por el cual los protones ceden su energía para retornar a su orientación original. Si se aplica un pulso de 90° a la muestra, M_0 rotará, y no habrá magnetización longitudinal presente después del pulso. Conforme pasa el tiempo, se observará un retorno de la magnetización longitudinal mientras los protones liberan su energía (Figura B.4). Este retorno de la magnetización sigue un proceso de crecimiento exponencial, siendo $T1$ una constante de tiempo que describe la tasa de crecimiento:

$$M(\tau) = M_0(1 - e^{(-\tau/T1)}) \quad (B.1)$$

Donde τ es el tiempo siguiente al pulso RF.

Figura B.4. Curva de relajación T1. (Dale y col., 2015).

B.2.3. Relajatividad y perfiles de dispersión NMRD

Los perfiles de dispersión reportan el cambio en la tasa de relajación spin-red de la magnetización del protón como una función de la frecuencia de Larmor ^1H . El tiempo de relajación longitudinal (T_1) describe cuanto tarda el mecanismo de señal de resonancia magnética en regresar a su estado original o a su relajación. T_1 resulta de la modulación de las interacciones magnéticas de los protones de agua con el ambiente circundante. Ésta depende de las propiedades intrínsecas de las SPIONs y del movimiento de las moléculas de agua en la vecindad de estas nanopartículas.

La potencia o eficiencia de un medio de contraste para incrementar la tasa de relajación se denomina relajatividad (r). La relajatividad longitudinal (r_1) de un fluido acuoso que contiene material magnético en suspensión, llamado generalmente Agente de Contraste (AC) se define como el incremento en la tasa de relajación longitudinal (T_1) observado en soluciones acuosas cuando la concentración del compuesto activo magnéticamente se incrementa por una unidad milimolar (Félix-González y col., 2015).

Cuando se caracteriza un agente de contraste basado en sus propiedades de relajación, el parámetro más importante es la relajatividad el cual se define como la tasa de relajación por molécula de coloide, y su fórmula matemática se expresa de la siguiente manera (Félix-González y col., 2015):

$$r_i = \frac{(-1/T_i|_{dia} + 1/T_i|_{meas})}{C}, \quad i = 1,2 \quad (B.2)$$

donde C es la concentración del agente de contraste en mMol/L o mg/mL, $1/T_i|_{dia}$ es la tasa de relajación del núcleo en el huésped diamagnético (solución o tejido puro) y $1/T_i|_{meas}$ es la tasa de relajación medida en presencia del agente de contraste, por lo que las unidades de la relajatividad está dada en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Corti y col., 2008).

La relación entre el tiempo de relajación y la dinámica de las interacciones magnéticas es dependiente de la frecuencia. La dependencia de T_i por B_0 se representa por los perfiles de dispersión de la relajación magnética nuclear (perfiles NMRD) que grafican los cambios en $(1/T_i)$ en función de la intensidad del campo magnético aplicado (Tóth y col., 2002). La información de la relajación sobre un rango extendido de frecuencias de Larmor se puede obtener mediante un Relajómetro por Ciclado Rápido de Campo.

APÉNDICE

C

*Publicaciones y estancia de
investigación relacionadas con la
tesis doctoral*

C. PUBLICACIONES Y ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL

1. J.J. Serrano, A. Mina, C. Sánchez, N. Félix, **A. Urbano**, F. del Pozo Guerrero. Research lines in Hyperthermia at the Bioinstrumentation Laboratory of the Centre for Biomedical Technology. Proceedings of the Nanospain 2011 Conference, Bilbao, April, 2011.
2. J.J. Serrano, N. Félix, V. Ferro, R.A. García, A. Mina, **A. Urbano**, F. del Pozo. Magnetic Particles Characterization at the Bioinstrumentation Laboratory of the Centre for Biomedical Technology. Proceedings of the Nanospain 2011 Conference, Bilbao, April, 2011.
3. Felix González, N., **Bojorge, U., Lorena, A.**, Sanchez Lopez de Pablo, C., Ferro Llanos, V., Pozo Guerrero, F. D., & Serrano Olmedo, J. J. (2014). Power absorption measurements during NMR experiments. *Journal of Magnetism*, 19(2), 155-160.
4. **Urbano-Bojorge, A. L.**, Felix-Gonzalez, N., Fernandez, T., del Pozo-Guerrero, F., Ramos, M., & Serrano-Olmedo, J. J. (2015). A Comparison of Magnetometry and Relaxometry Measures of Magnetic Nanoparticles Deposited in Biological Samples. In *Journal of Nano Research* (Vol. 31, pp. 129-137). Trans Tech Publications.
5. **Ana Lorena Urbano Bojorge**, Oscar Casanova Carvajal, Adrián Álvarez Fernandez, Beatriz Leoz Domínguez, Cristina Sánchez López de Pablo, Francisco del Pozo Guerrero, Elena Aznar, Oscar García, José Javier Serrano Olmedo. Progress in the Development of a Device for Applications in Nanomedicine through Magnetic Hyperthermia Therapy for Cancer Treatment. NanoBioApp 2015 Conference, Barcelona, September, 2015.

6. Oscar Casanova Carvajal, **Ana Lorena Urbano Bojorge**, Patricia Galán Montano, Cristina Sánchez López de Pablo, Francisco del Pozo Guerrero, Ricardo Martínez Murillo, José Javier Serrano Olmedo. Nanomedicine Application of Alternative Therapy Cancer Treatment in Animal Models with High-Grade Gliomas CT-2A. NanoBioApp 2015 Conference, Barcelona, September, 2015.

7. Félix-González, N., **Urbano-Bojorge, A. L.**, Mina-Rosales, A., Pozo-Guerrero, F., & Serrano-Olmedo, J. J. (2015). Assessment of a heuristic model for characterization of magnetic nanoparticles as contrast agent in MRI. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 44(5), 279-286.

8. Rosales, A. M., Aznar, E., Coll, C., Mendoza, R. A. G., **Bojorge, A. L. U.**, González, N. F., ... & Olmedo, J. J. S. (2016). Study of the Dependency of the Specific Power Absorption Rate on Several Characteristics of the Excitation Magnetic Signal when Irradiating a SPION-containing Ferrofluid. *Journal of Magnetism*, 21(3), 460-467.

9. **Ana Lorena Urbano-Bojorge**, Oscar Casanova-Carvajal, Nazario Félix-González, Laura Fernández, Rodrigo Madurga, Santiago Sánchez-Cabezas, Elena Aznar, Milagros Ramos and José Javier Serrano-Olmedo (2017). Influence of the Medium Viscosity and Intracellular Environment on the Magnetization of Superparamagnetic Nanoparticles in Silk Fibroin Solutions and 3T3 Mouse Fibroblast Cell Cultures. (In the process of reviewing).

10. Estancia de investigación en "The Laboratory of Natural Magnetism at the Institute of Geophysics", ETH-Zürich. El objetivo de la estancia fue implementar un modelo matemático de la dinámica de las nanopartículas magnéticas en suspensiones cuando se encuentran en un campo magnético alterno. Así mismo, mejorar la técnica de la medición de los ferrofluidos en el magnetómetro AGM y, adquirir el conocimiento y la destreza en el manejo del magnetómetro VSM. Duración de la estancia: 2 meses y medio. (Año 2014).