



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE FISICA

---

Tesis presentada para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

(Área Física)

**Estructuras Dipolares Magnéticas en Suspensiones Magnéticas Coloidales y  
su Influencia en Hipertermia Magnética**

---

DIEGO FERNANDO CORAL CORAL

Directora: Dra. Marcela B. Fernández van Raap

Co-Director: Dr. Pedro Mendoza Zélis

2015



## CONTENIDO

CAPÍTULO 1: MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN .....	7
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO .....	13
2.1    NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	14
2.2    SUPERPARAMAGNETISMO .....	16
2.3    INTERACCIÓN DIPOLAR MAGNÉTICA .....	22
2.4    SUSCEPTIBILIDAD DE NANOPARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN A CAMPOS MAGNÉTICOS ALTERNOS: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA. ....	24
2.4.1    Relajación Magnética de Nanopartículas en Suspensiones Coloidales....	25
2.5    INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES DIPOLARES EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN .....	29
2.5.1    Modelo de Campo Medio de Dormann-Bessais-Fiorani: .....	29
2.5.2    Modelo del Campo Medio de Landi .....	32
2.6    DISPERSION DE RAYOS X A BAJOS ÁNGULOS (SAXS) .....	35
2.6.1    Amplitud e Intensidad de Dispersión. ....	35
2.6.2    Dispersión en Suspensiones Coloidales Diluidas .....	41
2.6.3    Dispersión en Suspensiones Coloidales Concentradas.....	42
2.6.4    Factor de Estructura Fractal.....	43
2.6.5    Modelo Unificado de Beaucage. ....	46
2.6.6    Patrones SAXS Anisótropos: Ordenamiento Magnético Inducido. ....	47
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOS.....	53
3.1    SÍNTESIS DE SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS .....	54
3.1.1    Nanopartículas de Ferrita de Cobalto Recubiertas con Ácido Oleico (AO@CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> ).....	54
3.1.2    Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con Ácido Oleico y Quitosano (CS/AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	55

3.1.3	Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con ácido oleico y ácido dimercaptosuccínico (AO@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> y DMSA@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	56
3.1.4	Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con Ácido Cítrico (AC@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ). 58	
3.2	CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR CANCERÍGENA A549. ....	60
3.3	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL. ....	62
3.3.1	Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos.....	62
3.3.2	Microscopia Electrónica de Transmisión. ....	66
3.3.1	Microscopia de Fuerza Atómica.....	68
3.3.2	Dispersión Dinámica de Luz. ....	69
3.4	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA.....	70
3.4.1	Magnetometría d.c.....	70
3.4.2	Magnetocalorimetría: Medida de La Velocidad Específica De Absorción. 72	
CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS.....		75
4.1	NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE AO@CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> DISPERSAS HEXANO .....	76
4.2	NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS de CS/AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> DISPERSAS AGUA .....	82
4.3	NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> y DMSA@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	88
4.4	NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE AC@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> DISPERSAS AGUA.....	95
CAPÍTULO 5: PATRONES SAXS ANISÓTROPAS: DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.....		101
5.1.	DESARROLLO DEL MONTAJE EXPERIMENTAL.....	102

5.2. PATRONES DE SAXS ANISOTRÓPICOS EN SUSPENSIONES COLOIDALES .....	106
CAPÍTULO 6: PROPIEDADES MAGNÉTICAS .....	117
6.1 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA.....	118
6.1.1 Nanopartículas de CS/AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	118
6.1.2 Suspensiones Coloidales de Nanopartículas de AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Y DMSA/AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	126
6.2 DISIPACIÓN DE CALOR EN SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS.....	131
CAPÍTULO 7: INTERACCIONES DIPOLARES MAGNÉTICAS EN SUSPENSIONES COLOIDAES.....	143
7.1. INTERACCIONES DIPOLARES Y DE VAN DER WAALS ENTRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	143
7.2. INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES DIPOLARES EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN.....	151
CAPÍTULO 8: INTERNALIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES CON NPM ..	163
8.1 Caracterización Estructural de Endosomas Magnéticos: TEM y SAXS .....	164
CONCLUSIONES.....	179
AGRADECIMIENTOS.....	183
Referencias. ....	185



# CAPÍTULO 1: MOTIVACIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas magnéticas (NPM) permiten aplicaciones médicas específicas de manera comparativamente ventajosa frente a otras técnicas terapéuticas y de diagnóstico<sup>1</sup>. Como ejemplo se pueden mencionar aplicaciones para mejorar el contraste en imágenes obtenidas por resonancia magnética nuclear, la separación selectiva de células y otros biomateriales, la administración localizada de drogas agresivas, la magnetofección y la terapia por hipertermia bajo la acción de campos magnéticos alternos<sup>2</sup>. Esta investigación se enfoca en esta última aplicación, la hipertermia magnética.

La hipertermia<sup>3</sup> es un aumento de la temperatura corporal a valores mayores de 42°C y hasta 45°C. Una hipertermia localizada causada en forma deliberada y controlada puede ser utilizada de manera terapéutica, desencadenando mecanismos que dañen a las células. Cuando este aumento de temperatura es obtenido utilizando NPM se la denomina *hipertermia magnética*, la cual consiste en matar selectivamente a las células cancerígenas, basándose en que las células malignas presentan menor tolerancia térmica que las normales y en la inocuidad de los campos de radiofrecuencia a los tejidos sin NPM<sup>4</sup>.

Las perspectivas promisorias de la terapia por hipertermia mediante el uso de NPM están en la posibilidad de incrementar las opciones de tratamientos disponibles que sean menos invasivos, localizados y con pocos efectos colaterales. También es posible el uso simultáneo de hipertermia magnética y los tratamientos tradicionales (quimioterapia y radioterapia) puesto que se podría sensibilizar al tejido tumoral de forma que las mismas sean más exitosas. Adicionalmente, la posibilidad de localizar las partículas en los tejidos enfermos y disipar energía exclusivamente en esas regiones, evita los trastornos secundarios típicos de los tratamientos masivos.

Para llevar a cabo esta terapia, se localizan las NPM en las zonas afectadas y se aplica un campo magnético de radio frecuencia de amplitud  $H_0$  y de frecuencia  $f$ . Las NPM absorben energía del campo y la disipan al medio debido a la reorientación de su momento magnético, produciendo un aumento de la temperatura en la célula cancerígena y su consecuente muerte. La capacidad de las NPM de absorber energía del

campo alterno y liberarlo en forma de calor está determinada por su potencia específica disipada o parámetro SAR acrónimo de *Specific Absorption Rate* por sus siglas en inglés<sup>a</sup>.

La reorientación del momento magnético de la NPM<sup>5</sup> se da por mecanismos de relajación magnética. Si el momento magnético rota internamente para orientarse en la dirección del campo aplicado mientras la partícula permanece fija, el proceso se conoce como relajación de Néel y si la partícula, inmersa en una matriz viscosa, rota para alinear su momento magnético con el campo externo, el proceso se conoce como relajación de Brown. En los dos mecanismos la magnetización retrasa con respecto al campo magnético aplicado. Asumiendo independencia entre los mecanismos los tiempos de relajación se suman en paralelo de manera tal que si uno de estos tiene un tiempo considerablemente menor al otro, será el que prevalecerá. La ocurrencia de uno de los dos mecanismos, depende de las propiedades físicas de la NPM tales como tamaño, radio hidrodinámico, magnetización de saturación y constante de anisotropía magnética, y de la viscosidad del medio.

En un colide formado por NPM con polidispersión de tamaño, cada partícula tendrá definidos un tiempo de relajación de Néel y un tiempo de relajación de Brown determinados por sus tamaños. Por lo tanto es posible que para una dada frecuencia de excitación, las partículas grandes relajen por el mecanismo de Brown, mientras que las más pequeñas lo hagan por el mecanismo de Néel. Adicionalmente, interacciones dipolares entre las partículas, hacen que el tiempo de Néel aumente puesto que la energía de interacción dipolar aumenta la barrera de energía que el momento magnético de la partícula debe superar para pasar de un estado de fácil magnetización al otro.

Por otro lado, debido a las interacciones dipolares magnéticas las NPM suspendidas en un líquido o alojadas en vesículas celulares se pueden auto ensamblar formando agregados tipo cadenas lineales que a su vez se agrupan formando otras estructuras más complejas como clúster ramificados y anillos<sup>6</sup>. La formación de estas estructuras complejas impone que la determinación de las propiedades estructurales sea realizada en el mismo estado en que se efectúa la medida del SAR, es decir en el estado de suspensión coloidal o en las vesículas celulares que alojan las nanopartículas. Determinar la influencia las interacciones dipolares en el SAR (aumento o disminución

---

<sup>a</sup> También se conoce como SLP, acrónimo de specific loss power por sus siglas en inglés.



del SAR en sistemas interactuantes) permitirá usar la concentración del coloide como uno de los parámetros de control del SAR a través de las interacciones dipolares.

Uno de los principales retos para el establecimiento de la hipertermia como una terapia oncológica, es la obtención de una suspensión coloidal biocompatible, cuyas propiedades puedan ser optimizadas para obtener un mayor valor de SAR ( $\sim 1\text{k W/g}$ ) dentro del límite de confort ( $H_0=8.5\text{ kA/m}$  y  $f=100\text{ kHz}$ ) para su uso en pacientes<sup>2,7</sup>. La optimización de las propiedades del coloide permite disminuir las dosis de NPM a ser administradas con la obtención del resultado deseado (provocar la muerte de células cancerígenas), en las condiciones de amplitud y frecuencia admisibles dentro de los criterios biomédicos. Bajas dosis representan baja toxicidad.

El objetivo general de esta investigación es contribuir al entendimiento la influencia de las interacciones dipolares en los mecanismos de relajación magnética y consecuentemente en el parámetro SAR. Este problema se aborda mediante el estudio de las propiedades de las NPM, de su estado de agregación en forma estructuras dipolares en suspensiones coloidales y en endosomas magnéticos. Se correlacionan estas estructuras con valores de SAR medidos en forma calorimétrica y se analiza cómo las mismas influyen en la disipación de calor de las NPM.

Para cumplir el anterior objetivo, se estudiaron las propiedades magnéticas y estructurales de suspensiones coloides formadas por NPM de muy baja polidispersión como ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) recubiertas con ácido oleico y magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubiertas con ácido oleico y ácido dimercaptosuccínico, y de alta polidispersión como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) recubiertas con ácido cítrico, ácido oleico y quitosano. Las primeras fueron sintetizadas por descomposición térmica y las segundas por co-precipitación química.

Por medio del método de síntesis de *co-precipitación* se obtienen NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas por ácido cítrico las cuales pueden ser re-suspendidas en medio acuoso y son biocompatibles. Este método produce partículas con gran dispersión de tamaño, por lo cual, la influencia de la polidispersión de tamaño en las propiedades físicas que determinan el SAR es analizada.

Por medio del método de síntesis de *descomposición térmica* se sintetizan partículas de tamaño uniforme recubiertas con ácido oleico. Este recubrimiento es hidrofóbico, por lo cual estas NPM solo pueden ser resuspendidas en líquidos orgánicos, y el coloide

resultante no es biocompatible. La importancia de estos sistemas en esta investigación radica en que resulta más sencillo, debido a su baja polidispersión de tamaño, aplicar modelos teóricos simples para explicar la generación de calor por parte de las partículas cuando se las someten a campos de radio frecuencia. La superficie de estas NPM puede ser tratada químicamente para modificar su capa surfactante o agregar un segundo recubrimiento que sea biocompatible y permita la resuspensión en medio acuoso. Se mostrará que estos procedimientos químicos sobre la superficie de las partículas lleva a la formación de agregados de NPM dentro del coloide. De este tipo se estudian NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con ácido oleico y quitosano y NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con ácido dimercaptosuccinico (DMSA).

Una vez determinadas las propiedades físicas de las NPM y su grado de agregación en suspensiones coloidales, es necesario conocer como varía esta agregación cuando se cambia de un ambiente acuoso a un ambiente celular. Para analizar este cambio, se realizaron experiencias *in vitro* en las cuales las NPM biocompatibles (DMSA@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) fueron internalizadas en cultivos de la línea celular derivada de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

Las partículas ingresan a la célula vía endocitosis y se localizan en vesículas conocidas como endosomas, en los cuales la distancia entre partículas se reduce considerablemente en relación a la suspensión coloidal. Una reducción de la distancia entre partículas implica un aumento de las interacciones dipolares lo cual indica la necesidad de incluir a las interacciones dipolares en el modelado del SAR. Además de esto, la competencia entre las interacciones dipolares y de van der Waals, de carácter atractivo, con las interacciones estéricas y electrostáticas, de carácter repulsivo, dan lugar a la formación de arreglos de NPM en los endosomas.

En este sentido, se estudia en particular el efecto de la concentración del coloide en la internalización de NPM y de la disposición los endosomas magnéticos cuando son sometidos a campos magnéticos constantes. Si el campo es aplicado durante la internalización de las NPM en el cultivo celular, estas tienden a alinearse dentro de las vesículas. Si el campo magnético es aplicado después de la internalización se produce la alineación de los endosomas en la dirección del campo<sup>8</sup>.

La disposición espacial de las NPM tanto en el coloide como en la célula se estudia con la técnica de Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos (SAXS), la cual es la herramienta principal de estudio en esta investigación, puesto que permite determinar, además del

tamaño y forma de las NPM, su estado de agregación y como se ven afectadas en presencia de campos magnéticos externos en el estado coloidal, el cual es el mismo estado sobre el cual se determinará el SAR. Es de resaltar que en esta investigación se obtienen por primera vez patrones de SAXS que permitan identificar a las NPM dentro del ambiente celular.

El estudio estructural de los coloides, es complementado con medidas de propiedades magnéticas de las NPM utilizando campos magnéticos estáticos con el objetivo de determinar el mecanismo de relajación magnética predominante y como se ve reflejado en la determinación experimental del SAR, puesto que el mismo es proporcional a la componente fuera de fase ( $\chi''(f)$ ) de la susceptibilidad a.c5.

Estos resultados son utilizados para simular el SAR de un coloide magnético utilizando modelos teórico que incluyan la influencia de las interacciones dipolares entre NPM<sup>9,10,11,12</sup> en la disipación de calor. Después se compararan estos resultados con las mediciones magnetocalorimétricas del SAR realizadas en el laboratorio utilizando una fuente de radiofrecuencia.

De esta investigación se obtiene nuevo conocimiento acerca de las propiedades básicas relevantes de las nanopartículas de óxidos de Fe funcionalizadas para internalización celular, de su auto-organización, de la organización inducida por aplicación de campo en coloides y en el interior de las células y de la correlación entre éstas propiedades con la respuesta de las partículas cuando son sometidas a campos de radiofrecuencia.

Para cumplir el objetivo propuesto, se realiza un estudio sistemático de las propiedades magnéticas y estructurales de las nanopartículas en el estado de suspensión coloidal estable y alojada en endosomas de células A549.

Un resumen de esta tesis se presenta a continuación:

**Capítulo 2:** Se presenta un breve marco teórico donde se hace hincapié en los modelos utilizados para el análisis de los datos experimentales obtenidos para esta investigación.

**Capítulo 3:** Se describen: los métodos por los cuales fueron sintetizadas las NPM así como sus principales características químicas; los protocolos de medida utilizados para determinar las propiedades estructurales, magnéticas y calorimétricas de las suspensiones coloidales y las técnicas experimentales utilizadas. Se analizan con mayor completitud las técnicas más relevantes para esta investigación como SAXS,

magnetometría y magnetocalorimetría y se presentan las características mínimas necesarias de las técnicas complementarias.

**Capítulo 4:** Se detallan los resultados estructurales obtenidos por las técnicas de SAXS, TEM, AFM y SAXS en presencia de campo magnético obtenidos para las diferentes suspensiones coloidales.

**Capítulo 5:** Se presenta el diseño de un portamuestras SAXS fabricado para obtener patrones de dispersión a diferentes valores de campo magnético estático. El capítulo incluye simulaciones previas que determinaron la homogeneidad del campo en la zona de medida. Se termina con la presentación de medidas de los patrones SAXS, su análisis en función del campo aplicado y la anisotropía generada. Estos resultados se relacionan con la formación de agregados de NPM en las suspensiones coloidales.

**Capítulo 6:** Se presentan los resultados de la caracterización magnética de los coloides. Se analiza la respuesta a campos magnéticos. Se relacionan las propiedades magnéticas determinadas con la estructura del coloide estudiada en el capítulo 5. Finalmente se presentan los resultados de las medidas magnetocalorimétricas y se comparan estos resultados con los obtenidos a partir de simulaciones usando el modelo teórico con parámetros obtenidos a partir de las medidas magnéticas y estructurales.

**Capítulo 7:** Una vez determinadas las propiedades magnéticas y estructurales de los coloides, se utilizan estos parámetros para analizar la influencia en el SAR de las interacciones dipolares entre las NPM.

**Capítulo 8:** Se presentan los resultados de la organización de las NPM en los cultivos celulares de la línea A549 y las características de un sencillo aplicador de campo que provee las configuraciones deseadas (15.1 kA/m en el centro del cultivo) y que se ajusta a las condiciones de cultivo celular. Este aplicador fue desarrollado para experimentar con la internalización de células en presencia de campos magnéticos estáticos.

Se finaliza la tesis con las conclusiones y las respectivas referencias bibliográficas.

## **CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO**

En el siguiente capítulo se abordan las teorías y modelos que serán utilizados a lo largo de la investigación en la determinación de las propiedades magnéticas y estructurales de las nanopartículas magnéticas (NPM) en suspensiones coloidales. Se analiza la respuesta de las NPM a campos magnéticos externos y su consecuente liberación de calor debida a la propiedad conocida como velocidad de absorción específica (SAR).

Se introducen conceptos y definiciones claves para el entendimiento de los modelos. Se hace mayor énfasis en la teoría asociada a la dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) puesto que los resultados obtenidos con el uso de esta técnica son de gran relevancia en el desarrollo de esta investigación.

Se finaliza con la presentación de los modelos propuestos para el análisis de datos SAXS tanto de patrones de dispersión isótropos como los generados por estructuras anisótropas cuya formación está inducida por la aplicación de campo magnético.

## 2.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Las propiedades magnéticas de los materiales se clasifican dependiendo de sus respuesta a un campo magnético externo aplicado<sup>13,14</sup>. El orden magnético en los materiales es un fenómeno colectivo basado en el intercambio y acoplamiento cuántico entre dos espines atómicos<sup>15,16</sup>.

Según el modelo de Heisenberg, el intercambio magnético entre dos espines se puede describir por el hamiltoniano de intercambio ( $H_{ex}$ ) descrito por la ecuación 1.

$$1. \quad H_{ex} = -2 \sum_{i < j} J_{ij} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j$$

Donde  $S_i$  y  $S_j$  son los espines atómicos de dos átomos vecinos y  $J_{ij}$  es la constante de intercambio entre los dos espines, la cual está relacionada con el solapamiento de los niveles electrónicos de los átomos vecinos y las distancias inter-nucleares. Valores positivos de  $J$  favorecen el ferromagnetismo, mientras que valores negativos de  $J$  favorecen el anti-ferromagnetismo.

Este tipo de intercambio es puramente isótropo, es decir, no tiene en cuenta una dirección preferencial. Sin embargo, dentro de una red cristalina la simetría se reduce, no todas las orientaciones de los espines son equivalentes. La orientación del espín se encuentra a lo largo de un eje cristalino preferencial, lo cual hace necesario un término adicional de anisotropía en el hamiltoniano<sup>17</sup>:

$$2. \quad H_{ex} = -2 \sum_{i < j} J_{ij} \vec{S}_i \cdot \vec{S}_j - K_{mc} \sum_i (\vec{S}_{zi})^2$$

Donde  $K_{mc}$  es la constante de anisotropía magnetocristalina, y determina la dirección y estabilidad de la magnetización dentro del material. En la ecuación 2, se ha considerado la dirección  $z$  como la dirección cristalográfica de preferencia, así  $S_{zi}$  es la proyección de  $S_i$  en el eje  $z$ .

La zona sobre la cual los espines mantienen su colinealidad se conoce con el nombre de dominio magnético. Dentro de un dominio magnético la magnetización ( $M$ ) es uniforme y es proporcional al momento magnético ( $\mu$ ). En los materiales macroscópicos la magnetización de cada dominio individual se orienta de forma que la energía magnetostática, debida a la presencia de interacciones magnéticas de largo alcance que compiten con las interacciones de intercambio de corto alcance, se minimice. Así en el material macroscópico hay coexistencia de dominios magnéticos, magnéticamente

orientados en diferentes direcciones, separados por paredes de dominio, lo cual produce que el flujo magnético se cancele y conlleva a una magnetización total nula.

La aplicación de un campo externo ( $H$ ) induce el movimiento de las paredes de dominio y genera una magnetización no nula en el material, cuando se alcanza el campo de saturación, los momentos magnéticos están alineados en una sola dirección y el material alcanza la magnetización de saturación ( $M_s$ )<sup>14</sup>.

Las partículas magnéticas, en el rango de tamaño nanométrico, son necesariamente estructuras monodominio ( $MD$ ) y poseen un súper-momento magnético  $\mu$  el cual determina la magnetización  $M_s$  de la partícula.. Se puede estimar un tamaño crítico de partícula por debajo del cual una partícula esférica puede considerarse monodominio<sup>14</sup>.

$$3. \quad R_{MD} = \frac{6\sqrt{AK_{mc}}}{\mu_0 M_s^2}$$

donde  $A$  es la rigidez de intercambio, la cual es una constante relacionada con la temperatura crítica a la cual se pierde el orden magnético, y  $\mu_0$  es la permeabilidad magnética en el vacío. Para el caso de la magnetita<sup>18</sup>  $A = 1.32 \times 10^{-11}$  J/m con lo cual se obtiene  $R_{MD} = 8.3$  nm.

La respuesta de las NPM a un campo magnético externo es diferente a la respuesta del material macroscópico, las NPM pueden rotar para orientar su momento magnético en la dirección del campo en lugar de mover sus paredes de dominio o reacomodar internamente el momento magnético. Las aplicaciones biomédicas de las NPM dependen fundamentalmente del entendimiento de la dinámica de rotación de los momentos magnéticos y su dependencia con su estructura intrínseca.

El modelo más simple que estudia la respuesta del momento magnético a la aplicación de un campo es el propuesto por Stoner y Wohlfarth<sup>19</sup>. El modelo asume una rotación coherente de los momentos magnéticos, los cuales permanecen colineales y rotan al unísono y la uniformidad de la magnetización en toda la partícula, la cual debe mantenerse constante durante el proceso de rotación, esta suposición permite obtener soluciones exactas.

La energía requerida para rotar el momento magnético dentro de una NPM es más grande que la energía necesaria para generar una pared de dominio e inducir su

movimiento, conllevando a coercitividads más grandes que las que se obtienen para el material macroscópico<sup>20</sup>. Este incremento en la coercitividad es el resultado de la transición del comportamiento multidominio a monodominio. La máxima coercitividad es controlada por la energía de anisotropía la cual se opone a la rotación con respecto al eje de magnetización. Para partículas muy pequeñas ( $R_{MD} < 10$  nm) la coercitividad decrece rápidamente debido a los efectos térmicos que producen un rápido cambio en el momento magnético.

El comportamiento magnético de un sistema formado por partículas monodominio cuyos momentos magnéticos se encuentran aleatoriamente ordenados se conoce como superparamagnetismo<sup>13</sup>.

## 2.2 SUPERPARAMAGNETISMO

Un sistema compuesto por  $N$  nanopartículas magnéticas tendrá una magnetización neta igual a cero en ausencia de campo magnético, cuando las fluctuaciones térmicas producen que cada momento magnético esté aleatoriamente orientado, esto es que la energía térmica es mayor a la energía de anisotropía magnética. Al aplicar un pequeño campo  $\vec{H}$  se inducirá la alineación del momento magnético de algunas partículas en la dirección del mismo.

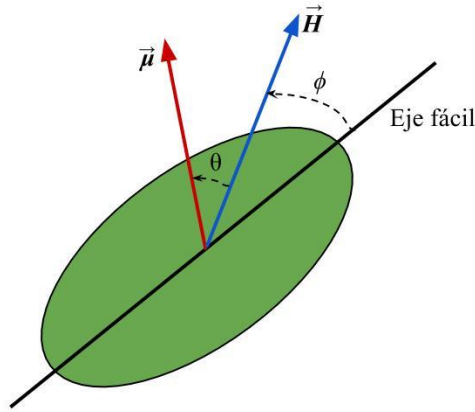
Consideremos una partícula monodominio de volumen  $V$  con momento magnético ( $\vec{\mu}$ ) sobre la cual se aplica un campo magnético externo  $\vec{H}$  en la dirección  $\theta$  con respecto a  $\vec{\mu}$  y que forma un ángulo  $\phi$  con respecto al eje de fácil magnetización o eje de anisotropía de la partícula tal como se representa en la Figura 2. 1.

La energía magnética estará determinada por el efecto Zeeman.

$$4. \quad E_m = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} = -\mu\mu_o H \cos\theta$$

Donde  $\vec{B}$  es el vector de inducción magnética y  $\mu_o$  es la permeabilidad magnética del vacío.





**Figura 2. 1.** Esquema de una nanopartícula con un momento magnético ( $\mu$ ) inmersa en un campo magnético ( $H$ ). El vector momento magnético forma un ángulo  $\theta$  con la dirección de  $H$ .

Según la estadística de Boltzmann de partículas distinguibles, la función de partición para la NPM es:

$$Z = e^{-E_m/k_B T}$$

donde  $k_B$  es la constante de Boltzmann.

De esta forma, el valor medio de la proyección del momento magnético  $\langle \mu \rangle$  en la dirección del campo está determinado por la probabilidad de que  $\mu$  forme un ángulo entre  $\theta$  y  $\theta+d\theta$  con  $H$ , aplicado en la dirección de  $z$  tal que:

$$5. \quad \langle \mu \rangle = \frac{\int_0^\pi \mu \cos \theta e^{-E_m/k_B T} \sin \theta d\theta}{\int_0^\pi e^{-E_m/k_B T} \sin \theta d\theta}$$

Cada momento magnético contribuye una cantidad  $\mu \cos \theta$  a la magnetización  $M$  paralela al campo magnético. Si se consideran  $N$  partículas idénticas la magnetización de todo el sistema será:

$$M = N \langle \mu \rangle$$

Resolviendo la ecuación 5 se tiene que:

$$6. \quad M = N \mu \left[ \text{Coth} \left( \frac{\mu \mu_0 H}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{\mu \mu_0 H} \right] = N \mu L(\xi)$$

$L(\xi)$  se conoce como la función de Langevin, siendo  $\xi = \mu \mu_0 H / k_B T$ .

De esta forma, cuando  $\xi \rightarrow \infty$  ( $\mu \mu_0 H \gg k_B T$ , temperaturas bajas y/o campos altos) entonces  $M = N \mu = M_s$ , y se obtiene la magnetización de saturación, y cuando  $\xi \rightarrow 0$

( $\mu H \ll k_B T$ , Temperaturas altas y/o campos bajos) entonces  $M = N\mu^2\mu_0 H/3k_B T$ , siendo  $\mu = M_s V$ .

Según la teoría de respuesta lineal a bajas intensidades de campo magnético se cumple la relación  $M = \chi_0 H$  donde  $\chi_0$  es la susceptibilidad magnética la cual comparando con el resultado anterior se obtiene que:

$$7. \quad \chi_0 = \frac{N\mu^2\mu_0}{3k_B T}$$

El resultado es el mismo que se obtiene cuando se considera el paramagnetismo atómico clásico, a diferencia que para una nanopartícula el momento magnético total proviene del acoplamiento ferromagnético de los momentos magnéticos atómicos por fuerzas de intercambio<sup>21,22</sup>.

Usualmente, las propiedades de las partículas monodominio no son completamente isotrópicas, contribuciones anisótropas asociadas a la forma, esfuerzos internos o estructura cristalina deben ser consideradas<sup>23</sup>.

Si la partícula presenta anisotropía uniaxial se genera un eje fácil de magnetización o eje de anisotropía a lo largo de la misma.

Así la energía de anisotropía magnetocristalina de una NPM de volumen  $V$  es:

$$8. \quad E_k = K_{mc} V \sin^2 \theta$$

Si se aplica un campo magnético  $H$  en la dirección del eje de fácil magnetización tenemos que la energía total de la NPM es

$$9. \quad E = E_k + E_m$$

Así la función de partición es ahora

$$10. \quad Z = e^{-(\sigma \sin^2 \theta - \xi \cos \theta)}$$

Donde  $\sigma = K_{mc} V/k_B T$ .

Si  $\xi = 0$  se tiene que la energía de la NP está determinada por el ángulo formado entre el momento magnético y el eje de anisotropía tal como lo predice la ecuación 8 y se representa en la Figura 2. 2(a). El modelo predice dos estados de mínima energía

separados por una barrera de potencial igual a  $\Delta E$ . Los momentos magnéticos que están en el estado 1 deben adquirir una energía igual a  $\Delta E$  para pasar al estado 2 de tal forma que:

$$11. \quad \Delta E = K_{mc}V$$

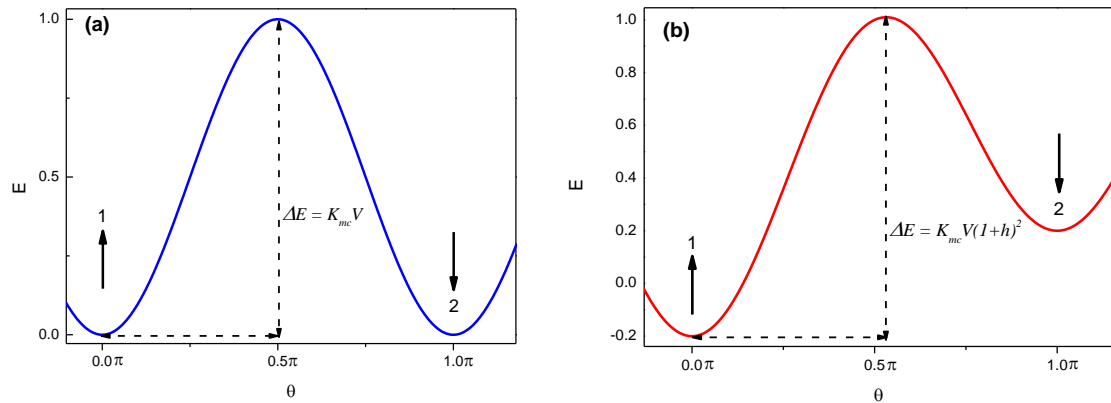
Cuando se aplica un pequeño campo magnético ( $\zeta \neq 0$ ) la altura de la barrera se modifica de forma que

$$12. \quad \Delta E = K_{mc}V(1 + h)^2$$

Donde  $h = \mu\mu_0 H / 2K_{mc}V$  es el campo reducido.

El tiempo ( $\tau$ ) en el cual la nanopartícula permanece en el estado 1 o el estado 2 es:

$$13. \quad \tau = \tau_0 e^{\Delta E/k_B T}$$



**Figura 2. 2.** Barrera de energía para: (a). Una partícula con energía de anisotropía  $K_{mc}V$ .(b). Una partícula con energía de anisotropía  $K_{mc}V$  inmersa en un campo magnético  $H$ .

Donde  $\tau_0$  se conoce como el tiempo característico (aprox.  $10^{-9}$  s). La ecuación 13 determina el tiempo de relajación del sistema y su inversa representa la probabilidad de salto por unidad de tiempo entre un estado y el otro. En el estado 1, el momento magnético está en la dirección del eje de fácil magnetización, el cual está determinado por la anisotropía magnetocristalina, cuando se invierte el campo magnético ( $\theta = \pi$ ), el momento magnético de la partícula debe rotar pasando por la dirección de difícil magnetización hasta el nuevo eje de fácil magnetización.

Cuando  $T \rightarrow 0$ , es necesario eliminar completamente la barrera de energía para pasar el momento magnético del estado 1 al estado 2. El campo al cual ocurre esto es:

$$14. \quad H = \frac{2K_{mc}}{M_s} = H_k$$

Donde  $M_s = \mu/V$  es la magnetización de saturación y  $H_k$  se conoce como el campo de anisotropía. Este comportamiento se ilustra en la Figura 2. 3(a).

De esta forma, la energía de la barrera para  $T = 0$  K es:

$$\Delta E = \frac{(2K_{mc}V - \mu\mu_o H_k)^2}{4K_{mc}V}$$

A medida que se aumenta la temperatura, los efectos térmicos tienen lugar y la energía de la barrera cambia debido a las fluctuaciones térmicas del momento magnético de la partícula, el periodo temporal de estas fluctuaciones está dado por la ecuación 13, de forma que la variación de la barrera de energía debido a la temperatura es:

$$\Delta E = k_B T \ln\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)$$

Si el campo de anisotropía ( $H_k$ ) es igual al campo coercitivo ( $H_c$ ), para un proceso térmicamente activado se tiene que:

$$15. \quad \frac{(2K_{mc}V - \mu\mu_o H_c(T))^2}{4K_{mc}V} = k_B T \ln\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right)$$

Desde donde se establece una relación entre el campo coercitivo y la temperatura tal que:

$$16. \quad H_c = H_k \left(1 - \left(\frac{k_B}{K_{mc}V} \ln\left(\frac{\tau}{\tau_0}\right) T\right)^{1/2}\right)$$

La temperatura a la cual  $H_c = 0$  se conoce como temperatura de bloqueo ( $T_B$ ). A temperaturas por encima de  $T_B$  no se observa coercitividad y las nanopartículas se comportan como superparamagnéticas y por debajo de  $T_B$  se observa coercitividad y se pierde el comportamiento superparamagnético.

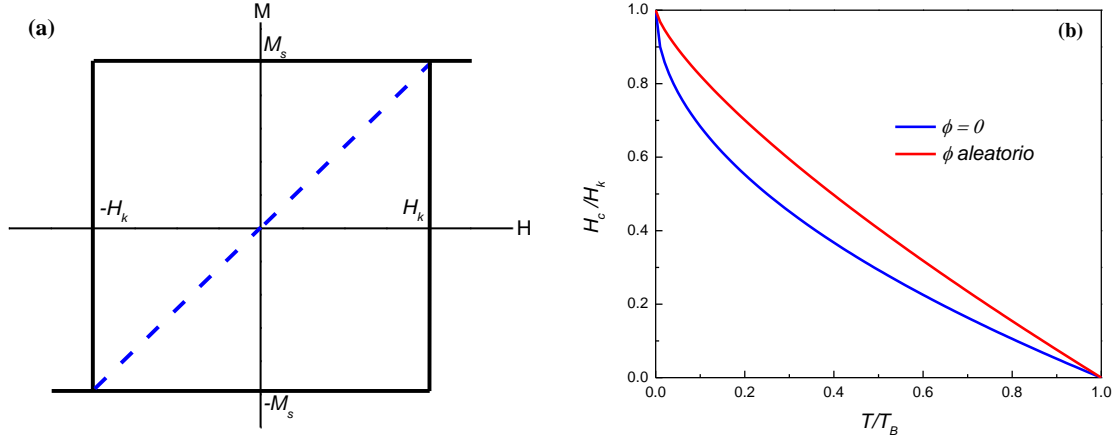
La temperatura de bloqueo depende del tiempo de medida característico de cada técnica ( $\tau_m$ ) y se encuentra cuando  $\tau = \tau_m$ .

$$17. \quad T_B = \frac{k_B}{K_{mc}V} \ln\left(\frac{\tau_m}{\tau_0}\right)$$

Utilizando las ecuaciones 16 y 17 se tiene que<sup>24</sup>:

$$18. \quad H_c = H_k \left(1 - \left(\frac{T}{T_B}\right)^{1/2}\right)$$

El comportamiento del campo coercitivo con la temperatura se ilustra en la Figura 2. 3(b).



**Figura 2. 3.**(a).La línea negra continua representa el ciclo de magnetización para una NPM donde  $H$  se aplica en la dirección del eje de anisotropía para  $T = 0$  K. La línea azul punteada representa la magnetización de la misma nanopartícula cuando el campo se aplica a  $90^\circ$  del eje de anisotropía (b). Comportamiento del campo coercitivo en función de la temperatura.

Por otro lado si la dirección de aplicación del campo magnético  $H$  forma un ángulo  $\phi$  con el eje de anisotropía se tiene que la energía total de la NPM es:

$$19. \quad E = 2K_{mc}V \left( \frac{1}{2} \text{sen}^2(\phi - \theta) - h \cos(\theta) \right)$$

En este caso, la coercitividad de la NPM depende del ángulo  $\phi$ . Cuando  $\phi = 0$  el resultado se reduce a la ecuación 18, mientras que para  $0 < \phi < \pi/4$  cuando  $T \rightarrow 0$  se tiene que:

$$20. \quad H_c = H_K \left( \frac{(1-w^2+w^4)^{1/2}}{1+w^2} \right)$$

Donde  $w = (\tan \phi)^{1/3}$ .

Cuando  $\pi/4 < \phi < \pi/2$  para  $T \rightarrow 0$  se tiene que<sup>25</sup>:

$$21. \quad H_c = H_K \frac{\text{sen}(2\phi - \pi)}{2}$$

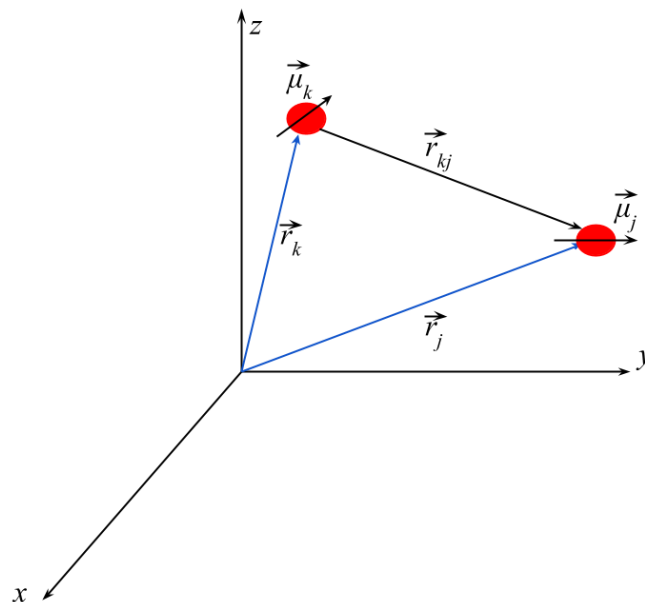
Cuando los ejes de anisotropía se encuentran aleatoriamente orientados se tiene que:

$$22. \quad H_c = 0.48H_k \left( 1 - \left( \frac{T}{T_B} \right)^{3/4} \right)$$

El comportamiento de  $H_c$  con la temperatura para un sistema con los ejes de anisotropía se encuentran aleatoriamente orientados se presenta en la Figura 2. 3(b), en la cual se observa que para un conjunto de NPM con los ejes de anisotropía aleatoriamente orientados se espera una mayor coercitividad que para el mismo conjunto con los ejes de anisotropía orientados en la dirección del campo magnético.

### 2.3 INTERACCIÓN DIPOLAR MAGNÉTICA

Consideremos una partícula cuya posición está determinada por el vector  $\vec{r}_k$  y tiene un momento magnético  $\vec{\mu}_k$  tal como se presenta en la Figura 2.4. El campo magnético ( $\vec{B}_j$ ) generado por la partícula  $k$  afecta a otra partícula ubicada en la posición  $\vec{r}_j$  y momento magnético  $\vec{\mu}_j$ ,



**Figura 2. 4.** Distribución espacial de dos NPM con momentos magnéticos  $\mu_k$  y  $\mu_j$  separadas una distancia  $r_{kj}$ .

De esta forma la energía de interacción está dada por:

$$E_{dip} = -\vec{\mu}_k \cdot \vec{B}_k$$

$$23. \quad E_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{\vec{\mu}_k \cdot \vec{\mu}_j}{|\vec{r}_{kj}|^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_k \cdot \vec{r}_{kj})(\vec{\mu}_j \cdot \vec{r}_{kj})}{|\vec{r}_{kj}|^5} \right)$$

Sean  $\gamma$  el ángulo formado por los vectores  $\vec{\mu}_k$  y  $\vec{\mu}_j$ ,  $\alpha$  el ángulo formado por los vectores  $\vec{\mu}_k$  y  $\vec{r}_{kj}$  y  $\beta$  el ángulo formado por los vectores  $\vec{\mu}_j$  y  $\vec{r}_{kj}$ . De esta forma si  $|\vec{\mu}_k| = |\vec{\mu}_j| = \mu$

$$24. \quad E_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{\mu^2 \cos \gamma}{|\vec{r}_{kj}|^3} - 3 \frac{\mu^2 \cos \alpha \cos \beta}{|\vec{r}_{kj}|^3} \right)$$

La configuración de menor energía se da para  $\gamma = \alpha = \beta = 0$ , en este caso la energía dipolar es

$$25. \quad E_{dip} = -\frac{\mu_0 \mu^2}{2\pi |\vec{r}_{kj}|^3} = -\frac{\mu_0 M_s^2 V^2}{2\pi |\vec{r}_{kj}|^3}$$

La anterior expresión es válida para la interacción producida por un par de partículas. En una suspensión coloidal, una partícula interactúa con todas las demás partículas de la suspensión, la intensidad de esta interacción depende de la distancia entre una partícula y el resto y además de las orientaciones relativas de momentos magnéticos de cada nanopartícula.

Para solucionar el problema de interacción entre varias partículas, uno de los posibles abordajes a este problema es considerar un modelo de campo medio, que incluya de forma analítica la contribución, tanto de las partículas cercanas como de las partículas lejanas, a la intensidad de la interacción.

En primera aproximación, se puede considerar que la partícula se encuentra en un *campo magnético medio* ( $H_m$ ) producido por el momento magnético de las otras partículas. Dos modelos para determinar este campo medio y por lo tanto la energía dipolar de un sistema de NPM se estudiará en la sección 2.5.

## 2.4 SUSCEPTIBILIDAD DE NANOPARTÍCULAS EN SUSPENSIÓN A CAMPOS MAGNÉTICOS ALTERNOS: VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN DE ENERGÍA.

Consideremos una nanopartícula de volumen  $V$  y magnetización de saturación  $M_s$  inmersa en un campo magnético variable en el tiempo de la forma:

$$H(t) = H_o e^{i\omega t}$$

Donde  $\omega = 2\pi f$ , siendo  $f$  la frecuencia de oscilación del campo magnético.

De esta forma, para campos magnéticos pequeños, la magnetización es proporcional a  $H$ :

$$26. \quad \vec{M}(t) = \chi \vec{H}(t)$$

Donde  $\chi$  es la susceptibilidad magnética y puede expresarse como

$$27. \quad \chi = \chi' - i\chi''$$

Donde  $\chi'$  es la componente en fase de la susceptibilidad y  $\chi''$  es la componente fuera de fase. De forma que:

$$M(t) = \text{Re}[\chi H_o e^{i\omega t}] = H_o (\chi' \cos \omega t + \chi'' \sin \omega t)$$

Debido a que  $\chi''$  está retrasada con respecto al campo de excitación, esta componente determina la capacidad de absorber energía y es la única que contribuye al aumento de  $\Delta U$  de la partícula.

De la primera ley de la termodinámica  $dU = dQ + dW$ , donde  $U$  es la energía interna,  $Q$  es el calor absorbido y  $W$  es el trabajo realizado por el sistema, considerando un sistema adiabático ( $dQ = 0$ ), el trabajo realizado para magnetizar la nanopartícula es  $dW = \vec{H} \cdot d\vec{B}$  donde  $\vec{B}$  es la inducción magnética que adquiere la NPM en presencia de un campo  $\vec{H}$ .



De esta forma  $dU = \vec{H} \cdot d\vec{B}$ , siendo  $\vec{B} = \mu_0(\vec{H} + \vec{M})$ . La energía interna del campo está relacionada con el término  $\vec{H} \cdot d\vec{H}$  y no contribuye a la variación de la energía interna de la nanopartícula, por lo tanto:

$$28. \quad \Delta U = -\mu_0 \oint \vec{M} \cdot d\vec{H} = 2\mu_0 H_0^2 \chi'' \int_0^{2\pi/\omega} \text{sen}^2(\omega t) dt$$

Así la velocidad específica de absorción<sup>5</sup> o SAR por sus siglas en inglés (Specific Absorption Rate) es  $SAR=f\Delta U$

$$29. \quad SAR = \mu_0 \pi \chi'' f H_0^2$$

#### 2.4.1 *Relajación Magnética de Nanopartículas en Suspensiones Coloidales.*

Un coloide magnético está formado por una fase líquida de viscosidad  $\eta$  en la cual se encuentran suspendidas NPM.

Al aplicar un campo magnético la magnetización específica del sistema de NPM está determinada por la ecuación de Shliomis<sup>26</sup>

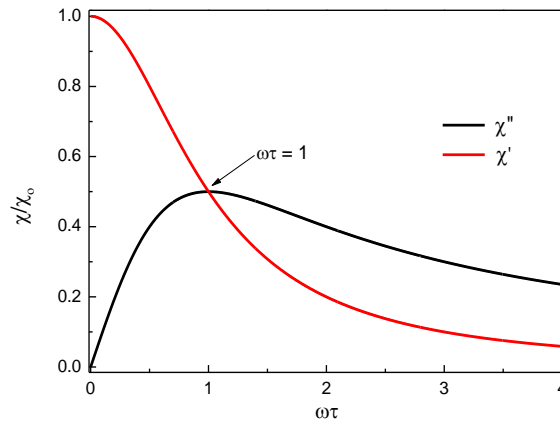
$$30. \quad \frac{\partial M(t)}{\partial t} = \frac{1}{\tau} (M_o(t) - M(t))$$

Donde  $\tau$  es el tiempo de relajación y  $M_o(t) = \chi_o H_o \cos \omega t$  es la magnetización en el equilibrio y  $\chi_o$  es la susceptibilidad en equilibrio. Resolviendo la ecuación 30 se tiene que:

$$31. \quad \chi' = \frac{\chi_o}{1+(\omega\tau)^2}$$

$$32. \quad \chi'' = \frac{\chi_o \omega \tau}{1+(\omega\tau)^2}$$

El comportamiento de  $\chi'$  y  $\chi''$  en relación a la frecuencia del campo magnético aplicado se presenta en la Figura 2.5.



**Figura 2. 5.** Comportamiento de las componentes en fase  $\chi'$  y fuera de fase  $\chi''$  de la susceptibilidad en función de  $\omega\tau$ .

El modelo predice que la componente fuera de fase de la susceptibilidad tiene un máximo valor cuando  $\omega\tau = 1$ , condición se conoce como *condición de resonancia*. Este máximo coincide con el punto de inflexión de  $\chi'$ .

De esta forma, la potencia disipada por la NPM también tiene dependencia con la frecuencia de oscilación del campo magnético y el tiempo de relajación de la NPM. Si el campo magnético aplicado es pequeño, existe una relación lineal entre la magnetización y el campo aplicado, donde la constante de proporcionalidad es  $\chi_0$ . La aproximación de la ecuación de Langevin, que gobierna la magnetización de un sistema superparamagnético, para campos magnéticos pequeños permite obtener un valor de  $\chi_0$  representado en la ecuación 7.0

El SAR, en unidades SI, tal como se describe en la ecuación 29 tiene unidades de potencia por unidad de volumen ( $\text{W}/\text{m}^3$ ), dividiendo por la densidad de la NPM ( $\rho_{NPM}$ ) se tiene la potencia absorbida por unidad de masa de NPM (esta magnitud será la utilizada en todo el documento):

$$33. \quad SAR = \frac{\mu_0^2 M_s^2 V H_0^2}{6k_B T \rho_{NPM}} \frac{\omega^2 \tau}{1 + (\omega\tau)^2}$$

Por otro lado, el tiempo de relajación dependerá del mecanismo de relajación magnética. Para una NPM en un sistema coloidal se tienen dos mecanismos de relajación<sup>27,28</sup>. En el mecanismo de relajación de Brown la NPM realiza una rotación para alinear su momento magnético con el campo aplicado, el tiempo en el cual se realiza la rotación se conoce como tiempo de relajación de Brown ( $\tau_B$ ). El segundo

mecanismo de relajación se conoce como mecanismo de Néel, en este el momento magnético rota en el interior de la NPM para alinearse con el campo externo, el tiempo en el cual se realiza la rotación se conoce como tiempo de relajación de Néel ( $\tau_N$ ). Estos tiempos de relajación se presentan en las ecuaciones 34 y 36 respectivamente.

$$34. \quad \tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T}$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad de la fase dispersante y  $V_H$  es el volumen hidrodinámico. Como primera aproximación, para una partícula de radio  $r$  y volumen  $V$  con una capa surfactante de espesor  $\delta$ , el volumen hidrodinámico es igual al volumen de una partícula de radio  $r+\delta$ .

$$35. \quad V_H = V \left(1 + \frac{\delta}{r}\right)^3$$

Esta aproximación subestima el valor real de  $V_H$  puesto que no se considera que en un sistema formado por NPM inmersa en una matriz de viscosidad  $\eta$ , las moléculas de la superficie de la partícula interactúan con las moléculas de la matriz provocando un efecto de arrastre debido a la fricción entre la partícula y el medio<sup>29</sup>, que resulta en un tamaño hidrodinámico mayor que el calculado con la ecuación 35.

Para el caso de la relajación de Néel, el tiempo de relajación es:

$$36. \quad \tau_N = \tau_0 e^{\Delta E/k_B T}$$

Donde  $\Delta E$  está dado por la ecuación 11.

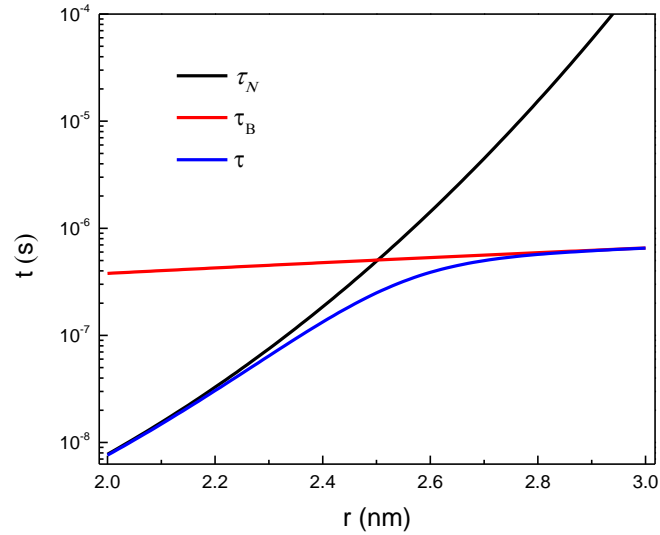
Si se asume independencia entre los mecanismos de relajación, el tiempo de relajación total es:

$$37. \quad \tau = \left(\frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B}\right)^{-1}$$

En el caso más simple, en ausencia de campo magnético externo:

$$\tau_N = \tau_0 e^{KV/k_B T}$$

El comportamiento del tiempo de relajación con respecto al radio ( $r$ ) de la partícula se puede observar en la Figura 2.6:



**Figura 2. 6.** Comportamiento del tiempo de relajación en función el tamaño de partícula para  $T = 300$  K.

Para esta simulación se consideraron NPM tal que  $K_{eff} = 53.81$  kJ/m<sup>3</sup>, recubiertas con una capa de  $\delta = 3$  nm inmersas en un líquido de viscosidad  $\eta = 10^{-3}$  Pa.s. Además  $\tau_o = 10^{-10}$  s.

De la gráfica se puede deducir que cuando el tamaño de las partículas es menor al radio para el cual  $\tau_N = \tau_B$  el mecanismo de relajación dominante es el de Néel, mientras que para partículas con tamaños por encima de este punto, el mecanismo de relajación predominante es el de Brown.

Si consideramos un sistema coloidal caracterizado por una función de distribución volumétrica de radios  $g(r)$ , que representa la fracción de volumen de muestra conformado por partículas cuyo radio está entre  $r$  y  $r + dr$ , se tiene que la potencia específica disipada es:

$$38. \quad SAR = \frac{\mu_0^2 M_s^2 H_0^2}{6k_B T \rho_{NPM}} \int_0^\infty V(r) \frac{\omega^2 \tau(r)}{(1 + (\omega \tau(r))^2)} g(r) dr$$

Cuando la frecuencia de excitación ( $\omega$ ) es igual al inverso del tiempo de relajación de las NPM se tiene que  $\omega \tau(r) = 1$ , condición que se conoce como de resonancia. En este punto la componente fuera de fase de la susceptibilidad ( $\chi''$ ) presenta un máximo. Para un sistema polidisperso, cuando el centroide de  $g(r)$  coincide con el máximo de  $\chi''(r)$  el SAR toma un valor máximo puesto que es proporcional al área debajo de  $\chi''(r) \cdot g(r)$ .

## 2.5 INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES DIPOLARES EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN

Varios modelos se han propuesto para determinar la influencia de las interacciones dipolares en las propiedades magnéticas de las NPM. Se discuten a continuación aquellos que revisten mayor importancia en relación al análisis del parámetro SAR que se realiza en este trabajo.

### 2.5.1 *Modelo de Campo Medio de Dormann-Bessais-Fiorani:*

El modelo DBF aborda el problema de la influencia de las interacciones dipolares en el tiempo de relajación de una nanopartícula dentro de un conjunto de NPM<sup>12</sup>.

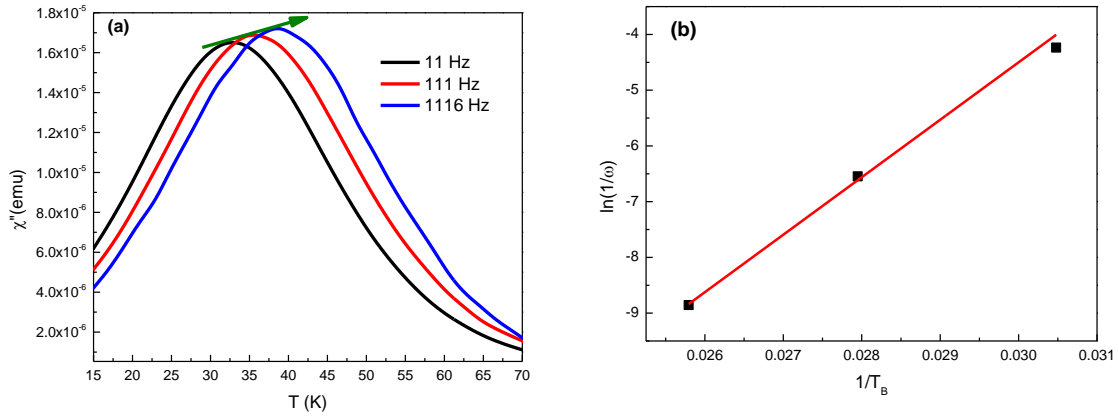
En un sistema no interactuante,  $\chi''(\omega\tau, T)$  tiene un máximo cuando  $\omega\tau = 1$  y se da cuando  $T = T_B$  tal como se presenta en la Figura 2.7(a) en donde el comportamiento de  $\chi''$  en función de la temperatura es presentado para diferentes frecuencias.

En esta figura se puede observar que el máximo de  $\chi''$  se desplaza a mayores temperaturas cuando se aumenta la frecuencia.

Así, de la ecuación 36, con  $\tau = 1/\omega$  se tiene que:

$$39. \quad \ln(1/\omega) = \frac{\Delta E}{k_B T_B} + \ln(\tau_o)$$

Al graficar  $\ln(1/\omega)$  en función de  $1/T_B$  se observa un comportamiento lineal entre estas dos variables donde la pendiente de la recta está dada por  $\Delta E/k_B$  y la intercepción con el eje de la ordenada es  $\ln(\tau_o)$ . La ecuación 39 corresponde a una *ecuación de Arrhenius*.



**Figura 2.7. (a).** Comportamiento de la componente fuera de fase de la susceptibilidad en función de la temperatura a diferentes frecuencias del campo AC. (b). Linealidad entre la inversa de la temperatura de bloqueo y el logaritmo del tiempo de relajación.

La altura  $\Delta E$  de la barrera puede verse afectada principalmente por tres motivos:

1. La energía magnetocrystalina, que proviene de la estructura cristalina de la NPM.
2. La energía magnetostática que proviene de la forma de la partícula (factor desmagnetizante) y tiene simetría uniaxial.
3. Las interacciones dipolares, las cuales producen una energía adicional que no puede ser despreciada si la distancia entre partículas es corta.

Para determinar el efecto de las interacciones en la barrera de energía se pueden considerar dos casos: en el primero, un arreglo regular de NPM idénticas en el cual todas las NPM tienen la misma barrera de energía y una rotación de los momentos es esperada. En segundo lugar se tiene un conjunto desordenado de partículas no idénticas con una dada distribución de tamaños, en este caso, la barrera de energía también se encuentra distribuida y depende del volumen de cada partícula.

En relación al primer caso, donde las NPM son idénticas, la barrera de energía de la  $i$ -ésima partícula se ve afectada por el campo dipolar generado por el momento magnético de la  $j$ -ésima partícula ( $\mu_j$ ), si la suma se extiende a todas las partículas vecinas este cambio de energía  $\Delta E_{int}$  es:

$$40. \quad \Delta E_{int} = \mu_o M_s^2 V \sum_j b_j L \left( \mu_o M_s^2 V \frac{a_j}{k_B T} \right)$$

Siendo  $L$  es la función de Langevin,  $a_j = V \frac{3\cos^2\alpha_j - 1}{d_j^3}$ , con  $\alpha_j$  es el ángulo entre  $\mu_j$  y el vector  $\vec{r}_{ij}$  que representa el vector posición de la partícula  $i$  con relación a la partícula  $j$ ,  $d_j$  es la distancia entre partículas y  $b_j$  tiene en cuenta el efecto de la interacción dipolar sobre la  $j$ -ésima partícula. Para un sistema monodisperso en la condición de menor energía  $b_j = a_j$ .

De esta forma, se tiene una barrera de energía total de la forma:

$$41. \quad \Delta E_{tot} = K_e V_{NP} + \Delta E_{int}$$

Donde  $K_e$  es la constante de anisotropía que tiene en cuenta la anisotropía magnetocristalina y magnetostática.

Considerando solo las contribuciones de los primeros vecinos y la aproximación de la función de Langevin  $L(x) \approx 1-1/x$  para  $x \geq 2$ , es decir la energía dipolar es mayor al doble de la energía térmica, se tiene que:

$$\Delta E_{int} = \mu_o M_S^2 V_{NP} n_1 \left( b_1 - \frac{k_B T b_1}{\mu_o M_S^2 V_{NP} a_1} \right)$$

Así que la ecuación 39 puede reescribirse de la forma:

$$42. \quad \ln(1/\omega) = \ln(\tau_o) - n_1 \frac{b_1}{a_1} + \frac{V}{k_B T_B} (K_e + \mu_o M_S^2 b_1 n_1)$$

Donde se tiene una constante de anisotropía efectiva que tiene en cuenta las interacciones dipolares y es mayor a la constante de anisotropía uniaxial:

$$K_{eff} = K_e + \mu_o M_S^2 b_1 n_1$$

En conclusión a partir del modelo de DBS se puede concluir que las interacciones dipolares aumentan la barrera de energía, puesto que la constante de anisotropía aumenta, y a su vez disminuye el valor de  $\tau_o$ , por lo cual se debe considerar un  $\tau_o^{eff}$  tal que:

$$\tau_o^{eff} = \tau_o e^{-n_1 b_1 / a_1}$$

El anterior resultado, se puede comparar con el modelo de Vogel-Fulcher en cual, de una forma más general, se expresa el tiempo de relajación de la forma:

$$43. \quad \ln(1/\omega) = \ln(\tau_o) + \frac{0.97K_{eff}V}{k_B(T_B - T_o)}$$

Donde  $T_o$  es una medida indirecta de las interacciones dipolares entre partículas.

Utilizando la ecuación 42 se puede determinar una expresión para  $T_o$  tal que:

$$44. \quad T_o = \frac{(\mu_o M_s^2 a_1)^2}{K_{eff}} (1 + \varepsilon) \frac{V b_1 n_1}{2.9 a_1 k_B}$$

Siendo  $\varepsilon$  el efecto de los vecinos no tan cercanos.

La aplicación de este modelo a datos experimentales, depende de parámetros como la distribución de tamaños de partícula y la magnetización de saturación de la NPM. El modelo propone que la barrera de energía de una nanopartícula inmersa en el campo dipolar producido por las NPM de su entorno, es mayor a la barrera de energía de una nanopartícula aislada.

### 2.5.2 *Modelo del Campo Medio de Landi*

En el modelo anterior, se ha discutido como las interacciones dipolares afectan las propiedades magnéticas de las NPM. Es de particular interés determinar si las interacciones dipolares pueden aumentar o disminuir el SAR, ya que existe un debate acerca de su influencia en la absorción de potencia, algunas investigaciones indica que la presencia de interacciones disminuye el SAR<sup>9</sup> mientras que otras investigaciones han demostrado que las interacciones aumentan el SAR obtenido<sup>9,30,31,32</sup>.

Utilizando una teoría de campo medio, se puede demostrar que el SAR puede aumentar o disminuir dependiendo de la intensidad de las interacciones dipolares<sup>11</sup>. Este modelo se basa en cálculos numéricos desarrollados para incluir las interacciones dipolares en la ecuación de Fokker-Planck que describe la evolución temporal del sistema<sup>33</sup>.



Para un sistema monodisperso la intensidad de las interacciones dipolares depende de la concentración de NPM en el coloide, incrementando la concentración desde un estado infinitamente diluido, primero observan cambios en el tiempo de relajación, relacionados con la barrera de energía  $\Delta E$ , seguidos por la aparición de un grado de orientación de los momentos magnéticos y finalmente un estado ordenado con magnetización no nula incluso a campo aplicado igual a cero<sup>27</sup>. De esta forma el modelo propone que la barrera de energía está dada por:

$$45. \quad \Delta E_{eff} = \frac{1}{\beta} (\sigma + \gamma \sigma^2 p_2)$$

Donde  $p_2 \approx 0.9$  es el promedio de las proyecciones sobre la dirección de la magnetización del polinomio de Legendre de orden dos y:

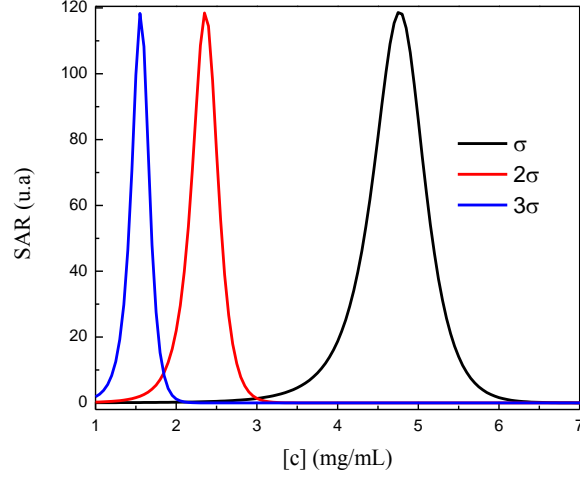
$$46. \quad \gamma = \frac{N}{10} \left( \frac{\langle \mu^2 \rangle \mu_0}{4\pi K_{mc} V_{NPM}} \right)^2 \left\langle \frac{1}{d^6} \right\rangle$$

Este resultado demuestra una fuerte dependencia de  $\Delta E_{eff}$  con la distancia entre partículas ( $d$ ). Como  $d$  es proporcional a la concentración de NPM en el coloide, pequeñas variaciones de la concentración producen incrementos importantes en la barrera de energía<sup>26</sup> tal como se presenta en la Figura 2.8.

Como puede apreciarse de la ecuación 46, la energía dipolar varía como  $1/d^6$  a diferencia de la ecuación 25 donde se observó que esta energía variaba como  $1/d^3$ . Esto se debe a que el modelo de Landi, considera un campo dipolar fluctuante cuyo primer momento promedia cero.

Al realizar la expansión del valor medio de la proyección del momento magnético sobre la dirección del campo dipolar, se obtiene una serie de polinomios de Legendre, considerando que  $p_l = \langle P_l(z) \rangle$ , siendo  $z = \cos\theta$ , donde las contribuciones simétricas, como por ejemplo  $p_l$  que produce la dependencia  $1/d^3$ , son iguales a cero.

De esta forma, el modelo propone que una aproximación de segundo orden para las interacciones dipolares que modifican la barrera de energía de las NPM.



**Figura 2. 8.**Comportamiento del SAR en función de la concentración de NPM en el coloide para diferentes valores de  $\sigma = K_{mc} V_{NP}/k_B T$ . En todos los casos se observa un máximo SAR para determinada concentración “óptima”.

Retomando la ecuación de Vogel-Fulcher para el tiempo de relajación de una NPM, donde  $T_o$  es una medida de las interacciones dipolares:

$$\tau \sim e^{\left(\frac{K_{mc} V_{NP}}{k_B (T - T_o)}\right)}$$

Si se realiza una expansión del factor exponencial en torno a  $T_o$  se tiene que:

$$47. \quad \frac{K_{mc} V_{NP}}{k_B (T - T_o)} = \frac{K_{mc} V_{NP}}{k_B T} + \frac{K_{mc} V_{NP}}{k_B T^2} T_o$$

De donde se puede observar que el resultado de la ecuación 47 es de la misma forma que el resultado presentado en la ecuación 45, comparando estas dos expresiones se puede determinar  $T_o$ :

$$48. \quad T_o = \frac{N}{10 k_B K_{mc} V_{NP}} \left( \frac{\langle \mu^2 \rangle \mu_o}{4\pi} \right)^2 \left\langle \frac{1}{d^6} \right\rangle$$

De esta forma, el modelo de campo medio, permite calcular la energía dipolar  $E_{dip} = k_B T_o$ , donde  $T_o$  está establecido por variables que se pueden medir o determinar a partir de medidas magnéticas y estructurales.

Al igual que el modelo de DBF, este modelo propone un aumento en el tiempo de relajación de las NPM debido al campo dipolar producido por el entorno, para sistemas formados por NPM monodispersas con momento magnético orientado aleatoriamente. Este campo en promedio es cero, pero una expansión en serie de polinomios de

Legendre, muestra que los momentos de segundo orden del campo dipolar no son nulos y dependen de la distancia entre partículas y aportan una modificación al tiempo de relajación que decrece mucho más rápido que los momentos de primer orden proporcionales a  $1/d^3$ . Para probar experimentalmente lo anterior, se utilizará la concentración del coloide como parámetro controlador de la distancia entre partículas.

## 2.6 DISPERSION DE RAYOS X A BAJOS ÁNGULOS (SAXS)

La ley de Bragg es la relación fundamental que describe la difracción de rayos X debida a una estructura cristalina. Esta ley relaciona las distancias interplanares ( $d$ ) con la posición angular ( $\theta$ ) de los máximos de interferencia para una onda electromagnética incidente de longitud de onda  $\lambda$ :

$$49. \quad \lambda = 2d \operatorname{sen}\theta$$

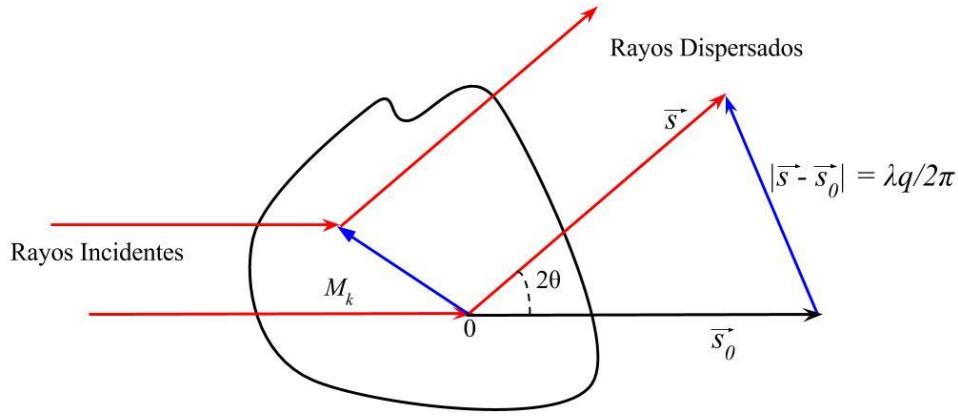
En estructuras cristalinas comunes, las distancias entre planos son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación utilizada, de forma que los ángulos de difracción son del orden de las decenas de grados.

El estudio de la difracción de rayos X a bajos ángulos ( $\theta \leq 1.25^\circ$ ), las distancias interplanares son alrededor de 10 ó 100 veces la longitud de onda utilizada. Estas distancias son comunes en algunos minerales y algunas moléculas complejas (proteínas, polímeros) y corresponden con el tamaño de las NPM utilizadas en esta investigación.

### 2.6.1 *Amplitud e Intensidad de Dispersión.*

Consideremos un objeto sobre el cual incide un haz de rayos X en la dirección dada por el vector unitario  $\vec{s}_0$  de longitud de onda  $\lambda$ . La amplitud de la radiación dispersada por un punto  $M_k$  del objeto en la dirección definida por el vector unitario  $\vec{s}$ , tal como se muestra en la Figura 2.9, está definida por la ecuación:

$$50. \quad A_k = A_e f_k e^{-i\frac{2\pi}{\lambda}(\vec{s}-\vec{s}_0) \cdot \overline{OM_k}}$$



**Figura 2. 9.**Esquema de dispersión de rayos X debida a un material.

Donde  $f_k$  es el factor de dispersión atómico, el cual depende del número de electrones y  $A_e$  es la amplitud de la onda dispersada por un electrón,  $\vec{s}_0$  es el vector unitario que define la dirección del haz incidente,  $\vec{q} = \frac{2\pi}{\lambda}(\vec{s} - \vec{s}_0)$  es el vector de onda. Si  $2\theta$  es el ángulo formado por el haz incidente y el haz dispersado, la magnitud del vector de onda es  $q = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen}\theta$ .

La amplitud de la radiación dispersada por todos los puntos del objeto en la Figura 2.9 será la suma de las amplitudes de los puntos individuales, de forma que la ecuación 50 se puede escribir de la forma:

$$51. \quad A(\vec{q}) = A_e(\vec{q}) \sum_k f_k e^{-i\vec{q} \cdot \vec{OM}_k}$$

La intensidad ( $I(q)$ ) de la radiación dispersada es el producto de la amplitud y su conjugado complejo  $A^*$ , tal como se muestra en la ecuación 52:

$$52. \quad I(\vec{q}) = I_e(\vec{q}) \sum_k \sum_j f_k f_j \cos(\vec{q} \cdot \vec{M}_k \vec{M}_j)$$

Donde  $I_e(\vec{q}) = A_e^2(\vec{q})$  es la intensidad dispersada por un electrón y depende únicamente del ángulo de dispersión<sup>34</sup>.

Para un objeto centro-simétrico, la expresión para la amplitud dispersada se simplifica si el punto de origen  $0$  de la Figura 3.10 coincide con el centro de simetría del objeto, de esta forma, para cada vector  $\vec{OM}_k$  existe un correspondiente vector  $-\vec{OM}_k$  de forma que:

$$53. \quad A(\vec{q}) = A_e(\vec{q}) \sum_k f_k \cos(\vec{q} \cdot \vec{OM}_k)$$

Así se define como factor de forma ( $F(q)$ ) la relación entre la amplitud total dispersada y la amplitud de la radiación dispersada por un electrón:

$$54. \quad F(q) = \frac{A(\vec{q})}{A_e(\vec{q})} = \sum_k f_k \cos(\vec{q} \cdot \overrightarrow{OM_k})$$

Así que la intensidad total dispersada por el objeto centro-simétrico es

$$55. \quad I(\vec{q}) = I_e(\vec{q}) F^2(\vec{q})$$

En una matriz viscosa, la partícula puede moverse libremente, este movimiento se puede expresar como una suma de traslaciones y rotaciones. Las traslaciones no tienen efecto en la intensidad total dispersada, por lo tanto solo las rotaciones se deben tener en cuenta. De esta forma, si cada dirección de rotación es igualmente probable, se tiene que la intensidad promedio debida a todas las posibles rotaciones es:

$$56. \quad \overline{I(\vec{q})} = I_e(\vec{q}) \overline{F^2(\vec{q})}$$

Considerando la amplitud de dispersión de dos puntos de una partícula como variables independientes, se puede escribir  $\overline{F^2} = \overline{F^2} = F^2$  y el problema se reduce a determinar el promedio de la función  $\cos(\vec{q} \cdot \overrightarrow{OM_k})$ :

$$57. \quad \overline{\cos(\vec{q} \cdot \overrightarrow{OM_k})} = \frac{\text{sen}(qr)}{qr}$$

Donde  $r$  es la magnitud del vector posición de cada punto de un objeto.

Si consideramos la interferencia de la intensidad dispersa por el punto  $k$  con la intensidad dispersada por el punto  $j$  dentro de una partícula, la intensidad dispersada por estos dos puntos es proporcional a:

$$58. \quad \overline{F^2(q)} = \sum_k \sum_j f_k f_j \frac{\text{sen}(q|\vec{r}_{kj}|)}{q|\vec{r}_{kj}|}$$

Donde  $\vec{r}_{kj}$  es el vector que define la posición del punto  $k$  con respecto al punto  $j$  y cuya magnitud es  $r_{kj}$ .

Para un objeto centro-simétrico de densidad electrónica continua se puede reemplazar la suma por una integral y de esta manera tener en cuenta la dispersión de un espacio continuo. Dicho esto, el factor de forma puede escribirse como:

$$F(q) = \int_0^{\infty} \rho(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr$$

Donde  $\rho(r)$  es la densidad electrónica<sup>34</sup>.

De esta forma, la ecuación 58 puede escribirse de la forma:

$$59. \quad \overline{F^2(q)} = \int_V \int_V \rho(r_k) \rho(r_j) \frac{\text{sen}(q|\overline{r_{kj}}|)}{q|\overline{r_{kj}}|} dv_k dv_j$$

Considerando la densidad electrónica como constante ( $\rho(r_k) = \rho(r_j) = \rho$ ) se tiene que el número de electrones a distancias entre  $r_{kj}$  y  $r_{kj} + dr_{kj}$  en el elemento de volumen  $dv_k$  está definido por la *función de correlación de pares*  $p(r_{kj})$ , la cual representa la probabilidad de que el punto  $j$  a una distancia  $r_{kj}$  en una dirección arbitraria desde el punto  $k$ , se encuentre dentro de la partícula:

$$\rho^2 p(r_{kj}) dr_{kj} = \int_V \rho [V_k(r_{kj} + dr_{kj}) - V_k(r_{kj})] \rho dv_k$$

De forma que la ecuación 59 se puede escribir de la forma:

$$60. \quad \overline{F^2(q)} = \rho^2 \int_V p(r_{kj}) \frac{\text{sen}(q|\overline{r_{kj}}|)}{q|\overline{r_{kj}}|} dr_{kj}$$

Eligiendo el punto  $k$  como el origen de un sistema coordenado se obtiene que

$$61. \quad p(r_{kj}) = 4\pi r_{kj}^2 V \gamma(r)$$

Donde  $V$  es el volumen medio de la partícula y  $\gamma(r)$  es la *función de correlación de densidades electrónicas*<sup>35</sup>:

$$\gamma(r_{kj}) = \frac{1}{4\pi r^2 \rho^2 V} \int_V \rho [V_k(r_{kj} + dr_{kj}) - V_k(r_{kj})] \rho dv_k$$

Así, generalizando para toda posición  $r_{kj}$ :

$$62. \quad \overline{F^2(q)} = V \rho^2 \int_0^{\infty} \gamma(r) \frac{\text{sen}(qr)}{qr} 4\pi r^2 dr$$

La solución a la ecuación 62 depende de forma y composición del objeto que dispersa la radiación. Al considerar casos en que todas las orientaciones son igualmente probables y que la densidad electrónica sea constante en el material y nula fuera del mismo, la distribución de la intensidad obtenida es isótropa.

El comportamiento de la intensidad dispersada varía según el rango de  $q$ . En primer lugar para  $q = 0$  se tiene la intensidad dispersada es proporcional al cuadrado número total de electrones ( $n_e$ ) que dispersan los rayos X:

$$63. \quad I(0) = \overline{F^2(0)} = V^2 \rho^2 = n_e^2$$

Para valores pequeños de  $q$ , esto es cuando  $q \rightarrow 0$  se tiene la expansión

$$64. \quad \frac{\text{sen}(qr)}{qr} = 1 - \frac{q^2 r^2}{6} + \frac{q^4 r^4}{120} + \dots$$

De forma que:

$$65. \quad I(q \rightarrow 0) = F^2(0) \left\{ 1 - \frac{q^2}{6V} \int_0^\infty \gamma(r) 4\pi r^4 dr + \frac{q^4}{120V} \int_0^\infty \gamma(r) 4\pi r^6 dr + \dots \right\}$$

Así se tiene que a medida que aumenta  $q$ , la intensidad dispersada disminuye siguiendo una curva parabólica cuya curvatura estará determinada por la función  $\gamma(r)$ .

Para partículas idénticas se tiene que:

$$66. \quad I(q \rightarrow 0) = n_e^2 e^{-q^2 R_o^2 / 3}$$

Donde  $R_o$  es el *radio de giro*, de forma que si  $R$  es el radio de una partícula esférica se tiene que

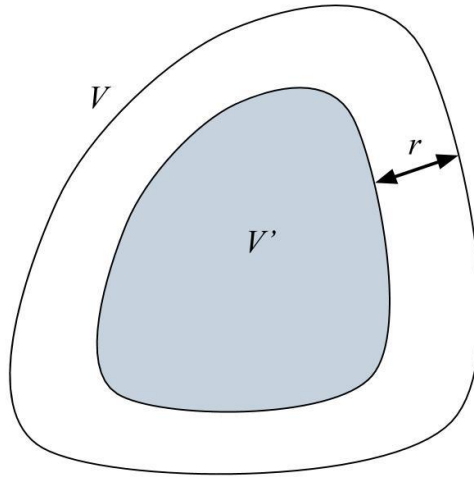
$$R_o = \sqrt{\frac{3}{5}} R$$

La expresión presentada en la ecuación 66 se conoce como *aproximación de Guinier*<sup>36</sup> y permite la determinación experimental del radio de giro de la partícula.

En el caso donde  $q \rightarrow \infty$ , los valores más pequeños de  $r$  dominan en la función  $\gamma(r)$ , de forma que expandiendo esta función en el límite de  $r \rightarrow 0$  se tiene una ecuación de la forma<sup>37</sup>:

$$67. \quad \gamma(r) = 1 - ar + br^2 + cr^3 \dots$$

Donde  $a$ ,  $b$  y  $c$  son números enteros.



**Figura 2. 10.**Esquema para calcular el comportamiento de  $\gamma(r)$  cuando  $r \rightarrow 0$

Si consideramos una partícula como la que se observa en la Figura 2.10, la correlación entre un punto del volumen  $V'$  y un punto dentro de la zona de espesor  $r$  es:

$$68. \quad 4\pi\rho^2r^2V\gamma(r)dr = 4\pi\rho^2r^2\left(V - \frac{rS}{4}\right)dr$$

Donde  $S$  es la superficie de la partícula.

Comparando las ecuaciones 67 y 68 se tiene que

$$\gamma(r) = 1 - \frac{S}{4V}r + br^2 + \dots$$

De forma que, siendo  $y = qr$ , y  $u = qR$  donde  $R$  es el radio de la partícula, si  $r > R$ ,  $\gamma(r) = 0$  (no hay electrones que correlacionar). La intensidad dispersada cuando  $q \rightarrow \infty$  es:

$$I(q) = \frac{4\pi V\rho^2}{q^3} \int_0^u \left(y - \frac{S}{4V}y^2 + \frac{b}{q^2} \dots\right) \text{sen } y \, dy$$

Integrando la expresión anterior y aproximando para  $q \rightarrow \infty$  y se tiene que:

$$69. \quad I(q \rightarrow \infty) = \frac{2\pi\rho^2S}{q^4}$$

La expresión anterior se conoce como *ley de Porod* y establece que la intensidad dispersada depende de la superficie específica de la partícula y disminuye como  $q^{-4}$ .



## 2.6.2 Dispersión en Suspensiones Coloidales Diluidas

Para un sistema diluido formado por  $n$  partículas de volumen  $V_p$  distribuidas en un volumen  $V$ , con densidad electrónica  $\rho_1$  inmersas en una matriz de densidad electrónica  $\rho_2$ .

La intensidad total dispersada ( $I_{sp}(q)$ ) será la suma de las intensidades dispersadas por cada partícula individualmente:

$$70. \quad I_{sp}(q) = NI_{part}(q)$$

Donde  $N = n/V$  es la densidad de partículas y  $I_{part}(q, r)$  es la intensidad dispersada por una sola partícula definida por las ecuaciones 56 y 62.

En este caso, según el principio de Babinet, solo la diferencia entre las densidades electrónicas ( $\Delta\rho = \rho_1 - \rho_2$ ) de las partículas y la matriz es relevante para la dispersión<sup>37</sup>.

Si las partículas son esféricas de radio  $R$  y su densidad electrónica es constante la intensidad dispersada, que resulta de resolver la ecuación 62 es:

$$F^2(q) = (\Delta\rho)^2 V_p^2 \left[ 3 \frac{\text{sen}(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Y por tanto:

$$71. \quad I_{sp}(q) = N(\Delta\rho)^2 V_p^2 \left[ 3 \frac{\text{sen}(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Sea  $\eta = r_o \rho$  la densidad de longitudes de dispersión donde  $r_o = e^2/m_e c^2 = 0.28179 \times 10^{-12} \text{cm}$  es el radio de Thompson, se tiene que la sección eficaz de dispersión diferencial, para un sistema de partículas esféricas e idénticas es:

$$72. \quad \frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = N(\Delta\eta)^2 V_p^2 \left[ 3 \frac{\text{sen}(qR) - qR \cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2$$

Donde  $N$  es el número de partículas por unidad de volumen. La diferencia entre densidades lineales de dispersión ( $\Delta\eta$ ) se conoce también como *contraste electrónico* entre las partículas y la matriz en la cual están dispersas.

Por otro lado, si el tamaño de las partículas se encuentra determinado por una función de distribución de número de partículas  $f(R)$  la ecuación 77 se puede escribir de la forma:

$$73. \quad \frac{d\Sigma_{sp}(q)}{d\Omega} = N(\Delta\eta)^2 \int_0^\infty V_p^2 \left[ 3 \frac{\text{sen}(qR) - qR\cos(qR)}{(qR)^3} \right]^2 f(R) dR$$

### 2.6.3 *Dispersión en Suspensiones Coloidales Concentradas.*

Cuando se aumenta la concentración de NPM en la suspensión, la distancia entre partículas se reduce y se empieza a producir interferencia entre las intensidades dispersada por las partículas individuales. En este caso, se hace necesario introducir una *función de correlación entre pares de partículas* ( $P(r)$ ) que tenga en cuenta estas interferencias.

De esta forma, la intensidad dispersada por un grupo de NPM cercanas unas a otras es:

$$74. \quad I(q) = I_{sp}(q, r) \left[ 1 + \frac{N}{V} \int_0^\infty 4\pi r^2 (P(r) - 1) \frac{\text{sen } qr}{qr} dr \right]$$

$P(r)$  es una función de probabilidad que tiende a la unidad a medida que  $r$  aumenta, de forma que si  $r$  es una medida de la distancia entre centros de partículas, la ecuación 74 se reduce a la ecuación 70 que corresponde a un sistema diluido.

La solución a la expresión entre corchetes de la ecuación 74 se conoce como *factor de estructura* ( $S(q)$ ) de forma que:

$$75 \quad S(q) = 1 + \frac{N}{V} \int_0^\infty 4\pi r^2 (P(r) - 1) \frac{\text{sen } qr}{qr} dr$$

La solución a la ecuación 75 depende de la forma del agregado así como de las interacciones que mantienen su estructura<sup>38</sup>.

Expresando la intensidad de dispersión de un sistema denso de NPM en unidades de la sección eficaz de dispersión:

$$76. \quad \frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = S(q) \cdot \frac{d\Sigma_{sp}(q)}{d\Omega}$$

Donde  $d\Sigma_{sp}/d\Omega$  es la sección eficaz de dispersión diferencial de las partículas individuales.

De esta forma, expresando apropiadamente la intensidad dispersada en unidades de la sección eficaz de dispersión, se puede obtener desde una medida SAXS información acerca de la diferencia de densidad electrónica entre las partículas y la matriz en la cual están dispersas, además de parámetros morfológicos como tamaño de las partículas y de su organización cuando se disminuye la distancia entre centros de las mismas.

En la siguiente sección se estudia un modelo de  $S(q)$  utilizado para determinar un ordenamiento de tipo fractal de las partículas. A partir de este modelo, utilizado como primera aproximación, se puede determinar el tipo y tamaño de las estructuras formadas por NPM en suspensiones coloidales.

#### 2.6.4 Factor de Estructura Fractal.

Debido al tipo de interacciones (dipolares y de London-van der Waals) que se presentan entre las nanopartículas magnéticas en suspensiones coloidales, se pueden formar estructuras agregadas cuya masa ( $M$ ) y número de partículas ( $N$ ) aumentan en relación al tamaño del agregado ( $\xi$ ) según una ley de potencia de la forma:

$$77. \quad M \sim \xi^{d_f}$$

Donde  $d_m$  es la dimensión fractal del objeto<sup>39</sup>.

Los objetos cuyo aumento de masa puede ser descrito por la ecuación 77 se conocen como *fractales de masa*. Esta expresión también es válida para objetos euclidianos normales como cilindros alargados, discos o esferas para los cuales  $d_f = 1, 2$  y  $3$  respectivamente, consistente con la noción común de dimensionalidad. Para objetos fractales, este exponente es un número semi-entero.

En contraste, los *fractales de superficie* son uniformemente densos, pero tienen una superficie rugosa. Matemáticamente un fractal de superficie se puede representar usando la ecuación 78, donde  $S$  es el área superficial y  $d_s$  es la dimensión fractal de la superficie.

$$78. \quad S \sim \xi^{d_s}$$

Para objetos completamente lisos,  $d_s = 2$ . Para fractales de superficie  $d_s$  toma un valor entre 2 y 3 de forma que  $d_s$  es una medida de la rugosidad de la superficie de un objeto.

En SAXS, un cambio de escala en el vector de onda, corresponde a un cambio en la escala dimensional del objeto observado, por este motivo la propiedad de auto-similaridad, característica de las estructuras fractales, puede determinarse a partir de los patrones de dispersión obtenidos.

Generalizando, la ley de Porod como una ley de potencia:

$$79. \quad I(q) \sim q^{-2d_f + d_s}$$

Donde  $p = -2d_f + d_s$  es la pendiente de Porod.

Los fractales de masa tienen exponentes de Porod entre -1 y -3, mientras que los fractales de superficie presentan exponentes de Porod entre -3 y -4. Para el caso de un objeto denso y liso se tiene que  $d_f = 3$  y  $d_s = 2$  lo cual lleva a  $p = -4$  que es el resultado de la Ley de Porod (ecuación 69).

Si una estructura fractal de dimensión  $d_f$  está formada por  $N_p$  partículas individuales de radio  $R$ , el número de partículas dentro de una esfera de radio  $r$  está dado por la siguiente expresión:

$$N(r) = \left(\frac{r}{R}\right)^{d_f}$$

Además, según la definición de la función de correlación  $P(r)$ , el número de partículas entre la distancia comprendida entre los puntos  $r$  y  $r+dr$  es:

$$N(r) = \frac{N}{V} \int_0^\infty 4\pi r^2 P(r) dr$$

Si el segmento entre  $r$  y  $r+dr$  se encuentra comprendido en el tamaño de la estructura fractal se tiene que:

$$\frac{N}{V} \int_0^\infty 4\pi r^2 P(r) dr = \left(\frac{r}{R}\right)^{d_f}$$

De forma que resolviendo la ecuación anterior se tiene que para una estructura fractal la función de correlación puede escribirse como:

$$80. \quad P_{fractal}(r) = \frac{1}{4\pi r^2} \frac{dN}{dr} = \frac{d_f}{4\pi N_p} \frac{1}{R^{d_f}} r^{d_f-3}$$

Esta función debe estar limitada por el tamaño del agregado ( $\xi$ ) por lo cual se introduce una *función de corte* de tipo exponencial<sup>40</sup>:

$$81. \quad h(r, \xi) = e^{-r/\xi}$$

Así el factor de estructura ( $S(q)$ ) según la ecuación 75 es:

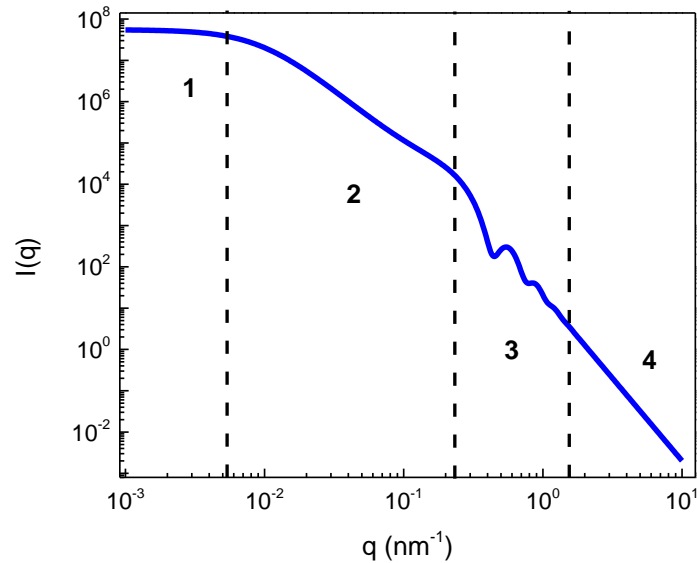
$$82. \quad S(q) = N \int_0^\infty P_{fractal}(r) h(R, \xi) \frac{\text{sen } qr}{qr} dr$$

Resolviendo la ecuación anterior<sup>41</sup>:

$$83. \quad S(q\xi, R) = 1 + \frac{d_f \Gamma(d_f-1) \text{sen}[(d_f-1)\tan^{-1}(q\xi)]}{(qR)^{d_f} (1+1/(q\xi)^2)^{\frac{d_f-1}{2}}}$$

Donde  $\Gamma$  es la función gamma.

En la figura 3.12 se observa una curva típica de  $I(q)$  de NPM esféricas con polidispersión de tamaño que forman agregados fractales. La curva se dividió en 4 regiones<sup>40</sup> según la funcionalidad de la curva con  $q$ .



**Figura 2. 11.** Curva típica de intensidad dispersada en función del vector de onda  $q$ .

Para la región 1 ( $q \leq 1/\xi$ ) se tiene la zona de Guinier de agregado, de esta región es posible determinar el tamaño  $\xi$  del agregado. En la región 2 ( $1/\xi \leq q \leq 2/R$ ) la intensidad es proporcional a  $q^{-d_f}$  y corresponde a una combinación de la zona de Porod del agregado con la zona de Guinier de la partícula individual de radio  $R$ , en esta región es

posible determinar la dimensión fractal del agregado y el tamaño de la partícula. En la región 3 ( $q > 2/R$ ) se observan los máximos y mínimos debidos a la intensidad dispersada por las partículas, en esta región es posible determinar la polidispersión de tamaño de las partículas. El efecto de la polidispersión de tamaño es borrar estos máximos secundarios, resultando en una curva más suave. Finalmente, la región 4 corresponde a la zona de Porod de la partícula individual, a partir de la cual se puede obtener acerca de la superficie específica de la misma.

### 2.6.5 Modelo Unificado de Beaucage.

El modelo de unificado de Beaucage<sup>42</sup> determina la intensidad dispersada por un agregado de dimensión fractal  $d_f$  y radio de giro  $R_g$  el cual está formado por partículas más pequeñas cuyo radio de giro es  $R_s$ . Este modelo propone que la intensidad dispersada por este agregado se puede representar como una suma funciones de Guinier y de Porod, tal como se presenta en la ecuación 84:

$$84. \quad I(q) = G \exp \left[ \frac{-q^2 R_g^2}{3} \right] + B \exp \left[ \frac{-q^2 R_s^2}{3} \right] \left( \frac{[\text{erf}(\frac{q R_g}{\sqrt{6}})]^3}{q} \right)^{d_f} + G_s \exp \left[ \frac{-q R_s^2}{2} \right] + B_s \left( \frac{[\text{erf}(q R_s / \sqrt{6})]^3}{q} \right)^P$$

Usualmente  $P = 4$  el cual corresponde al exponente de Porod cuando  $q \rightarrow \infty$ . Las constantes  $G$  y  $B$  corresponden a los coeficientes de Guinier y Porod para el agregado, mientras que las constantes  $G_s$  y  $B_s$  corresponden a los coeficientes de Guinier y Porod de las partículas individuales:

$$85. \quad G_s = N \Delta \eta^2 V^2 = N \Delta \eta^2 \left( \frac{4\pi}{3} \right)^2 R_s^6$$

$$86. \quad B_s = 2\pi N \Delta \eta^2 S = 8\pi N \Delta \eta^2 R_s^2$$

Para un sistema con polidispersión de tamaño<sup>43</sup> los coeficientes de Guinier y de Porod de la partícula individual se pueden expresar de la siguiente forma:

$$87. \quad G_s = N \Delta \eta^2 \langle V \rangle = N \Delta \eta^2 \left( \frac{4\pi}{3} \right)^2 \langle r^6 \rangle$$

$$88. \quad B_s = 2\pi N \Delta \eta^2 \langle S \rangle = 8\pi N \Delta \eta^2 \langle r^2 \rangle$$

A partir de los mismos se puede deducir el índice de polidispersión (PDI) el cual está determinado por la expresión:

$$89. \quad PDI = \frac{B_s R_s^4}{1.62 G_s}$$

Para un sistema monodisperso  $PDI = 1$ , este valor aumenta a medida que se aumenta la polidispersión del sistema.

Si consideramos que el tamaño de las partículas sigue una distribución LogNormal de mediana ubicada en  $r_o$  y con una polidispersión  $\sigma$  se tiene que los momentos ( $m$ ) de la distribución están dados por:

$$90. \quad \langle r^m \rangle = r_o^m e^{\sigma^2 m^2 / 2}$$

Con lo cual se obtiene que

$$91. \quad \sigma = \sqrt{\frac{\ln(PDI)}{12}}$$

$$92. \quad r_o = \sqrt{\frac{5R_s^2}{3e^{14\sigma^2}}}$$

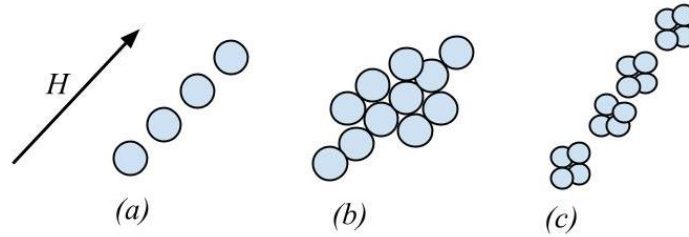
De igual forma, se puede determinar el grado de agregación ( $z$ ), definido como la cantidad de partículas de radio  $R_s$  en el agregado de radio  $R_g$ .

$$93. \quad z = \left( \frac{R_s}{R_g} \right)^{-d_f/2}$$

### 2.6.6 Patrones SAXS Anisótropos: Ordenamiento Magnético Inducido.

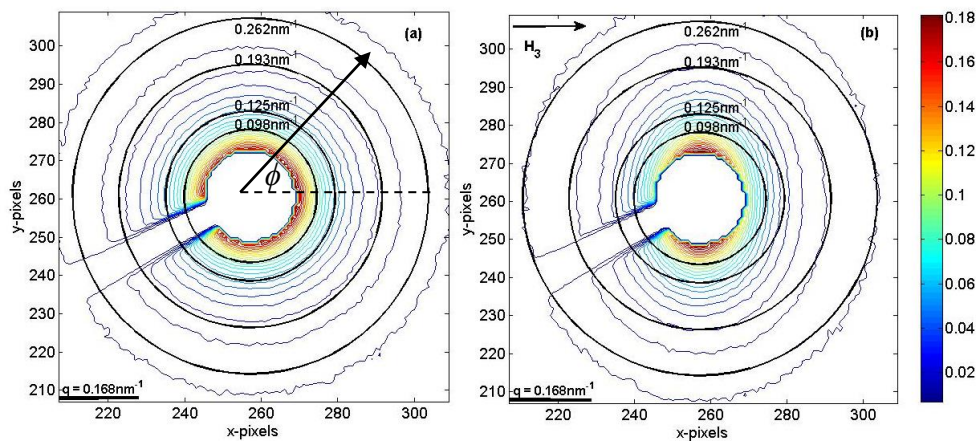
En una suspensión coloidal compuesta por partículas magnéticas, se puede producir un ordenamiento o agregación de las partículas en la dirección de aplicación del campo. De esta forma, se genera una dirección preferencial de orientación por lo cual el patrón de intensidades dispersada no será más isótropo. De igual forma, si hay agregados pre-existentes en el coloide, se puede inducir una organización de los mismos. Los posibles efectos de aplicación de campo magnético en un coloide se presentan en la Figura 2.12.

Una comparación entre un patrón de dispersión isótropo y un patrón de dispersión anisótropos cuando se aplica un campo magnético externo se puede observar en la Figura 2.13.



**Figura 2.12.** Posibles arreglos de las partículas magnéticas dentro de un coloide bajo la acción de un campo magnético externo ( $H$ ). (a). Las partículas individuales se alinean en la dirección de  $H$ . (b). Los agregados pre-existentes se orientan en la dirección de  $H$ . (c). Los agregados pre-existentes se alinean en la dirección de  $H$ .

Para la Figura 2.13(a) se puede observar un patrón de dispersión isotrópico el cual es producido por un sistema de NPM aleatoriamente distribuidas en el espacio. Para un mismo valor de  $q$ , dado por los círculos concéntricos en la figura, se observa un valor de intensidad constante. En contraste, en la Figura 2.13(b) se observa el patrón de dispersión del mismo sistema pero bajo un campo magnético aplicado.

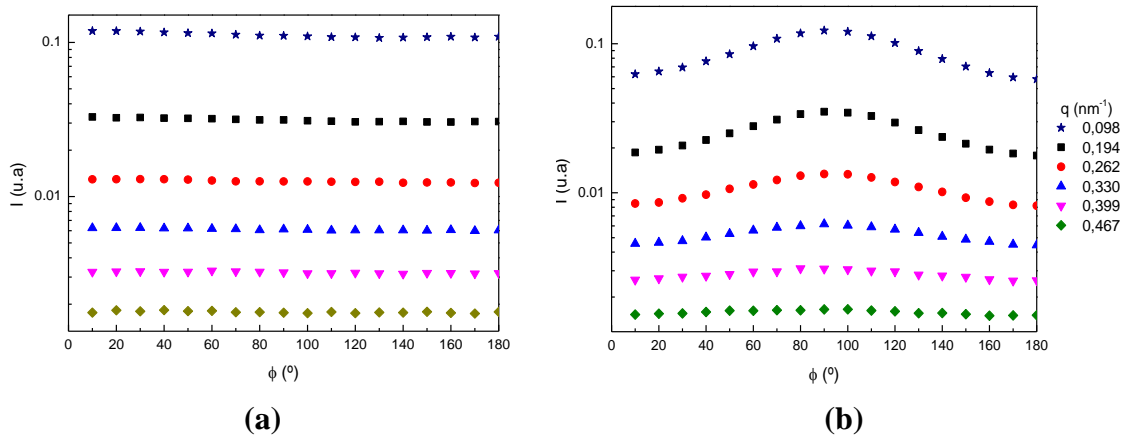


**Figura 2.13.** (a). Patrón de dispersión isotrópico producido por nanopartículas magnéticas dispersas en agua estudiadas en esta investigación. El ángulo acimutal  $\phi$  formado por el vector  $q$  y un origen de referenciase presenta. (b). Patrón de dispersión anisótropo producido por el mismo coloide cuando se aplica un campo magnético  $H_3 = 39$  kA/m. La dirección de aplicación del campo se representa por una flecha en la parte superior. Los círculos concéntricos definen valores de  $q$  constantes.

El efecto del campo es generar un orden dentro del coloide, esto produce una deformación del patrón de dispersión en la dirección perpendicular a la aplicación del campo, y como se puede apreciar la intensidad varía para un mismo valor de  $q$ . De esta forma, la intensidad dispersada por las partículas depende del ángulo acimutal ( $\phi$ )<sup>56</sup>.



El comportamiento de la intensidad dispersada como función del ángulo acimutal se presenta en la Figura 2.14. En esta figura se puede observar que para un sistema sin campo externo no existe dependencia con el ángulo acimutal, mientras que para el sistema ordenado por un campo magnético se observan mínimos de intensidad ( $I_{\parallel}(q)$ ) para los ángulos en los cuales el vector  $q$  tiene la dirección paralela y antiparalela al campo aplicado, y máximos de intensidad ( $I_{\perp}(q)$ ) para la dirección del vector  $q$  perpendicular al campo magnético.



**Figura 2.14.** Intensidad dispersada en función del ángulo acimutal para un sistema (a) aleatoriamente distribuido y (b) ordenado por la aplicación de un campo magnético. Estas curvas se obtienen a partir del análisis de las imágenes de la Figura 3.12.

Empíricamente<sup>56</sup> se obtiene que la intensidad como función del ángulo acimutal y del campo aplicado está dada por la ecuación 94:

$$94. \quad I(q, \phi) = I_o(q)[1 + A(q, H)(\text{sen}^2 \phi - 0.5)]$$

Donde  $I_o(q)$  es la intensidad promedio dada por:

$$I_o(q) = \frac{I_{\parallel}(q) + I_{\perp}(q)}{2}$$

Y  $A(q)$  es el parámetro de anisotropía definido como:

$$95. \quad A(q, H) = 2 \left( \frac{I_{\perp}(q) - I_{\parallel}(q)}{I_{\parallel}(q) + I_{\perp}(q)} \right)$$

Resultados experimentales donde se ha utilizado la ecuación 94 para modelar intensidad dispersada en función del ángulo acimutal en patrones de dispersión anisótropos han demostrado que el parámetro de anisotropía es mayor para valores bajos de  $q$  y tiende a cero cuando  $q$  aumenta.

Puesto que la magnitud de  $q$  es inversamente proporcional al tamaño del objeto que provoca la dispersión, se espera que la anisotropía se observe con mayor intensidad a bajos valores de  $q$ , donde el patrón de dispersión es causado por estructuras grandes, mientras que las partículas, más pequeñas, son las responsables del patrón de dispersión a mayores valores de  $q$ , de forma que si la partícula es isótropa, no se espera un patrón de dispersión anisótropo en esta zona de la curva.

Además del parámetro de anisotropía ( $A(q,H)$ ), a partir de los patrones acimutales de dispersión, es posible cuantificar el grado de orden dentro del coloide, es decir, si hay una dirección particular de orientaciones de las partículas, o agregados de partículas<sup>44</sup>.

Si consideramos un conjunto de partículas donde cada partícula tiene un eje de anisotropía que forma un ángulo  $\alpha$  con la dirección de aplicación de  $\vec{H}$  se tiene que el patrón de intensidades dispersadas por este conjunto de partículas está dado por la convolución de la distribución estadística de ejes de anisotropía ( $D(\alpha)$ ) con la intensidad dispersada por una sola partícula ( $P(\alpha)$ ). Debido a la simetría cilíndrica que tienen  $D(\alpha)$  y  $P(\alpha)$  la intensidad total dispersada por el sistema también tendrá simetría cilíndrica y se puede expresar como una serie de los polinomios de Legendre ( $P_{2n}$ )<sup>45</sup>:

$$96. \quad I(\alpha) = \sum_{n=0}^{\infty} I_{2n} P_{2n}(\cos \alpha)$$

Donde:

$$97. \quad I_{2n} = (4n + 1) \int_0^{2\pi} I(\alpha) P_{2n}(\cos \alpha) \sin \alpha d\alpha$$

Similares desarrollos se obtienen para  $D(\alpha)$  y  $P(\alpha)$ . Utilizando la aproximación de Deas<sup>45</sup> se tiene:

$$98. \quad I_{2n} = \frac{2\pi}{4n+1} D_{2n} I_{2n}^p$$

Donde  $D_{2n}$  y  $I_{2n}^p$  son los coeficientes de la expansión en serie de Legendre de  $D(\alpha)$  y  $P(\alpha)$  respectivamente.

Lo anterior implica que:

$$99. \quad \langle P_{2n} \rangle_I = \langle P_{2n} \rangle_D \langle P_{2n} \rangle_{I^p}$$

Donde:

$$100. \quad \langle P_{2n} \rangle_I = \frac{\int_0^{2\pi} I(\alpha) P_{2n}(\cos \alpha) \sin \alpha d\alpha}{\int_0^{2\pi} I(\alpha) \sin \alpha d\alpha}$$

De forma que conociendo  $I(\alpha)$  y  $P(\alpha)$  se puede determinar a partir de la ecuación 99 el parámetro de orden determinado por el promedio de las orientaciones dado por  $\langle P_{2n} \rangle_D$ :

$$101. \quad \langle P_{2n} \rangle_D = \frac{1}{\langle P_{2n} \rangle_I} \frac{\int_0^{2\pi} I(\alpha) P_{2n}(\cos \alpha) \sin \alpha \, d\alpha}{\int_0^{2\pi} I(\alpha) \sin \alpha \, d\alpha}$$

Ahora, considerando un máximo en la intensidad dispersada en el ángulo  $\alpha_0$  se tiene que:

$$102. \quad \langle P_{2n} \rangle_I = P_{2n}(\cos \alpha_0)$$

Y la ecuación 101 puede escribirse de la forma:

$$\langle P_{2n} \rangle_D = \frac{\langle P_{2n} \rangle_I}{P_{2n}(\cos \alpha_0)}$$

Considerando dos casos especiales  $\alpha_0 = 0$  y  $\alpha_0 = \pi/2$  se tiene la dispersión meridional y ecuatorial respectivamente.

Para el caso meridional:

$$103. \quad \langle P_{2n} \rangle_D = \langle P_{2n} \rangle_I$$

Y para el caso ecuatorial:

$$104. \quad \langle P_{2n} \rangle_D = \frac{(-1)^n 2^{2n} (n!)^2}{(2n)!} \langle P_{2n} \rangle_I$$

Si el campo magnético se aplica en una dirección perpendicular al haz de rayos X, se tiene que:

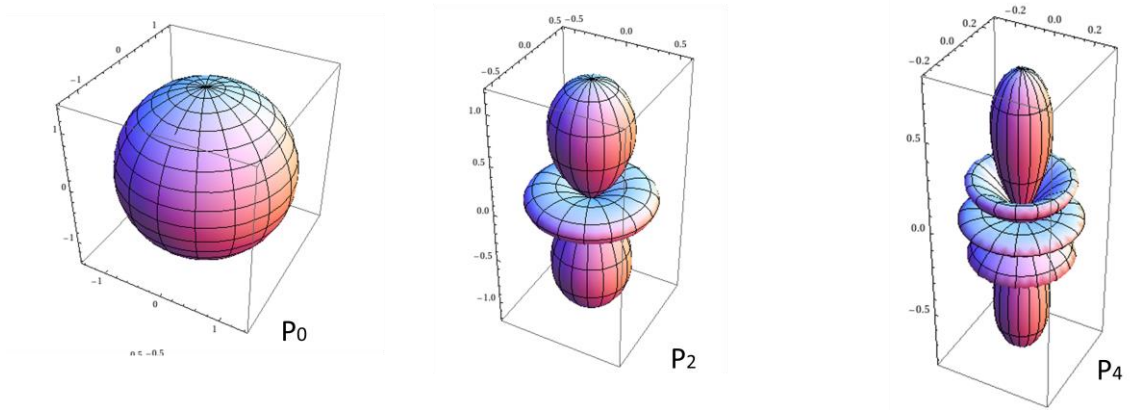
$$\alpha = \phi$$

Donde  $\phi$  es el ángulo acimutal representado en la Figura 3.12.

De esta forma, la distribución de orientaciones ( $D(\phi)$ ) de las partículas está dada por:

$$105. \quad D(\phi) = \frac{1}{2\pi} \sum_{n=0}^{\infty} (4n + 1) \langle P_{2n} \rangle_I \frac{P_{2n}(\cos \phi)}{P_{2n}(\cos \phi_0)}$$

Graficando los polinomios de Legendre en coordenadas esféricas (Figura 2.15), se puede observar que el polinomio de Legendre de orden 2 ( $n = 1$ ) representa la principal aproximación la contribución de la anisotropía al patrón de dispersión.



**Figura 2. 15.** Representación de los polinomios de Legendre de orden 0, 2 y 4 en coordenadas esféricas. De esta forma, se puede escribir en primera aproximación el parámetro de orden ( $S$ ) como el valor medio del polinomio de Legendre de segundo orden:

$$106. \quad S = \langle P_2 \rangle_D = \frac{\langle P_2 \rangle_I}{P_2(\cos \phi_0)} = \frac{\int_0^{2\pi} I(\phi)(3 \cos^2 \phi - 1) \sin \phi \, d\phi}{(3 \cos^2 \phi_0 - 1) \int_0^{2\pi} I(\phi) \sin \phi \, d\phi}$$

Además se puede determinar el ordenamiento generado en un sistema de NPM por la aplicación de campo magnético externo a partir de los patrones SAXS acimutales.

## **CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOS**

Para determinar las propiedades estructurales y magnéticas de las nanopartículas magnética (NPM), las suspensiones coloidales y líneas celulares con NPM internalizadas se utilizaron técnicas de caracterización estructural como SAXS, TEM y AFM y de caracterización magnética como magnetometría d.c.

En este capítulo se describe brevemente los métodos y condiciones de síntesis utilizadas para la preparación de los coloides y se presentan las características principales de cada una de las técnicas utilizadas en el desarrollo del trabajo.

### 3.1 SÍNTESIS DE SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS

La fase dispersa de los coloides utilizados en esta investigación son nanopartículas sintetizadas por investigadores de la Universidad de Zaragoza-España, el Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, el Instituto de Química del Sur de Bahía Blanca-Argentina y el Instituto de Física de La Plata-Argentina.

#### 3.1.1 *Nanopartículas de Ferrita de Cobalto Recubiertas con Ácido Oleico (AO@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)*

Nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> de diferentes tamaños fueron preparadas por descomposición térmica<sup>46,47</sup> utilizando acetilacetonato de Fe (Fe(acac)<sub>3</sub>) y acetilacetonato de Co (Co(acac)<sub>2</sub>) como precursores orgánicos.

Las adecuadas proporciones de Fe(acac)<sub>3</sub>, Co(acac)<sub>2</sub>, ácido oleico, oleilamina y los correspondientes solventes fueron mezclados en atmósfera de N<sub>2</sub>. Para una preparación típica, 10.4 mmol de Fe(acac)<sub>3</sub> y 5.2mmol de Co(acac)<sub>2</sub> fueron disueltos en 52 mmol de ácido oleico (AO), 65.4 mmol de oleilamina, 86.5 mmol de 1,2-octanodiol y 150 ml de solvente.

La mezcla se llevó a 200 °C y se mantuvo a esa temperatura por 2 h para promover la nucleación. Después, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se llevó hasta el punto de ebullición del solvente donde se dejó por un tiempo de reflujo  $t_r$  para permitir el crecimiento de las partículas.

Los solventes que se utilizaron durante la síntesis fueron fenil-eter, bencil-eter, 1-octanodéceno y trioctilamina, los cuales tienen puntos de ebullición en 538, 573, 593 y 638 K respectivamente, la temperatura de ebullición de los solventes se utilizó como parámetro de control del tamaño final de partícula. La relación molar de precursor/surfactante fue de 1:3.

Cinco diferentes suspensiones coloidales fueron formadas mediante la resuspensión de estas NPM en hexano<sup>48</sup> y fueron rotuladas teniendo en cuenta el solvente en el cual fueron sintetizadas las NPM. En la Tabla 3.1 se listan las suspensiones obtenidas junto con el solvente utilizado, tiempo de reflujo ( $t_r$ ) y la concentración  $[x]$  de los coloides, medida como mg de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  por ml de hexano la cual fue determinada por espectroscopía de emisión atómica por acoplamiento inductivo (AES-ICP).

<i>COLOIDE</i>	<i>SOLVENTE</i>	$t_r$ (min)	$[x]$ (mg/mL)
C <sub>be</sub>	bencil-eter	30	27.8
C <sub>pe</sub>	fenil-eter	60	5.0
C <sub>od</sub>	octadeceno	30	16.6
C <sub>tA</sub>	trioctil-amina	30	10.8
C <sub>tB</sub>	trioctil-amina	30	13.7

**Tabla 3. 1.** Nomenclatura utilizada para las NPM de  $\text{AO@CoFe}_2\text{O}_4$  dependiendo del solvente utilizado. Se detalla el tiempo de reflujo (formación)  $t_r$  y la concentración expresada en mg de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  por mL de hexano

### 3.1.2 *Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con Ácido Oleico y Quitosano (CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)*

Estas NPM fueron sintetizadas por investigadores del Instituto de Química del SUR (INQUISUR-CONICET) en Bahía Blanca-Argentina<sup>49</sup>. Las NPM se fueron sintetizadas por el método de *co-precipitación*<sup>50</sup> comúnmente utilizado para sintetizar magnetita con algunas modificaciones<sup>9</sup>. La misma cantidad de quitosano (CS) (450mg) se utilizó para hidrofilar 300 mg de NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con AO (3/2 p/p) previamente sintetizadas con diferentes relaciones de  $\text{AO/Fe}_3\text{O}_4$  (1/1 y 4/1).

Para la síntesis de estas NPM, proporciones adecuadas de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.0121 mol of  $\text{Fe}^{3+}$ ) y  $\text{FeSO}_4$  ( $6.46 \times 10^{-3}$  mol  $\text{Fe}^{2+}$ ) fueron disueltos en 100 ml de agua destilada. La porción correspondiente de AO se incorporó en la mezcla. Después, de forma controlada para evitar la agregación de la magnetita, 25 ml de NaOH 5M fueron adicionados para precipitar el óxido y la mezcla se dejó por 30 min para completar la

formación de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. La síntesis se realizó a 70°C en atmósfera de N<sub>2</sub>. La solución resultante, de color oscuro, fue decantada y el sobrenadante fue extraído. Agua bi-distilada fue adicionada para remover impurezas por filtración, proceso que se realizó por triplicado. El material sólido obtenido se secó al vacío en un horno a 45°C durante toda una noche.

En un segundo paso, se utilizó el proceso de *nano precipitación*<sup>51</sup> para recubrir las NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> con CS. En este procedimiento se utilizaron 300 mg de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> fueron dispersados en acetona y fueron tratados con ultrasonido durante 15 min. Después, una solución de 9.73 mg/ml de CS en ácido acético al 50% fue agregada. Las NPM sólidas decantan inmediatamente. El sobrenadante fue removido y el material restante fue re-suspendido en agua destilada. Bajo estas condiciones se obtienen dos suspensiones coloidales estables, etiquetadas como HD y LD según sus capacidades para disipar calor bajo campos de radiofrecuencia, cuyas condiciones de síntesis se presentan en la Tabla 3.2.

Coloide	OA/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	CS/ OA@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	[x] mg <sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></sub> /mL
HD	1/1	3/2	3.2
LD	4/1	3/2	1.7

**Tabla 3. 2.** Nomenclatura utilizada para de los coloides formados por NPM de CS/OA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. OA/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> es la relación masa/masa entre ácido oleico y magnetita y CS/ OA@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> es la relación masa/masa entre CS y OA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. [x] es la concentración del coloide.

La concentración fue determinada por espectroscopia de emisión atómica por acoplamiento inductivo (AES-ICP) y se corroboró con el método de titulación química usando como titulante dicromato de potasio.

### 3.1.3 *Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con ácido oleico y ácido dimercaptosuccínico (AO@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y DMSA@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)*

Estas NPM fueron sintetizadas por investigadores del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid (ICMM-CSIC)<sup>52</sup> por el método de descomposición térmica a alta temperatura, el cual se realiza por vía orgánica y produce partículas que solo se pueden suspender en



líquidos orgánicos como el hexano, en un procedimiento adicional se realizó un cambio de ligando de la capa surfactante de las NPM para tornarlas hidrosolubles.

Las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se obtuvieron por descomposición térmica de  $\text{Fe}(\text{oleato})_3$  en 1-octadeceno (punto de ebullición en  $315\text{ }^\circ\text{C}$ ). Se utilizó ácido oleico y oleilamina como estabilizadores. La síntesis consiste en un proceso de nucleación entre  $200$  y  $240^\circ\text{C}$  y un posterior proceso de crecimiento de las NPM a  $300^\circ\text{C}$ . Esto produce tamaños de partícula uniformes.

Para resuspender las NPM en un fase acuosa se utilizó ácido meso-2-3-dimercaptosuccínico (*DMSA*). Este último procedimiento consiste en los siguientes pasos: Primero se realiza la sustitución del ligando de ácido oleico a *DMSA*, lo cual produce grupos tioles que son oxidados formando puentes disulfúricos. En un segundo paso se produce la alcalinización para incrementar la carga superficial y estabilizar el coloide por medio de la repulsión electrostática de las NPM mediada por grupos  $\text{COO}^-$ . Los grupos tiólicos que no llegan a formar puentes disulfúricos son desprotonados a  $\text{pH} = 10$  resultando en grupos tiolatos que tienen afinidad por los átomos de Fe y permiten la sustitución parcial de fracciones de carboxilato en la superficie de la NPM. En un tercer paso se realiza una diálisis para remover el exceso de *DMSA* que no formó parte de la reacción. Finalmente se realizó la esterilización del coloide y se fijó el pH en 7 y se pasó por un filtro de  $0.22\ \mu\text{m}$  para eliminar bacterias o polvo. En la tabla 3.3 se listan las suspensiones coloidales estudiadas rotuladas según recubrimiento y tamaño de NPM, la capa surfactante, el medio dispersante y la concentración que fue determinada por AES-ICP.

Coloide	Capa Surfactante	Fase Líquida	[x] mg <sub>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></sub> /mL
O10	Ácido Oleico	Hexano	7.1
O11	Ácido Oleico	Hexano	-
O16	Ácido Oleico	Hexano	8.8
O16B	Ácido Oleico	Hexano	8.6
ODMSA10	DMSA	Agua	14.8
ODMSA11	DMSA	Agua	6.9
ODMSA16	DMSA	Agua	2.8
ODMSA16B	DMSA	Agua	6.5

**Tabla 3. 3.** Nomenclatura utilizada para de los coloides formados por NPM de DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. [x] es la concentración expresada en mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por mL de fase dispersante.

### ***3.1.4 Nanopartículas de Magnetita Recubiertas con Ácido Cítrico (AC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).***

Estas NPM se sintetizaron por investigadores del Instituto de Física de La Plata (IFLP-CONICET) en La Plata-Argentina<sup>53</sup> utilizando el método de co-precipitación química.

Se disolvieron 2.750 g de FeCl<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O en 50.0 ml de agua bidestilada y se dejó reaccionado esta mezcla dentro del balón bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 5 minutos. A continuación se adicionaron 1.010 g de FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, previamente disueltos en 50.0 ml de agua bidestilada. Una vez alcanzada la temperatura de reacción deseada se agregó, desde bureta, gota a gota 75.0 ml de hidróxido de amonio NH<sub>4</sub>OH (25 %p/p) hasta alcanzar un pH final de 10.5. Luego se dejó reaccionar durante 30 minutos más. Inmediatamente después, se procedió a la separación de las NPM utilizando un imán permanente de 0.1T en su superficie.

Una vez finalizada la síntesis de las NPM mediante el protocolo anterior, se adicionó al precipitado de NPM húmedas una solución de ácido cítrico (AC) de concentración 0.02 g/mL. Se procedió a adicionar directamente el ácido cítrico, evitando el paso previo de neutralización y lavado del precipitado negro. De esta forma se aprovecha el exceso de base retenido en el precipitado (pH ~10.5) para neutralizar el primer protón del ácido cítrico, evitando de esta manera la disolución de las NPM. Para este fin se les adicionó al precipitado húmedo gota a gota la solución AC (0.02 g/ml), hasta alcanzar un dado valor de pH de adsorción  $pH_{ads}$  en el rango entre comprendido entre 4.58 y 7.08, luego se dejó reaccionarla mezcla durante 90 minutos a 60 °C bajo flujo de  $N_2$  y finalmente se llevó a un pH final de suspensión  $pH_{susp} \sim 7.4$  empleando una solución diluida de  $NH_4OH$  (0.25 % p/p).

Se realiza una separación magnética, con un imán permanente de 0.1 T, de esta forma queda un precipitado en el fondo del recipiente y partículas dispersadas en la solución, las cuales no son atraídas por el imán debido a su estabilización con carga superficial. Las partículas precipitadas se resuspenden en agua y se rotulan con la letra *P* mientras que las partículas estabilizadas en suspensión y posteriormente dializadas para quitar el exceso de ácido cítrico se rotulan con las letras *SD* tal como se presenta en la Tabla 3.4. La concentración fue determinada por el método de titulación química usando como titulante dicromato de potasio.

Coloide	$pH_{ads}$	$[x]$ (mg $_{Fe_3O_4}$ /mL)
130312-P	4.58	8.0
130312-SD	4.58	10.5
161112-P	6.25	18.1
161112-SD	6.25	3.0
201112-P	5.70	6.9
201112-SD	5.70	9.3

**Tabla 3. 4.** Suspensiones coloidales formadas por NPM de  $AC@Fe_3O_4$ . Se lista el  $pH_{ads}$  de adsorción del ácido cítrico y la concentración del coloide llevado a pH fisiológico  $\sim 7.4$ .

### 3.2 CULTIVOS DE LA LÍNEA CELULAR CANCERÍGENA A549.

Las células A549 son células epiteliales de carcinoma pulmonar humano. Fueron aisladas por primera vez en 1972 por D.J. Giard<sup>54</sup> a partir de pacientes de género masculino con cáncer de pulmón. Estas células crecen en monocapa con un tiempo de duplicación de 48 horas en fase logarítmica de crecimiento, alcanzando esta fase a las 48 horas de ser repicadas. La morfología celular se corresponde con las células epiteliales, presentando numerosos gránulos citoplasmáticos, visibles con microscopía de campo claro o de fase.

Las líneas celulares empleadas crecen en monocapa por lo cual se mantuvieron a 37 °C en atmósfera controlada al 5 % de CO<sub>2</sub> en botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> hasta el momento de su utilización. El medio de cultivo utilizado fue Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, invitrogen). La esterilidad del medio de cultivo se realizó haciendo pasar el medio a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. A este medio se le adicionó penicilina/estreptomicina (20 mg/l) (PAA Laboratory, GMBH) y 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba). Cuando las células alcanzaron el 80-90 % de confluencia se procedió a repicarlas diluyéndolas 1/3.

Los subcultivos se realizaron despegando la monocapa de células con una solución salina isotónica de tripsina estéril (0,5 mg/ml), diluida en buffer fosfato salina, PBS (*phosphate buffered saline*) estéril conservada a 4°C, se agregó en cantidad suficiente para cubrir las monocapas. El desprendimiento de las células se controló observándolas con microscopio invertido (Olympus IX-71) y al completarse el mismo se procedió a adicionar medio de cultivo (DMEM 10% SFB) para diluir la mezcla y neutralizar la tripsina.

Según la cantidad de células necesarias para la experiencia, se pueden utilizar botellas de cultivo de diferentes tamaños, clasificadas según el área donde se adhieren las células: grande (17500mm<sup>2</sup>), mediana (7500mm<sup>2</sup>) y pequeña (2500mm<sup>2</sup>). Para experimentos que no requieran un gran número de células se pueden utilizar otros dispositivos de menor área como cajas de Petri (1963 mm<sup>2</sup>).

Todos los procedimientos que involucren el manejo de células vivas se llevan a cabo en una cabina de flujo laminar, previamente esterilizada con luz UV, al igual que todos los elementos necesarios para realizar el cultivo.

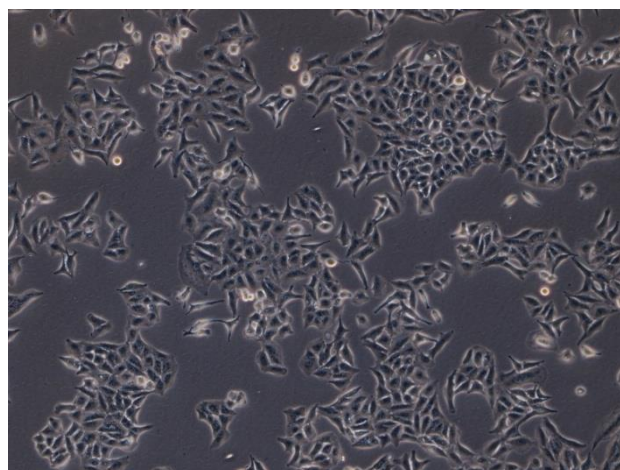
Para determinar el número aproximado de células en el cultivo, se realiza un conteo en una cámara de Neubauer. Para esto, se toman 300  $\mu\text{l}$  de suspensión de células, buscando homogeneidad en la suspensión y se mezclan con 300  $\mu\text{l}$  de Azul de Tripán. Las células muertas se tornan de un color azulado, lo cual las hace diferenciables de las células vivas al observarlas con el microscopio.

Los procedimientos de internalización de NPM se realizaron en cultivos celulares vivos. Para los experimentos de caracterización física de las células con NPM internalizadas, los cultivos se fijaron con paraformaldehído, esto hace que las células permanezcan fijas en la última disposición que tenían en su vida de cultivo, es decir mantienen forma y tamaño. Este procedimiento puede realizarse con células en monocapa o con células suspendidas.

En el proceso de fijado, el cultivo se lava con un *Buffer* fosfato salino (PBS) para eliminar restos del cultivo. En el caso de las células fijadas en suspensión, se realiza una centrifugación a 1500 RPM por 3 minutos para poder descartar el sobrenadante.

Se agrega a las células una solución de paraformaldehído al 4% y se deja durante 20-25 minutos, después se realiza otro proceso de limpieza/centrifugación y se descarta el sobrenadante.

Una imagen de las células obtenida por microscopia de contraste de fases donde se puede apreciar la morfología de las células A549 utilizadas en esta investigación se presenta en la Figura 3.1.



**Figura 3. 1.** Imagen tomada con un microscopio óptico de las células A549

Las células vivas, se ven de forma alargada y están adheridas a la superficie sobre la cual crecen, mientras las células muertas, se ven circulares y están suspendidas en el medio de cultivo.

### **3.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL.**

#### **3.3.1 *Dispersión de Rayos X a Bajos Ángulos.***

En general, la técnica de caracterización estructural de dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS) ha sido ampliamente utilizada para determinar el tamaño y forma de las NPM que forman suspensiones coloidales, así como el estado de agregación de las mismas<sup>55,56</sup>. El uso de diferentes modelos de análisis de datos ha permitido conocer con mejor detalle el tipo de estructuras que pueden formar las NPM dentro de un coloide y los mecanismos físicos y/o químicos que determinan la estabilidad de la estructura<sup>41,48</sup>.

En este trabajo se realizó la caracterización SAXS de los coloides rotulados en la sección anterior formados por NPM en suspensión orgánica y en suspensión acuosa con la finalidad de conocer, además de la forma y distribución de tamaño de las NPM, el estado de agregación de las mismas. Estos resultados serán utilizados, en conjunto con la caracterización magnética, para modelar la capacidad de las NPM para generar calor bajo campos de radio frecuencia y el potencial uso de las suspensiones acuosas para la terapia por hipertermia magnética.

También se realizó la caracterización por SAXS de células internalizadas con NPM para determinar cómo se organizan las NPM dentro de los endosomas, y proponer un modelo para la generación de color en estructuras magnéticas intracelulares formadas durante la internalización de las NPM.

Finalmente se desarrolló un dispositivo para aplicar campo magnético constante y uniforme, de diferentes intensidades, durante la medida SAXS, para así generar estructuras de NPM cuya forma y tamaño estarán determinadas por la dirección e intensidad del campo magnético.

Los experimentos SAXS fueron realizados en las líneas D11A-SAXS y D01B-SAXS del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón en Campinas-Brasil<sup>57,58</sup> durante la ejecución de las misiones realizadas bajo las propuestas D11ASAXS1-29293, D01BSAXS2-13714, D01BSAXS2-14429 y D01BSAXS2-16920. Los dispositivos necesarios para la realización de medidas SAXS en presencia de campo magnético fueron diseñados, desarrollados e implementados en la línea D01B-SAXS2 durante el transcurso de esta tesis. Todos los datos fueron registrados a temperatura ambiente (300K).

Las condiciones experimentales como rango de vector de onda ( $q$ ), longitud de onda utilizada ( $\lambda$ ) y distancias ( $L$ ) entre la muestra y el detector, así como el detector utilizado se presentan en la Tabla 3.5 para las diferentes muestras utilizadas en esta investigación.

Muestra	Estación Experimental	$q$ (nm <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (Å)	$L$ (mm)	Fuente	Detector
AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	D11A-SAXS	0.06-6.00	1.488	659 y 1760	Sincrotrón	Pilatus 300K
CS/AO@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	D01B-SAXS	0.06-3.00	1.822	975 y 1977	Sincrotrón	MAR165-CCD
AC@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	D01B-SAXS	0.06-4.00	1.822	975 y 1977	Sincrotrón	MAR165-CCD
	D01B-SAXS	0.06-5.00	1.822	573 y 2083	Sincrotrón	MAR165-CCD
DMSA@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	D01B-SAXS	0.07-5.50	1.550	610 y 1976	Sincrotrón	MAR165-CCD
	NANOSTAR	0.08-3.50	1.541	1070	Xenox (Cu)	Multi-Wire HiStar
Cultivos celulares	D01B-SAXS	0.07-5.50	1.550	610 y 1976	Sincrotrón	MAR165-CCD

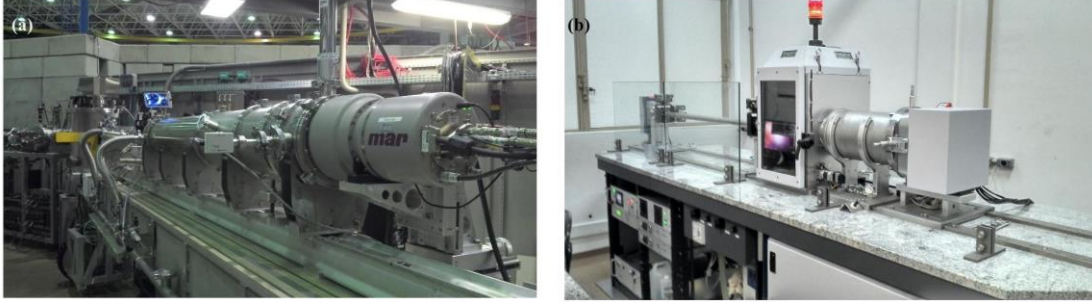
**Tabla 3. 5.** Condiciones experimentales utilizadas para realizar los experimentos de SAXS.

También se utilizó la cámara SAXS *Nanostar* del Laboratorio de Cristalografía del Instituto de Física de la Universidad de Sao Paulo (IFUSP) la cual utiliza una fuente de rayos X Xenox-Genix 3D Cu-ULD de ultra baja divergencia sellada al vacío. Una aleación de carbón vítreo y aluminio, como patrón de transmitancia conocida ( $T_{CvAl} = 0.009294$ ) para determinar la transmitancia de la muestra, a diferencia de las líneas de luz del LNLS donde la intensidad incidente y la intensidad transmitida se mide con una fotomultiplicadora ubicadas antes y después de la muestra.

En todos los experimentos la cámara fue previamente calibrada usando el patrón de difracción de la estructura laminar del behenato de plata<sup>59</sup>. La suspensión coloidal se

inyectada entre dos discos de Mica-Rubí de 25  $\mu\text{m}$  de espesor cada uno para los experimentos en el LNLS y en un capilar de vidrio de 2 mm de diámetro para las experiencias en el NANOSTAR.

En la Figura 3. 2 se presenta una fotografía de las instalaciones SAXS del LNLS (a) y del IFUSP (b).



**Figura 3. 2.** (a) Cámara SAXS de la línea D01B-SAXS del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS) en Campinas-Brasil. (b) Cámara *Nanostar* de SAXS en el Laboratorio de Cristalografía del Instituto de Física la Universidad de Sao Paulo-Brasil (IFUSP).

La radiación de fondo o *background* y la intensidad dispersada por el solvente fueron sustraídas de los datos, previamente corregidos por la absorción. Después de eso, utilizando agua como patrón<sup>60</sup>, se expresó la intensidad medida en unidades arbitrarias ( $I(q)$ ) en unidades absolutas, es decirse obtiene la sección eficaz de dispersión ( $\partial\Sigma/\partial\Omega$ ) en  $\text{cm}^{-1}$ .

El uso del agua como patrón se justifica puesto que su sección eficaz de dispersión no depende del vector de onda como se puede ver en la siguiente expresión:

$$107. \quad \frac{d\Sigma}{d\Omega_{\text{agua}}} = \eta_{\text{agua}}^2 k_B T \chi_T = 1.632 \times 10^{-2} \text{ cm}^{-1}$$

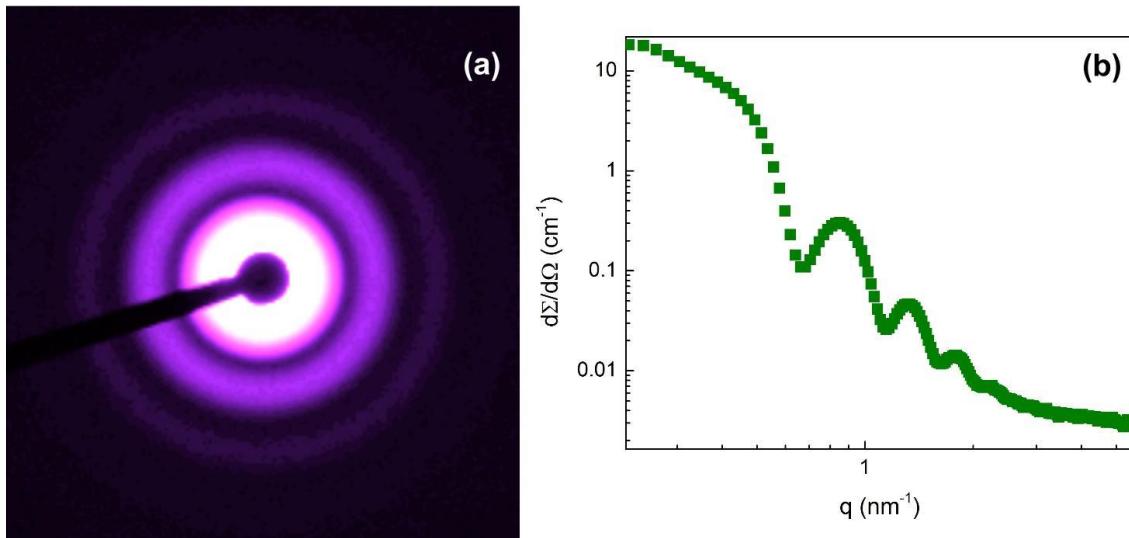
Donde  $\eta_{\text{agua}}$  es la densidad de longitudes de dispersión del agua,  $T$  la temperatura y  $\chi_T$  es la compresibilidad isotérmica del agua.

Así, siendo  $I_P(q)$  y  $d\Sigma_P/d\Omega$  la intensidad dispersada y la sección eficaz de dispersión de la muestra patrón, la sección eficaz de dispersión de un objeto cualquiera obtenida bajo las mismas condiciones utilizadas para muestra patrón puede expresarse de la forma:

$$108. \quad \frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = I(q) \frac{d\Sigma_P/d\Omega}{I_P(q)}$$



Además de expresar la intensidad dispersada en unidades absolutas, el uso de muestras patrón también permite obtener una única curva para todo el rango de  $q$  por medio del pegado de datos obtenidos con diferentes longitudes de cámara.



**Figura 3.3.** (a) Imagen del patrón de dispersión bidimensional (SAXS-2D) captada por la cámara CCD para la muestra ODMSA11. (b). Perfil unidimensional obtenido para la misma muestra a partir de la integración de la imagen SAXS-2D.

En la Figura 3.3 se presenta el patrón de dispersión bidimensional (SAXS-2D) obtenido para la muestra ODMSA11 y su correspondiente perfil unidimensional. En la imagen de SAXS-2D se pueden observar anillos de diferentes diámetros que corresponden a los máximos de intensidad observados en la figura 3.3(b). El diámetro de los círculos de mayor intensidad corresponde a un dado valor de vector de onda  $q$ , determinado con la previa calibración del equipo.

Para obtener el perfil de la Figura 3.3(b) a partir de la imagen de SAXS-2D, se realiza una integración a lo largo de una circunferencia cuyo radio igual a  $q$ . Para cada valor de  $q$  se obtiene un valor promedio de la intensidad dispersada. El rango de  $q$  está determinado por la longitud de la cámara, es decir la distancia entre la muestra y el detector.

Para la observación de células por SAXS se utilizó una concentración de entre  $10^5$  y  $10^6$  células/mL suspendidas en PBS y fijadas previamente.

### 3.3.2 *Microscopia Electrónica de Transmisión.*

La técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para determinar tamaño, dispersión de tamaño, y cristalinidad las NPM y para el análisis de cultivos incubados con las suspensiones coloidales. Diferentes equipos se utilizaron para registrar las imágenes de las diferentes muestras, un listado de los equipos y sus principales características, como potencial acelerador de los electrones (V) y resolución se presenta en la Tabla 3.6.

Las imágenes obtenidas en el TEM JEM3010 fueron adquiridas por un colaborador durante la ejecución de la propuesta TEM-14825 y por mí parte durante la ejecución de la propuesta propia TEM-16901 del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LNNano) en Campinas-Brasil<sup>61</sup>.

Este microscopio permite observar NPM individuales y en el modo de alta resolución también se pueden identificar los planos cristalinos de la partícula y así determinar su composición. Cuenta con un filamento de LaB<sub>6</sub> y un potencial acelerador de los electrones de 300 kV y una resolución de punto de 0.17 nm. Una foto del HR-TEM del LNNano se presenta en la Figura 3. 4(a). Para observar muestras biológicas un se utilizó un portamuestras criogénico enfriado con nitrógeno líquido. Una foto de este portamuestras se presenta en la Figura 3. 4(b).

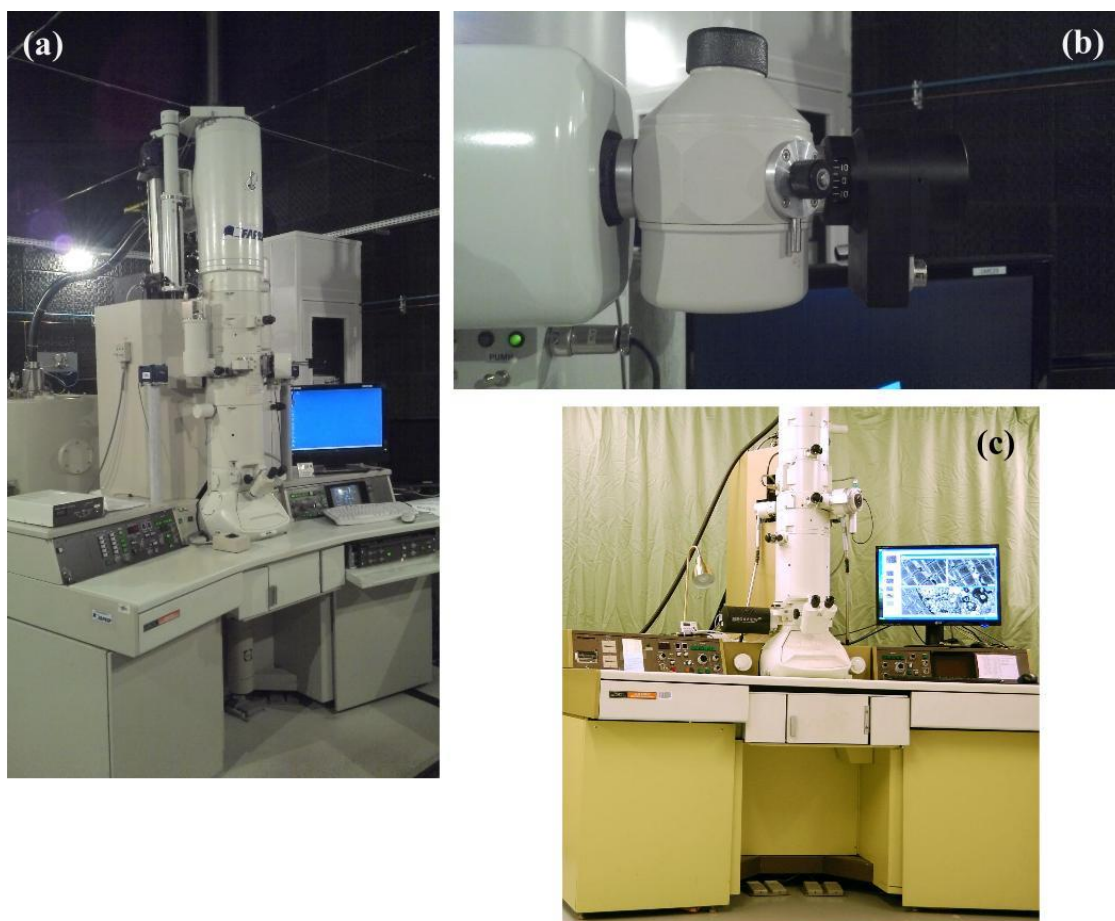
Muestra	TEM	V(kV)	Resolución (nm)
AO@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Tecnai T20*	200	0.14
CS/AO@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	JEOL 3010	300	0.17
AC@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	JEOL 3010	300	0.17
DMSA@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	JEOL 2000FXII	200	0.14
Cultivos celulares	JEOLM 3010	300	0.17
	JEOL 1200EXII	40-120 (variable)	0.35

**Tabla 3. 6.** Principales característica de los equipos utilizados en microscopía electrónica de transmisión. \*Estas medidas fueron realizadas por un colaborador del Laboratorio de Microscopias Avanzadas de la Universidad de Zaragoza.

Las imágenes TEM de los cultivos celulares también fueron tomadas en el TEM JEOL 1200 EXII del Servicio Central de Microscopía Electrónica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata<sup>62</sup>. Una foto de este equipo se presenta en la Figura 3. 4(c).

Para la observación de NPM, la muestra se prepara secando una gota de la muestra sobre una grilla de carbono a una disolución tal que permita la observación de partículas individuales en el campo de observación del microscopio.

Para visualizarlas células en TEM, los cultivos celulares, incubados bajo distintas condiciones, fueron fijados en monocapa con una disolución de glutaraldehído al 2%, la solución se mantuvo a 4°C durante dos horas para obtener un buen fijado y el levantamiento de las células de la superficie donde se encontraban adheridas.



**Figura 3. 4.** Fotografía del microscopio (a) HR-TEMJEOL 3010 del LNNano. (b) Portamuestras criogénico para medir muestras biológicas del HR-TEMJEOL 3010 del LNNano. (c) Microscopio TEM JEOL 1200 EX II de la Fac. de Veterinaria de la UNLP.

La solución de glutaraldehído y células se centrifuga a 1500 rpm por 2 minutos, se desecha el sobrenadante y se lava con solución fosfato salina (PBS).

Las células son resuspendidas en una resina *invisible* a los electrones la cual se solidifica y es cortada en fragmentos de 60 nm de espesor, se agrega una grilla para identificar las diferentes zonas de la muestra y se agrega tetróxido de Osmio para aumentar el contraste y favorecer la visualización de las células. Estos cortes son utilizados para visualizar las células en cualquier microscopio TEM.

### **3.3.1 Microscopia de Fuerza Atómica.**

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una técnica que permite medir directamente el tamaño de una partícula. Para realizar la medida en el AFM los coloides se diluyeron hasta una concentración de  $1/10^4$  desde la concentración original.

Para asegurar la observación de partículas individuales, las NPM fueron fijadas, secando una gota del coloide a 45°C durante 12 horas, en una superficie limpia de mica-moscovita grado V-1. La observación se realizó a temperatura ambiente en atmósfera de aire utilizando el método estándar de semicontacto en un microscopio NT-MDT Solver Pro del Laboratorio de Microscopía de Fuerza Atómica y Magnética del IFLP. El mismo está equipado con una punta de silicio APPNANO-ACTA utilizada para imágenes de alta resolución. El *cantiléver* rectangular tiene una constante de fuerza de 40 N/m, frecuencia de resonancia de 281.8 kHz y una punta de 6 nm de radio de curvatura. Una fotografía del equipo utilizado se presenta en la figura 3.5.



**Figura 3. 5.** Fotografía del microscopio de fuerza atómica utilizado en esta investigación

### 3.3.2 *Dispersión Dinámica de Luz.*

La dispersión dinámica de luz (*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, o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros<sup>63</sup>.

El movimiento Browniano de las moléculas en suspensión causa que la luz de un láser sea dispersada en diferentes direcciones con diferente intensidad. El análisis de las fluctuaciones en la intensidad permiten conocer la velocidad del movimiento browniano y por lo tanto el tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ) de las partículas por medio de la aplicación de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_f}$$

Donde  $\eta$  es la viscosidad del medio donde se encuentran dispersas las NPM y  $D_f$  es la constante de difusión de la partícula en el medio y tiene que ver con su velocidad y la fuerza de fricción que ejerce el medio.

Para las muestras de AC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, las medidas de tamaño hidrodinámico se realizaron a 90° midiendo la dispersión a de un láser de helio-neón (22 nW) con un goniómetro ALV/CGS-5022F y un Correlador Múltiple Digital ALV- 5000/EPP.

El tamaño hidrodinámico para las NPM de CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> fue determinado con el equipo Malvern Zetasizer NanoZS90. Se utilizaron 0.1mg<sub>NPM</sub>/mL a pH = 5.5, la cual fue sonicada por 1 hora antes de la medida. Un equipo similar fue utilizado para determinar el tamaño hidrodinámico de las NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, de las cuales se tomó una disolución de 0.5 mg<sub>NPM</sub>/mL a pH = 7.

### 3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA

Las medidas magnéticas se realizaron con NPM secas y en suspensión. Para medir las NPM secas se tomaron 100 µL de la suspensión coloidal se secaron en un horno a 45°C durante 12 horas. La masa de la fase magnética obtenida después del secado depende de la concentración de cada coloide.

Para as medir las NPM en suspensión coloidal, se tomaron entre 50 y 100 µL de muestra, las cuales fueron selladas en portamuestras de material termocontraible. La masa de la fase magnética se calcula con la concentración de cada coloide y el volumen tomado en cada alicuota.

#### 3.4.1 *Magnetometría d.c.*

En la magnetometría d.c., un campo magnético constante ( $H$ ) es aplicado sobre la muestra a una temperatura  $T$ , la cual adquiere una magnetización ( $M$ ) que depende del tipo de material magnético. La forma de generar el campo y determinar el valor de  $M$  depende de cada técnica, en esta investigación se realizaron medidas de magnetometría de muestra vibrante (VSM) en el Instituto de Física de La Plata (UNLP), magnetometría SQUID en el Laboratorio de Bajas Temperaturas (UBA) y el sistema para medida de propiedades físicas (PPMS) en el Laboratorio de Sólidos Amorfos (UBA).

En el VSM se pueden medir curvas de magnetización en función del campo magnético a temperatura ambiente entre hasta  $\pm 2$  T, mientras que en el magnetómetro SQUID y PPMS se pueden hacer medidas hasta  $\pm 7$  T desde una temperatura de 2K hasta 400K.

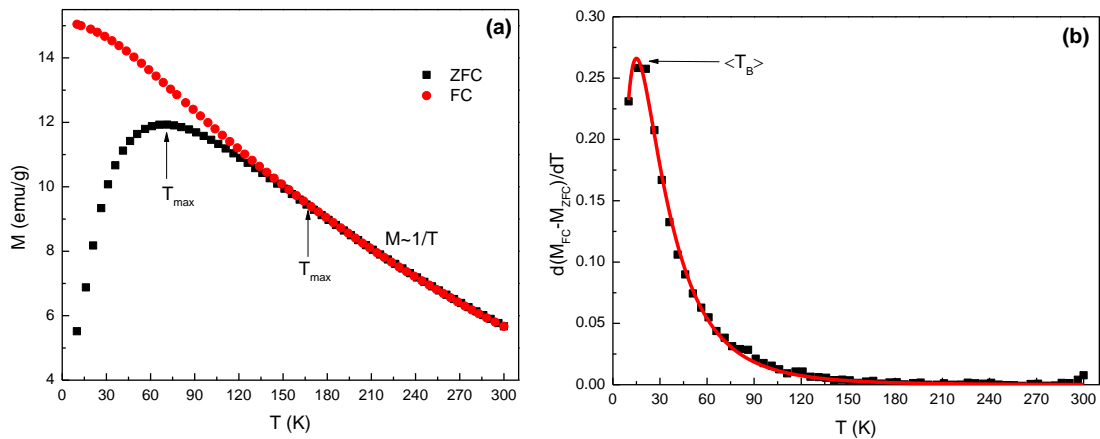
De igual forma, tanto en el magnetómetro SQUID como en el PPMS se pueden realizar medidas de magnetización en función de la temperatura, las cuales se conocen como procedimientos *Zero Field Cooling (ZFC)* y *Fiel Cooling (FC)*.

En el procedimiento de *ZFC*, la muestra se lleva hasta 5K con campo cero. En este caso, tanto los ejes de anisotropía como los momentos magnéticos se encuentran

aleatoriamente distribuidos. Después se aplica un campo magnético pequeño (entre 50 y 100 Oe) que no supere el campo necesario para que la muestra responda dentro de la teoría de respuesta lineal. La medida se hace aumentando la temperatura a una velocidad de 5 °K/min.

La medida *FC* se lleva la muestra a 5K en presencia de un campo magnético pequeño igual al campo con el cual se realizó el *ZFC*. La medida puede realizarse tanto bajando la temperatura como subiendo a la misma tasa *r* que se utilizó en el *ZFC*.

Un resultado típico de un resultado *ZFC-FC* se presenta en la Figura 3. 6 (a). La dispersión de tamaño resulta en una dispersión de temperaturas de bloqueo. En esta figura se puede observar que la curva de *ZFC* presenta un máximo a la temperatura  $T_{max}$ , este punto determina la temperatura a la cual la mayoría de las partículas pasan de un estado bloqueado a un estado desbloqueado. El punto determinado por la temperatura de irreversibilidad ( $T_{irr}$ ) indica la temperatura a la cual todas las partículas se han desbloqueado y el sistema responde como un sistema superparamagnético puro cuya magnetización disminuye según la Ley de Curie (como  $1/T$ ). A temperaturas mayores que  $T_{irr}$  las curvas de *ZFC* y *FC* coinciden.



**Figura 3. 6.** (a) Resultado típico de un procedimiento *ZFC-FC* obtenido con un magnetómetro SQUID. (b) Determinación de la temperatura de bloqueo media utilizando los protocolos *ZFC* y *FC*. La línea continua roja representa una distribución gaussiana que determina la distribución de temperaturas de bloqueo.

La temperatura de bloqueo media ( $\langle T_B \rangle$ ) se determina realizando la diferencia entre las curvas *FC* y *ZFC* y derivando con respecto a la temperatura, de esta forma se obtiene una función de distribución de temperaturas de bloqueo, donde  $\langle T_B \rangle$  se puede determinar a partir de un ajuste con una función de distribución apropiada<sup>64</sup>.

### 3.4.2 *Magnetocalorimetría: Medida de La Velocidad Específica De Absorción.*

Las medidas de disipación de calor fueron realizadas en las facilidades del IFLP-CONICET.



**Figura 3. 7.** Izquierda: Circuito resonante RLC utilizado para producir el campo magnético de radiofrecuencia sobre la muestra. Derecha: Se observa la disposición del coloide dentro del portamuestras centrado respecto de la bobina.

Un volumen conocido, entre 0.5 y 1.0 mL de suspensión coloidal, se sitúa dentro de un termo de vidrio en el cual se ha realizado vacío, diseñado específicamente para evitar pérdida de calor de la muestra hacia el medio, tal como se presenta en la Figura 3. 7. El cambio en la temperatura del coloide cuando se aplica un campo magnético de radiofrecuencia fue monitoreado con una sonda de fibra óptica marca Neoptics que permite una lectura de temperatura con una precisión de  $\pm 0.1^\circ\text{C}$ .

Una fuente de corriente a.c. marca Hüttinger (2.5/300) que permite variaciones de corriente entre 0 y 15.2 A y una potencia máxima de 2kW fue utilizada para alimentar un circuito RLC a una frecuencia determinada. La frecuencia de resonancia, en el rango de la radiofrecuencia (RF) del circuito fue controlada variando el valor de la capacitancia y la inductancia del circuito RLC. Una bobina externa 5 espiras con un diámetro de 5 cm y altura 3.7 cm, fue utilizada para generar un campo magnético a.c. con frecuencia igual a la frecuencia de resonancia del circuito RLC la cual puede variar entre 45 y 267 kHz. La muestra se sitúa en el centro geométrico de esta bobina.



Cuando el coloide se somete a campos magnéticos de radiofrecuencia absorbe energía del campo transformándola en energía interna, lo cual en condiciones adiabáticas es un aumento de temperatura ( $\Delta T$ ), de forma que la potencia ( $P$ ) entregada al coloide en el intervalo de tiempo  $\Delta t$  es:

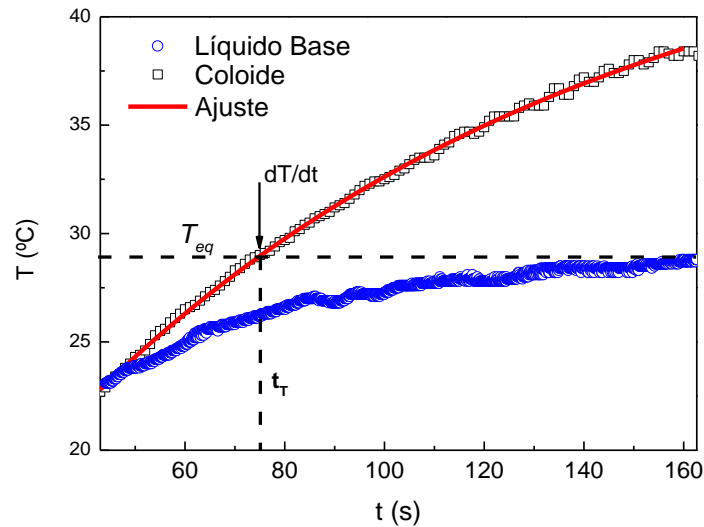
$$109. \quad P = mc \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Donde  $m$  y  $c$  son la masa y el calor específico del coloide. De igual forma, siendo  $\rho$  la densidad del coloide y  $[x]$  su concentración, definida como la masa de material magnético por unidad de volumen, podemos definir la potencia específica ( $P_m$ ) por unidad de masa como:

$$110. \quad P_m = \frac{\rho c \Delta T}{[x] \Delta t}$$

En el Sistema Internacional de Unidades, la potencia definida tal como se presenta en la ecuación 110 tiene unidades de  $W/kg$  y define la medida calorimétrica del SAR.

$$111. \quad SAR = \frac{\rho c \Delta T}{[x] \Delta t}$$



**Figura 3. 8.** Curvas de calentamiento de una suspensión coloidal magnéticas y de su fase dispersante o líquido base. La temperatura se midió con la fibra óptica Neóptics. El campo RF fue producido con la fuente a.c. configurada para  $f = 256$  kHz y  $H_o = 52$  kA/m.

En la figura 3.8 se presentan curvas de calentamiento, para  $f = 256$  kHz y  $H_o = 52$  kA/m, obtenida para una suspensión coloidal (cuadros negros) y su correspondiente fase dispersante (círculos azules).

Para determinar  $\Delta T/\Delta t$ , se mide primero el calentamiento de la fase dispersante (en nuestro caso será agua o hexano) bajo las mismas condiciones de campo y frecuencia a las cuales se medirán los coloides, y se establece la temperatura de equilibrio ( $T_{eq}$ ) que equivale a la máxima temperatura que alcanza el líquido por acción del campo de radio frecuencia.

Después se mide el aumento de temperatura de la suspensión coloidal, la curva resultante se ajusta con una ecuación exponencial (curva continua roja de la Figura 3.8) del tipo:

$$T = A - B e^{-t/b}$$

Siendo,  $A$ ,  $B$  y  $b$  los parámetros de ajuste.

De esta forma, se calcula la pendiente para el valor del tiempo ( $t_T$ ) en el cual el coloide alcanza la  $T_{eq}$  de la fase dispersante:

$$112. \quad \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{A}{b} e^{-t_T/b}$$

Para el caso de las NPM dispersas en hexano, se utiliza  $T = 27^\circ\text{C}$  como temperatura de equilibrio y para el caso de NPM dispersas en agua se utiliza  $T_{eq} = 25^\circ\text{C}$ .

# **CAPÍTULO 4: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS.**

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la caracterización estructural de las suspensiones coloidales. Se presentan principalmente los resultados de las técnicas de microscopía de transmisión de electrones (TEM) y dispersión de rayos X a bajos ángulos (SAXS), con las cuales se determina la forma, tamaño, polidispersidad y la estructuración de las NPM en suspensiones coloidales.

De estos estudios, se observa que las NPM en las suspensiones coloidales pueden estar aisladas o formando agregados de NPM cuya forma y estabilidad depende de la competencia entre las energías de interacción que tienden a agrupar a las NPM y las energías de interacción que tienden a desagrupar las NPM.

#### 4.1 NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE AO@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> DISPERSAS HEXANO

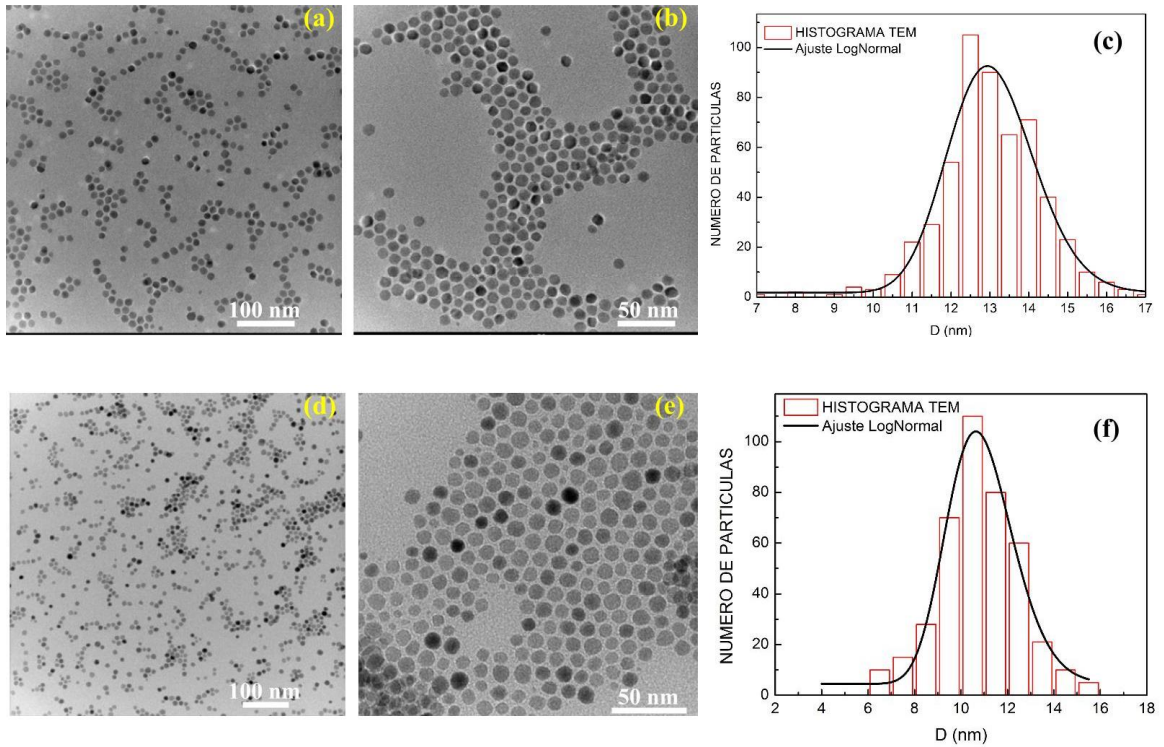
En esta sección se estudian la estructuración de las NPM en los coloides sintetizados y rotulados según el protocolo presentado en la Tabla 3.1. Debido al tipo de capa surfactante que tienen estas NPM, las mismas son hidrofóbicas, lo cual las hace insolubles en medios acuosos y no pueden ser aplicados en hipertermia magnética intracelular.

El interés en estos coloides se debe a que, por su metodología de síntesis, están formados por sistemas de partículas con muy baja polidispersión de tamaño. Esta característica facilitará estudiar estos coloides con la técnica SAXS y aplicar en sus análisis diferentes modelos teóricos que serán de utilidad en el estudio de la estructura de los coloides biocompatibles.

Utilizando la técnica de TEM, se obtuvieron imágenes de las NPM de estos coloides y se pudo determinar la forma y tamaño de las partículas<sup>48</sup>. En la Figura 4.1 se presentan las imágenes y los correspondientes histogramas de tamaño para las muestras  $C_{od}$  y  $C_{tA}$ .

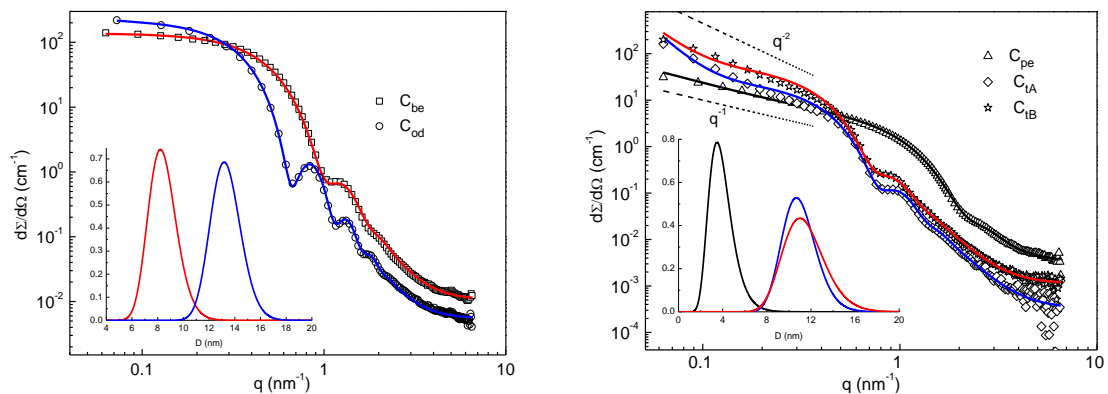
El tamaño de las NPM ( $D_{TEM}$ ) y su desviación estándar ( $s.d_{TEM}$ ), resultado de ajustar una distribución Gaussiana al histograma se presentan en la Tabla 4. 1 para todos los coloides formados por NPM de AO@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

En la Figura 4. 1, se observa que las partículas son esféricas y con baja dispersión de tamaño. También se aprecia un grado de agregación inducido por el secado del coloide sobre la grilla para observación de TEM. Una estimación del espesor de la capa surfactante que envuelve a cada NPM se puede estimar de la separación entre partículas.



**Figura 4. 1.** (a, b). Imagen TEM de las NPM del coloide  $C_{od}$ . (c) Histograma resultado del conteo de partículas ajustado con una función de distribución de LogNormal de tamaño de partícula de  $C_{od}$ . (d, e). Imagen TEM de las NPM del coloide  $C_{tA}$ . (f) Histograma resultado del conteo de partículas ajustado con una función de distribución de LogNormal de tamaño de partícula de  $C_{tA}$ .

En la Figura 4. 2 se presentan las curvas de intensidad dispersada por las NPM en función del vector de onda, obtenidas para los diferentes coloides.



**Figura 4. 2.** Patrones de dispersión SAXS. Sección eficaz de dispersión  $\partial\Sigma/\partial\Omega$  en función del vector de onda  $q$  (a). Para las muestras  $C_{pe}$  y  $C_{od}$  y (b) para las muestras  $C_{pe}$ ,  $C_{tA}$ ,  $C_{tB}$ . Las líneas continuas representan los mejores ajustes obtenidos con las ecuaciones 113 y 118. Las figuras internas corresponden a las distribuciones LogNormal obtenidas de los ajustes para cada coloide.

Los patrones de dispersión están en figuras diferentes puesto que no todos tienen las mismas características y por eso se presentan agrupados según similitud.

Las curvas de dispersión correspondientes a los coloides  $C_{be}$  y  $C_{od}$  corresponden a patrones que son típicos de sistemas de partículas aisladas, presentan un comportamiento cercano a la ley de Guinier en la región de bajos valores de  $q$ , indicando baja polidispersión y agregación de NPM baja o nula. En la parte central de las curvas se observan los máximos secundarios suavizados por el tamaño finito de la distribución de tamaños y para el rango de valores mayores de  $q$  se observa el efecto del fondo o *background* que esconde el comportamiento determinado por la Ley de Porod.

Por otro lado, los patrones de dispersión de las muestras  $C_{pe}$ ,  $C_{tA}$  y  $C_{tB}$  difieren de los patrones obtenidos para las otras muestras. A bajos valores de  $q$  se observa que  $d\Sigma(q)/d\Omega$  se comporta como una ley de potencia, en lugar de la ley de Guinier, lo cual indica que las NPM se encuentran formando agregados en el coloide. De esto se deduce que la intensidad dispersada se comporta como una ley de potencia con un exponente semi-entero correspondiente a la intensidad dispersada por un fractal de masa. Para visualizar lo anterior, se agregaron dos rectas en la Figura 4.2(b) que representan  $d\Sigma(q)/d\Omega$  como función de  $q^{-1}$  y  $q^{-2}$ . Por tal motivo, las curvas de SAXS obtenidas de NPM de AO@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> fueron ajustadas con el modelo de fractal de masa, donde la sección eficaz diferencial de dispersión en función del vector de onda es:

$$113. \quad \frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = N_p P(q) S(q\xi, R_o) + bkg$$

Donde  $P(q)$  es el factor de forma de partículas simétricas esféricas polidispersas con diámetro medio en  $D_o$ :

$$114. \quad P(q) = \int_0^\infty g(R) F^2(q, R) dR$$

Donde  $g(R)$  es la distribución número de tamaños de partícula y  $F(q, R)$  es el factor de forma para partículas esféricas monodispersas de diámetro  $D$ .

Para tener en cuenta la agregación de las NPM, el análisis de las curvas de dispersión fue realizado utilizando el factor de estructura  $S(q\xi, R_o)$  derivado del modelo fractal de agregación.

$$115. \quad S(q\xi, R_o) = 1 + \frac{d_f \Gamma(d_f - 1) \operatorname{sen}[(d_f - 1) \tan^{-1}(q\xi)]}{(qR_o)^{d_f} \frac{d_f - 1}{(1 + 1/(q\xi)^2)^{\frac{d_f - 1}{2}}}}$$

Donde  $d_f$  es la dimensión fractal del agregado.

Las densidades de longitudes de dispersión ( $\eta$ ) calculadas para  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , ácido oleico y hexano son  $3.942 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$ ,  $0.807 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$  y  $0.646 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$  respectivamente. Sin embargo, el contraste electrónico ( $\Delta\eta$ ) entre el ácido oleico y el hexano es muy pequeño en comparación con el contraste entre la fase magnética y el hexano. Esta situación hace que la capa surfactante sea casi indetectable por SAXS, motivo por el cual, se utiliza el factor de forma esférico, tal como se describe en la ecuación 116, en lugar de un factor de forma tipo “*core/shell*” que tenga en cuenta tanto el tamaño de la partícula como el espesor del recubrimiento. El factor de forma esférico resulta:

$$116. \quad F(q, R) = 3\Delta\eta V_p \frac{\text{sen}(qR) - qR\text{cos}(qR)}{(qR)^3}$$

El estudio de las imágenes de TEM de las NPM indica que una función LogNormal representa muy bien la distribución de tamaños de partícula ( $f(R)$ ) como se ve en las Figuras 4.1 c y f.

$$117. \quad f(R) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma R} e^{-\ln^2(R/R_0)/2\sigma^2}$$

Donde  $R_0$  representa la mediana de la distribución LogNormal y  $\sigma$  es su dispersión. El valor medio se calcula a partir del primer momento o valor esperado:

$$\langle D_{saxs} \rangle = 2D_0 e^{\sigma^2/2}$$

Con una desviación estándar igual a:

$$s. d_{saxs} = \langle D_{saxs} \rangle \sqrt{e^{\sigma^2} - 1}$$

Las curvas SAXS obtenidas de los coloides en la Figura 4. 2(a) fueron ajustadas teniendo en cuenta el modelo propuesto en la ecuación 113 (líneas continuas), con  $S(q\xi, R_0) = 1$ , esto es, se considera que las NPM están aisladas y no forman agregados.

Para los coloides presentado en la Figura 4. 2(b), no fue posible realizar un buen ajuste, para todos los valores de  $q$ , utilizando la ecuación 113 aun considerando valores para  $S(q\xi, R_0)$  diferentes de 1. Considerando que el modelo no contemplaba una posible *agregación parcial* se lo modificó incluyendo un parámetro  $\alpha$  que considere la fracción de NPM agregadas coexistiendo con  $(1 - \alpha)$  partículas no agregadas, tal como se presenta en la ecuación 118.

$$118. \quad \frac{d\Sigma}{d\Omega}(q) = N_p [1 - \alpha + \alpha S(q\xi, D_0)] P(q) + bkg$$

Se puede observar en la Figura 4. 2(b) que el modelo propuesto en la ecuación 118, representado por líneas continuas, es adecuado para ajustar los datos en todo el rango de  $q$ .

En el rango de  $q\xi \ll 1$ , los datos deberían presentar una tendencia a la saturación debido al tamaño finito del agregado. Este comportamiento no se observa por que el corte relacionado con  $\xi$  se encuentra fuera del rango de medida utilizado y determinado por la longitud de la cámara SAXS.

Un análisis de la función  $S(q\xi R_0)$  demuestra que la misma es más sensible a los cambios en  $R_0$  y  $d_f$  que a los cambios en  $\xi$ . Por este motivo los ajustes se realizaron fijando  $\xi = 2\pi/q_m = 100$  nm, el cual es el máximo tamaño observable para  $q_m = 0.06$  nm<sup>-1</sup> que corresponde al mínimo valor del vector de onda que fue posible medir con la configuración del equipo utilizado.

Los parámetros de ajuste obtenidos utilizando los modelos presentados en las ecuaciones 113 y 118 junto con el análisis de tamaño de partícula realizado en las imágenes TEM se presentan en la Tabla 4. 1.

Coloide	$[x]$ (mg <sub>CoFe2O4</sub> /ml)	$\langle D_{saxs} \rangle$ (nm)	$s.d_{saxs}$ (nm)	$D_{TEM}$ (nm)	$s.d_{TEM}$ (nm)	$d_f$	$\Delta\eta$ (10 <sup>-3</sup> nm <sup>-2</sup> )	$\alpha$
C <sub>be</sub>	27.8	8.35	0.56	8.80	0.63	-	2.90	0
C <sub>od</sub>	5.0	13.27	0.60	13.26	0.56	-	3.13	0
C <sub>pe</sub>	16.6	3.77	0.39	5.00	0.37	1.33	3.55	0.34
C <sub>tA</sub>	10.8	10.89	0.80	10.80	0.73	2.99	1.22	0.38
C <sub>tB</sub>	13.7	11.29	0.95	13.12	1.40	2.89	1.47	0.20

**Tabla 4. 1.** Parámetros estructurales determinados con TEM y SAXS.  $[x]$  es la concentración del coloide,  $\langle D_{saxs} \rangle$  es el valor medio del diámetro de partícula obtenido desde SAXS y  $s.d_{saxs}$  es su desviación estándar.  $d_f$  es la dimensión fractal de los agregados,  $\Delta\eta$  es la diferencia de contraste electrónico entre las MNP y el hexano,  $\alpha$  es la fracción de NPM agregadas,  $D_{TEM}$  y  $s.d_{TEM}$  son el diámetro medio y su distribución estándar obtenida desde el ajuste gaussiano de los histogramas TEM.

Se observa que los valores obtenidos con TEM de tamaño de partícula y su dispersión concuerdan con los valores obtenidos con SAXS. Cabe resaltar que en la técnica SAXS



el número de partículas caracterizadas para determinar el tamaño de partículas es mucho mayor que el número de partículas caracterizadas en TEM, esto se debe a que la zona de muestreo en SAXS es mucho mayor que la zona de muestreo en TEM. Para un tamaño del haz de rayos X de 3x1 mm, se tiene que el número de NPM en esta zona se encuentra entre  $10^{18}$  y  $10^{19}$ , mientras que en una imagen TEM solo unos cuantos cientos de NPM pueden ser visualizadas.

Los valores de  $\Delta\eta$  son similares al valor teórico del contraste entre las NPM de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  y hexano ( $3.296 \times 10^{-3} \text{ nm}^{-2}$ ) aunque para las muestras  $C_{IA}$  y  $C_{IB}$  el valor obtenido es considerablemente más bajo. Estas muestras presentan un exponente fractal cercano a 3, lo cual indica que forman estructuras tridimensionales, por lo tanto la densidad electrónica del agregado que no es totalmente compacto es menor que la de la partícula y por tanto resulta en una disminución del contraste electrónico.

El tipo de auto-organización de las NPM dentro del coloide se puede inferir a partir de los valores obtenidos para  $d_f$ . Para la muestra  $C_{pe}$  se obtuvo un valor para  $d_f$  cercano a la unidad, lo cual indica la presencia de una estructura tipo cadenas conectadas, mientras que una estructura tridimensional más densa y compacta se puede inferir para las muestras  $C_{IA}$  y  $C_{IB}$  para las cuales se obtuvo un valor de  $d_f$  más cercano a 3.

Las medidas de SAXS permiten afirmar que los coloides formados por NPM de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  recubiertas con ácido oleico y dispersas en hexano, presentan diferentes estructuras: una suspensión completamente homogénea se obtiene para los coloides formados por NPM sintetizadas con bencil-eter y octadeceno ( $C_{be}$  y  $C_{od}$ ) y una suspensión en la se presentan agregados que coexisten con partículas libres para los coloides formados por NPM sintetizadas con fenil-eter y trioctil-amina ( $C_{pe}$ ,  $C_{IA}$  y  $C_{IB}$ ).

La auto organización y agregación de las NPM es el resultado de la competencia entre las interacciones anisótropas, como al dipolar magnética que favorece la formación de estructuras lineales, las interacciones isotrópicas, como la interacción de van der Waals que favorece la formación de estructuras más compactas y tridimensionales, y la interacción estérica que impide la interpenetración de las NPM. Estas interacciones se estudiarán con más detalle en el capítulo 7.

## 4.2 NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> DISPERSAS AGUA

Los coloides estudiados en esta sección, fueron sintetizados y rotulados según el protocolo presentado en la sección 3.1.2 (Tabla 3.2).

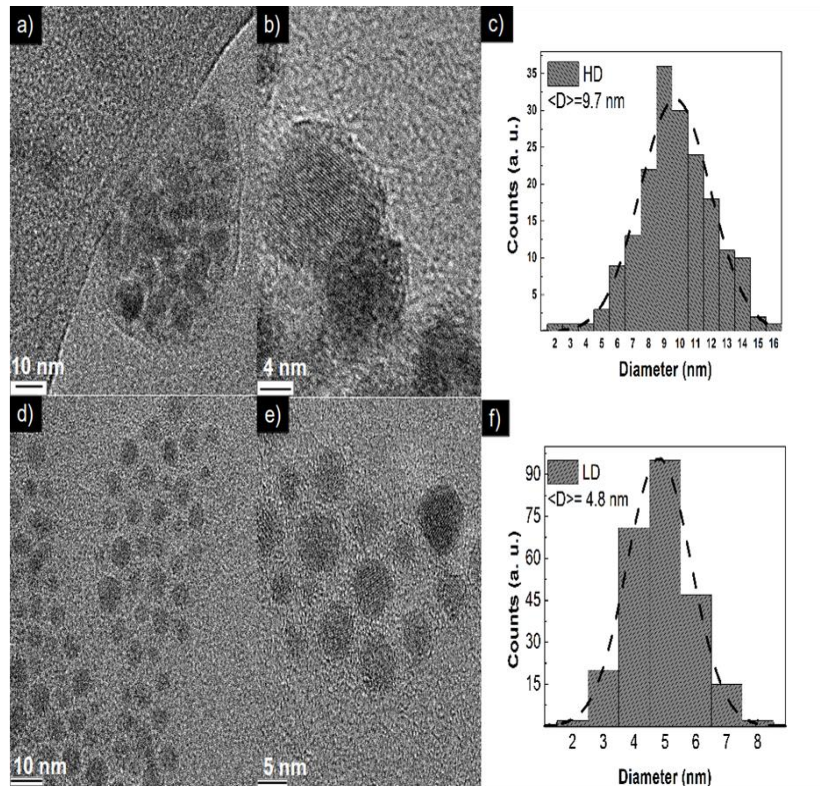
En la sección anterior, se estudiaron NPM recubiertas con AO, las cuales presentan baja polidispersión debido el método utilizado para su síntesis. Para aplicaciones biomédicas, el recubrimiento de estas NPM deben ser modificados para permitir su resuspensión en un medio acuoso. Es decir el recubrimiento es intercambiado con una capa surfactante que sea poco tóxica e hidrófila.

Por este motivo, en esta sección se estudia la estructura de suspensiones coloides acuosas con NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas con quitosano (CS) y como esta modificación afecta las propiedades estructurales de estos coloides<sup>65</sup>.

Para determinar el tamaño de las NPM y de las estructuras que se forman en el coloide se utilizaron las técnicas de AFM, TEM, DLS y SAXS.

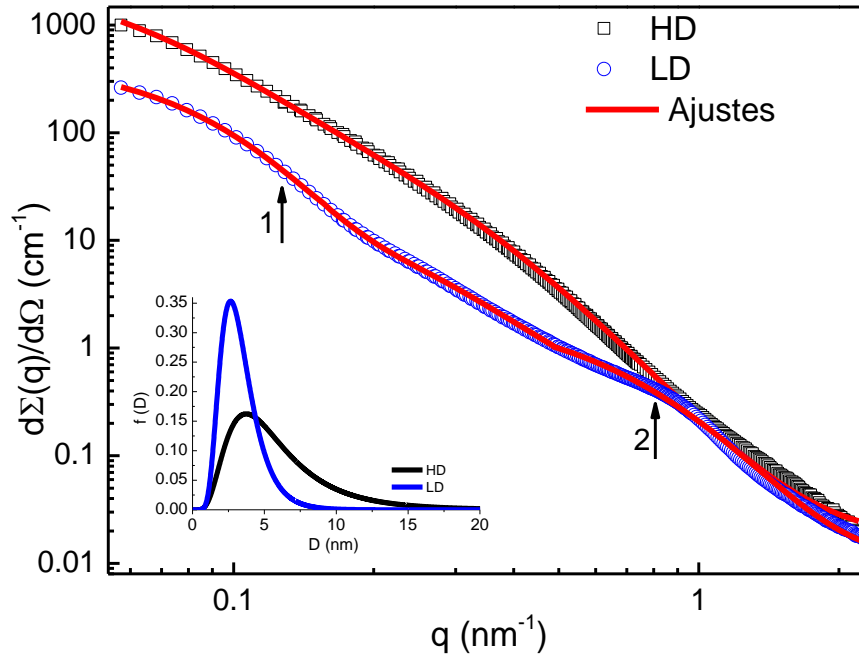
Los análisis de las imágenes TEM se realizaron midiendo el diámetro de aproximadamente 200 partículas. Los histogramas obtenidos se ajustaron con una distribución gaussiana de tamaños de partícula de valor medio  $D_{TEM}$  y desviación estándar  $s.d_{TEM}$ , tal como se presenta en la Figura 4. 3. Además de esto, las imágenes muestran que el coloide está compuesto por partículas de CS al interior de las cuales se encuentran las NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Para la muestra HD, las NPM se encuentran formado agregados, mientras en la muestra LD las NPM se encuentran separadas unas de otras una distancia media entre superficies de 3 nm.

El radio hidrodinámico ( $R_H$ ) de las partículas, obtenido a partir de medidas de Dispersión de Luz (DLS), de la muestra LD es 2.4 veces mayor que para la muestra HD, (ver Tabla 4.2). Considerando que  $R_H$  es una medida que incluye el tamaño de la partícula así como el arrastre que se produce entre las moléculas de la superficie de la partícula y las moléculas del agua, y puesto que la capa superficial es igual para los dos tipos de NPM, se puede decir que la capa de quitosano que rodea a las NPM es mayor para la muestra LD.



**Figura 4. 3.** Imágenes TEM e histogramas con el correspondiente ajuste gaussiano obtenidos para las muestras (a, b, c) HD y (d, e,f) LD.

Los resultados anteriores son sustentados por los resultados de SAXS presentados en la Figura 4.4. Para la muestra la muestra HD se observa una disminución suave de la sección eficaz de dispersión con respecto a  $q$ , mientras que para la muestra LD se observan dos comportamientos distintos, indicados con dos flechas en la Figura 4. 4, correspondientes a la intensidad dispersada por los objetos en diferentes escalas. Para las dos muestras no se observan los máximos de intensidad, debidos a las dispersiones de orden superior, lo cual indica que existe polidispersión de tamaño en las NPM.



**Figura 4. 4.** Sección eficaz diferencial de dispersión de las muestras HD y LD en función del vector de onda. Las líneas continuas corresponden al ajuste obtenido con el modelo de fractal de masa. En el interior se presenta la distribución. La flechas indican la posición de los diferentes niveles de dispersión en la muestra LD.

El análisis de los datos SAXS fue realizado teniendo en cuenta el modelo propuesto en la ecuación 118 considerando un sistema agregado para la muestra HD el cual permite determinar el tamaño. Para la muestra LD se utiliza un modelo correspondiente a un sistema de NPM aisladas ( $S(q) = 1$  y  $\alpha = 0$  donde  $\alpha$  es la fracción de partículas agregadas) pero el mismo no reproduce la totalidad de la curva, puesto que  $d\Sigma(q)/d\Omega$  en la zona marcada como 1 es producida por partículas de mayor tamaño y de diferente contraste electrónico que los partículas de la zona 2. Esto significa que en la zona 1 se está observando la intensidad dispersada por las partículas de CS, mientras que en la zona 2 se observa la intensidad dispersada por las NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

De esta forma, la totalidad de la curva  $d\Sigma(q)/d\Omega$  para la muestra LD se ajusta considerando dos modelos aplicados en diferentes las zonas del patrón:

Para la región 1 ( $q < 0.46 \text{ nm}^{-1}$ ) se utilizó el modelo de Beaucage monodisperso<sup>42</sup> para un solo nivel estructural, descrito por la ecuación 72. con  $B_s$  y  $G_s$  iguales a cero, del cual se obtiene el tamaño de la partícula de CS ( $d_{cs}$ ) proporcional al radio de giro ( $R_g$ ) correspondiente a los objetos dispersantes de mayor tamaño en el modelo de Beaucage:

$$119. \quad \frac{d\Sigma(q)}{d\Omega} = G \exp \left[ \frac{-q^2 R_g^2}{3} \right] + B \exp \left[ \frac{-q^2 R_s^2}{3} \right] \left( \frac{[\operatorname{erf}(\frac{qR_g}{\sqrt{6}})]^3}{q} \right)^{d_f}$$

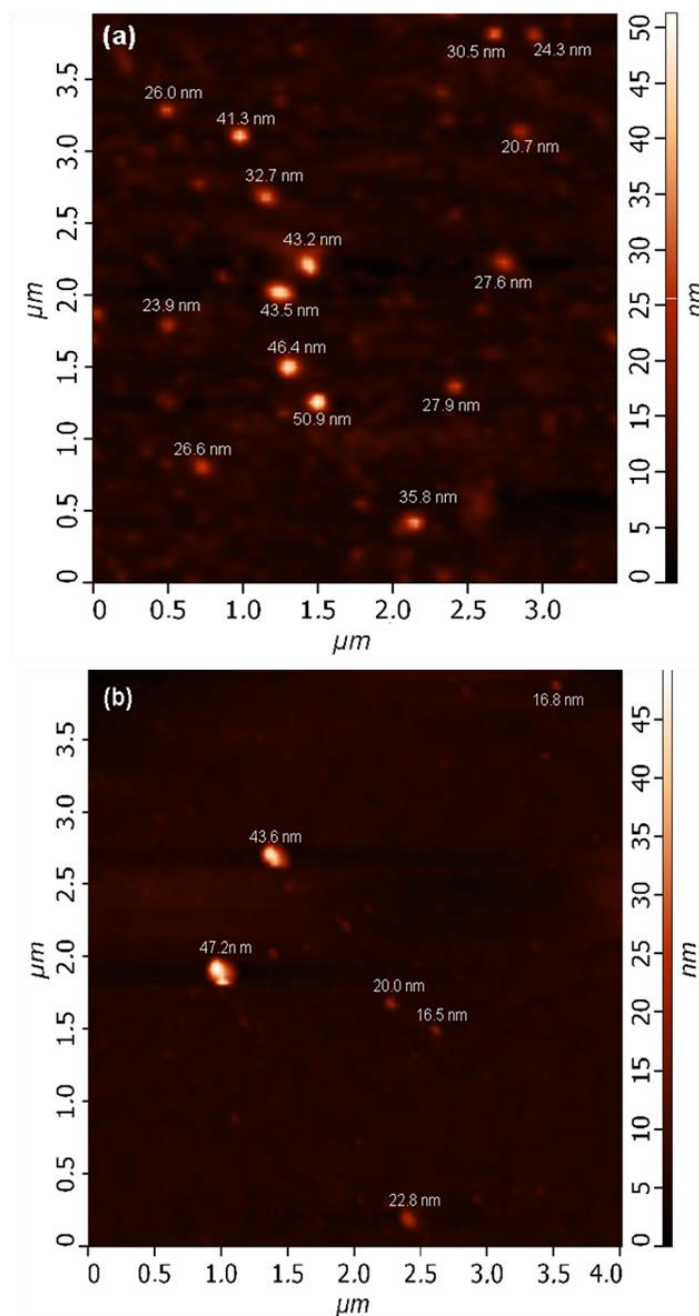
Para la región 2 ( $q \geq 0.46 \text{ nm}^{-1}$ ) se consideró el modelo de partículas esféricas aisladas, presentado en la ecuación 113 y probado para NPM en la sección anterior.

Los ajustes y sus respectivos parámetros se presentan como una línea continua en la Figura 4. 4 y en la Tabla 4. 2 respectivamente.

Coloide	$D_{TEM}$ (nm)	$s.d_{TEM}$ (nm)	$D_H$ (nm)	$\sigma_{D_H}$ (nm)	$\langle D_{SAXS} \rangle$ (nm)	s.d <sub>saxs</sub> (nm)	$d_f$	$\xi$ (nm)	$d_{CS}$ (nm)
HD	9.70	4.50	56.91	7.71	6.00	3.12	2.69	28.22	48.6
LD	4.80	2.10	134.62	18.79	3.41	1.32	-----	-----	52.5

**Tabla 4. 2.** Propiedades estructurales:  $D_{TEM}$  es el diámetro medio de las NPM determinado por los histogramas de TEM y  $s.d_{TEM}$  es su desviación estándar (d.e);  $D_H$  y  $\sigma_{D_H}$  son el diámetro hidrodinámico y su d.e obtenidas desde DLS.  $\langle D_{SAXS} \rangle$  y s.d<sub>saxs</sub> son el diámetro medio y su d.e,  $d_f$  es la dimensión fractal,  $\xi$  el tamaño del agregado obtenidos y  $d_{CS}$  es el tamaño de la partícula de quitosano.

Debido a la gran diferencia entre el tamaño hidrodinámico y el tamaño de nanopartícula de CS derivado de SAXS se utilizó la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM) para obtener otra determinación el tamaño de la partícula de CS. Las imágenes obtenidas con este microscopio se presentan en la Figura 4. 5 en la cual se pueden observar los diferentes tamaños de partícula de las muestras HD y LD. El tamaño de partícula se mide en el eje  $z$  presentado por la barra de intensidad de color a la derecha de la figura. El diámetro promedio encontrado para cada muestra coincide con los tamaños encontrados en SAXS para la partícula de CS.

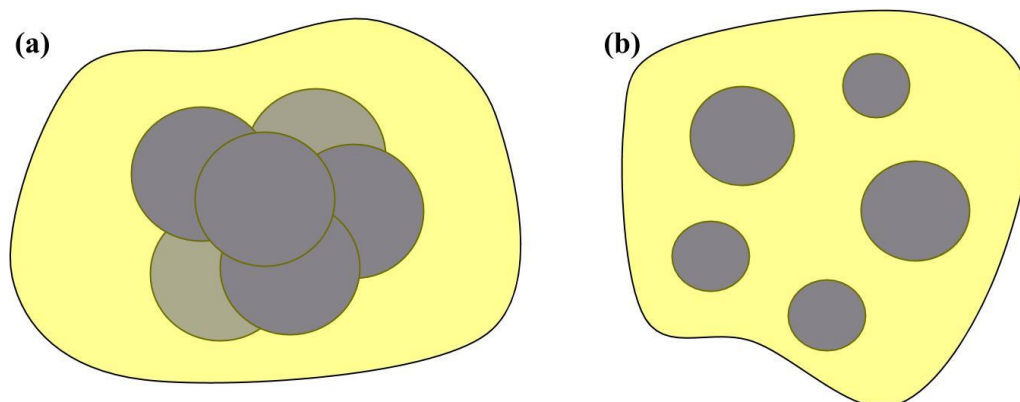


**Figura 4. 5.** Imágenes tomadas con AFM de las muestras **(a)**. HD y **(b)**. LD.

A partir de las medidas de SAXS y AFM se puede deducir, considerando el cociente entre el volumen medio del agregado y el volumen medio de la partícula de CS, que los agregados formados en la muestra HD, ocupan en promedio el 19.5% del volumen total de la partícula. Para la muestra LD si se considera el volumen ocupado por las NPM incluyendo la separación entre ellas se obtiene un porcentaje promedio de ocupación de 12.6%. Debido a la alta polidispersión de tamaño de las NPM estos porcentajes pueden variar de una partícula de CS a otra.

Los resultados anteriores permiten concluir que las suspensiones coloidales formadas por NPM de CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> presentan diferente estructuración. Para el coloide HD, NPM de 9.7 nm forman estructuras agregadas de 28.2 nm, las cuales están recubiertas por una capa de quitosano. Para el coloide LD, NPM de 4.8 nm se encuentran separadas unas de otras una distancia promedio de 3 nm dentro de la partícula de CS. Estos agregados son permanentes para la muestra HD, así como la separación entre NPM permanece constante para la muestra LD. Una representación esquemática de las dos muestras se presenta en la Figura 4. 6.

Para la muestra LD fue necesario considerar que el patrón de dispersión es generado por dos tipos de objetos a diferentes escalas: la partícula de CS y las NPM. Un cambio en la escala del vector  $q$  corresponde a un cambio de escala en el tamaño de la partícula, es por esto que se asoció el patrón de dispersión a bajos valores de  $q$  a las partículas de CS y para mayores valores de  $q$  se asoció con el tamaño de las NPM polidispersas.

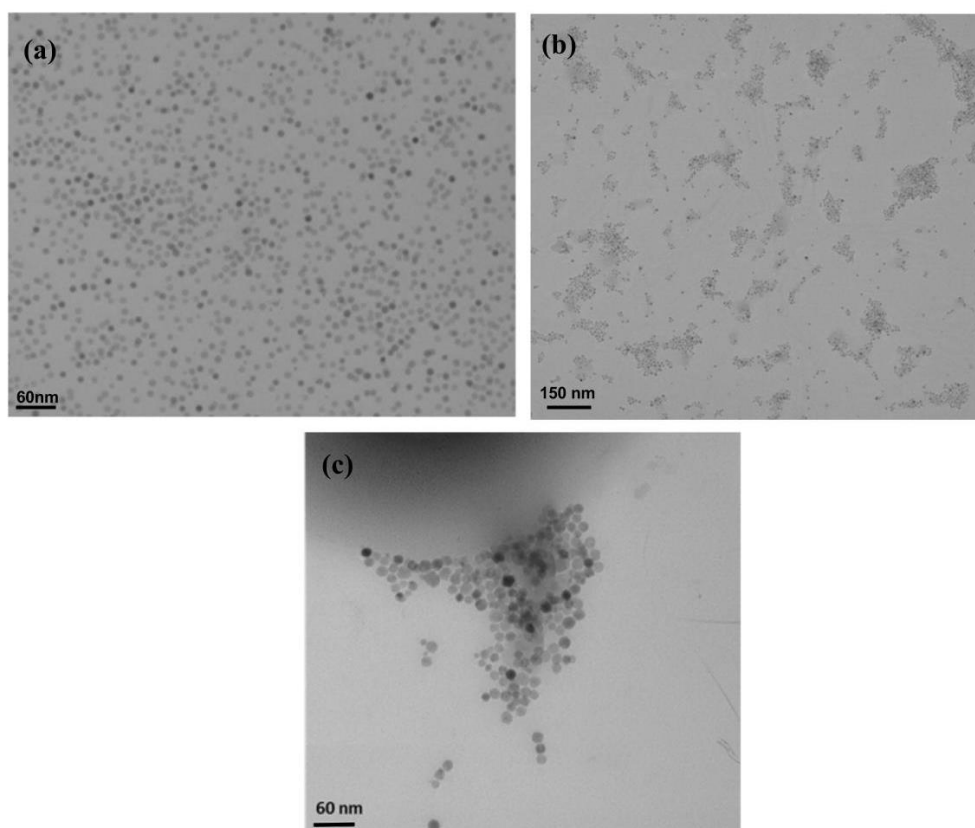


**Figura 4. 6.** Representación esquemática de las estructuras formadas por las NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dentro de las partículas de CS en las muestras (a) HD y (b) LD.

### 4.3 NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Y DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Los coloides estudiados en esta sección, fueron sintetizados y rotulados según el protocolo presentado en la sección 3.1.3 (Tabla 3.3). Las NPM que componen estos coloides fueron sintetizados de forma que su tamaño sea homogéneo, para lo cual se utilizó la técnica de descomposición térmica de alta temperatura y un recubrimiento de ácido oleico (AO). Después, se realizó un cambio químico de ligando para recubrir las NPM con ácido dimercaptosuccínico (DMSA), esto hace que las partículas se puedan resuspender en medios acuosos.

Con la finalidad de determinar el efecto del cambio de ligando en la estructura del coloide, se estudian las NPM antes y después de la modificación química de su superficie. Las muestras O10, O11, O16 y O16B corresponden a coloides formados por NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dispersas en hexano y las muestras ODMSA10, ODMSA11, ODMSA16 y ODMSA16B corresponden a coloides formados por NPM de DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> dispersas en agua.



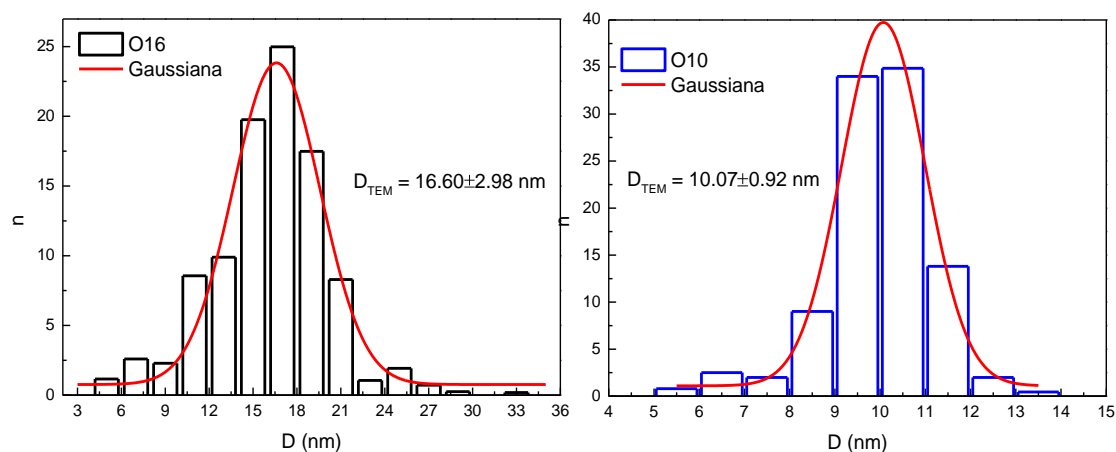
**Figura 4. 7.** Imágenes TEM obtenidas de las NPM (a) O10, (b) ODMSA10 y (c) O16.



Las imágenes TEM (Figura 4. 7) obtenidas para estas NPM fueron analizadas contando alrededor de 200 partículas, los histogramas obtenidos se ajustaron con una distribución gaussiana de diámetros. Los parámetros de ajuste se presentan en la Figura 4.8 y en la Tabla 4. 3.

Los valores de tamaño hidrodinámico ( $D_H$ ) fueron tomados de la referencia 47. Se observa que  $D_H$  es mayor para las muestras suspendidas en agua.

Las imágenes TEM de las NPM muestras que los coloides están formados por partículas de forma esférica, a partir del conteo y análisis del histograma se obtiene que las NPM del coloide O16 tienen mayor tamaño y mayor polidispersión de tamaño que la muestra O10.



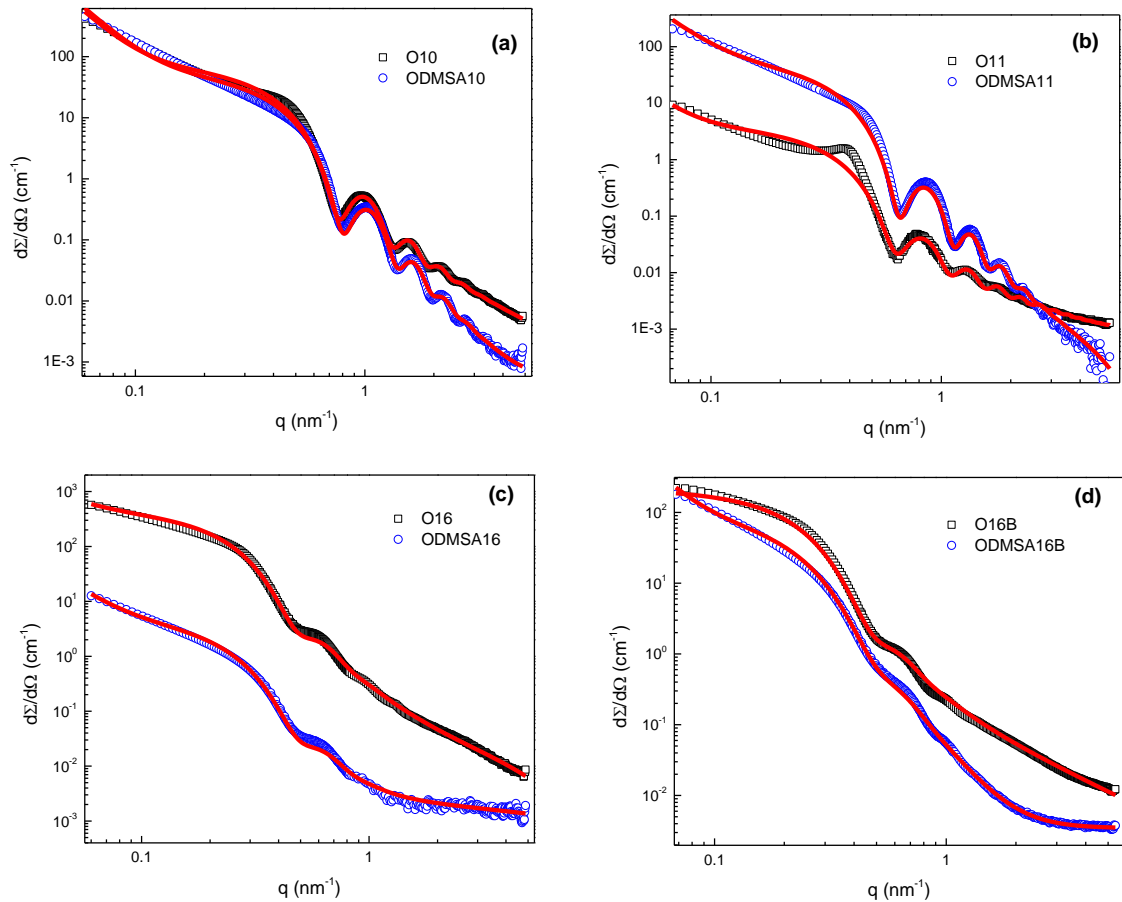
**Figura 4. 8.** Histogramas obtenidos a partir del análisis de las imágenes TEM de las muestras O10 y O16. Las líneas continuas representan los ajustes de una función de distribución gaussiana.

Los patrones SAXS de estos coloides se muestran en la Figura 4.9. Los patrones SAXS para las muestras O10, O11 y ODMSA11 contienen máximos secundarios, correspondientes a los órdenes superiores de dispersión, consistentes con patrones producidos por muestras de baja polidispersión de tamaño. En los patrones de las muestras O16, O16B, ODMSA16 y ODMSA16B se observan curvas más suaves y con un menor número de máximos debido a que las NPM de estos coloides presentan mayor polidispersión de tamaño, en acuerdo con lo observado por TEM.

Como se observó para otras NPM en suspensión coloidal, la forma del patrón SAXS sugiere que el modelo de dispersión de esferas duras con polidispersión de tamaño considerando un factor de estructura ( $S(q\xi, R_o)$ ) correspondiente a una estructura tipo

fractal de masa (ecuación 118) es suficiente para reproducir mediante un ajuste los patrones medidos.

Considerando un factor de forma esférico y una función LogNormal de distribución de número de tamaños de partícula, se obtienen las curvas de ajuste representadas por las curvas continuas en la Figura 4.9 y los principales parámetros de ajuste se muestran en Tabla 4.3



**Figura 4.9.** Resultados de SAXS para las muestras (a)O10 y ODMSA10, (b)O11 y ODMSA11,(c) O16 y ODMSA16 y (d)O16B y ODMSA16B. Las líneas rojas continuas representan los ajustes obtenidos utilizando la ecuación 118.

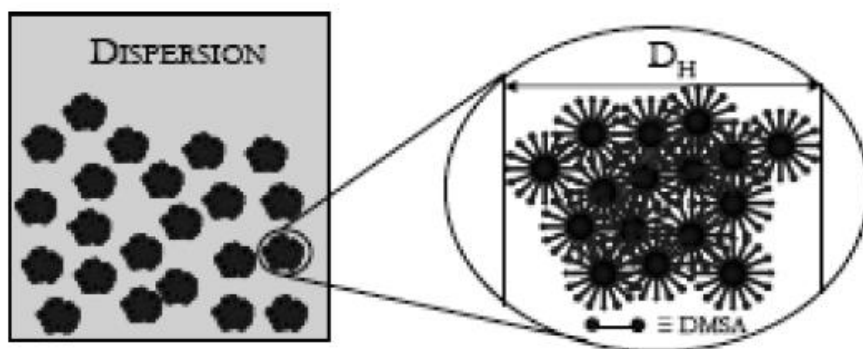
El tamaño de partícula obtenido de SAXS coincide, dentro de la desviación estándar, con el valor determinado a partir de las imágenes TEM. Los valores del porcentaje de agregación ( $\alpha$ ) obtenidos del ajuste indican que hay coexistencia de NPM aisladas y NPM agregadas en todos los coloides a excepción de las muestra O16B, para la cual se pudo representar la totalidad de la curva sin considerar partículas agregadas ( $\alpha = 0$  y  $S(q\xi, R_o) = 1$ ). El exponente fractal para las muestras que presentan agregados toma valores entre 2.5 y 3, lo cual indica la presencia de estructuras tridimensionales.

El porcentaje de agregación para los coloides cuya fase líquida es hexano es menor que el porcentaje observado para las NPM en fase acuosa. De esta forma se evidencia que el proceso químico de cambio de ligando desde ácido oleico hacia DMSA genera cambios en el tamaño de los agregados de forma que más partículas se agregan resultando en estructuras más grandes en el coloide de fase acuosa.

Coloide	$D_{TEM}$ (nm)	s.d <sub>TEM</sub> (nm)	$\langle D_{SAXS} \rangle$ (nm)	$\sigma_{SAXS}$	s.d <sub>SAXS</sub> (nm)	$d_f$	$\xi$ (nm)	$\alpha$	$D_H$ (nm)
O10	10.07	0.92	11.46	0.06	0.72	2.96	54.7	0.20	55
O11	-	-	14.02	0.01	0.07	2.99	78.45	0.15	-
O16	16.60	2.18	17.24	0.18	2.94	2.45	60.2	0.06	60
O16B	-	-	16.90	0.17	3.03	-	-	-	60
ODMSA10	-	-	10.98	0.08	0.92	2.90	57.7	0.28	70
ODMSA11	-	-	13.44	0.07	0.93	2.85	> 200	0.60	52
ODMSA16	-	-	16.88	0.17	2.99	2.77	> 200	0.32	66
ODMSA16B	-	-	16.02	0.21	3.57	2.93	43.2	0.13	66

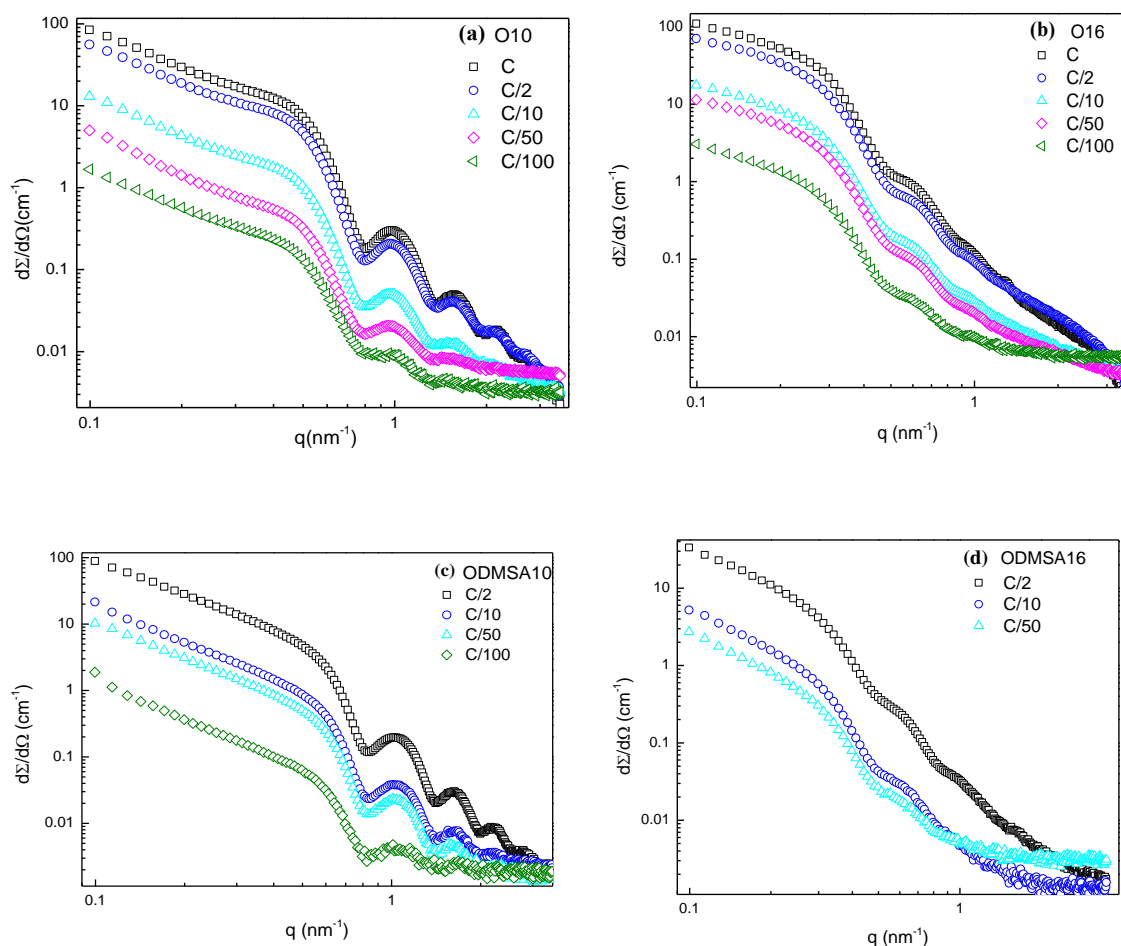
**Tabla 4. 3.** Parámetros estructurales de las suspensiones coloidales determinados por TEM y SAXS.

Lo anterior se debe a que el cambio de ligando favorece el aumento de las interacciones dipolares, puesto que la molécula de DMSA es más corta que la molécula de ácido oleico lo que produce que las NPM puedan estar más cerca unas de otras<sup>66</sup>. Un esquema de estos agregados se presenta en la Figura 4. 10.



**Figura 4. 10.** Esquema representativo de la agregación de NPM recubiertas con DMSA<sup>66</sup>.

Para determinar la estabilidad de los agregados formados por las NPM de los coloides O10, O16, ODMSA10 y ODMSA16, estos fueron diluidos a partir de su concentración original  $C = [x]$  hasta llegar a concentraciones de  $C/2$ ,  $C/10$ ,  $C/50$  y  $C/100$ . Los patrones SAXS para cada valor de concentración fueron obtenidos en la cámara Nanostar del IFUSP y los resultados se presentan en la Figura 4. 11.



**Figura 4. 11.** Sección eficaz de dispersión obtenida de los coloides (a) O10 y (b) O16 derivada de las medidas de SAXS para diferentes diluciones del coloide de concentración  $C$ .

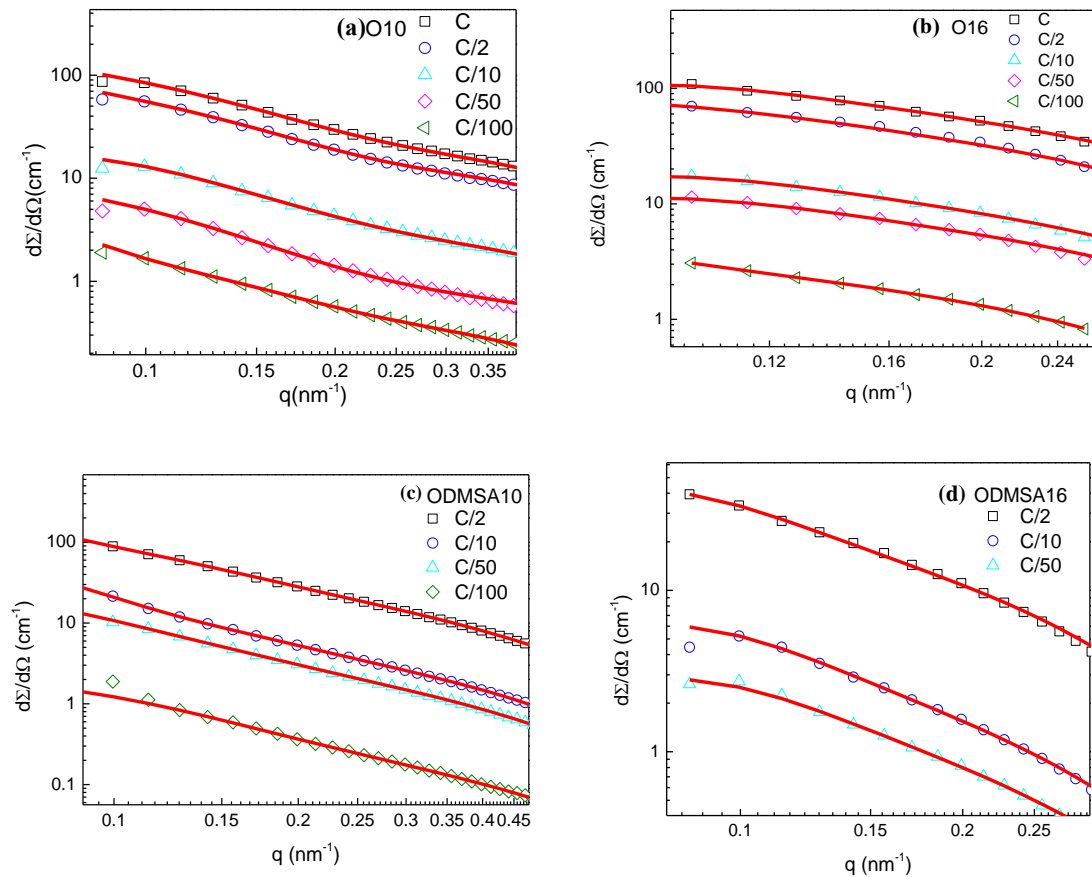
Para determinar analíticamente si existe una influencia de la concentración en las propiedades estructurales del coloide, se utiliza la ecuación unificada de Beaucage<sup>42</sup>, (Ecuación 84) la cual determina la intensidad dispersada por un agregado de dimensión fractal  $d_f$  y radio de giro  $R_g$  formado por partículas más pequeñas cuyos radios de giro son  $R_s$ .

Debido al tamaño del agregado, el efecto de la intensidad dispersada por el mismo es visible como un apartamiento de la Ley de Guinier a bajos valores de  $q$ . La zona

comprendida en rangos de  $q$  tal que  $qR_s < 1$  se conoce como la zona de Guinier de la partícula.

En esta zona existe una superposición de la intensidad dispersada por la NPM individual según la Ley de Guinier y la intensidad dispersada por el agregado según la Ley de Porod. Por lo tanto, las curvas se ajustan con el modelo de Beaucage con  $B_s$  y  $G_s$  iguales a cero, debido a que la intensidad dispersada por las NPM según la ley de Porod se encuentra a mayores valores de  $q$ .

Los ajustes obtenidos utilizando el modelo de Beaucage (ecuación 119) para un solo nivel estructural, se presentan en la Figura 4. 12 y la relación entre la concentración y el radio de giro del agregado ( $R_g$ ), el radio de giro de la partícula individual ( $R_s$ ) y la dimensión fractal ( $d_f$ ) resultado de los ajustes se muestran en la Tabla 4. 4.



**Figura 4. 12.** Zona de Guinier ( $qR_s < 1$ ) para los coloides (a) O10, (b) O16, (c) ODMSA10 y (d) ODMSA16. Las curvas continuas rojas representan los ajustes obtenidos utilizando la ecuación generalizada de Beaucage para un solo nivel estructural en esta porción del patrón.

<i>Coloide</i>	<i>[x]</i>	<i>G</i>	<i>B</i>	<i>R<sub>g</sub> (nm)</i>	<i>R<sub>s</sub> (nm)</i>	<i>d<sub>f</sub></i>
O10	C	133.78	5.55	36.01±0.31	3.50±0.05	1.28±1.4
	C/2	177.08	4.44	33.57±0.01	3.43±0.01	1.18±0.04
	C/10	16.65	1.11	40.40±0.01	3.50±0.01	1.43±0.04
	C/50	11.10	0.55	22.35±0.01	3.64±0.01	1.00±0.85
	C/100	14.45	0.11	28.60±0.40	3.50±1.43	1.51±0.7
O16	C	152.67	15.62	17.29±0.1	5.57±0.04	1.96±0.60
	C/2	103.47	1.87	11.60±0.02	5.75±0.01	2.58±0.36
	C/10	26.19	0.31	11.42±0.02	5.72±0.01	2.94±1.03
	C/50	17.38	0.21	11.72±0.02	5.65±0.01	2.83±0.59
	C/100	5.28	0.02	13.65±0.02	4.42±0.01	2.99±1.67
ODMSA10	C	816.90	3.57	24.86±0.03	1.97±0.01	1.67±0.01
	C/2	181.02	2.11	16.23±0.04	2.08±0.01	1.70±0.06
	C/10	243.34	0.39	31.35±0.02	1.97±0.01	1.66±0.02
	C/50	90.64	0.22	31.96±0.04	2.01±0.01	1.66±0.01
	C/100	130.76	0.02	39.57±0.02	1.34±0.01	1.77±0.01
ODMSA16	C/2	103.47	1.87	20.16±0.01	5.17±0.02	1.42±0.38
	C/10	10.24	0.16	19.39±0.10	5.18±0.04	1.69±1.01
	C/50	7.07	0.19	21.42±0.01	6.02±0.01	1.01±1.57

**Tabla 4. 4.** Radio de giro del agregado ( $R_g$ ) y de las NPM ( $R_s$ ) y dimensión fractal ( $d_f$ ) obtenida a partir del modelo de Beaucage para los coloides listados en función de la concentración  $[x]$ . El valor de C corresponde al valor inicial de concentración del coloide.

Como es de esperarse, el tamaño de la partícula individual, dado por el radio de giro  $R_s$  se mantiene constante, dentro de la incertidumbre para cada parámetro, para todos los coloides a medida que se disminuye la concentración. También se ve una disminución de las constantes  $G$  y  $B$ , estas constantes son directamente proporcionales a la cantidad  $N\Delta\eta^2$  a medida que se diluye el sistema, el número de partículas disminuye y por lo tanto los valores de  $G$  y  $B$  disminuyen cuando se disminuye la concentración.

Para los coloides O10 y O16 se observa que a medida que la concentración disminuye el tamaño del agregado tiende a disminuir alrededor de un 30% para las dos muestras. Esto no se observa en las NPM suspendidas en agua, las cuales presentan un tamaño de agregado que varía dentro del valor de incertidumbre del ajuste. En la muestra ODMSA10 se observa un cambio en el tamaño del agregado que no podría estar relacionado a un aumento de tamaño si no a un proceso de fraccionamiento de la muestra durante la preparación de la disolución o también a un proceso químico de acidificación de la muestra durante la medida. Estudios de estabilidad sobre este tipo de

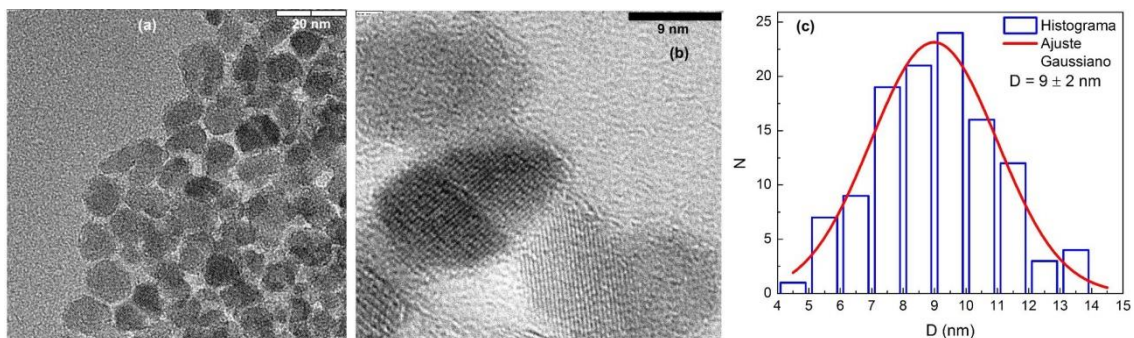
muestras han demostrado que el coloide puede disminuir su pH debido a la carbonatación de la capa de DMSA, lo cual conlleva a que más NPM se agreguen<sup>47,66</sup>.

Lo anterior significa que los agregados de los coloides con partículas más grandes son más estables puesto que a mayor tamaño, mayor energía de interacción dipolar y por lo tanto es más difícil separar partículas del agregado. El exponente fractal se mantiene alrededor de un valor constante para todos los coloides de forma que a medida que se disminuye la concentración, el agregado disminuye su tamaño pero mantiene cierta estructura definida.

Del análisis estructural de este sistema, se puede concluir que las suspensiones coloidales cambian su estructura cuando las NPM se someten a un proceso de cambio de ligando. Durante el proceso, la distancia entre partículas disminuye, debido a que la molécula de DMSA es más corta que la molécula de AO, debido a esto la interacción entre NPM se incrementa y el agregado se vuelve más estable. Esto también se evidencia en el porcentaje de NPM, el cual siempre es mayor para las muestras dispersas en agua que para las muestras dispersas en hexano. Las medidas de SAXS en función de la concentración de los coloides, las cuales fueron analizadas con el modelo de Beaucage, aportan evidencias de la estabilidad de los agregados, muestran que existe una pequeña disminución del tamaño del agregado para las NPM en hexano, y que se mantiene constante para las NPM dispersas en agua.

#### **4.4 NANOESTRUCTURACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE AC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> DISPERSAS AGUA**

Estas NPM fueron sintetizadas de forma que se pudieron estabilizar electrostáticamente en agua, por lo cual tienen una capa surfactante de ácido cítrico, que además de ser biocompatible, hace que el coloide esté estabilizado por medio de la carga repulsiva en la superficie de las partículas. Los coloides formados por NPM que precipitan al aplicar un campo magnético externo se denominan *P*, mientras que los coloides formados por NPM que no son atraídas por el campo magnético (estables en suspensión) son separadas y sometidas a un proceso de dializado para eliminar el exceso de ácido cítrico, se denominan como *SD*.



**Figura 4. 13.**TEM de alta resolución de la muestra 130312P. **(a).** Imagen panorámica para observar la forma y tamaño de las partículas. **(b).** Imagen de partículas individuales donde se observan los planos cristalinos que confirman la calidad estructural de las NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . **(c).** Histograma resultado de contar más de 100 NPM. La línea roja corresponde al ajuste gaussiano con un tamaño medio de partícula de 9 nm.

El tamaño y forma de la partícula así como su calidad cristalina se determinó utilizando un microscopio de transmisión de electrones de alta resolución (TEM-HR). En la Figura 4. 13 se presentan las imágenes obtenidas para la muestra 130312P así como el histograma de tamaños obtenido contando más de 100 NPM. Este histograma es ajustado con una función gaussiana a partir de la cual se obtuvo el tamaño medio de partícula y su desviación estándar, estos parámetros se presentan para las muestra 130312P en la Tabla 4. 5. Las imágenes tomadas muestran que las NPM son de forma esferoidal, mientras que el análisis de tamaño de partícula muestra que tienen una amplia polidispersión de tamaño.

En las curvas de SAXS, presentadas en la Figura 4. 14, la polidispersión de tamaño se ve reflejada en la ausencia de los máximos de intensidad de orden superior y en la variación monótona de  $d\Sigma(q)/d\Omega$ .

Los datos obtenidos de las muestras 130312SD y 130312P son ajustados utilizando el modelo propuesto en la ecuación 118 con  $S(q\xi, R_o)$  correspondiente a una estructura masa fractal, un factor de forma esférico y una función LogNormal de distribución de tamaños de partícula. Los parámetros obtenidos a partir del ajuste se presentan en la Tabla 4. 5.

El ajuste con el modelo de partícula esférica dura y su correspondiente factor de estructura no describe la totalidad de la curva de  $d\Sigma(q)/d\Omega$  de las muestras 161112SD, 161112P, 201112SD y 201112P. Por este motivo se utiliza el modelo de Beaucage con dos niveles estructurales considerando una aproximación polidispersa, con el cual se



determina el tamaño de la partícula, el tamaño del agregado y la dimensión fractal del mismo. Los resultados se presentan en la Figura 4. 14 y la Tabla 4. 6.

Coloide	$D_{TEM}$ (nm)	s.d <sub>TEM</sub> (nm)	$\langle D_{saxs} \rangle$ (nm)	$\sigma_{saxs}$	s.d <sub>saxs</sub> (nm)	$d_f$	$\xi$ (nm)	$\alpha$	$R_o$
130312P	9	2	7.28	0.42	3.54	2.56	22.96	0.10	2.82
130312SD	-	-	7.74	0.35	2.98	2.11	17.18	0.08	3.00

**Tabla 4. 5.** Parámetros de ajuste de las curvas SAXS obtenidos a partir del modelo de esferas duras con polidispersión de tamaño y agregadas. Los valores obtenidos de tamaño, dispersión y desviación estándar a partir de SAXS y TEM. A partir del modelo masa fractal se obtiene el tamaño del agregado ( $\xi$ ), la dimensión fractal del agregado ( $d_f$ ) y la proporción de NPM agregadas ( $\alpha$ ).  $R_o$  es el radio de giro de la partícula.

Se observa en la Figura 4.14(a) que las muestras 130312P y 130312SD presentan gran polidispersión de tamaño. El porcentaje de agregación y el tamaño del agregado es mayor para la muestra 130312P que para la muestra 130312SD, Esto indica que el proceso de separación magnética deja mayor cantidad de NPM estabilizadas electrostáticamente en el coloide *SD*, y que las NPM más grandes o que no fueron recubiertas con ácido cítrico se quedan en la muestra tipo *P*

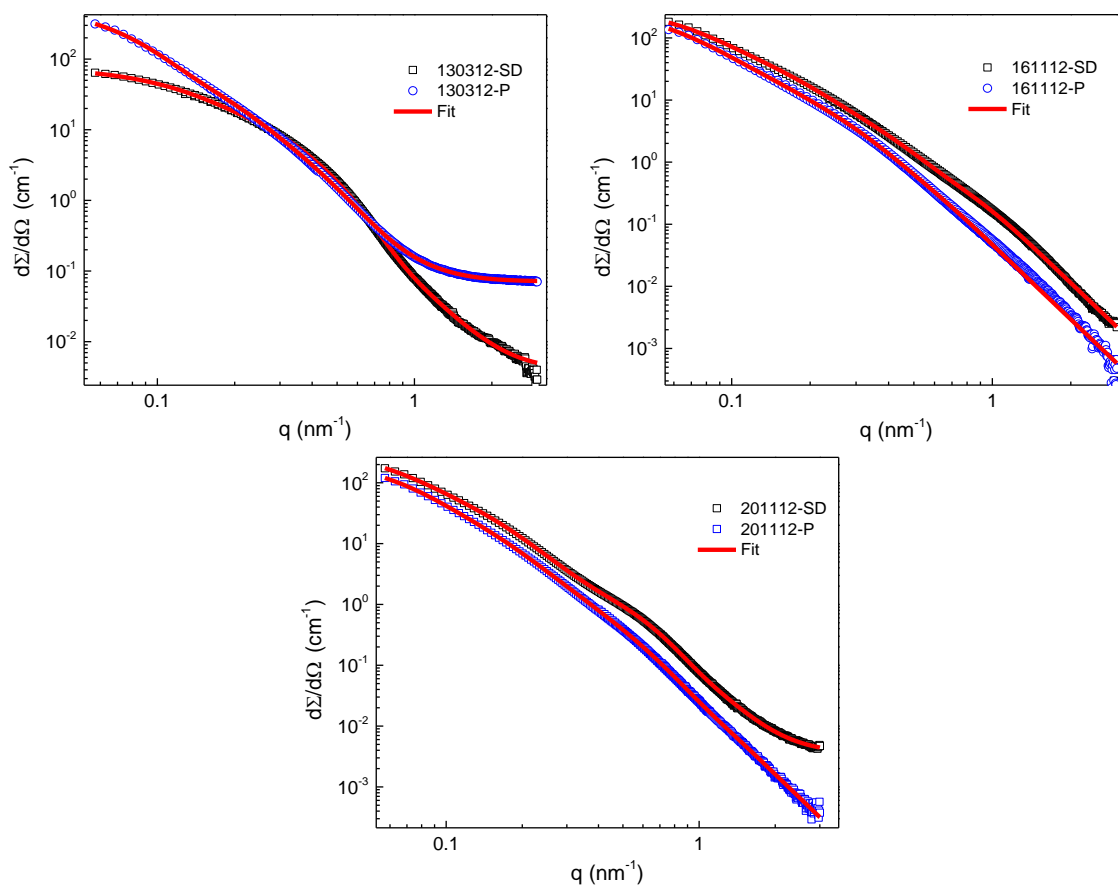
A partir del análisis de los parámetros obtenidos por medio del ajuste del modelo de Beaucage, se puede determinar que las NPM que forman estos coloides presentan un tamaño de partícula ( $D_s = 2R_s$ ) entre 6.80 y 13.58 nm para las muestras etiquetadas como *P* y entre 5.52 y 8.28 nm para las muestras *SD*. Para las muestras 130312 y 161112, el tamaño de partículas los coloides tipo *P* son mayores que los correspondientes coloides tipo *SD*, mientras que un tamaño de partícula similar se encontró para los coloides 201112P y 201112SD.

El radio de giro ( $R_s$ ) por el modelo de Beaucage para las muestras 130312P y 130312SD es similar al determinado usando el modelo de esferas duras polidispersas ( $R_o =$

$$\sqrt{\frac{3}{5} \frac{D_{saxs}}{2}} \text{ determinado a partir de los parámetros Tabla 4. 6.}$$

Tanto el tamaño de las NPM como de los agregados, están relacionados con las condiciones de síntesis de los coloides. Además la formación de agregados depende también de la concentración de NPM en la suspensión coloidal. La relación entre el pH

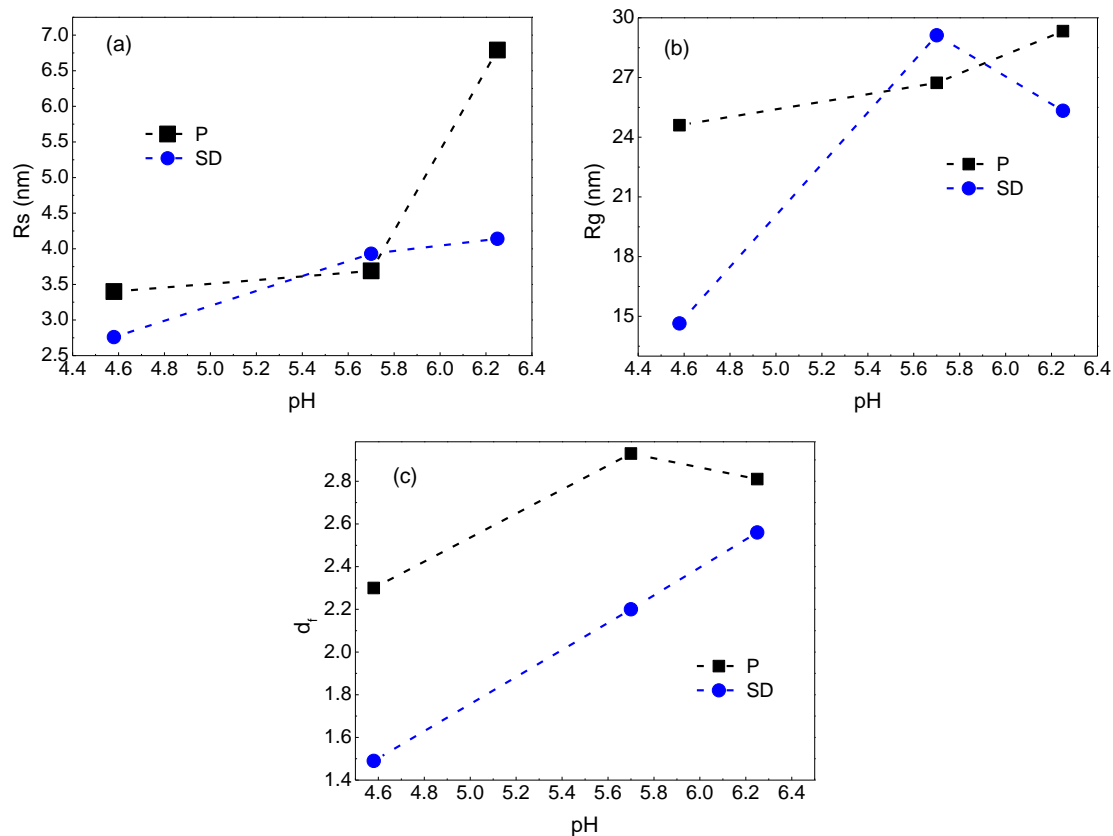
de adsorción al cual fueron sintetizadas las NPM con el tamaño de partícula, el tamaño del agregado y la dimensión fractal se presentan en la Figura 4. 15.



**Figura 4. 14.** Patrones SAXS obtenidos de las muestras AC@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Las líneas continuas representan los ajustes realizados con la ecuación unificada de Beaucage.

Coloide	$G(cm^{-1})$	$B(cm^{-1})$	$R_g (nm)$	$G_s(cm^{-1})$	$B_s (cm^{-1})$	$R_s (nm)$	$d_f$	$z$
130312P	578.88	0.67	24.36	1.49	0.10	3.40	2.30	9.63
130312SD	76.35	2.27	14.64	0.60	0.09	2.76	1.49	3.47
161112P	315.54	0.09	29.33	9.75	0.05	6.79	2.81	7.81
161112SD	333.46	0.28	25.33	3.57	0.18	4.14	2.56	10.16
201112P	251.01	0.07	26.73	0.69	0.03	3.69	2.93	18.19
201112SD	384.73	0.57	29.12	3.12	0.07	3.93	2.20	9.05

**Tabla 4. 6.** Parámetros de ajuste obtenidos a partir de la ecuación unificada de Beaucage. A partir del análisis de los momentos de la función LogNormal, se determinó la proporción de partículas agregadas ( $z$ ).



**Figura 4. 15.**Relación entre el(a) radio de giro de la NPM ( $R_s$ ), (b) el radio de giro del agregado ( $R_g$ ) y (c) la dimensión fractal ( $d_f$ ) del agregado con el pH de adsorción para las muestras  $P$  y  $SD$ .

En las Figura 4. 15(a) y (b) se puede observar que tanto el tamaño de partícula así como el tamaño del agregado dependen del pH de adsorción al cual se realizó la síntesis de las NPM: a mayor pH de adsorción mayor tamaño de partícula y de agregado. En su mayoría los tamaños medios de las muestras  $P$  son mayores a los tamaños medios de las muestras  $SD$ , lo cual indica que durante la separación magnética las partículas más grandes son atraídas por el imán, mientras que las más pequeñas se quedan en suspensión. Además el tamaño del agregado es más grande para las muestras  $P$  debido a que sus NPM tienen un mayor momento magnético lo cual incrementa las interacciones dipolares y la probabilidad de agregación.

En la Figura 4. 15 (c) se observa el comportamiento de la dimensión fractal del agregado en función del pH de adsorción. La dimensión fractal aumenta a medida que aumenta el pH, de forma que las condiciones del medio intervienen en la formación de agregados. Así, medios más cercanos a la neutralidad favorecen la aparición de estructuras fractales

con exponentes cercanos a 3 mientras que los medios más ácidos favorecen la formación de estructuras fractales ramificadas con exponentes fractales entre 1 y 2.

A mayor  $pH_{ads}$  (6.25) la eficiencia del recubrimiento del ácido cítrico sobre la superficie de las NPM es menor por lo tanto existen dos poblaciones de NPM: algunas recubiertas y otras no. Debido a la separación magnética, las NPM de mayor tamaño formarán parte de la muestra *P*. Además la influencia de las interacciones dipolares es mayor en la muestra tipo *P* lo cual se ve reflejado en un mayor tamaño de agregado.

Para el  $pH_{ads} = 4.58$ , se tiene el mejor pegado de ácido cítrico sobre las NPM de magnetita, y el sistema se estabiliza electrostáticamente. Esto es consistente con la observación de un menor tamaño de agregado para este  $pH$  de adsorción.

En conclusión, Se evidencia que el proceso de separación magnética fracciona el sistema, de forma que las NPM más grandes o inestables en la suspensión (no recubiertas) se encuentran en las muestras tipo *P* y que las NPM más pequeñas y estabilizadas electrostáticamente se encuentran en las muestra tipo *SD*. También se observó que las condiciones de síntesis influyen en la estructuración del coloide.

Así, a mayor valor de  $pH$  de adsorción se favorecen la formación de NPM y agregados de NPM más grandes con una mayor dimensión fractal. Para medios de  $pH$  cercanos a la neutralidad existe una competencia entre las interacciones de van der Waals y dipolar magnética que conlleva a estructuras de exponente fractal mayor a 2.

## **CAPÍTULO 5: PATRONES SAXS ANISÓTROPOS: DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**

En este capítulo se presenta primero el desarrollo de un dispositivo para obtener patrones de SAXS anisótropos generados por la aplicación de campo magnético en suspensiones coloidales. Los patrones anisótropos son el resultado de la alineación, en la dirección del campo aplicado, de agregados previamente formados o de la conformación de nuevas estructuras que crecen a lo largo de la dirección del campo aplicado.

Los resultados se obtienen a partir de la aplicación de 4 valores de campo magnético (20.5 kA/m, 31.9 kA/m, 39.1 kA/m y 43.0 kA/m). Los patrones SAXS-2D se analizan mediante modelos que correlacionan la intensidad dispersada por la muestra en la dirección paralela al campo con la dispersada en la dirección perpendicular al campo y con modelos teóricos basados en el cálculo de la función de distribución de direcciones de alineación de los agregados en la suspensión coloidal.

## 5.1.DESARROLLO DEL MONTAJE EXPERIMENTAL

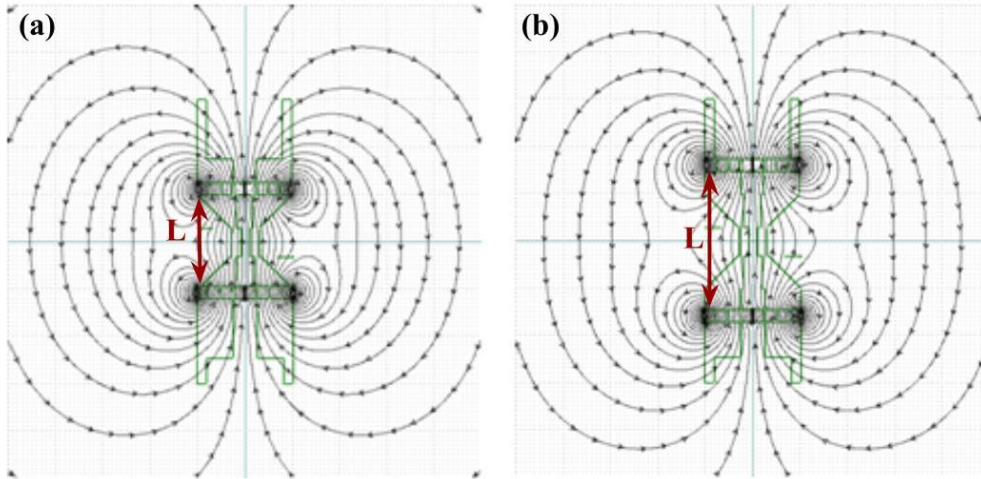
Uno de los objetivos de esta tesis es estudiar la respuesta al campo magnético de los coloides y estudiar la respuesta de estas estructuras ante la aplicación del campo. La técnica SAXS tiene las características necesarias para llevar adelante estos estudios. Con este objetivo se desarrolló un sistema de aplicación de campo magnético utilizando imanes permanentes los cuales generan un campo constante y uniforme en el lugar donde se posiciona la muestra para las medidas SAXS. Este dispositivo se utilizó para estudiar la inducción de agregación en coloides por aplicación de campos magnéticos estáticos.

El diseño del portamuestras que permite la aplicación de campo magnético se realizó en el marco de esta investigación en el Instituto de Física La Plata y su fabricación e instalación se realizó en la línea D01B-SAXS del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón en Campinas-Brasil con la colaboración del Dr. Jean Marie Polli, responsable de la instrumentación de las líneas SAXS mencionadas. Debido a la sencillez de fabricación e implementación, además de satisfacer las condiciones de homogeneidad e intensidad de campo magnético, se desarrolló contempló que se pudiera apilar anillos magnéticos situados simétricamente a cada lado del portamuestras para incrementar la magnitud del campo aplicado.

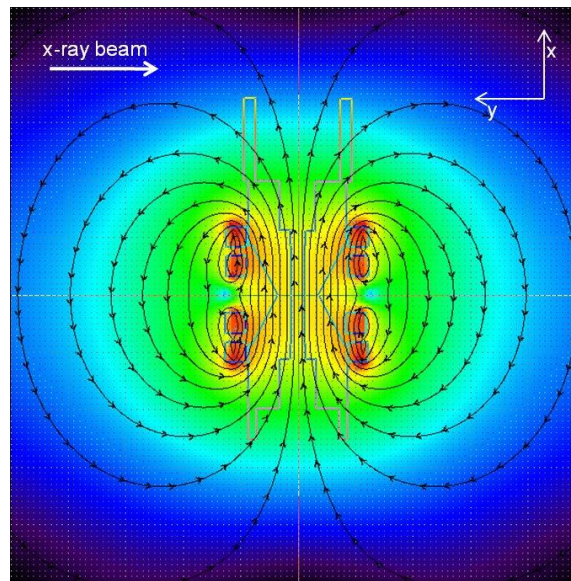
Para definir la configuración de imanes más adecuada y modelar la homogeneidad e intensidad del campo magnético se realizaron simulaciones con el programa Vizimag. En las simulaciones se consideraron imanes de NdFeB con forma de anillo con una intensidad de 1.2 T en su interior de dimensiones iguales a 35 mm de diámetro externo, 24 mm de diámetro interno y 10 mm de altura y como material para el portamuestras un metal de baja permeabilidad como el aluminio ( $\mu_r = 1.00002$ ). Estas simulaciones se presentan en la Figura 5. 1 en la cual se observa una gran concentración de líneas de campo en la zona donde se sitúa la muestra, la cual corresponde al centro del plano cartesiano. Para una distancia entre imanes ( $L$ ) de 20 mm se encontró una intensidad de 0.25 T sobre el origen y para  $L = 30$  mm se encontró una intensidad de 0.15 T.

La determinación de la homogeneidad del campo se realizó simulando dos anillos concéntricos de igual tamaño. La simulación se presenta en la Figura 5. 2, en donde la

homogeneidad se estudia mediante el uso de una escala de colores, donde el rojo corresponde a la zona de mayor intensidad, le siguen amarillos, verde y el azul corresponde a la zona de menor intensidad de campo. La dirección de aplicación del campo magnético es perpendicular al dirección de incidencia de los rayos X.



**Figura 5. 1.** Simulación de intensidad y la distribución de líneas de campo dentro y fuera del portamuestras. **(a).** Para una distancia entre imanes de  $L = 20$  mm. **(b).** Para una distancia entre imanes de  $L = 30$  mm. La posición de la muestra corresponde al origen del plano.

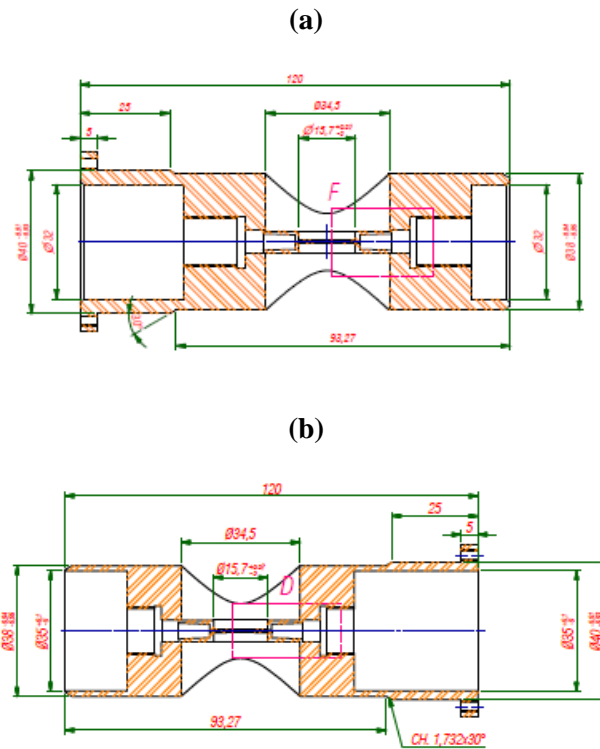


**Figura 5. 2.** Simulación de la intensidad y homogeneidad del campo producido por dos anillos magnéticos concéntricos de NdFeB.

De las simulaciones se concluye que el campo magnético en el plano de la muestra en una región de  $3 \times 1$  mm presenta variaciones menores al 0.05%. Estos resultados dieron lugar a la fabricación del primer prototipo de portamuestra para muestras líquidas que permitiera la aplicación de campo magnético. Una comparación entre el portamuestras

sin modificaciones y el portamuestras modificado para incluir los imanes se presenta en la Figura 5. 3.

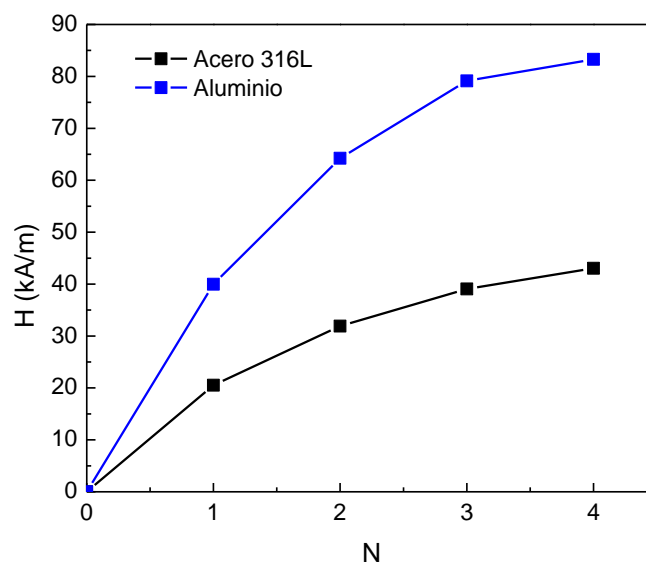
En búsqueda del portamuestras con menor respuesta magnética se fabricaron dos prototipos de diferentes materiales, el primero de acero inoxidable 316L ( $\mu_r= 1.002$ ) y el segundo de aluminio.



**Figura 5. 3.**Plano de construcción del portamuestras SAXS para líquidos (a). Sin modificaciones y utilizado tradicionalmente. (b). Modificado para incluir imanes en forma de anillos y generar anisotropías magnéticas en los coloides.

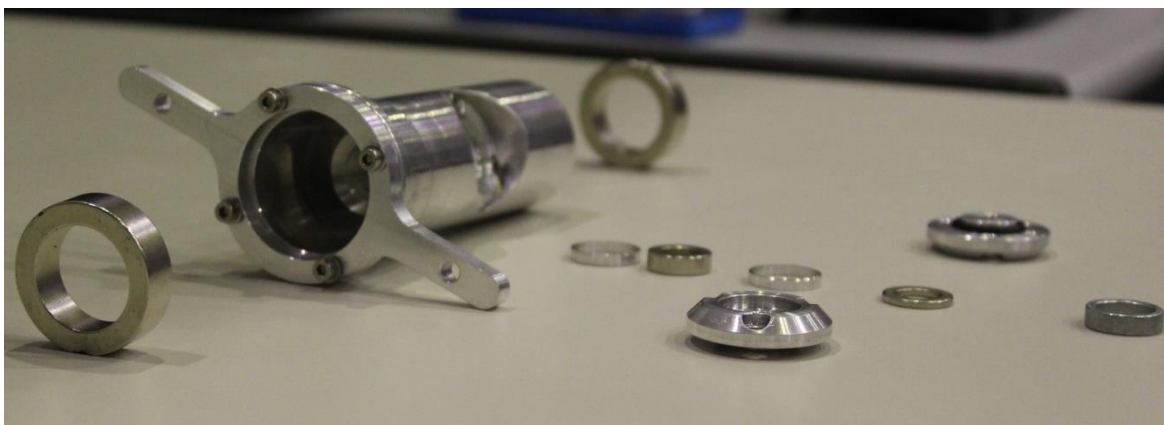
El campo magnético, medido con un gaussímetro en el lugar donde luego se sitúa la muestra, como función del número ( $N$ ) imanes permanentes con forma de anillo a cada lado del portamuestras se muestra en la Figura 5. 4.





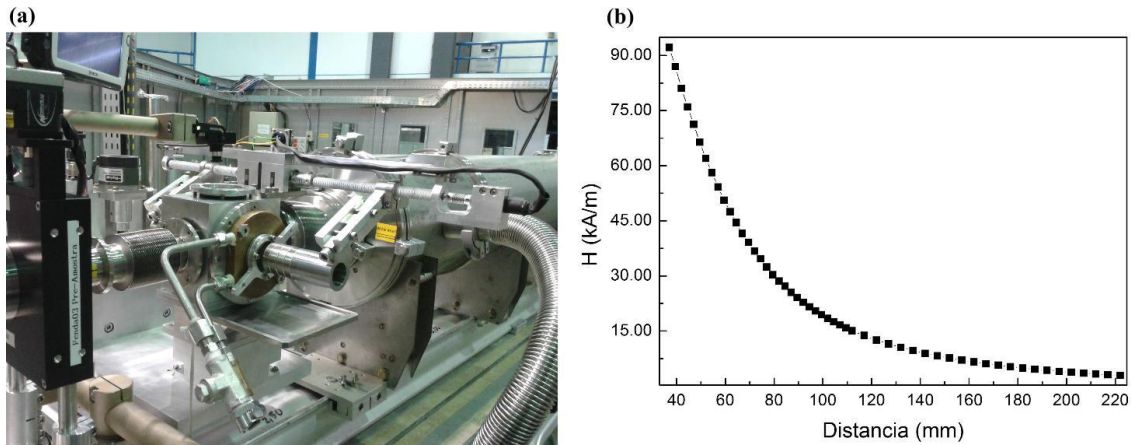
**Figura 5. 4.** Intensidad de campo magnética medida en el plano de la muestra en función del número de imanes ( $N$ ) a cada lado del portamuestras.

Una fotografía del portamuestras fabricado se presenta en la Figura 5. 5.



**Figura 5. 5.** Fotografía del portamuestras en aluminio terminado, dos imanes de NdFeB y otros componentes que se utilizan para sellar la zona donde se inyecta la muestra.

Con el fin de variar el campo magnético, modificando la distancia entre imanes a cada lado de la muestra, se desarrolló un sistema motorizado con controlador programable que permite variar milimétricamente la distancia entre imanes. Una fotografía del montaje experimental en la línea de SAXS y su correspondiente medida de campo se presenta en la Figura 5.6.



**Figura 5.6(a).** Fotografía del montaje experimental utilizado para variar el campo magnético en función de la distancia entre imanes. **(b).** Intensidad magnética medida en el centro geométrico en función de la distancia de separación entre imanes.

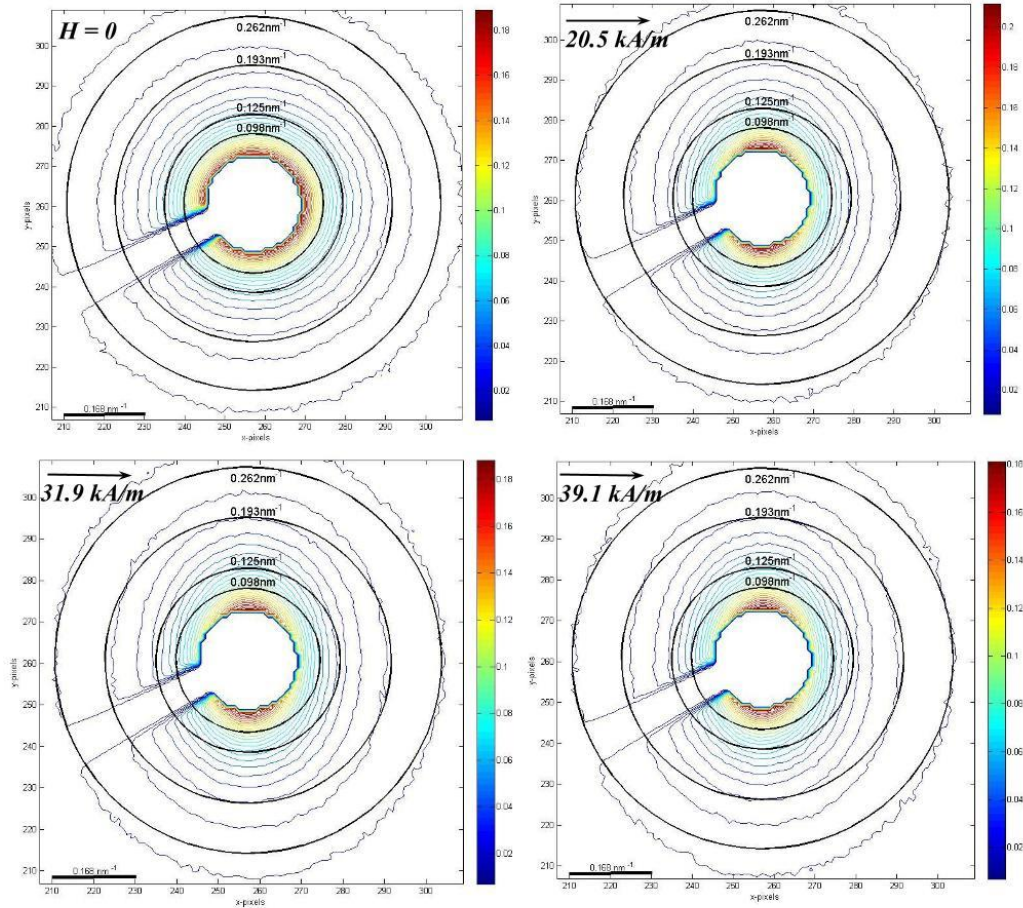
## 5.2.PATRONES DE SAXS ANISOTRÓPICOS EN SUSPENSIONES COLOIDALES

Con el portamuestras modificado para medir SAXS en presencia de campo magnético se realizaron medidas de SAXS en ausencia de campo y aplicando diferentes intensidades de campo magnético de 20.5 kA/m, 31.9 kA/m, 39.1 kA/m y 43.0 kA/m en los coloides mencionados en el capítulo anterior. .

La aplicación de campo magnético genera en el coloide la alineación de estructuras en la dirección del campo aplicado. Debido a esta organización el patrón de SAXS-2D obtenido no es circular y presenta un estiramiento en la dirección perpendicular al campo y una compresión en la dirección paralela al campo. Por este motivo este patrón es anisótropo y la intensidad dispersada en función del ángulo acimutal se analiza según lo modelos propuestos en la sección 2.6.6, en los cuales se determina el parámetro de anisotropía ( $A(q,H)$ ) del patrón SAXS-2D y el grado de ordenamiento de las estructuras ( $S(q,H)$ ).

Con la finalidad de comparar diferentes efectos producidos por el campo sobre las NPM y sus agregados, se estudian en esta sección las suspensiones coloidales rotuladas como: HD, LD, ODMSA10, ODMSA16, O10, O16, 130312-P y 130312-SD.

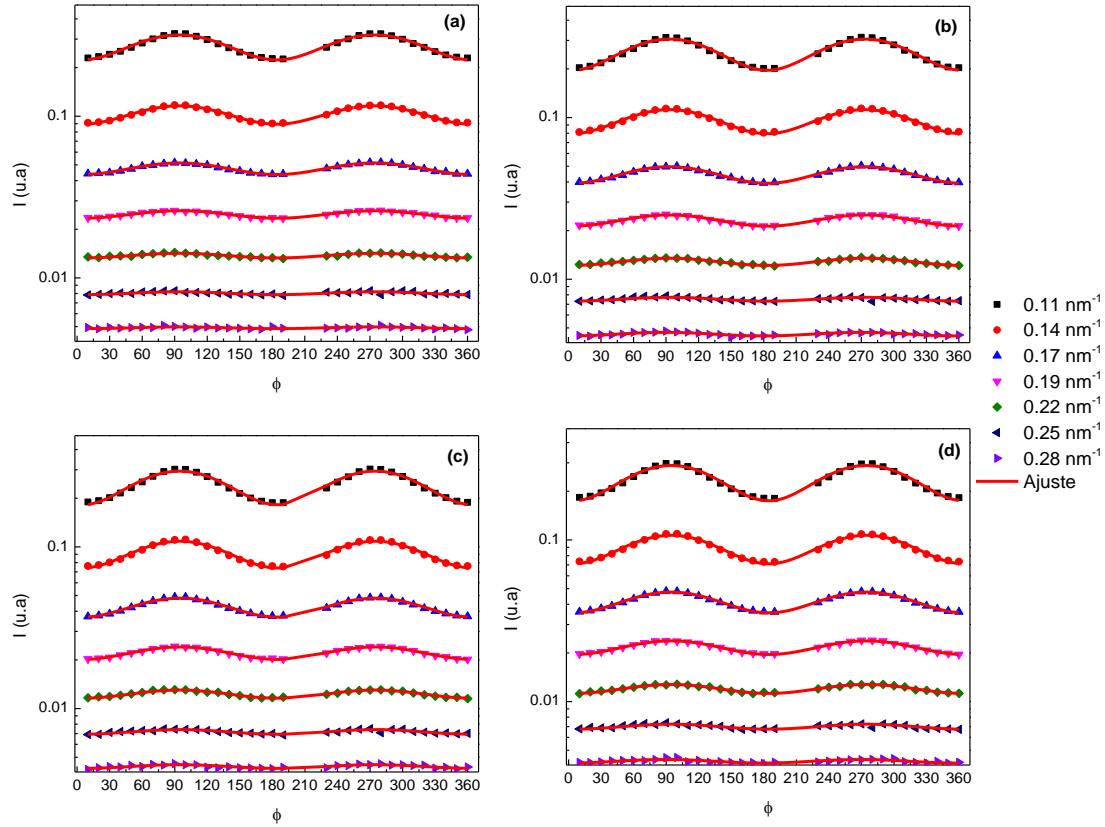
En la Figura 5. 7 se presentan los patrones de SAXS anisótopos obtenidos para la muestra 130312-P con diferentes intensidades de campo. Los círculos en negro corresponden a guías visuales de  $q$  constante.



**Figura 5. 7.** Patrones de SAXS anisótopos obtenidos para la muestra 130312-P. La dirección de aplicación del campo se indica con una flecha. Los círculos concéntricos corresponden a guías visuales de  $q$  constante. La barra de colores representa la intensidad de los rayos X dispersados por el coloide.

Se puede observar que el patrón obtenido sin campo magnético es isótopo, es decir para un dado valor de  $q$  se tiene el mismo valor de intensidad determinada por la escala de colores, para todo el rango de  $\phi$  medido. Cuando se aplica campo magnético, se observa que el patrón de dispersión se alarga en la dirección perpendicular de aplicación del campo, lo cual indica que existe una reorganización de las NPM y de sus agregados dentro del coloide en la dirección de  $H$ . Esto hace que para un mismo valor de  $q$  se tengan valores diferentes de intensidad. El efecto es más notorio a medida que se aumenta la intensidad del campo magnético.

La intensidad dispersada en función del ángulo  $\phi$  para ciertos valores de  $q$  obtenida a partir del análisis de los patrones SAXS-2D de la muestra HD se muestran en la Figura 5.8. En la misma, se puede observar que la intensidad varía sinusoidalmente con máximos definidos en  $\phi = 90^\circ$  y  $\phi = 270^\circ$  que corresponden a las direcciones perpendiculares a la dirección del aplicación del campo.

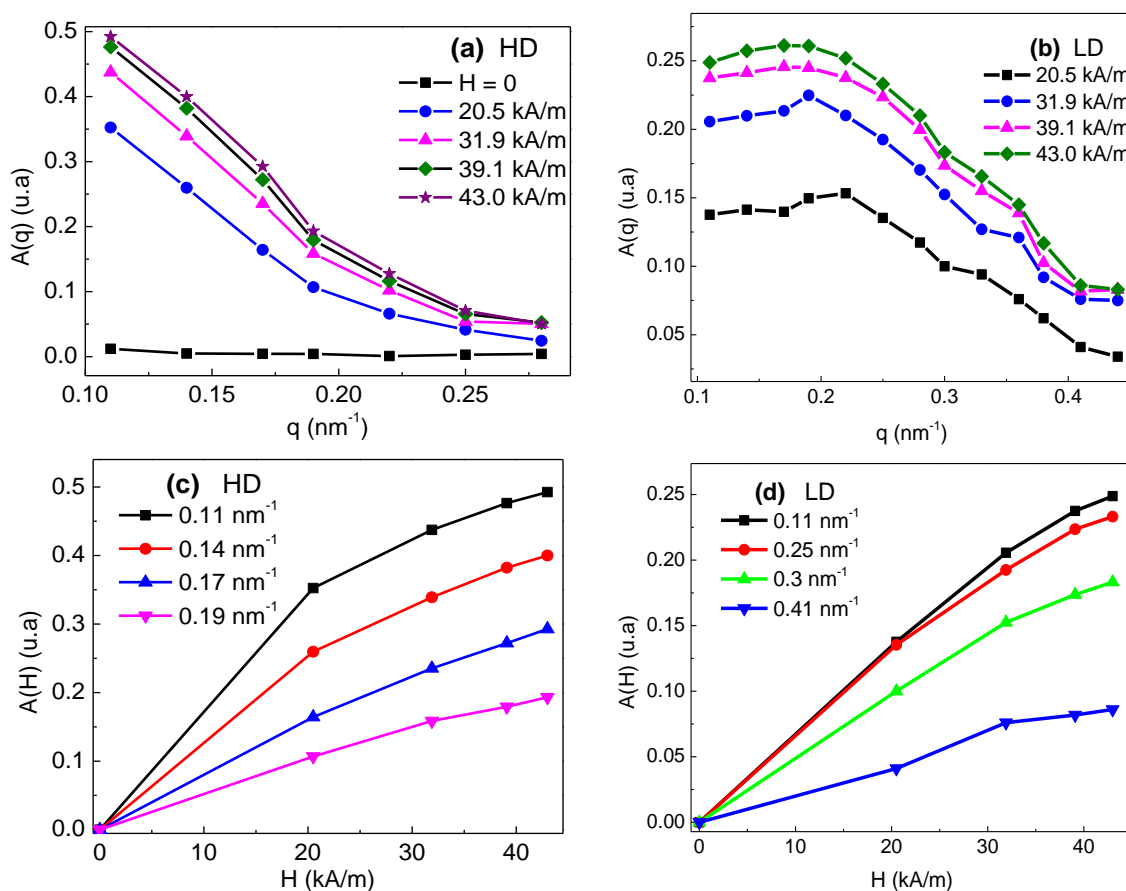


**Figura 5.8.** Patrones de SAXS acimutales obtenidos para la muestra HD para diferentes intensidades de campo magnético: (a) 20.5 kA/m, (b) 31.9 kA/m, (c) 39.1 kA/m y (d) 43.0 kA/m.

En la Figura 5.8 también se puede observar que para un mismo valor de  $H$  la amplitud de la curva  $I(\phi)$  disminuye a medida que se aumenta el valor de  $q$ . Esto indica que la mayor anisotropía del patrón es generada en la zona de bajos valores de  $q$ , lo cual corresponde a la observación de estructuras de mayor tamaño. Para valores mayores de  $q$  el patrón de dispersión es generado por las NPM, si las mismas son isotrópicas, se espera que su dispersión sea isotrópica y el valor de  $I(\phi)$  permanezca constante.

La anisotropía generada por el campo magnético se estudia ajustando las curvas presentadas en la Figura 5.8 con el modelo propuesto en la ecuación 94 en el cual se considera la intensidad dispersada para cada valor de  $q$  como una función sinusoidal de  $\phi$  donde se utilizaron  $I_0$  y  $A(q, H)$  como parámetros de ajuste<sup>56</sup>.

En la Figura 5. 9 se presenta el comportamiento del parámetro de anisotropía  $A(q,H)$  como función del vector de onda  $q$  y la amplitud de campo aplicado  $H$ :



**Figura 5. 9.**Factor de anisotropía como función del vector de onda  $q$  para las muestras (a) HD y (b) LD y de la amplitud de campo  $H$  para las muestras (c) HD y (d) LD.

Se observa que el factor de anisotropía ( $A$ ) disminuye a medida que aumenta  $q$  esto indica que la presencia de estructuras anisótropas es observable a valores pequeños de  $q$  donde el patrón SAXS está gobernado por la dispersión de estructuras agregadas. A medida que se aumenta el valor de  $q$  el patrón está gobernado por la dispersión de la partícula individual, motivo por el cual se espera que el factor de anisotropía tienda a cero dado que las partículas tienen forma esférica. Tanto para la muestra HD, como para la muestra LD, el valor de  $A(q)=0$  se encuentra para  $q = 2\pi/\xi$ , donde  $\xi$  es el tamaño del agregado.

En las Figura 5. 9c y d se presenta el comportamiento de  $A$  en función del campo. A medida que aumenta el campo magnético se observa un aumento de  $A$  con tendencia a

la saturación. Este efecto es más notable para valores más pequeños de  $q$  en concordancia con lo presentado anteriormente.

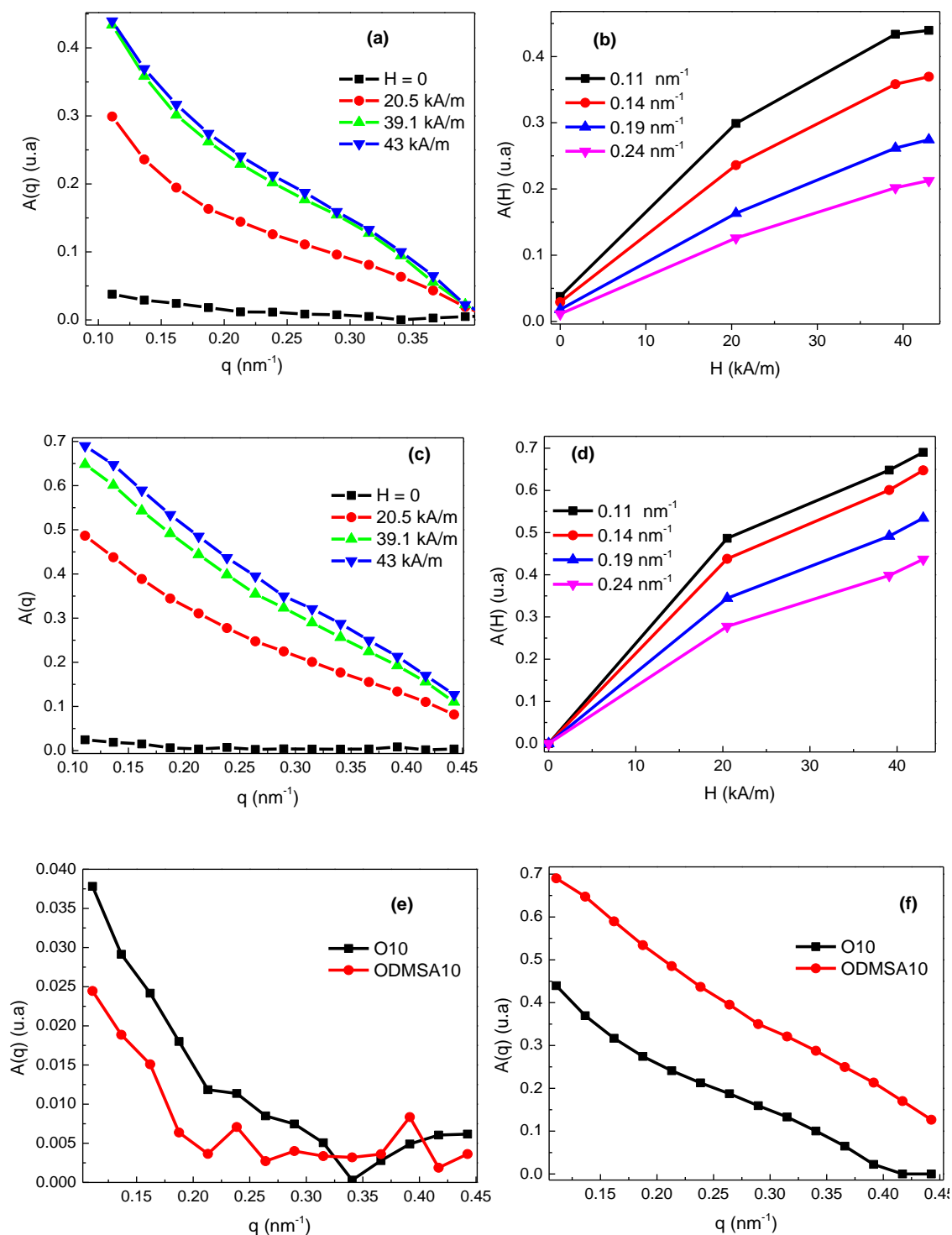
Cabe mencionar que el parámetro de anisotropía de la muestra HD es mucho mayor y tiende más rápido a cero que el de la muestra LD. Esto evidencia que la muestra HD tiene una mayor respuesta a campos magnéticos. Las estructuras anisótropas formadas en la muestra HD se manifiestan en un rango del espacio recíproco entre 0.06 y 0.30  $\text{nm}^{-1}$  lo cual corresponde a tamaños entre 20 y 100 nm, mientras que la muestra LD tiene una menor respuesta a campos magnéticos y las estructuras anisótropas presentan tamaños entre 14 y 100 nm.

Lo anterior se puede relacionar con los datos presentados en la Tabla 4. 2 donde se presentó un tamaño de agregado de 28.2 nm para la muestra HD y partículas aisladas para la muestra LD dentro de una partícula de quitosano. Así, para estas muestras los agregados formados antes de la aplicación del campo son los responsables de la anisotropía, ya sea por la alineación sobre un eje preferencial del agregado o la alineación de varios agregados. En la Figura 5. 10 se presentan los valores de  $A(q,H)$  obtenidos para las muestras O10 y ODMSA10. Como se explicó anteriormente, la muestra ODMSA10 se obtiene a partir de un cambio de ligando de la muestra O10, originalmente recubierta por ácido oleico y dispersa en hexano, hacia NPM de igual tamaño recubiertas con DMSA y dispersas en agua.

Se puede observar que para la muestra O10 (Figura 5. 10 a y b) se obtienen menores valores de anisotropía en comparación con la muestra ODMSA10 (Figura 5. 10 c y d). Lo anterior se puntualiza en la Figura 5. 10(f) donde se compara el valor de  $A(q)$  para  $H = 43 \text{ kA/m}$ . Como dijimos anteriormente, a mayor valor de  $A(q,H)$  mayor respuesta a campos magnéticos de las NPM. También se observa que la muestra ODMSA10 posee un mayor rango de  $q$  donde la anisotropía es diferente de cero, lo cual corresponde a estructuras de menor tamaño provocando el patrón anisótropo. En este caso para la muestra ODMSA10 se tienen estructuras de más de 12 nm, mientras que para la muestra O10 el tamaño de las estructuras está por encima de 16 nm.

Como se presentó en la Tabla 4. 3 la muestra O10 está formada por NPM de 11.46 nm de las cuales el 19.9% forman agregados de 54.7 nm mientras que la muestra ODMSA10 está formada por NPM de 10.98 nm de las cuales el 28% forman agregados de 57.7 nm. Esto indicaría que al aplicar campo magnético se está generando una agregación de las NPM individuales y la alineación de los agregados ya existentes en la

dirección del campo. En el caso de la muestra ODMSA10, los valores más altos de anisotropía estarían relacionados con la alineación de agregados permanentes formados debido al cambio del recubrimiento.



**Figura 5. 10.** Parámetro de anisotropía como función del vector de onda  $q$  y de la amplitud de campo  $H$  para las muestras (a) y (b) O10, (c) y (d) ODMSA10 y comparación de los valores de  $A(q)$  para (e)  $H = 0$  y (f)  $H = 43 \text{ kA/m}$ .

Para estas muestras se observó que aún en ausencia de campo magnético (Figura 5. 10, e) existe un valor no nulo de anisotropía por debajo de los  $0.35 \text{ nm}^{-1}$ . Esto indicaría que los agregados formados en ausencia de campo tienen una forma alargada en alguno de sus ejes y que las interacciones presentes entre partículas o entre agregados estarían produciendo este patrón anisótropo a campo cero.

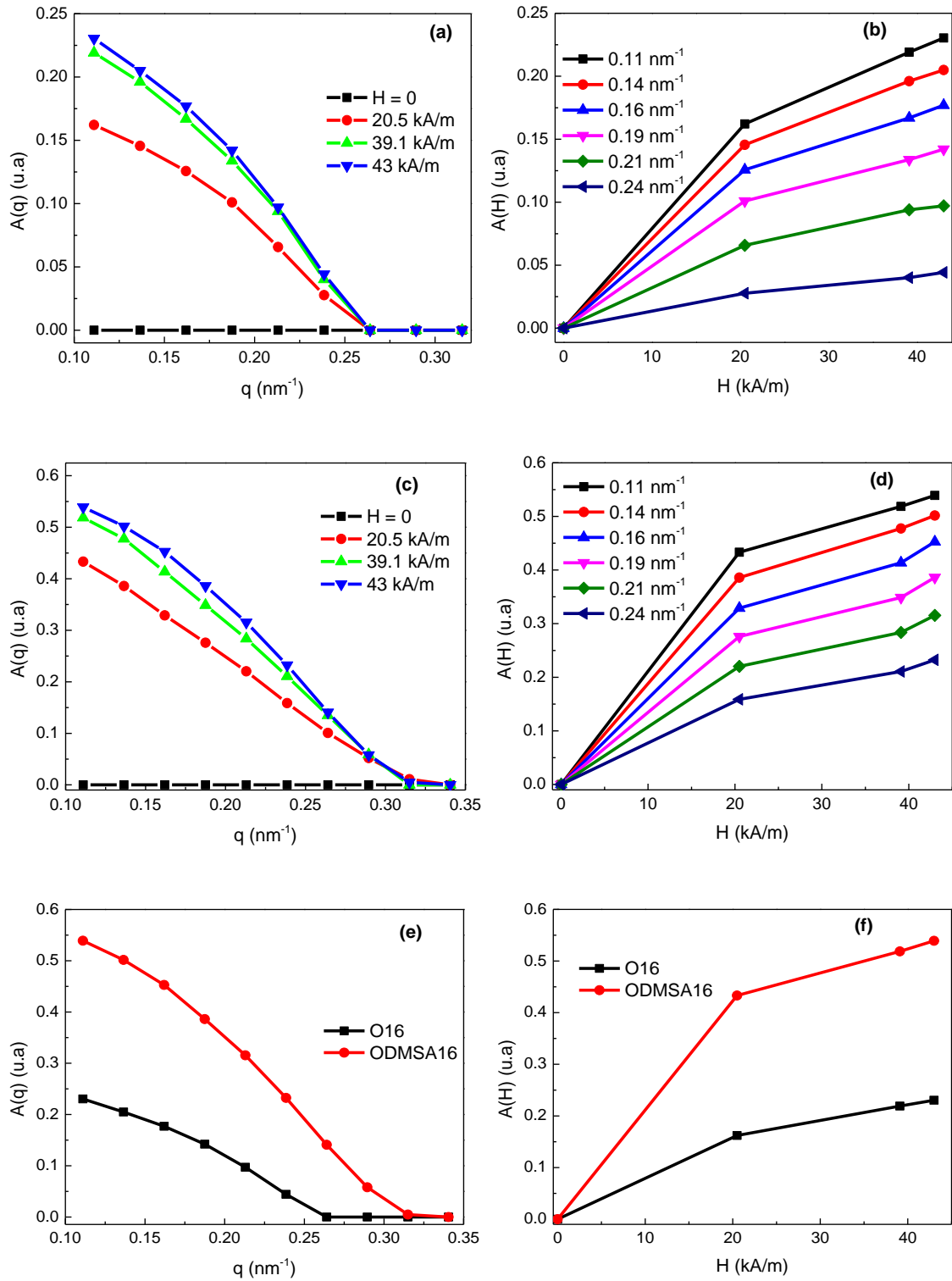
Esto concuerda con lo observado en los resultados de la Tabla 4. 4, donde el exponente fractal toma valores menores a 2 para las muestras O10 y ODMSA10 lo cual corresponde a estructuras lineales o alargadas en una dirección en particular. La mayor complejidad de las estructuras para la muestra ODMSA10 sería la responsable de menores valores de  $A(q,H)$  para campo cero, tal como se observa en la Figura 5. 10(e). El valor de  $A(q) = 0$  se da para  $q = 2\pi/D$ , donde  $D$  es el tamaño de las NPM. Esto indica que existen estructuras de mínimo dos partículas que provocan los patrones anisótropos.

Un comportamiento similar al presentado por las muestras O10 y ODMSA10 se observa para las muestras O16 y ODMSA16 (Figura 5. 11). Estructuras de más de 20 y 24 nm (mínimo dos partículas) son las responsables de la anisotropía para las muestras ODMSA16 y O16 respectivamente. Los valores de  $A(q)$  obtenidos para la muestra en suspensión acuosa son mayores que los obtenidos para la muestra en hexano, lo cual una vez más evidencia el efecto del cambio de ligando con la formación de agregados permanentes para la muestra ODMSA16.

En comparación con los datos de  $A(q,H)$  obtenidos para las muestras O10 y ODMSA10, se observa que los valores obtenidos para las muestras O16 y ODMSA16 son menores. Como se presentó en la Tabla 4. 3 la muestra O10 presenta un 19.9% de NPM agregadas, mientras para la muestra O16 este porcentaje es de apenas el 0.6%. Por lo tanto, para el caso de la muestra O10 se esperaría una mayor anisotropía generada por las estructuras preexistentes, mientras que para la muestra O16 el campo magnético es quien genera la organización de las NPM.

Para el caso de las muestras ODMSA10 y ODMSA16 se tiene un porcentaje de agregación de 28 y 32 % respectivamente, pero el exponente fractal (ver Tabla 4. 3) de la muestra ODMSA10, es menor en comparación al exponente fractal de la muestra ODMSA16. Esto otorga más libertad a las NPM de la muestra ODMSA10 de formar agregados más compactos y grandes, resultando en un mayor valor de  $A(q,H)$ .



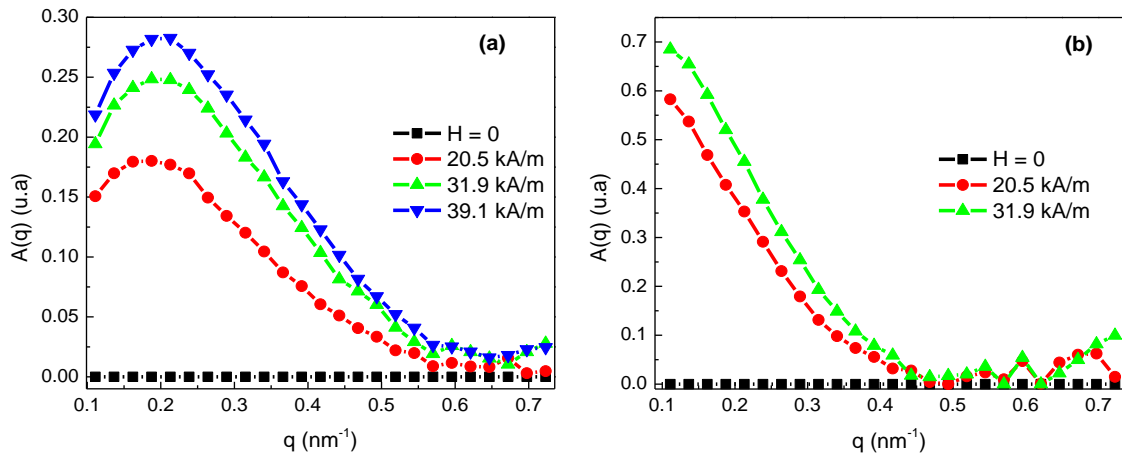


**Figura 5. 11.**Factor de anisotropía como función del vector de onda  $q$  y de la amplitud de campo  $H$  para las muestras (a) y (b) O16, (c) y (d) ODMSA16 y comparación de los valores de  $A$ (e) en función de  $q$  para  $H = 43$  kA/m y (f) en función de  $H$  para  $q = 0.11$   $\text{nm}^{-1}$ .

Finalmente se presenta en la Figura 5. 12 el comportamiento de  $A(q,H)$  para las muestras 130312P y 130312SD.

Se observa para la muestra 130312SD (Figura 5. 12(a)), la cual corresponde al sobrenadante de la síntesis, es decir, la suspensión coloidal estable, que el valor de  $A(q,H)$  es menor que para la muestra 130312P (Figura 5. 12 (b)), la cual está formada por partículas estabilizadas con ácido cítrico que decantaron después de una separación magnética .

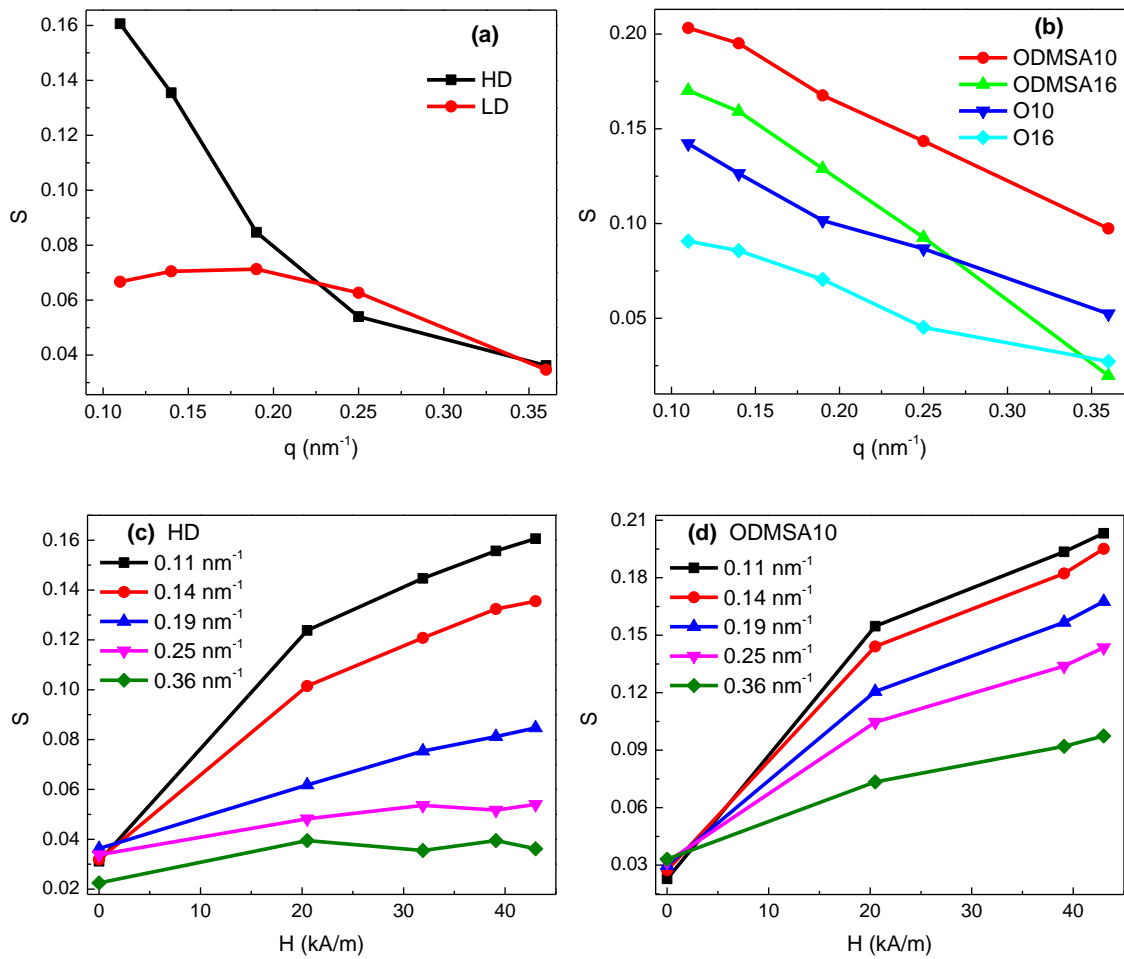
Al ser de mayor tamaño, las partículas del coloide 130312P tienen mayor momento magnético lo cual hace que su respuesta a campos magnéticos sea mayor que para la muestra 1301312SD. Esta última está formada por partículas más pequeñas y estabilizada electrostáticamente con ácido cítrico, lo cual impide su agregación a campo cero.



**Figura 5. 12.**Factor de anisotropía como función del vector de onda  $q$  de las muestras (a) 130312 SD y (b) 130312P.

La estabilidad de las NPM en la suspensión coloidal, también se evidencia en el valor de  $q$  para el cual  $A(q,H) = 0$ . Para la muestra 130312SD este valor corresponde a  $q = 0.6 \text{ nm}^{-1}$  y para la muestra 130312P se observa en  $q = 0.45 \text{ nm}^{-1}$ , este valor corresponde a estructuras de más de 10 y 14 nm para las muestras 130312SD y 130312P respectivamente. Además el porcentaje de agregación y el número promedio de partículas por agregado es menor para la muestra 130312SD (7 % y 3.47 % respectivamente) que para la muestra (130312P 10% y 9.63% respectivamente) tal como se presentó en las Tabla 4. 5 y Tabla 4. 6. Esto también sustenta la idea de obtener menores valores de anisotropía en la muestra 130312SD.

En un análisis complementario se estudia el comportamiento del parámetro de orden  $S$  calculado con la ecuación 106. Los resultados de este cálculo se presentan en la Figura 5. 13.



**Figura 5.13.** Parámetro de orden  $S$  para diferentes valores de  $q$  y  $H = 43$  kA/m para las muestras (a) HD y LD, (b) O10, ODMSA10, O16 y ODMSA16. (c) Parámetro de orden  $S$  en función del campo magnético para la muestras HD y (d) ODMSA10.

Al igual que el parámetro de anisotropía, el parámetro de orden  $S$  disminuye cuando es observado a mayores valores de  $q$  y cuando se disminuye el valor de campo magnético aplicado. Esto indica que el campo magnético actúa como organizador de las partículas o agregados dentro de la suspensión coloidal y que a medida que se aumenta el campo magnético tanto  $A(q,H)$  como  $S$  tienden a un valor de saturación, que corresponde a todo el sistema organizado en la dirección del campo.

También es evidente que a mayor parámetro de anisotropía mayor parámetro de orden. Así las muestras HD y ODMSA10 presentan un mayor ordenamiento comparada con las muestras correspondientes a cada sistema.

Para finalizar, podemos concluir que tanto los valores de  $A(q,H)$  como de  $S(q,H)$  son indicadores de la estructuración de las NPM en las suspensiones coloidales. Valores de  $A(q,H)$  diferentes de cero, indican la presencia de estructuras de NPM orientadas en la

dirección del campo. El valor de  $q$  para el cual  $A(q,H) = 0$ , corresponde al tamaño medio de la partícula o del agregado más pequeño que provoca la anisotropía.

Para el caso de las muestras HD y LD, este valor coincide con el tamaño del agregado, mientras que para las muestras O10, ODMSA10, O16 y ODMSA16, este valor corresponde al tamaño de la partícula individual. Lo anterior es consistente con lo observado en la sección anterior (SAXS-2D isótropo) donde se determinó que las muestras HD y LD estaban conformadas por agregados estables dentro de una partícula de quitosano, y para las muestras O10, ODMSA10, O16 y ODMSA16 que coexisten partículas individuales con agregados de NPM. Por tal motivo se concluye que la anisotropía de las muestras HD y LD se genera por alineación de las partículas de quitosano, mientras que para las muestras O10, ODMSA10, O16 y ODMSA16 la anisotropía se forma por la alineación de los agregados existentes y por la formación de nuevos agregados, de mínimo dos partículas, en la dirección del campo aplicado

## **CAPÍTULO 6: PROPIEDADES MAGNÉTICAS**

Después de la caracterización estructural tanto de las NPM como de las suspensiones coloides formadas por las mismas, se presenta en la sección 6.1 de este capítulo la caracterización magnética, es decir, la respuesta de las NPM y de las suspensiones coloidales a campos magnéticos constantes (d.c.).

En la sección 6.2, se trata el fenómeno de absorción de energía desde un campo magnético de radiofrecuencia por parte de las NPM y su subsecuente liberación en forma de calor. Este fenómeno será estudiado por medio de la propiedad física conocida como velocidad específica de absorción o *SAR* por sus siglas en inglés (*Specific Absorption Rate*).

## 6.1 CARACTERIZACIÓN MAGNÉTICA.

### 6.1.1 Nanopartículas de CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

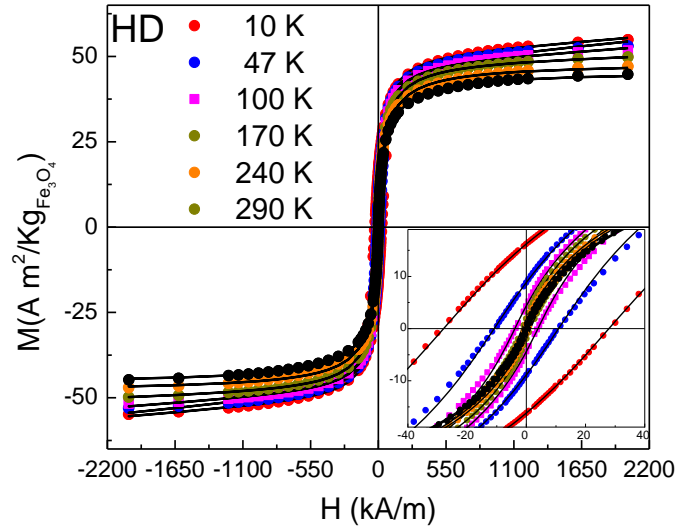
Las NPM secas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas por ácido oleico y quitosano correspondientes a las suspensiones coloidales listadas en la Tabla 4.2 fueron estudiadas a partir de medidas magnéticas con campos d.c..

La fracción ( $[C]$ ) de masa de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por masa de nanopartículas se presenta en la Tabla 6. 1 y fue utilizada para expresar las magnitudes magnéticas en unidades específicas (por unidad de masa de óxido de hierro). En el magnetómetro SQUID, se midió la magnetización específica ( $M$ ) en función del campo magnético ( $H$ ) entre 2200 y -2200 kA/m para diferentes temperaturas por debajo de la temperatura ambiente (290 K).

Las curvas obtenidas se presentan en la Figura 6. 1 para la muestra HD. Se observa que la curva de magnetización para 290 K aumenta en función del campo aplicado y después alcanza un estado próximo a la saturación por encima de los 1000 kA/m. Si consideramos que para esta temperatura las fluctuaciones térmicas son suficientes para que el sistema se comporte como un superparamagneto, es posible utilizar una función de Langevin modificada, tal como se presenta en la ecuación 120, para reproducir la totalidad de la curva  $M(H)$ .

$$120. \quad M(H) = N \int_0^{\infty} \mu \left[ \text{Coth} \left( \frac{\mu \mu_0 H}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{\mu \mu_0 H} \right] g(\mu) d\mu + \chi_{hf} H$$

Donde  $\chi_{hf}$  corresponde a la susceptibilidad de alto campo y modela el leve aumento de la magnetización por encima del campo de saturación, el cual puede estar asociado a la presencia de una capa magnéticamente frustrada, o simplemente capa muerta, de material magnético que no responde al campo como lo hace el resto de la partícula.



**Figura 6. 1.** Curvas de magnetización para la muestra HD medidas a varias temperaturas. En la figura interna, se presenta con detalle el campo coercitivo ( $H_c$ ). Las líneas sólidas negras representan el mejor ajuste que se obtuvo con la función de Langevin (ecuación 120) pesada con una distribución LogNormal de momentos magnéticos.

La función  $g(\mu)$  es la distribución de número de momentos magnéticos ( $\mu$ ), la cual se considera para tener en cuenta el efecto de la polidispersión de tamaño de las NPM. Como se observó por medio de las técnicas de SAXS y TEM, la distribución de tamaños de partícula sigue una distribución LogNormal, por lo cual, esta misma distribución se tendrá en cuenta para  $\mu$ . De esta forma se tiene que el momento magnético medio ( $\langle\mu\rangle$ ) es:

$$121. \quad \langle\mu\rangle = \mu_o e^{\sigma^2/2}$$

Siendo  $\mu_o$ , en unidades de  $\mu_B$ , el centroide de la función de distribución LogNormal de momentos y  $\sigma$  su dispersión. De esta forma, si  $N$  es la densidad de partículas, la magnetización de saturación será:

$$122. \quad M_s = N\langle\mu\rangle$$

Los valores de  $\langle\mu\rangle$  y  $M_s$  determinados a partir del ajuste de la ecuación 120 sobre los datos de la curva  $M(H)$  a 290 K se presentan en la Tabla 6. 1.

Coloide	[C] mg <sub>Fe3O4</sub> /mg <sub>NPM</sub>	$\langle\mu\rangle$ ( $\mu_B$ )	$M_s$ (Am <sup>2</sup> /kg <sub>Fe3O4</sub> )	$\langle D_{mag}\rangle$ (nm)	$\delta_{CM}$ (nm)
HD	0.17	8053	46	5.75	1.97
LD	0.07	4009	53	4.57	0.12

**Tabla 6. 1.** Propiedades magnéticas medidas a partir de magnetometría d.c.  $\langle\mu\rangle$  es el momento magnético medio de las NPM y  $M_s$  su magnetización de saturación a 290K.  $\langle D_{mag}\rangle$  es el radio magnético y  $\delta_{CM}$  es el espesor de la capa muerta.

Se observa que el valor obtenido para  $\langle\mu\rangle$  es mayor para la muestra HD que para la muestra LD, mientras que  $M_s$  es mayor para la muestra LD que para la muestra HD. El valor menor de  $\langle\mu\rangle$  para la muestra LD coincide con que la misma presente un menor tamaño de partícula (4.8 nm) en comparación con la muestra HD (9.7 nm). A pesar de que la muestra HD tiene un mayor momento magnético es la que tiene mayor espesor de capa muerta.

A partir de los parámetros del ajuste, es posible obtener el tamaño magnético medio  $\langle D_{mag}\rangle$ , tal como se presenta en la ecuación 123 que corresponde al carozo de la nanopartícula en el cual se encuentra distribuido el momento magnético tal que su magnetización es igual a la magnetización de *bulk* ( $M_{bulk}$ ). Las diferencia entre el tamaño de partícula determinado por TEM o por SAXS y el radio magnético, determinan el espesor de la capa muerta ( $\delta_{CM}$ ).

$$123. \quad \langle D_{mag}\rangle = 2 \left( \frac{3\langle\mu\rangle}{4\pi M_{bulk}} \right)^{1/3} e^{\sigma_r^2/2}$$

Donde  $\sigma_r = \sigma/3$  siendo  $\sigma$  la dispersión del momento magnético.

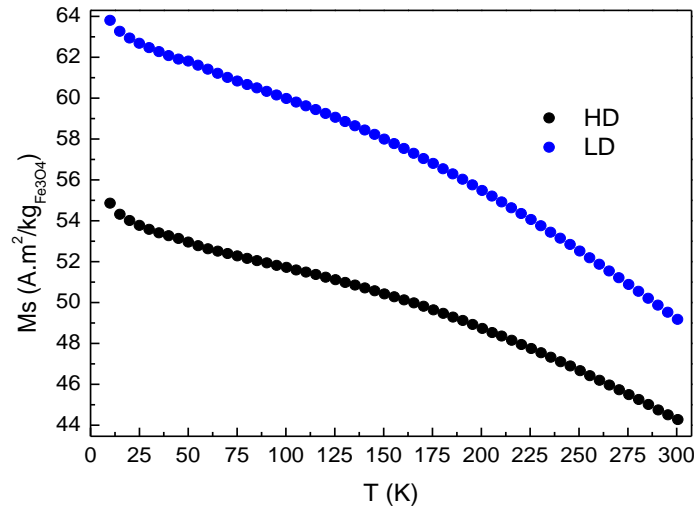
Como se puede ver en la Tabla 6. 1, la muestra HD tiene mayor capa muerta que la muestra LD, esto se ve reflejado en una magnetización de saturación menor para la muestra HD, que aunque tiene un mayor momento magnético la mayor capa muerta en la partícula hace que el valor neto de su magnetización disminuya.

La capacidad del modelo propuesto en la ecuación 120 para reproducir la curva de  $M(H)$  fue testada para curvas medidas a diferentes temperaturas. Como se explicó en la sección 2.2, por debajo de la temperatura de bloqueo, las NPM pierden el comportamiento superparamagnético y se observa coercitividad. Para modelar esta coercitividad, se consideró los ciclos con histéresis como ciclos correspondientes a un



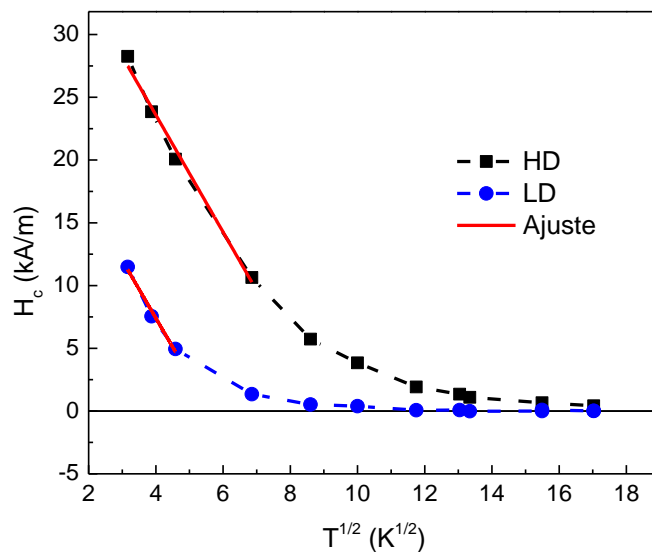
comportamiento superparamagnético pero desplazados una cantidad  $H_c$  la cual dé cuenta del campo coercitivo para cada temperatura.

Una curva de  $M_s$  vs  $T$  se presenta en la Figura 6. 2, donde se observa la disminución esperada de  $M_s$  a medida que se aumenta la temperatura.



**Figura 6. 2.** Comportamiento de la magnetización de saturación ( $M_s$ ) en función de la temperatura.

Utilizando el desplazamiento de la función de Langevin ( $H_c$ ) como parámetro de ajuste, se obtiene el comportamiento de  $H_c$  en función de la temperatura para las muestras HD y LD, el cual se puede observar en la Figura 6.3. Para las dos muestras se observa que  $H_c$  disminuye a medida que se aumenta la temperatura y se anula cerca a la temperatura ambiente para la muestra HD y en 140 K para la muestra LD. Se espera un comportamiento superparamagnético de las NPM por encima de estas temperaturas.



**Figura 6. 3.** Dependencia del campo coercitivo ( $H_c$ ) con la temperatura  $T$ .

Para las temperaturas en las que la energía de anisotropía magnética es mayor a la energía térmica, el comportamiento de  $H_c$  es lineal en función de  $T^{1/2}$  y se puede aproximar utilizando el modelo propuesto en la ecuación 18:

$$H_c = H_k \left( 1 - \left( \frac{T}{T_B} \right)^{1/2} \right)$$

Donde:

$$H_k = \frac{2K_{eff}}{\mu_0 M_s}$$

y además

$$T_B = \langle T_B^H \rangle$$

Siendo  $K_{eff}$  la constante de anisotropía,  $\mu_0$  es la permeabilidad magnética del vacío y  $\langle T_B^H \rangle$  es la temperatura de bloqueo obtenida a partir del análisis de la curva de  $H_c$  vs  $T$ . Los valores de  $K_{eff}$  y  $\langle T_B^H \rangle$  obtenidos como parámetros de ajuste del modelo descrito en la zona lineal de la curva de  $H_c$  vs  $T^{1/2}$  se presentan en la Tabla 6. 2. El ajuste se puede apreciar como una curva roja continua en la figura 6.3.

Coloide	$K_{eff}$ (kJ/ m <sup>3</sup> )	$T_m$ (K)	$\langle T_B^H \rangle$ (K)	$\langle T_B^Z \rangle$ (K)	$T_m$ (K)	$T_i$ (K)
HD	14.74	196	83 <sub>13</sub>	92.9 <sub>1.7</sub>	196	156
LD	11.69	71	31 <sub>12</sub>	29.6 <sub>0.2</sub>	71	290

**Tabla 6. 2.** Parámetros magnéticos obtenidos para las muestras HD y LD a partir del análisis de curvas  $M(H)$  medidas a diferentes temperaturas.  $K_{eff}$  y  $\langle T_B^H \rangle$  son la constante de anisotropía y temperatura media de bloqueo obtenida a partir del análisis de la curva de  $H_c$  vs  $T$  y  $T_m$ ,  $T_i$  y  $\langle T_B^Z \rangle$  son la temperatura del máximo, Temperatura de irreversibilidad y temperatura de bloqueo media obtenidas a partir del análisis de las curvas de ZFC-FC.

Para un sistema donde la energía de anisotropía es mayor que la energía térmica<sup>67</sup> y el campo magnético se aplica en la dirección del eje de fácil magnetización de las NPM, el comportamiento de  $M(H)$  tiene una funcionalidad que es proporcional a  $\tanh\left(\frac{\mu\mu_0 H}{k_B T}\right)$ . En esta investigación, la función de Langevin desplazada una cantidad  $H_c$  fue suficiente para ajustar la totalidad de las curvas de  $M(H)$  a diferentes temperaturas, por lo cual el modelo de tangente hiperbólica no fue tenido en cuenta.

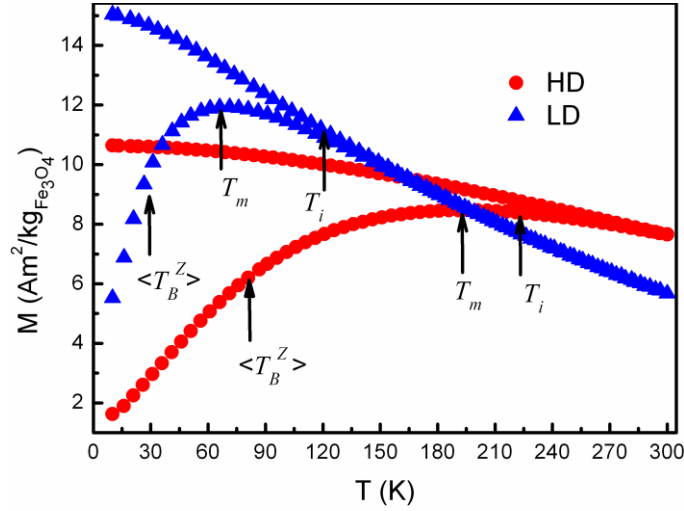
La constante de anisotropía efectiva de la muestra HD (14.7 kJ/m<sup>3</sup>) es mayor que para la muestra LD (11.6 kJ/m<sup>3</sup>) y estos valores son mucho mayores que el aceptado para la magnetita en *bulk*<sup>14,68</sup>(9 kJ/m<sup>3</sup>). Esto concuerda con lo observado para este tipo de NPM<sup>69</sup> y corresponde a que la presencia de interacciones dipolares, modifica la barrera de energía el cual se ve reflejado en un aumento de la constante de anisotropía por sobre el valor de *bulk*.

En principio si el valor de  $K_{eff}$  está influenciado por las interacciones dipolares entre NPM, se podría decir que la muestra HD es más interactuante que la muestra LD. Según los análisis de las curvas de SAXS la muestra HD está formada por NPM de magnetita formando un agregado recubierto por quitosano, mientras la muestra LD está formada por NPM de magnetita espaciadas dentro de una partícula de quitosano tal como se esquematiza en la Figura 4. 6. De esta forma, la distancia entre partículas para la muestra HD es mucho menor que la distancia entre partículas para la muestra LD por lo cual la energía de interacción en la muestra HD es más grande.

Para determinar la temperatura de bloqueo de las NPM se realizaron medidas de magnetización en función de la temperatura según los protocolos ZFC y FC descritos en la sección 3.4.1 con un campo magnético de 8 kA/m y una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 5 K/min. Los resultados se presentan en la Figura 6. 4.

En la misma figura se destacan con flechas las temperaturas del máximo de la curva de ZFC ( $T_m$ ), la temperatura de irreversibilidad ( $T_i$ ) y la temperatura de bloqueo media ( $\langle T_B^Z \rangle$ ), la cual es obtenida por medio un ajuste gaussiano de la distribución de temperaturas de bloqueo<sup>64</sup> dada por la ecuación 124:

$$124. \quad f(T_B) \propto \frac{d(M_{ZFC} - M_{FC})}{dT}$$



**Figura 6. 4.** Magnetización específica ( $M$ ) versus temperatura ( $T$ ) medida con los protocolos de ZFC y FC con  $H_{DC} = 8$  kA/m y velocidad de calentamiento de 5 k/min.  $\langle T_B^Z \rangle$  indica la temperatura de bloqueo media obtenida desde la ecuación 124,  $T_i$  es la temperatura de irreversibilidad y  $T_m$  el máximo de la curva  $M_{ZFC}(T)$ .

Para la muestra HD, la curva de  $M_{ZFC}$  es más ancha y la posición del máximo ( $T_m$ ) se encuentra en 196 K, a mayor temperatura que para la muestra LD para la cual  $T_m = 71$  K. La temperatura de bloqueo media obtenida para la muestra HD ( $\langle T_B^Z \rangle = 92.9$  K) también es mayor que la obtenida para la muestra LD ( $\langle T_B^Z \rangle = 29.6$  K), lo cual es consistente con un mayor tamaño de partículas y una distribución de tamaño más amplia para la muestra HD en comparación con LD. Los datos de TEM y SAXS en la Tabla 4. 2 confirman estas diferencias entre las distribuciones de tamaño (ver figuras 4.3 y 4.4 de la sección 4.2).

Por encima de  $T_i$  las NPM se encuentran desbloqueadas y un comportamiento superparamagnético es observado tal que  $M \propto 1/T$ . Hay que resaltar que la temperatura de bloqueo depende del tiempo de medida ( $\tau_m$ ) de la técnica, en el caso de magnetometría d.c. con SQUID  $\tau_m = 100$  s.

Por otro lado, la curva de  $M_{FC}$  para la muestra LD se incrementa a medida que se disminuye la temperatura por debajo de la temperatura de irreversibilidad ( $T_i$ ) mientras que la curva de  $M_{FC}$  para la muestra HD tiene un comportamiento más constante. Este comportamiento de la curva de  $M_{ZFC}$  y  $M_{FC}$  observado para la muestra HD es señal de que esta muestra presenta una mayor influencia de las interacciones dipolares que la muestra LD. Los valores ajustados para  $\langle T_B^H \rangle$  (83 y 31 K para HD y LD

respectivamente) son consistentes con los valores de  $\langle T_B^Z \rangle$  determinados a partir de la curva de ZFC.

Como se estableció utilizando las técnicas de TEM y SAXS, las NPM del coloide HD se encuentran casi en contacto entre sí dentro de la partícula de quitosano, mientras que las NPM del coloide LD están separadas unas de otras dentro de la partícula de quitosano. La menor distancia entre NPM y el mayor momento magnético en la muestra HD hacen que el valor de la interacción dipolar entre partículas sea mayor que en el caso de la muestra LD donde la mayor separación entre partículas y el menor momento magnético establecen un valor menor de energía dipolar. Los cálculos de la energía dipolar entre dos partículas para estas NPM serán presentados en la sección 7.1.

Debido a que las medidas de magnetocalorimetría, presentadas en el próximo capítulo, se realizan con amplitudes de campo de igual orden de magnitud que los campos coercitivos encontrados para las NPM, se considera como representativos de los sistemas los valores de  $K_{eff}$  obtenidos a partir del análisis de la curva de  $H_c$  vs  $T$ .

A partir de las medidas de magnetización de las NPM de CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se puede concluir que a mayor tamaño de nanopartícula mayor momento magnético mayor y mayor temperatura de bloqueo. El comportamiento de la magnetización por encima de la temperatura de bloqueo corresponde al comportamiento de un sistema superparamagnético, por lo cual, la ecuación de Langevin fue suficiente para describir la curva de  $M(H)$  de las muestras analizadas. Aunque por debajo de la temperatura de bloqueo, el sistema no se considera superparamagnético, la coercitividad observada pudo ser modelada desplazando la ecuación de Langevin una cantidad igual a  $H_c$ , de lo cual podemos concluir que en primera aproximación podría ser utilizada para describir la magnetización de un sistema de NPM supermagnéticas para toda temperatura.

Las medidas de magnetización según los protocolos de ZFC y FC, indican que para un sistema con polidispersión de tamaño, el mismo está caracterizado por una temperatura de bloqueo media ( $\langle T_B^Z \rangle$ ) que corresponde a la  $T_B$  de las partículas cuyo tamaño es igual al tamaño medio, por una temperatura de bloqueo de pico ( $T_m$ ) que corresponde a la temperatura a la cual la mayoría de las NPM se comportan como superparamagnéticas y la temperatura de irreversibilidad ( $T_i$ ) que corresponde a la temperatura a la cual las partículas más grandes se desbloquean<sup>64</sup>. Se espera que por encima de  $T_i$  la totalidad de las NPM se comporten como superparamagnéticas, esto fue demostrado a partir de las

medidas de campo coercitivo, donde se observó que la coercitividad se anula para valores mayores a  $T_i$ .

### 6.1.2 Suspensiones Coloidales de Nanopartículas de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Y DMSA/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

A continuación se estudian las propiedades magnéticas de las suspensiones coloidales formadas por NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas por ácido oleico suspendidas en hexano y por NPM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> recubiertas por DMSA y suspendidas en agua. A diferencia del sistema anterior, en el cual se estudió el comportamiento de las NPM sin su fase dispersante, este sistema se estudia en estado coloidal congelado, el cual es un estado similar al estado sobre el cual se realizarán medidas magnetocalorimétricas.

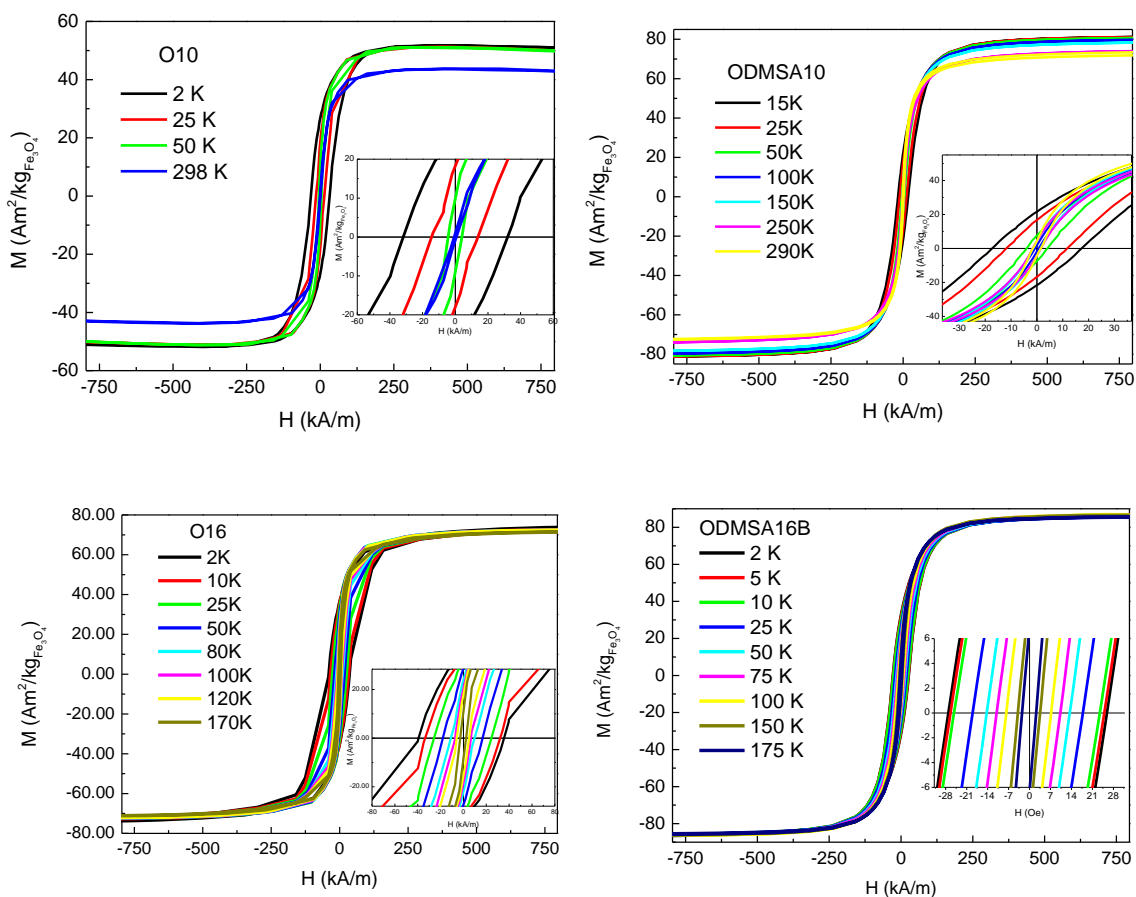
Coloide	$\langle\mu\rangle$ ( $\mu_B$ )	$M_s$ (Am <sup>2</sup> /kg)	$K_{eff}$ (kJ/ m <sup>3</sup> )	$T_m$ (K)	$\langle T_B^H \rangle$ (K)	$\langle T_B^Z \rangle$ (K)	$\langle D_{mag} \rangle$ (nm)	$\delta_{CM}$ (nm)
O10	25836	48.90	14.07	110.83	60.48	46.44	9.8	0.8
ODMSA10	21188	76.81	19.18	196.01	58.64	61.92	8.6	1.2
ODMSA11	19479	78.76	19.10	231.23	86.30	82.33	8.0	2.7
O16	9359*	87.32*	21.34	-	140.10	111.75	3.1	7.1
ODMSA16	-	-	-	-	-	156.21	-	-
O16B	8639	44.25	10.90	-	144.50	146.14	4.3	6.3
ODMSA16B	31772	75.99	16.50	-	170.00	176.12	7.0	4.5

**Tabla 6. 3.** Propiedades magnéticas medidas con magnetometría d.c.  $\langle\mu\rangle$  es el momento magnético medio de las NPM y  $M_s$  su magnetización de saturación específica a 300K (\*La curva de  $M(H)$  se midió a 170 K).  $K_{eff}$  y  $\langle T_B^H \rangle$  son la constante de anisotropía y temperatura media de bloqueo obtenidas a partir del análisis de la curva de  $Hc$  vs  $T$  y  $T_m$  y  $\langle T_B^Z \rangle$  son la temperatura del máximo y temperatura de bloqueo media obtenidas a partir del análisis de las curvas de ZFC-FC.  $\langle D_{mag} \rangle$  es el radio magnético y  $\delta_{CM}$  es el espesor de la capa muerta.

Por medio de magnetometría SQUID y PPMS se determinó magnetización isotérmica. Los curvas de  $M(H)$  para las muestras O10, ODMSA10 y ODMSA11 presentan un comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente, por lo cual fueron ajustadas con una ecuación de Langevin. Para las muestras O16, O16B y ODMSA16B

se observa coercitividad a temperaturas cercanas a la temperatura ambiente, por lo cual se utiliza en el análisis de datos la ecuación de Langevin, desplazada una cantidad  $H_c$ , modelo que resulta suficiente para representar las curvas de  $M(H)$  a diferentes temperaturas, inclusive por debajo de la temperatura de bloqueo, tal como se demostró en la sección anterior.

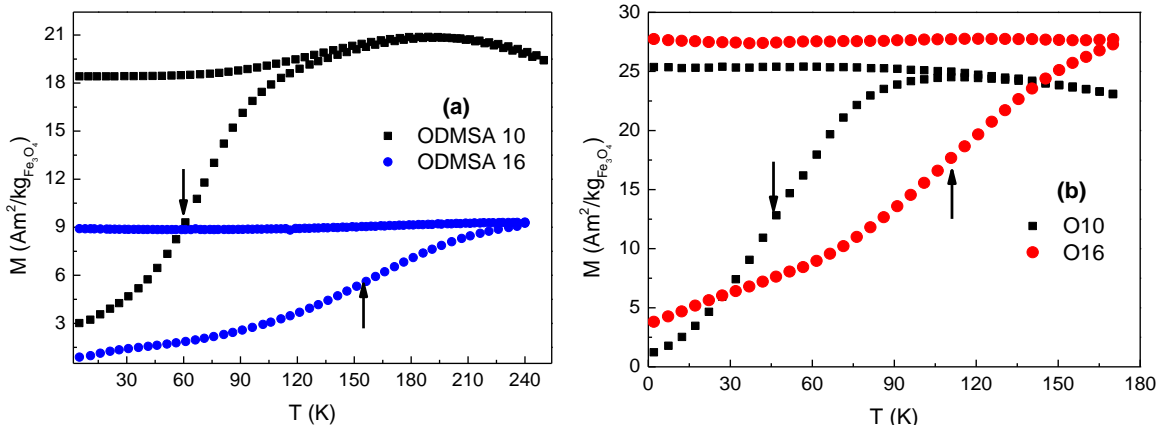
Los valores obtenidos de  $\langle \mu \rangle$  y  $M_s$  para  $T = 300$  K se presentan en la Tabla 6. 3 y las curvas de  $M(H)$  obtenidas para las diferentes temperaturas se presentan en la Figura 6.5.



**Figura 6.5.** Curvas de magnetización en función del campo aplicado para diferentes temperaturas para las muestras (a) O10, (b) ODMSA10, (c) O16 y (d) ODMSA16B. En las figuras insertadas se observa el comportamiento del campo coercitivo para cada temperatura.

Los resultados presentados en la Figura 6.5 permiten observar que  $M_s$  para las NPM dispersas en hexano es menor que para las NPM dispersas en agua. Esto evidencia que el cambio de ligando podría provocar una redistribución electrónica en la superficie de la nanopartícula disminuyendo la capa muerta y aumentando el momento magnético de las NPM.

A partir de los protocolos de medida de ZFC y FC se obtuvieron las temperaturas de bloqueo de las NPM en suspensión. Los valores de la temperatura del pico ( $T_m$ ) y temperatura de bloqueo media ( $\langle T_B^Z \rangle$ ) se presentan en la Tabla 6. 3 mientras que en la Figura 6. 6 se presentan las curvas obtenidas según los protocolos de ZFC y FC a 100 Oe con una velocidad de calentamiento y enfriamiento de 5 K/min. El rango de temperatura se mantuvo por debajo del punto de fusión de la fase dispersante, agua o hexano según corresponda.



**Figura 6. 6.** Curvas de ZFC y FC obtenidas para las muestras (a) ODMSA10 y ODMSA16 y (b) O10 y O16. Las flechas indican la temperatura de bloqueo media.

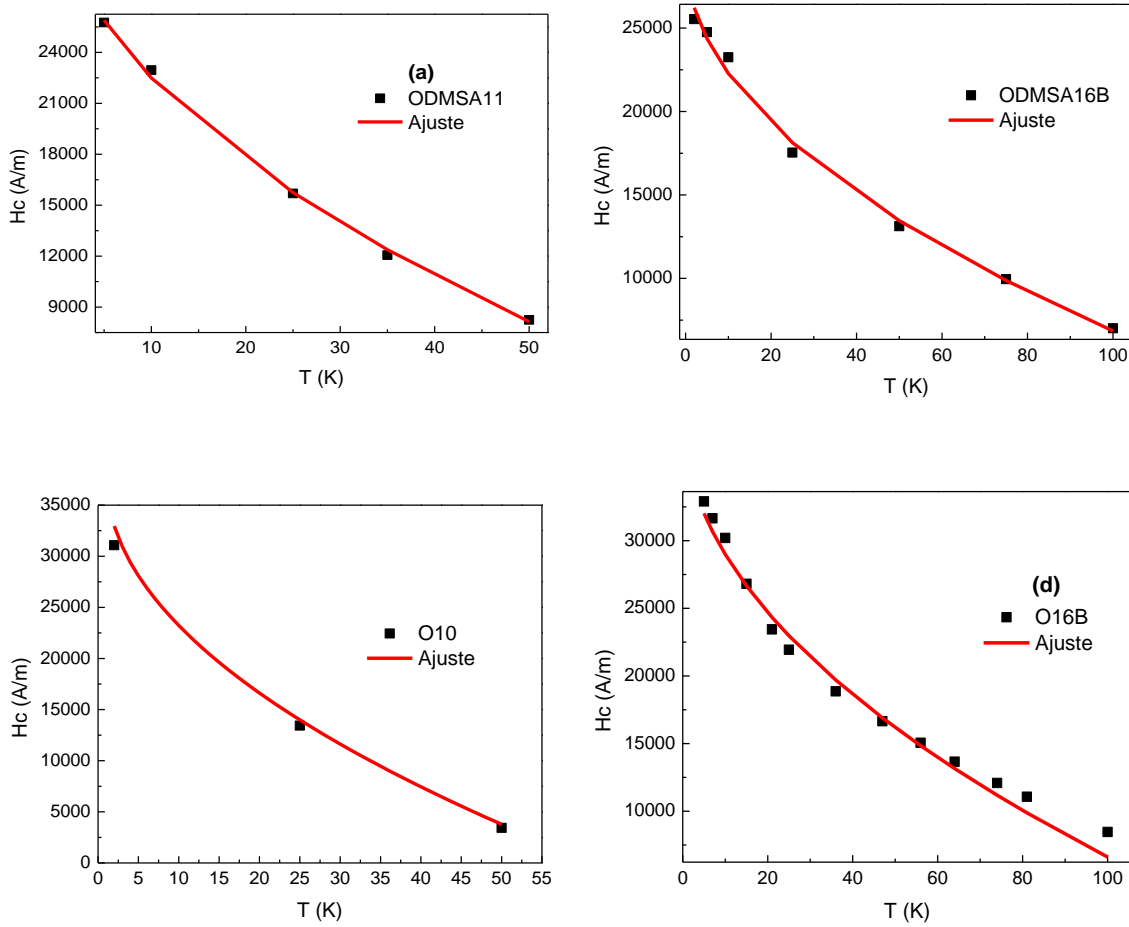
Se observa en la Figura 6. 6 que las NPM de menor tamaño (O10 y ODMSA10) presentan temperaturas de bloqueo media y temperaturas de pico menores que las muestras con NPM mas grandes (O16 y ODMSA16). Las  $T_m$  para las muestras O16 y ODMSA16 se encuentran por encima del rango de medida utilizado.

Para todas las muestras en hexano, la temperatura de bloqueo media es menor en comparación con su homólogo en agua, esto indica que las muestras que fueron sometidas a un cambio químico de ligando para ser suspendidas en agua presentan una mayor interacción dipolar. Como se mencionó anteriormente, el proceso de cambio de ligando hace que las NPM formen agregados permanentes incrementando así la interacción dipolar entre partículas del agregado.

A partir de las medidas de  $Hc$  vs  $T$  se determinó la constante de anisotropía de las muestras. Los resultados experimentales fueron ajustados utilizando la ecuación 18 con  $\langle T_B^H \rangle$  y  $K_{eff}$  como parámetros de ajuste, los valores obtenidos se presentan en la Tabla 6.



3. En la Figura 6. 7 se presentan las curvas de  $H_c$  vs  $T$  y la curva de ajuste obtenida utilizando la ecuación 18 para las muestras ODMSA11, ODMSA16B, O10 y O16B.



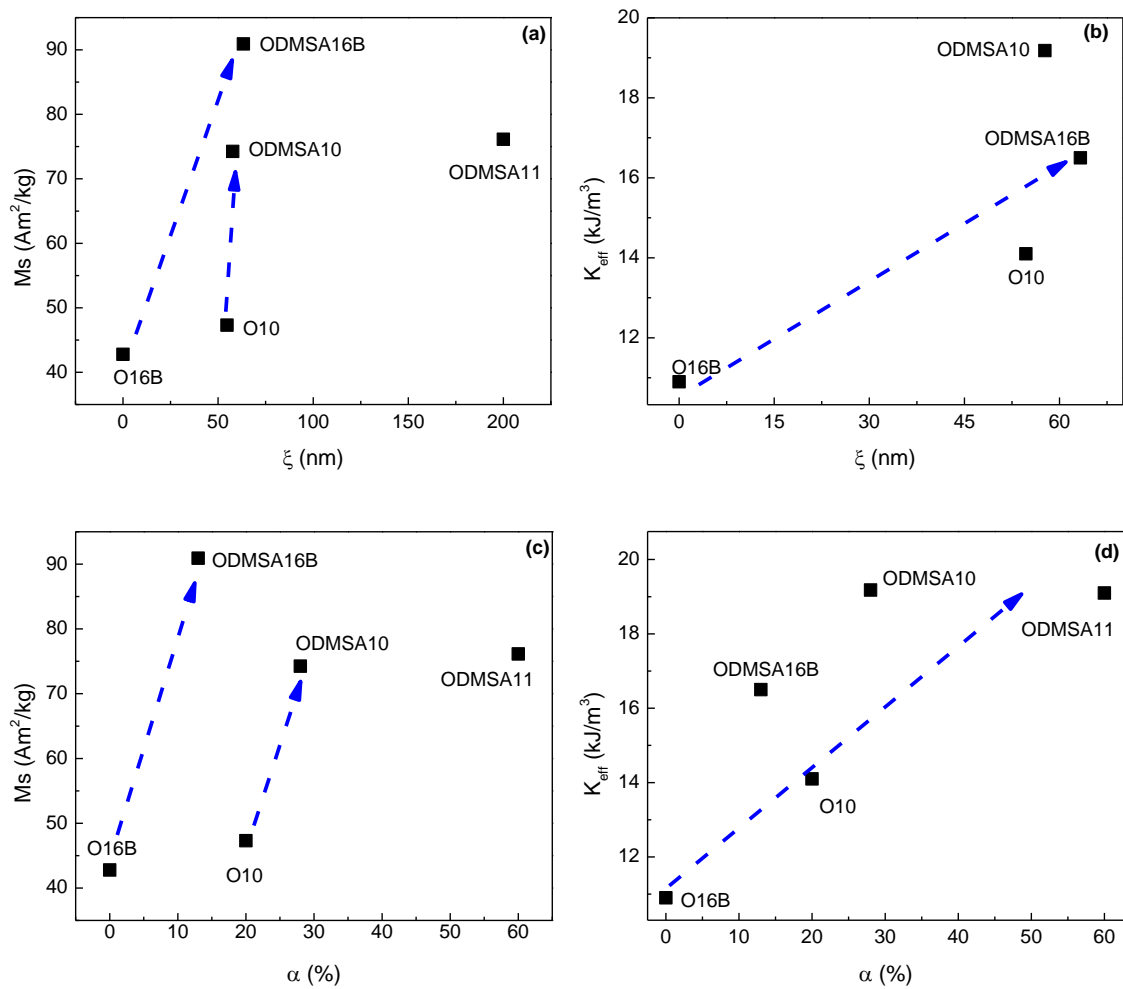
**Figura 6. 7.** Comportamiento del campo coercitivo en función de la temperatura para las muestras (a) ODMSA11, (b) ODMSA16B, (c) O10 y (d) O16B.

Las temperaturas de bloqueo determinadas a partir de las curvas de  $H_c$  vs  $T$  son consistentes con las obtenidas por medio de las curvas de ZFC y FC. De igual manera, las NPM con DMSA dispersas en agua presentan mayor temperatura de bloqueo que las NPN con ácido oleico dispersas en hexano.

Para este sistema de NPM en suspensiones coloidales se observa la influencia sobre las propiedades magnéticas de la estructuración de las NPM en el coloide. Según los datos obtenidos de SAXS se tienen agregados estables para las muestras suspendidas en agua. En estos coloides la distancia entre partículas en el agregado se disminuye y las interacciones dipolares aumentan. Para este tipo de muestras se observa que la

magnetización de saturación y la constante de anisotropía son mayores en comparación con el coloide formado por la misma nanopartícula dispersa en hexano.

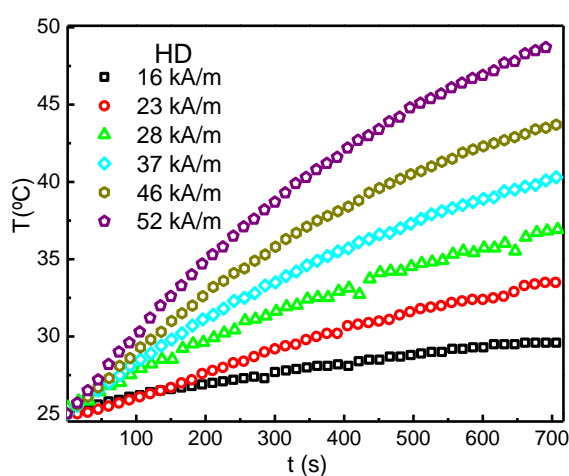
Se observa una tendencia para todas las muestras en relación al porcentaje de agregación, de forma que si hay más partículas formando agregados, mayor  $M_s$  y  $K_{eff}$ , lo cual también está relacionado con una mayor energía dipolar en las muestras con mayor grado de agregación. En la figura 6. 10 se ilustra la tendencia que toman  $M_s$  y  $K_{eff}$  en función del porcentaje de agregación ( $\alpha$ ) y el tamaño del agregado ( $\xi$ ) determinados a partir de SAXS.



**Figura 6. 8.** Comportamiento de  $M_s$  y  $K_{eff}$  con relación a la agregación de las NPM en suspensión.

## 6.2 DISIPACIÓN DE CALOR EN SUSPENSIONES COLOIDALES MAGNÉTICAS

Para determinar la disipación de calor de las suspensiones coloidales formadas por NPM de CS/AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> suspendidas en agua, de NPM de AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> suspendidas en hexano y NPM de DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> suspendidas en agua, se utilizó el procedimiento descrito en la sección 3.4.2.



**Figura 6. 9.** Curvas de temperatura en función del tiempo para la muestra HD obtenidas a 260 kHz y diferentes amplitudes de campo magnético.

En la Figura 6. 9 se observan las curvas de temperatura en función del tiempo para la muestra HD a diferentes amplitudes de campo magnético y una frecuencia de 260 kHz. Se observa que la pendiente de las curvas de calentamiento y la temperatura final aumentan a medida que se aumenta la amplitud del campo magnético. Los valores de SAR obtenidos mediante este método para los diferentes coloides se presentan en la Tabla 6.4.

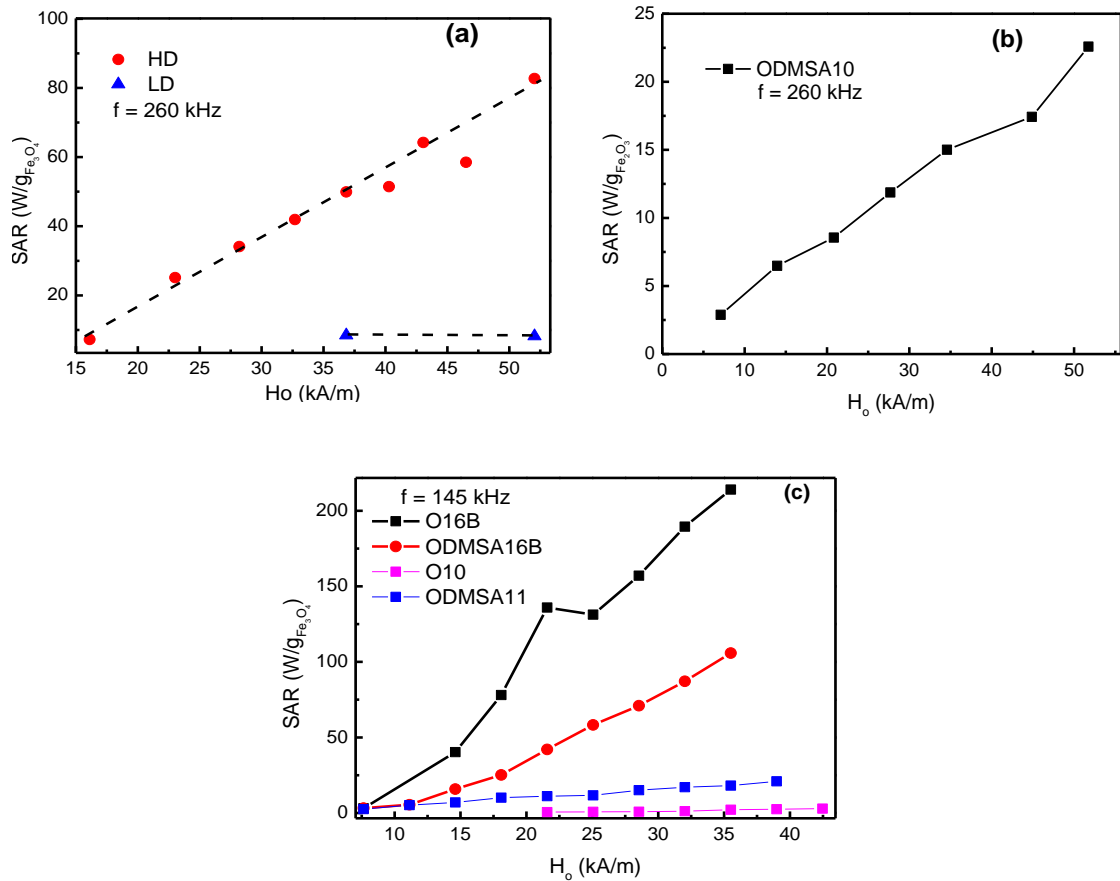
Puesto que el SAR depende de la amplitud de campo magnético ( $H_0$ ), se realizaron medidas a frecuencia constante y variando la amplitud del campo, estos resultados se presentan en la Figura 6.10. Se puede observar que el SAR aumenta a medida que se aumenta la amplitud del campo magnético. Según la ecuación 38 el SAR depende de  $H_0^2$  bajo el modelo de respuesta lineal. Este comportamiento no es observado para la muestra HD ni para la muestra ODMSA10 a 260 kHz, donde el cambio del SAR es casi

lineal y constante para la muestra LD, aunque si es observado para la muestra ODMSA16B (Figura 6.10(b)).

MUESTRA	[x] (mg/mL)	$f$ (kHz)	$H_0$ (kA/m)	$SAR_{exp}$ (W/g)	$SAR_{simulado}$ (W/g)
HD	3.19	260	52.0	82.70	79.01
LD	1.73	260	52.0	8.20	0.10
O10	7.15	260	52.0	45.10	1.78
ODMSA10	14.79	260	52.0	22.60	24.99
ODMSA11	6.86	145	39.0	21.00	135.72
O16	8.79	260	52.0	80.20	1450.50
O16B	8.60	145	35.6	214.00	341.27
ODMSA16B	6.47	145	35.6	67.67	1267.90

**Tabla 6.4.** Resultados de SAR determinados a partir de medidas calorimétricas.

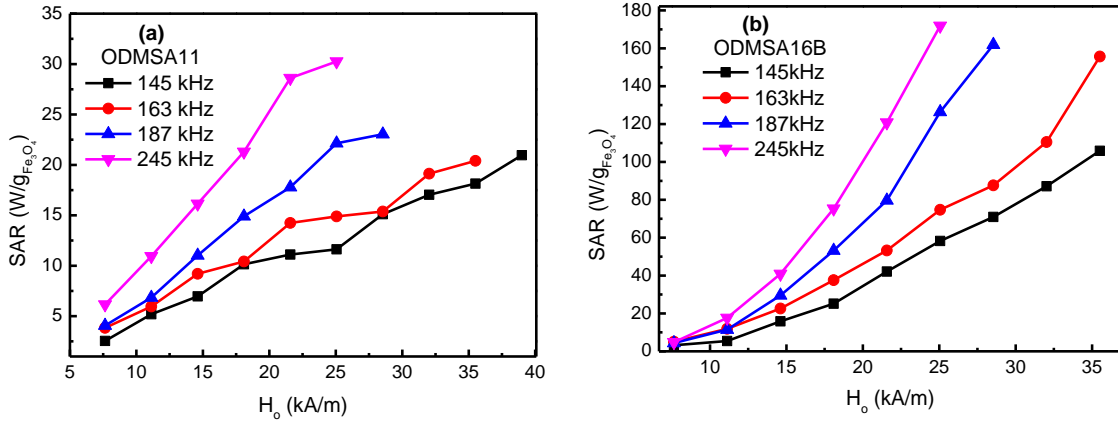
Tanto la amplitud del campo como su frecuencia son parámetros de control de la potencia específica disipada por una dada NPM. Por tal motivo, se realizaron medidas de SAR a varias frecuencias para las muestras ODMSA11 y ODMSA16B, los resultados se presentan en la Figura 6. 11.



**Figura 6. 10.** SAR vs  $H_o$  para las muestras (a) HD y LD, (b) ODMSA10, (c) O16B, ODMSA16B, O10 y ODMSA11.

Se puede observar que para la muestra ODMSA11 y la muestra ODMSA16B el SAR aumenta a medida que se aumenta la frecuencia a un campo magnético constante. Para la muestra ODMSA11 se observa un aumento lineal del SAR como función de  $H_o$  y para la muestra ODMSA16B se observa una curvatura más acentuada y aumenta a medida que se aumenta la frecuencia de 145 a 245 kHz.

Así, del análisis de la Figura 6.10 y 6.11, se puede concluir que el comportamiento de la curva de SAR vs  $H_o$  más cercano al predicho por el modelo de respuesta lineal (ecuación 38) es observable para las NPM de mayor tamaño para el rango de frecuencias estudiado. En los sistemas HD, LD, ODMSA10 y ODMSA11 que poseen los menores valores de tamaño de partícula el comportamiento observado de la curva SAR vs  $H_o$  es lineal.

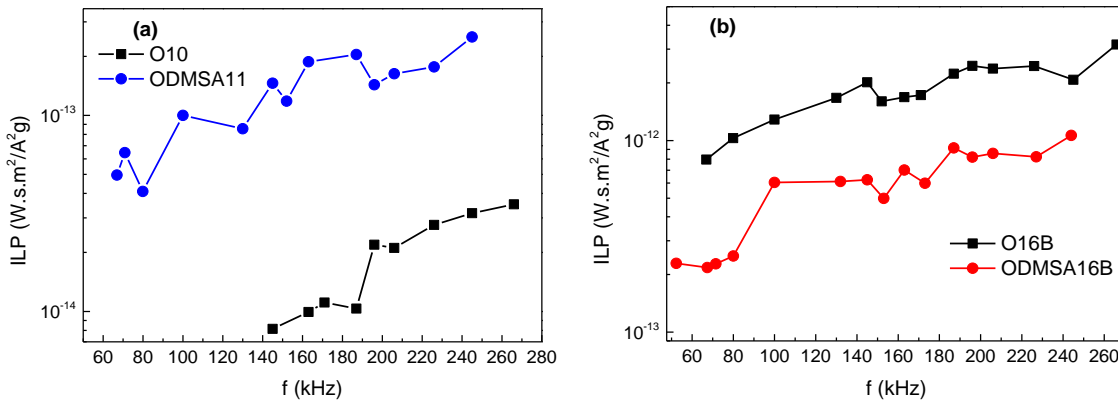


**Figura 6. 11.** SAR vs  $H_0$  para diferentes frecuencias para las muestras (a) ODMSA11 y (b) ODMSA16B.

Con la finalidad de comparar los datos de SAR obtenidos para las diferentes muestras a diferentes valores de frecuencia y amplitud de campo se utiliza la propiedad conocida como ILP (*Intrinsic Loss Power*<sup>70</sup>) la cual representa el SAR normalizado por el producto  $fH_0^2$ .

$$125. \quad ILP = \frac{SAR}{fH_0^2}$$

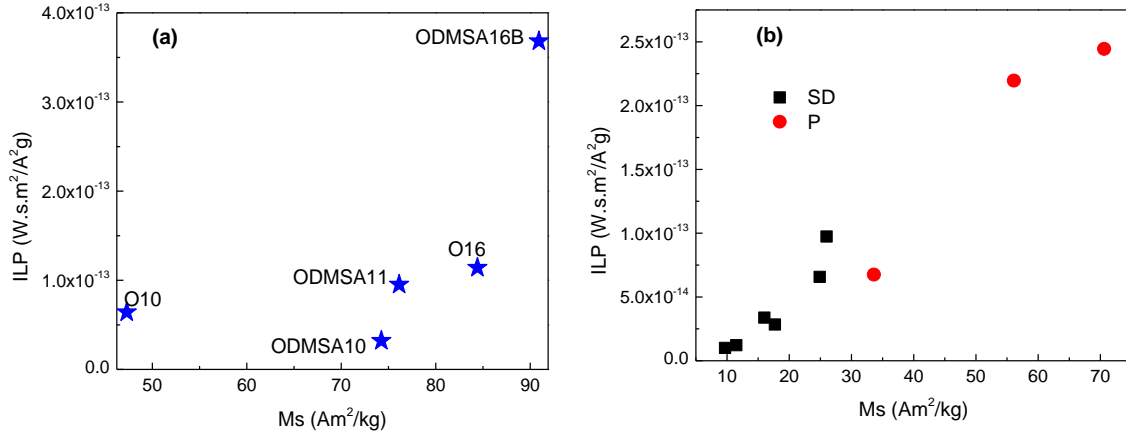
El comportamiento del ILP en función de la frecuencia para las muestras O10, ODMSA11, O16B y OMDAS16B se presenta en la Figura 6. 12 donde se observa que el ILP para la muestra ODMSA11 es un orden de magnitud mayor que para la muestra O10 y posee el mismo orden de magnitud para las muestras O16B y ODMSA16B.



**Figura 6. 12.** Comportamiento del ILP vs  $f$ . (a) Muestras O10 y ODMSA11. (b) Muestras O16B y ODMSA16B.

En la figura 6.13 se puede observar el aumento del ILP a medida que se aumenta la  $M_s$  de las partículas. Este comportamiento también es predicho por el modelo de respuesta

lineal propuesto en la ecuación 33 donde el SAR es proporcional a  $M_s^2$ . La misma tendencia también fue observada en la ref. 53 para NPM de  $AC@Fe_3O_4$  del mismo tipo de las descritas en la sección 3.1.4 y que se replica en la figura 6.15 (b).

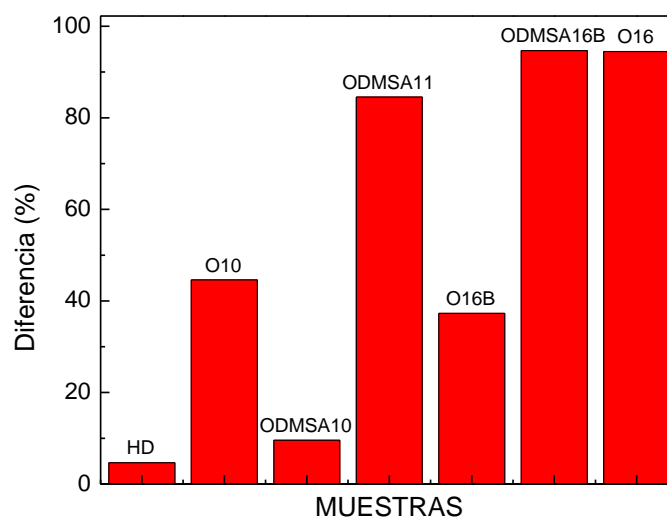


**Figura 613.** Comportamiento del ILP en función de la magnetización de saturación específica. **(a)** NPM de  $AO@Fe_3O_4$  en hexano y NPM de  $DMSA@Fe_3O_4$  dispersas en agua. **(b)** NPM de  $AC@Fe_3O_4$  dispersas en agua. Las muestras O10, ODMSA10, O16 fueron medidas a  $H_0 = 52$  kA/m y  $f = 260$  kHz. Las muestras O16B y ODMSA16B fueron medidas a  $H_0 = 35$  kA/m y  $f = 145$  kHz. La muestra ODMSA11 fue medida a  $H_0 = 39$  kA/m y  $f = 145$  kHz. Las muestras del tipo SD y P fueron medidas a  $H_0 = 40.1$  kA/m y  $f = 265$  kHz

Utilizando las propiedades estructurales de los coloides determinadas por TEM y SAXS junto con las propiedades magnéticas como magnetización de saturación específica ( $M_s$ ) y constante de anisotropía ( $K_{eff}$ ), se simuló el SAR de las NPM por medio del modelo de respuesta lineal (ecuación 38). Para realizar las simulaciones se utilizó una función de distribución gaussiana volumétrica de diámetros de partícula ( $g(d)$ ), es decir la fracción de volumen magnético ocupado por partículas de volumen  $V$ , de forma que:

$$126. \quad g(d) = \frac{Vf(d)}{\langle V \rangle}$$

donde  $f(d)$  es una distribución gaussiana de número de partículas con diámetros entre  $d$  y  $d+dd$  la cual fue determinada por SAXS y TEM para todos los sistemas estudiados. El SAR simulado de esta forma se presenta en la Tabla 6.4 para las frecuencias y amplitudes de campo especificadas para cada coloide y la diferencia porcentual entre el SAR experimental y el SAR simulado se presenta en la figura 6.14.



**Figura 6. 14.** Diferencia porcentual entre SAR experimental y SAR simulado para las muestras en estudio.

En la figura 6.14 no se presenta la muestra LD puesto que presenta una diferencia porcentual mayor al 100%. De la misma figura podemos decir que el modelo utilizado para simular el SAR no reproduce todos los valores de SAR experimentales obtenidos por medidas calorimétricas. Para las muestras HD y ODMSA10 la diferencia entre el modelo teórico y el valor experimental es de 4.7 y 9.6%, este porcentaje es mucho mayor para las otras muestras.

Cabe resaltar que el éxito de la aplicación de la ecuación 38 depende de tres factores importantes: Primero, la correcta determinación de las magnetización de saturación específica y la constante de anisotropía, segundo, la correcta determinación de los tamaños de partícula y su dispersión, tercero, la estructura del coloide, se necesita definir con exactitud si la suspensión coloidal se encuentra formada por NPM en estado libre o agregado.

Aunque el modelo tiene en cuenta los dos primeros factores, no tiene en cuenta la agregación de las NPM y por lo tanto las interacciones que se generan entre las mismas y que pueden afectar el SAR; este punto será tratado en el siguiente capítulo. Por ahora estudiaremos las causas o condiciones que hacen que una suspensión coloidal disipe y como se relaciona esto con lo predicho en el modelo teórico.

En primer lugar, la función  $\chi''(\omega, \tau(d))$  determina la respuesta de las NPM a campos alternos y tiene un máximo cuando  $\omega\tau = 1$  es decir cuando el tiempo de relajación de una nanopartícula de tamaño *des* igual al tiempo de observación.



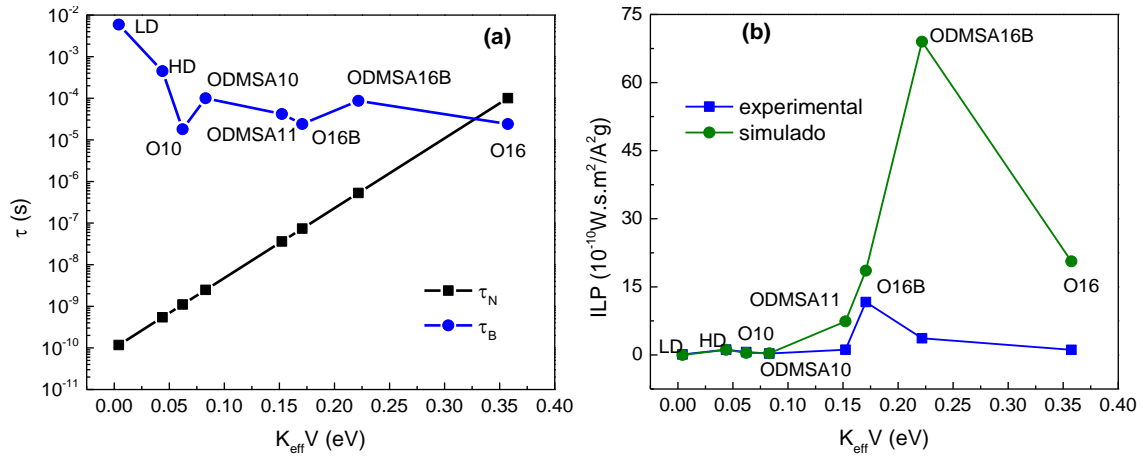
En el caso de las medidas SAR, se utiliza un campo de radiofrecuencia cuya amplitud de campo y frecuencia son mucho mayores a las utilizadas en magnetometría d.c., pero en la zona de respuesta lineal de la magnetización de las NPM, donde es aplicable la ecuación 38.

MUESTRA	$\tau_N$ (s)	$\tau_B$ (s)	$\tau$ (s)
HD	$5.5 \times 10^{-10}$	$4.5 \times 10^{-4}$	$5.5 \times 10^{-10}$
LD	$1.2 \times 10^{-10}$	$5.9 \times 10^{-3}$	$1.2 \times 10^{-10}$
O10	$1.1 \times 10^{-9}$	$1.8 \times 10^{-5}$	$1.1 \times 10^{-9}$
ODMSA10	$2.5 \times 10^{-9}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$2.5 \times 10^{-9}$
ODMSA11	$3.5 \times 10^{-8}$	$4.2 \times 10^{-5}$	$3.5 \times 10^{-8}$
O16	$1.0 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-5}$	$1.9 \times 10^{-5}$
O16B	$7.7 \times 10^{-8}$	$2.4 \times 10^{-5}$	$7.7 \times 10^{-8}$
ODMSA16B	$5.3 \times 10^{-7}$	$8.7 \times 10^{-5}$	$5.3 \times 10^{-7}$

**Tabla 6.5.** Tiempos de relajación calculados usando las ecuaciones 34 y 36 para las NPM de los coloides listados. Los parámetros estructurales como tamaño de partícula y su dispersión determinados de medidas TEM y SAXS. Los parámetros magnéticos como  $M_s$  y  $H_c$  fueron obtenidos de las curvas de magnetización d.c.

Como se dijo anteriormente, se consideran dos mecanismos de relajación de partículas, con tiempos característicos  $\tau_B$  (Brown) y  $\tau_N$  (Néel) determinados por las ecuaciones 34 y 36 respectivamente. Los cálculos de  $\tau_B$ ,  $\tau_N$  y tiempo total de relajación ( $\tau$ ) son presentados en la Tabla 6.5.

Para los cálculos de los tiempos de relajación se utilizó  $\tau_o = 1 \times 10^{-10}$  s, el valor de  $K_{eff}$  determinado a partir de las curvas de  $H_c$  vs  $T$ , el tamaño medio de partícula determinado por TEM y SAXS, la viscosidad<sup>71</sup> a 300K del agua ( $0.7978 \times 10^{-3}$  Pa.s) y del hexano ( $2.94 \times 10^{-4}$  Pa.s). El radio hidrodinámico fue determinado por DLS para las muestras HD y LD (Tabla 4.2) y fue tomado de la ref. 47 para las muestras AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Tabla 4.3).



**Figura 6. 15. (a)** Comportamiento de los tiempos de relajación en función de la energía de anisotropía ( $K_{eff}V$ ). **(b)** Comparación entre el ILP experimental y el simulado como función de  $K_{eff}V$ .

En la Figura 6.15(a) se muestra el comportamiento de los tiempos de relajación de Néel y de Brown listados en la Tabla 6.5 con respecto a la energía de anisotropía ( $K_{eff}V$ ). Aunque no se espera una relación entre el tiempo de relajación de Brown y la energía de anisotropía, se observa una ligera disminución de  $\tau_B$  a medida que aumenta  $K_{eff}V$ . La comparación de los valores de  $\tau_B$ ,  $\tau_N$  junto con la suposición de independencia entre modos de relajación, sugiere que todas las muestras responden con el mecanismo de relajación de Néel, a excepción de la muestra O16 que responde por Brown.

En la Figura 6.15 (b) se puede apreciar el ILP, calculado con las frecuencias y amplitudes de campo listados en la Tabla 6.4 para cada muestra, en función de  $K_{eff}V$ . En la misma se puede apreciar que los valores simulados coinciden con los valores experimentales cuando el mecanismo de Néel gobierna la relajación de las NPM, a medida que el tiempo de Néel aumenta y el tiempo de Brown disminuye el acuerdo entre el modelo y los resultados experimentales es cada vez menor, teniendo la mayor diferencia para las muestras ODMSA16B y O16. Esto también podría estar asociado con que para la simulación se utilizó un valor de tamaño hidrodinámico medio y no se considera una distribución de tamaños hidrodinámicos.

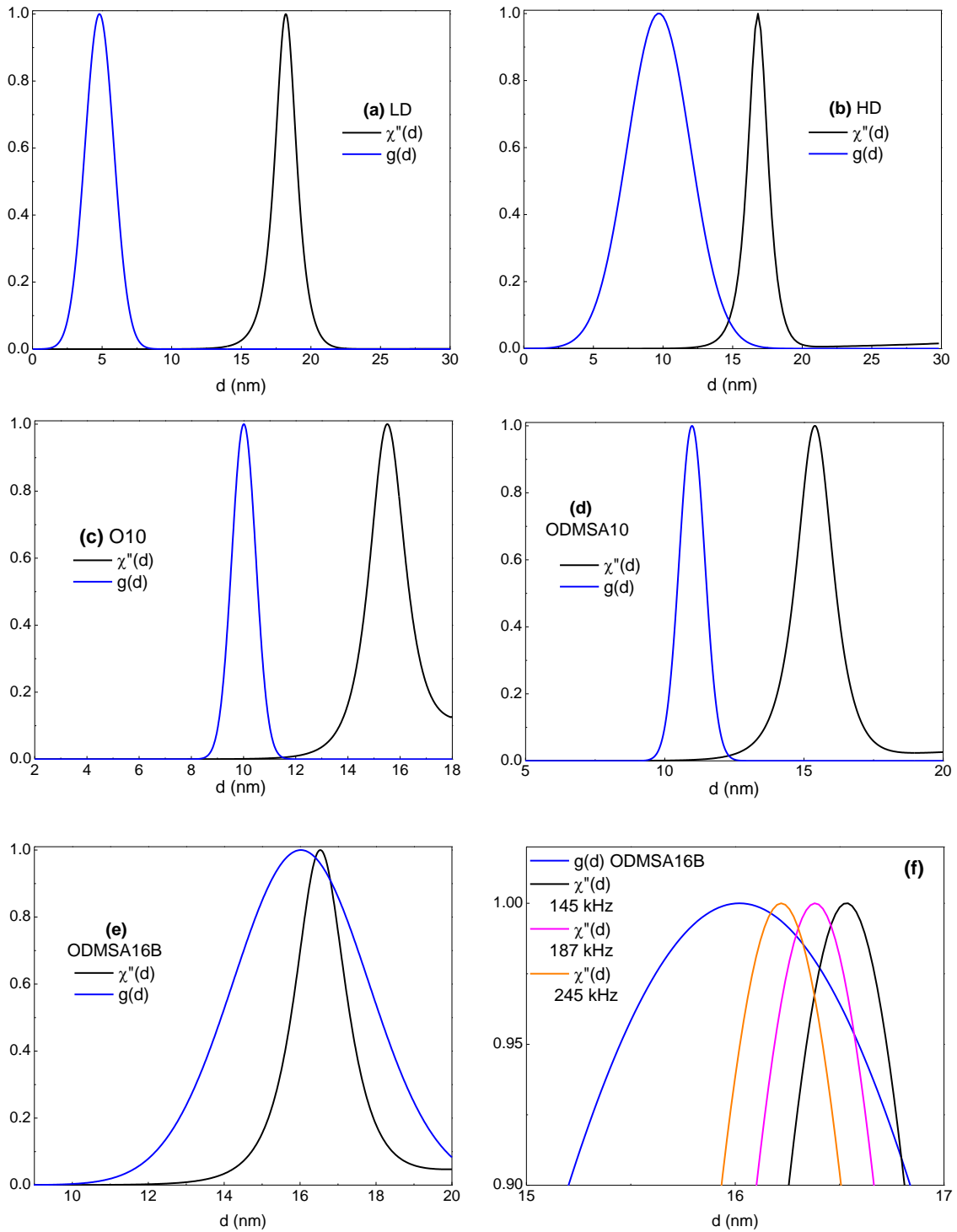
Una vez establecido el mecanismo de relajación magnética en cada coloide estudiado, se analiza la influencia de la polidispersión de tamaño de las NPM, dada por la función de distribución  $g(d)$ . Puesto que el SAR es proporcional a la integral para todos los tamaños de partícula del producto  $\chi''(\omega, \tau(d)) \cdot g(d)$  es claro que cuando las posiciones de los máximos de las funciones  $\chi''(\omega, \tau(d))$  y  $g(d)$  coinciden el SAR es máximo, puesto que

para cada coloide la función  $g(d)$  no varía es posible sintonizar la función  $\chi''(\omega, \tau(d))$  variando la frecuencia del campo a.c. aplicado, llevando más partículas a la condición de resonancia.

En la Figura 6.16 se presenta el comportamiento de la función  $\chi''(d)$  para diversos coloides y se compara con la respectiva función  $g(d)$ . Se observa que para los coloides que presentan menos SAR experimental, como es el caso de las muestra LD, O10 y ODMSA10, el área de superposición de las funciones  $\chi''(d)$  y  $g(d)$  es nula o muy pequeña en comparación con el área de superposición observada en las muestras HD y ODMSA16B que presentan mayor SAR.

Es importante notar, que para la frecuencia de 145 kHz, la muestra ODMSA16B presenta la mayor superposición de áreas, en comparación con las otras muestras.. De los resultados experimentales listados en la Tabla 6.4 se ve que es esta muestra la que presenta mayor SAR en comparación con las muestras recubiertas con DMSA.

Sobre la muestra ODMSA16B se realizaron cálculos de  $\chi''(d)$  a diferentes frecuencias y con una amplitud de campo de 35.6 kA/m, se observa en la Figura 6.18 (f) que a medida que se aumenta la frecuencia, la posición del pico de la función  $\chi''(d)$  se acerca al de la función  $g(d)$  lo cual deriva en un aumento del SAR, este comportamiento fue observado experimentalmente en la Figura 6. 11.



**Figura 6. 16.** Comportamiento  $\chi''(d)$  en relación a la distribución de tamaños de partícula ( $g(d)$ ) para las muestras (a) LD, (b) HD, (c) O10, (d) ODMSA10 y (e) ODMSA16B. (f) Se presenta el corrimiento del pico máximo de  $\chi''(d)$  para diferentes frecuencias.

Para finalizar podemos concluir que a pesar de no haber concordancia entre los valores simulados y experimentales del SAR, el uso del modelo de respuesta lineal sirve para determinar una tendencia cualitativa acerca del SAR producido por un coloide.

De los resultados experimentales, podemos concluir que a mayor tamaño de partícula mayor es el SAR obtenido de la suspensión coloidal. El mayor tamaño medio de partícula provoca que la temperatura de bloqueo de las NPM aumente.

Para partículas de igual tamaño, existe una influencia del estado de agregación de las NPM. En general, para un mismo tamaño de partícula, el SAR disminuye cuando aumenta el porcentaje de agregación (determinado por SAXS). Este es el caso de las NPM O10, ODMSA10, O16B y ODMSA16B, donde se observa un porcentaje de agregación menor en las NPM dispersas en hexano en relación a las NPM dispersas en agua, los coloides O10 y O16 presentan un mayor SAR que los coloides homólogos, en fase acuosa, ODMSA10 y ODMSA16B. Esta disminución podría estar asociada a la supresión del mecanismo de Brown de las NPM en el agregado, evidencia de esto es la muestra O16, la cual presenta el mayor SAR medido, tiene un porcentaje de agregación del 6% y disipa por el mecanismo de Brown.

También se observa que las constantes de anisotropía son mayores en las NPM dispersas en agua que en las NPM dispersas en hexano. Debido a que la distancia entre partículas disminuye por el cambio de ligando desde AO hacia DMSA, las NPM dispersas en agua están más cerca y su energía de interacción dipolar aumenta. Por esto, los datos anteriores determinan que los sistemas interactuantes disipan más que los sistemas no interactuantes. Esto también fue observado para las muestras HD y LD, donde según la estructura determinada por SAXS en cada partícula de quitosano, las NPM de la muestra HD están más cerca que las NPM de la muestra LD.



# CAPÍTULO 7: INTERACCIONES DIPOLARES MAGNÉTICAS EN SUSPENSIONES COLOIDALES

## 7.1. INTERACCIONES DIPOLARES Y DE VAN DER WAALS ENTRE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

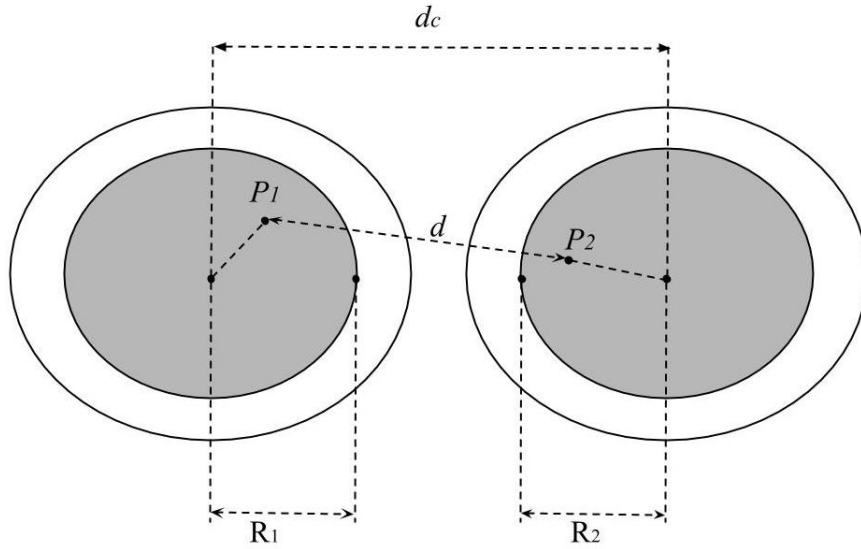
Como se determinó en el análisis estructural de las suspensiones coloidales, las NPM de las mismas se encuentran en coexistencia con estructuras agregadas. Las NPM en los agregados se encuentran a una distancia muy pequeña, del orden del recubrimiento que posean, por lo cual las interacciones dipolares se incrementan. La coexistencia de las dos estructuras en el coloide es reflejo de un equilibrio térmico entre las NPM agregadas y las no agregadas<sup>56</sup>.

Esta auto-organización es resultado de la competencia entre la energía dipolo-dipolo ( $E_{dip}$ ), la cual es de carácter atractivo y tiende a formar estructuras anisótropas como cadenas unidimensionales, la energía London-van der Waals ( $E_{vdw}$ ), la cual es de carácter atractivo y tiende a formar estructuras isotrópicas como agregados esféricos tridimensionales; y la energía estérica ( $E_s$ ) que es de carácter repulsivo e impide la interpenetración entre las moléculas del recubrimiento de dos partículas diferentes.

La capa surfactante se considera como una capa rígida de espesor  $t_c$  de forma que  $E_s = \infty$  para una separación entre la superficie de las partículas menor a  $2t_c$  y  $E_s = 0$  para sí la distancia es mayor a  $2t_c$ .

La energía de interacción de *London-Van der Waals* entre dos partículas de radio  $R_1$  y  $R_2$  respectivamente cuyos centros están separados una distancia  $d_c$ , tal como se presenta en la Figura 7. 1, está definida por:

$$127. \quad E_{vdw} = - \int_{V_1} dv_1 \int_{V_2} \frac{\rho^2 \Lambda}{d^6} dv_2$$



**Figura 7. 1.** Dos partículas esféricas de radios  $R_1$  y  $R_2$  separadas una distancia  $d_c$ .

donde  $\Lambda$  es la constante de London-van der Waals,  $\rho$  la densidad electrónica,  $V_1 y dv_1$  son el volumen total y el diferencial de volumen en el punto  $P_1$  y  $V_2 y dv_2$  son el volumen total y el diferencial de volumen en el punto  $P_2$  separado una distancia  $d$  de  $P_1$ .

La integración de la ecuación 127 sobre todo el volumen de cada partícula<sup>72</sup> es:

$$128. \quad E_{vdW} = -\frac{A_H}{6} \left\{ \frac{2R_1R_2}{d_c^2 - (R_1+R_2)^2} + \frac{2R_1R_2}{d_c^2 - (R_1-R_2)^2} + \ln \left( \frac{d_c^2 - (R_1+R_2)^2}{d_c^2 - (R_1-R_2)^2} \right) \right\}$$

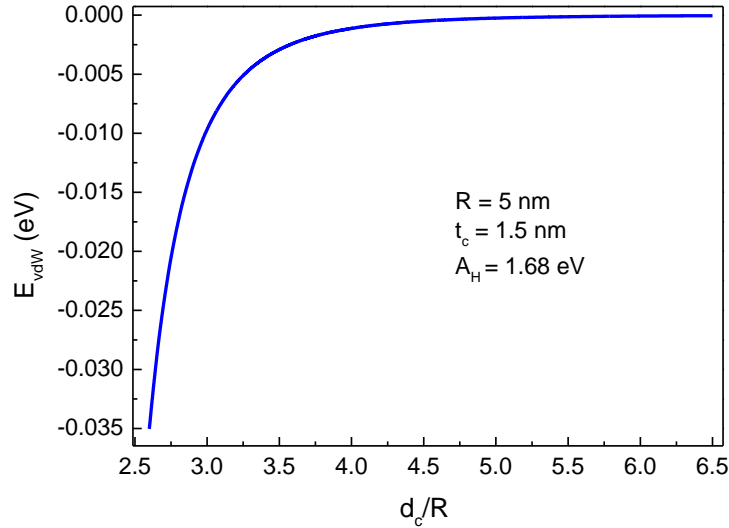
La constante de Hamaker ( $A_H$ ) depende de las propiedades dieléctricas de las NPM y del medio en la cual se encuentran:

$$129. \quad A_H = (A_{HNPM}^{1/2} - A_{Hm}^{1/2})^2$$

donde  $A_{HNPM}$  y  $A_{Hm}$  representan la constante de Hamaker de la NPM y del medio respectivamente.

El comportamiento de la interacción de London-van der Waals entre dos partículas de radio  $R = 5$  nm recubiertas con una capa surfactante de espesor  $t_c = 1.5$  nm, en función de la separación entre los centros de las partículas se presenta en la Figura 7. 2 para el caso de partículas en contacto  $d_c = 2R + 2t_c$ .





**Figura 7. 2.** Energía de interacción London-van der Waals en función de la separación entre partículas. En modo contacto  $d_c=2R+2t_c$ .

Se puede observar en esta figura, que la energía de atracción en modo contacto es mayor y tiende a cero cuando se separan las partículas.

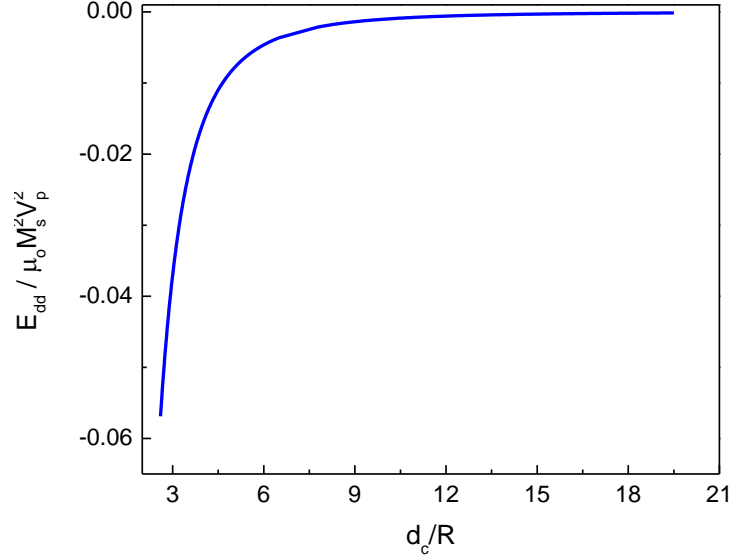
Por otro lado, como se estudió en la sección 2.3, debido al carácter magnético de las NPM que forman el coloide, puede existir interacción magnética dipolar ( $E_{dip}$ ) entre los momentos magnéticos  $\mu_k$  de la partícula  $k$  y  $\mu_j$  de la partícula  $j$ . Al igual que la  $E_{vdw}$  la energía de interacción dipolar depende de la distancia entre los centros de las partículas  $r_{kj}$ :

$$130. \quad E_{dip} = \frac{\mu_0}{4\pi} \left( \frac{\vec{\mu}_k \cdot \vec{\mu}_j}{|\vec{r}_{kj}|^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_k \cdot \vec{r}_{kj})(\vec{\mu}_j \cdot \vec{r}_{kj})}{|\vec{r}_{kj}|^5} \right)$$

Para minimizar la energía los momentos de las NPM y el vector posición deben disponerse en la configuración "cabeza cola", de forma que para dos partículas iguales de magnetización de saturación  $M_s$  se tiene que la energía de interacción dipolar está dada por:

$$131. \quad E_{dd} = -\frac{\mu_0 M_s^2 V_P^2}{2\pi d_c^3}$$

Al igual que la energía de London-van der Waals, la energía dipolar tiende a cero cuando la distancia entre partículas aumenta. Este comportamiento se puede observar en la Figura 7. 3:



**Figura 7. 3.** Energía de interacción dipolar en función de la separación entre partículas. En modo contacto  $d_c=2R+2t_c$

Es de resaltar que la energía de interacción dipolar depende del tamaño magnético ( $\langle D_{mag} \rangle$ ) de la NPM el cual es menor que el radio total y depende del momento magnético medio ( $\mu$ ) de la partícula y de la magnetización de saturación volumétrica del material macroscópico ( $M_{bulk}$ ):

La posibilidad de la formación de agregados dentro del coloide se puede cuantificar utilizando un *parámetro de agregación*<sup>56,73</sup> ( $\lambda_A$ ) definido como la relación entre la energía total de interacción de dos partículas y su energía térmica  $2k_B T$ :

$$132. \quad \lambda_A = \left| \frac{E_{vdW} + E_{dd}}{2k_B T} \right|$$

Los existencia de los agregados es posible si  $\lambda_A > 1$ . Es decir, las energías de interacción son mayores a la energía térmica que trata de desordenar el sistema.

En la Tabla 7. 1 se presentan los valores calculados para  $E_{dip}$ ,  $E_{vdW}$  y  $\lambda_A$  para los coloides formados por NPM de AO@CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> calculados con las ecuaciones 132, 128 y 131. El espesor de la capa surfactante ( $t_c$ ) fue medido de las imágenes TEM a partir de la separación entre partículas. Para el hierro y sus correspondientes óxidos<sup>72</sup>  $A_H$  toma valores entre  $0.3 \times 10^{-19}$  y  $3 \times 10^{-19}$  J. Para la capa surfactante de ácido oleico<sup>74</sup> tiene un valor de  $2.45 \times 10^{-20}$  J y para el hexano<sup>75</sup> se encuentra en el rango de  $3.8$  y  $5.48 \times 10^{-20}$  J. Para las NPM de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> se toma  $A_H = 2.7 \times 10^{-19}$  J (1.68 eV).

Para todos los coloides se observa que  $|E_{vdW}| > |E_{dip}|$  lo cual indica que el comportamiento está fuertemente influenciado por las interacciones de London-van der Waals. Se encontró que  $\lambda_A < 1$  para  $C_{be}$  y  $C_{od}$ , lo cual indica que si dos partículas interaccionan entre sí, el enlace se puede romper debido a la energía térmica, por lo tanto no existe agregación de las NPM, en acuerdo con lo observado en los resultados estructurales de SAXS.. Para los coloides  $C_{pe}$  y  $C_{tA}$  se encontró que  $\lambda_A > 1$  lo cual indica que las energías de interacción son mayores a la energía térmica, lo cual hace que los agregados sean estables y puedan observarse con SAXS tal como fue expuesto en la sección 4.1.

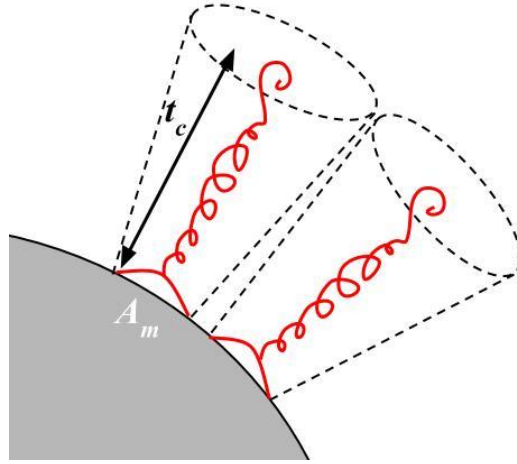
Coloide	$M_s(\text{Am}^2/\text{kg})$	$\langle D_{mag} \rangle$ (nm)	$t_c$ (nm)	$E_{dd}$ ( $10^{-3}$ eV)	$E_{vdW}$ ( $10^{-3}$ eV)	$\lambda_A$	$\zeta$	$V_M$ ( $\text{nm}^3$ )
$C_{be}$	40.2	3.9	1.2	-0.2	-39.0	0.7	438	0.33
$C_{od}$	67.3	7.8	1.7	-2.9	-47.0	0.9	1106	0.46
$C_{pe}$	17.1	1.5	1.5	-0.002	-90.0	1.3	90	0.81
$C_{tA}$	48.1	5.2	1.0	-0.8	-99.0	1.9	745	0.23

**Tabla 7. 1.** Energía de interacción dipolar ( $E_{dip}$ ) calculada a partir de las propiedades magnéticas de las NPM: Magnetización de saturación a 400 K ( $M_s$ ) y tamaño magnético ( $\langle D_{mag} \rangle$ ). El cálculo de la energía de London-van der Waals ( $E_{vdW}$ ) se calcula utilizando los parámetros estructurales como la distancia entre centros incluyendo el espesor de la capa surfactante ( $t_c$ ).  $\lambda_A$  el parámetro de agregación calculado para  $2k_B T = 5.17 \times 10^{-2}$  eV ( $T = 300$  K).  $\zeta$  es el número de moléculas de AO en la superficie de las NPM y  $V_m$  es el volumen de movilidad de las moléculas de AO.

Para todas las NPM de la Tabla 7.1 se tiene que la energía de van der Waals es mayor que la energía dipolar, motivo por el cual se espera la formación de agregados de forma tridimensional. Esto es acorde con lo observado por SAXS, donde la dimensión fractal toma valores cercanos a 3 para las muestras  $C_{tA}$  y  $C_{tB}$ .

Para la muestra  $C_{pe}$ , los resultados de SAXS indican un exponente fractal de 1.33, lo cual corresponde a la observación de estructuras lineales de NPM, motivo por el cual se espera que la energía dipolar sea la responsable de formar y mantener estas estructuras. Lo contrario se observa en los resultados de la Tabla 7.1, donde  $|E_{vdW}| > |E_{dip}|$ , lo cual está en desacuerdo con la observación de estructuras lineales de NPM.

Una posible explicación para la discrepancia anterior, es haber considerado el modelo de capa rígida para el recubrimiento de las NPM de  $C_{pe}$ . Suponer que es posible la interpenetración entre las capas surfactantes de las NPM podría dar cuenta de los resultados obtenidos. Para demostrar esto, el número de moléculas ( $\zeta$ ) de ácido oleico en la superficie de las NPM y su volumen de movilidad ( $V_M$ ) se calculan. Los resultados se presentan en la Tabla 7.1.



**Figura 7. 4.** Representación esquemática de la unión de las moléculas a la capa surfactante a la superficie de la NPM. El volumen de movilidad de las moléculas de AO está determinado por un cono de altura  $t_c$ .

Utilizando la representación esquemática de la Figura 7. 4, se puede deducir que si  $A_m$  es el área de interacción entre el AO y la NPM ( $0.5 \text{ nm}^2$ ) y si  $A_p = \pi D^2$  es el área de la nanopartícula de diámetro  $D$ , entonces el número de moléculas de ácido oleico sobre la superficie de la NPM es:

$$133. \quad \zeta = \frac{A_p}{A_m}$$

El volumen de movilidad de la molécula de ácido oleico es igual al volumen de la sección cónica determinada por el tamaño de la nanopartícula y el espesor del recubrimiento:

$$134. \quad V_M = \left(1 + \frac{2t_c}{D}\right) \frac{A_m t_c}{3}$$

De esta forma, se establece una relación entre el volumen de movilidad de una moléculas de la capa surfactante y el diámetro de la partícula, entre más pequeña las NPM mayor volumen de movilidad tienen las moléculas del recubrimiento. Este comportamiento es observado en los resultados de la Tabla 7. 1.

De esta forma, se observa que las NPM de  $C_{pe}$  tienen un menor número de moléculas de AO en la superficie y por tanto mayor volumen de movilidad por molécula, este aumento de volumen, hace que sea posible la presencia de espacios a partir de los cuales los recubrimientos de dos NPM puedan interpenetrarse, disminuyendo la distancia entre partículas y aumentando la energía dipolar, consecuentemente la formación de agregados lineales es posible para esta muestra.

Dicho esto, se estudia el comportamiento de las energías dipolar y de London-van der Waals para los coloides a los cuales se les ha realizado un cambio superficial de ligando. En la Tabla 7. 2 se presenta la estimación de las energías dipolar y de van der Waals en modo contacto de las NPM de  $AO@Fe_3O_4$ ,  $DMSA@Fe_3O_4$  y  $CS/AO@Fe_3O_4$ . Los tamaños de partícula utilizados para el cálculo fueron los estimados por SAXS, mientras que el espesor de la molécula utilizado para el ácido oleico<sup>76</sup> fue de 1.97 nm y de 1 nm para el DMSA<sup>77</sup>, para las NPM de  $CS/AO@Fe_3O_4$  se consideró la separación entre centros de las NPM determinada por TEM dentro de la partícula de quitosano:  $D_{TEM}$  para HD y  $D_{TEM} + 3nm$  para LD.

Las constantes de Hamaker utilizadas para el caso de las NPM de  $AO@Fe_3O_4$  dispersas en hexano y de NPM de  $DMSA@Fe_3O_4$  dispersas en agua fueron  $1.47 \times 10^{-21}$  J y  $34 \times 10^{-21}$  J respectivamente<sup>78</sup>. Debido a que las NPM de las muestras HD y LD están inmovilizadas no se consideró la  $E_{dW}$  para este sistema y el cálculo de  $\lambda_A$  se realizó teniendo en cuenta únicamente la  $E_{dip}$ . El cálculo de  $\lambda_{ANO}$  incluye el efecto de la repulsión electrostática debida a la carga superficial generada en el DMSA.

Los resultados indican que  $\lambda_A < 1$  para todas las NPM de  $AO@Fe_3O_4$  dispersas en hexano y para las NPM de  $DMSA@Fe_3O_4$  dispersas en agua, por lo cual la energía térmica es mayor que las energías de interacción y la formación de agregados estables no sería posible. Los resultados SAXS para las muestras O16 y O16B confirman lo anterior, puesto que el grado de agregación ( $\alpha$ ) encontrado con SAXS fue de 0.06 y 0% respectivamente.

Coloide	$ E_{dd} $ ( $10^{-3}$ eV)	$ E_{vdw} $ ( $10^{-3}$ eV)	$\lambda_A$
O10	4.9	0.1	0.12
ODMSA10	8.3	12.7	0.50
ODMSA11	3.6	18.6	0.53
O16	$0.6 \times 10^{-2}$	0.3	$0.08 \times 10^{-1}$
O16B	$0.1 \times 10^{-2}$	0.3	$0.08 \times 10^{-1}$
ODMSA16B	1.4	25.4	0.64
HD	49.3	-	1.17
LD	14.2	-	0.33

**Tabla 7. 2.** Determinación de la energía dipolar, energía de van der Waals y parámetro de agregación para las NPM de AO@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, DMSA@ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, HD y LD.

Para las NPM dispersas en agua se tiene un parámetro  $\lambda_A$  mucho mayor que para las NPM dispersas en hexano, pero aún menor que 1. El grado de agregación observado por SAXS fue de 28, 60 y 13 % para las muestras ODMSA10, ODMSA11 y ODMSA16B respectivamente, mucho mayor que el observado para las muestras en hexano.

Los resultados del parámetro  $\lambda_A$  no serían consistentes con la presencia de agregados permanentes en las NPM de DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> que se ha observado con SAXS y TEM puesto que estos agregados, se forman durante el proceso de síntesis, al realizar el cambio de ligando las NPM quedan desnudas, permitiendo que las mismas estén en contacto unas con otras incrementando la energía dipolar y permitiendo la formación de agregados los cuales se mantienen cuando se realiza el recubrimiento con DMSA. Es decir, el resultado del cálculo es consistente con que no se produce agregación después del proceso de intercambio de ligando.

Los resultados obtenidos para  $\lambda_A$  en el sistema de DMSA@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> indican que no se pueden formar nuevos agregados. Estas NPM se encuentran estabilizadas electrostáticamente, y esta interacción no ha sido tenido cuenta en el cálculo de  $\lambda_A$ . Si se hubiese tenido en cuenta esta interacción el valor de este parámetro hubiese sido aún menor. La interacción electrostática aumentaría la distancia entre partículas y por lo tanto la energía dipolar como la de van der Waals disminuirían.

Para las NPM de las muestras HD y LD, se observa que la interacción dipolar es mayor para la muestra HD que para la muestra LD, consistente con la estructura observada por SAXS y TEM, que corresponde a NPM en contacto para la muestra HD y NPM separadas para la muestra LD. Considerando únicamente la energía dipolar la formación de agregados estables es más posible en la muestra HD que en la muestra LD.

Si consideramos el estado anterior de estas nanopartículas, antes de la segunda nanocrystalización durante la cual las NPM del tipo AO@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> son recubiertas con quitosano, se obtienen valores de  $\lambda_A < 1$ , confirmando que la formación de agregados en la muestra HD se debe al proceso de recubrimiento con quitosano, y a que probablemente el recubrimiento previo con ácido oleico no fue uniforme. En la Tabla 3.2 se observó que la cantidad de ácido oleico utilizada en la síntesis de la muestra HD fue menor que el utilizado en la muestra LD, lo cual avala la idea anterior.

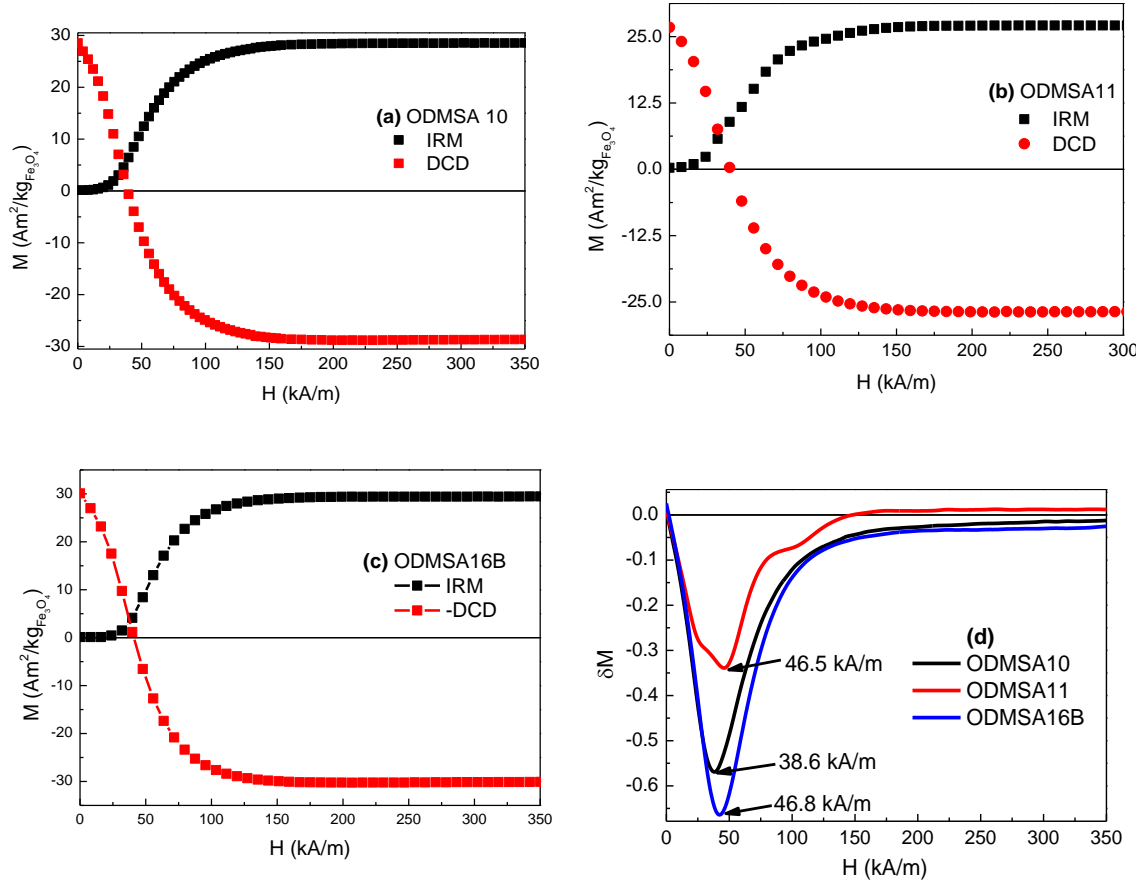
## **7.2. INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES DIPOLARES EN LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE ABSORCIÓN.**

En la sección anterior, se determinó la intensidad de las interacciones dipolar y van der Waals entre dos NPM del mismo tamaño separadas una distancia entre centros igual a su diámetro, incluyendo el espesor de su capa surfactante. En una suspensión coloidal, la aproximación anterior no siempre es útil. La polidispersión de tamaño y la concentración de la suspensión juegan un papel importante en la determinación del efecto de las interacciones dipolares en la disipación de calor de las NPM. En este caso, se debe considerar la formación de un campo dipolar producido por las NPM y como este campo interactúa con una partícula del sistema.

En primer lugar, para determinar experimentalmente la magnitud de las interacciones dipolares entre NPM en una suspensión coloidal, se realizaron medidas de magnetización remanente isotérmica (IRM) y demagnetización d.c. (DCD)<sup>79</sup>. Estas medidas que determinan solo la componente irreversible de la magnetización se realizaron sobre muestras de 100  $\mu$ L de la suspensión coloidal con magnetometría SQUID y PPMS a 5 K.

Las medidas de IRM se realizaron enfriando desde temperatura ambiente hasta 5 K sin campo magnético aplicado ( $H = 0$ ), después se aplica un pequeño campo  $H_{app}$  para magnetizar la muestra, se vuelve a  $H = 0$  y se mide la magnetización remanente. El

procedimiento se repite con un  $H_{app}$  cada vez más grande hasta alcanzar el campo de saturación magnética, para nuestro caso  $H_{app}$  se varió entre 4 y 4000 kA/m. El aumento del campo magnético se realizó en varias etapas, en la primera, desde 4 hasta 160 kA/m se midió cada 4 kA/m, de 160 hasta 800 kA/m se midió cada 8 kA/m, y el rango restante se midió cada 200 kA/m.



**Figura 7. 5.** Diagramas IRM y DCD para las muestras (a) ODMSA10, (b) ODMSA11, (c) ODMSA16B. (d) Diferencia entre las curvas IRM y DCD ( $\delta M$ ) en función del campo aplicado.

En el caso de las medidas DCD, en el estado desmagnetizado a 5 K, se aplica un campo positivo  $H_{max} = 4000$  kA/m, después se aplica un pequeño campo negativo  $H_{app}$  para magnetizar la muestra, se vuelve a  $H = 0$  y se mide la magnetización remanente. El procedimiento se repite volviendo cada vez a  $H_{max}$  y aplicando un  $H_{app}$  de magnitud cada vez más grande hasta alcanzar el campo negativo de saturación magnética, para nuestro caso  $H_{app}$  se varió entre -4 y -4000 kA/m, con rangos y variaciones iguales a los de la medida IRM. Las medidas de IRM y DCD se presentan en la Figura 7. 5 para las muestras ODMSA10, ODMSA11 y ODMSA16B.



Si dividimos la magnetización de las curvas IRM y DCD por su respectiva remanencia para campo de saturación obtenemos las magnetizaciones relativas ( $m$ ) para cada caso. Para un sistema no interactuante se cumple la siguiente relación lineal:

$$135. \quad m_{DCD} = 1 - 2m_{IRM}$$

Desviaciones de la linealidad son atribuidas a interacciones en el sistema, de forma que se puede definir el parámetro  $\delta M$  como la diferencia entre la curva  $m_{DCD}$  y el resultado de la ecuación 135:

$$136. \quad \delta M = m_{DCD} - (1 - 2m_{IRM})$$

La presencia de las interacciones en el sistema se revela en este tipos de curvas  $\delta M$  vs  $H$ , y cuanto más interactivo es el sistema más grande es el pico  $\delta M$ . De esta forma si  $\delta M < 0$  significa que la energía dipolar es la interacción dominante entre las NPM o que las mismas son más fácilmente desmagnetizables que magnetizables<sup>80</sup>.

En la Figura 7. 5(d) se presentan el cálculo de  $\delta M$  en función del campo aplicado. Como se puede observar para todas las muestras existe un pico negativo que indicaría la presencia de interacciones dipolares entre las NPM. A medida que el campo se aumenta la curva tiende a cero debido a que la energía del campo aplicado sobrepasa a la energía dipolar.

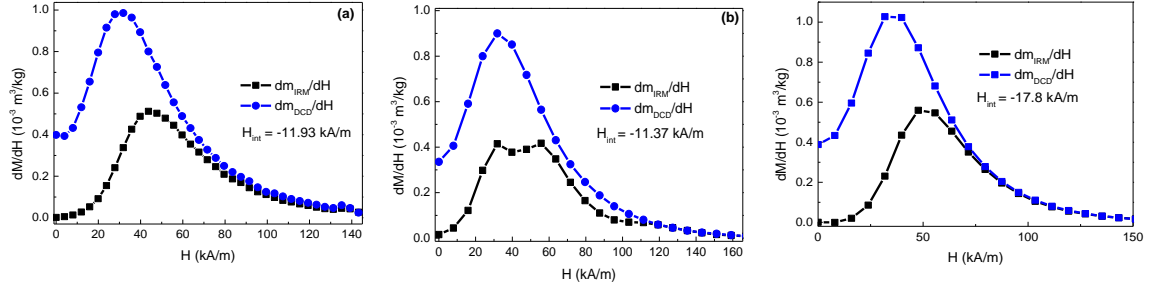
Por otro lado, a partir de la ecuación 135 se puede deducir que:

$$\frac{dm_{DCD}}{dH} = 2 \frac{dm_{IRM}}{dH}$$

La desviación de los datos experimentales de la anterior relación es atribuida a las interacciones entre partículas. Un orden de magnitud del campo medio de interacción ( $H_{int}$ ) puede obtenerse a partir de la relación<sup>81,82</sup>:

$$137. \quad H_{int} = \frac{H_{DCD} - H_{IRM}}{2}$$

Donde  $H_{DCD}$  y  $H_{IRM}$  representan el valor de campo para el cual las curvas de  $dm_{DCD}/dH$  y  $dm_{IRM}/dH$  presentan un máximo. En la Figura 7.5 se presentan estas curvas en función de la amplitud de campo para las muestras ODMSA10, ODMSA11 y ODMSA16B.



**Figura 7. 6.** Comportamiento de  $dm_{DCD}/dH$  y  $dm_{IRM}/dH$  en función del campo magnético por las muestras (a) ODMSA10, (b) ODMSA11, (c) ODMSA16B.

Los valores de  $H_{int}$  obtenidos se presentan también en la Figura 8.5. Se puede observar que para todas las muestras  $H_{DCD} > H_{IRM}$  lo cual sugiere que las interacciones producen un campo desmagnetizante.

De esta forma, se considera la energía dipolar como:

$$138. \quad E_{dip}^{\delta M} = -\mu_o H_{int}^2 V_{NPM}$$

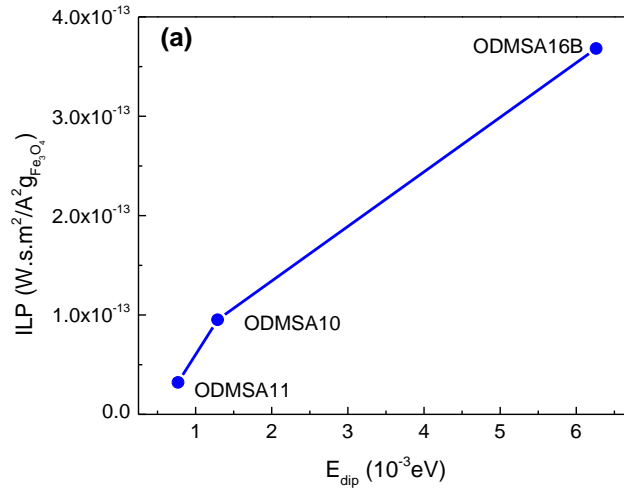
Los cálculos de la energía dipolar utilizando la ecuación 138 se presentan en la Tabla 7. 3. Se puede observar que los valores de energía dipolar encontrados son del mismo orden de magnitud que los calculados en la Tabla 7. 2.

Coloide	$H_p$ (kA/m)	$H_{int}$ (kA/m)	$ E_{dip}^{\delta M} $ ( $10^{-3}$ eV)
ODMSA10	38.6	-11.93	0.77
ODMSA11	46.5	-11.37	1.29
ODMSA16B	46.8	-17.80	6.26

**Tabla 7. 3.** Valores de pico máximo de la curva  $H_p$  y energía dipolar  $E_{dip}^{\delta M}$  obtenidos a partir de la curva de  $\delta M$  y el campo medio de interacción  $H_{int}$ .

En la Figura 7. 7 se presenta la relación entre el ILP medido en estas muestras para las muestras ODMSA10, ODMSA11 y ODMSA16B y la energía dipolar calculada con los dos métodos presentados anteriormente. En esta figura se observa que a medida que aumentan las interacciones dipolares, calculadas a partir del análisis de IRM y DCD, el ILP aumenta, estos valores difieren de los calculados en la sección anterior utilizando la ecuación 131.

Mientras que las medidas de IRM y DCD proveen una determinación experimental del campo de interacción y por lo tanto da información sobre el campo medio producido por todas las partículas analizadas, el modelo considerado en la sección anterior es solamente una estimación de la energía dipolar entre dos partículas en contacto. Motivo por el cual no se espera una concordancia perfecta entre los dos métodos.



**Figura 7. 7.** ILP vs  $E_{dip}$  obtenida para las muestras ODMSA10, ODMSA11 y ODMSA16B. Los valores de  $E_{dip}$  se calcularon a partir del análisis de la curva de IRM y DCD.

Según los resultados de la caracterización estructural por SAXS, se estableció que las NPM de la muestra ODMSA16B (16.8 nm) son más grandes que las NPM de las muestras ODMSA10 y ODMSA11 (10.98 y 13.44 nm respectivamente). Aunque la  $M_S$  de la muestra ODMSA16B es mayor que para las otras dos muestras, su mayor tamaño de partícula hace que la distancia entre centros se incremente, resultando en una energía dipolar menor para esta muestra en comparación con la muestra ODMSA11 que posee menor distancia entre centros.

Por otro lado, la muestra ODMSA16B tiene una mayor dispersión de tamaño ( $s.d$ ), por lo cual, una partícula de este coloide está rodeada por otras partículas de tamaño entre  $D-sdy D+s.d$ . Este rango, así como el tamaño del agregado, es mayor para las muestra ODMSA16B que para las otras muestras, razón por la cual se espera que el campo dipolar ( $H_{int}$ ) generado por el entorno sea mayor para esta muestra y menor para las muestras ODMSA10 y ODMSA11.

Debido a que las medidas del campo medio dipolar tienen en cuenta la influencia del entorno sobre las propiedades magnéticas de una partícula, podemos suponer es una

mejor aproximación para tener en cuenta la influencia de las interacciones dipolares en el SAR de las NPM.

Por otro lado, la influencia de un campo dipolar en SAR del coloide se puede determinar a partir de la aplicación el modelo de campo medio de Landi discutido en la sección 2.5.2, considerando una aproximación monodispersa para los coloides estudiados.

Para determinar las interacciones dipolares, se asume que  $E_{dip} = k_B T_o$ , donde  $T_o$  se calcula utilizando los parámetros estructurales del coloide determinados por SAXS y TEM y los parámetros magnéticos determinados por medidas de magnetización d.c., tal como se presentó en la ecuación 48:

$$T_o = \frac{N}{10k_B K_{mc} V_{NP}} \left( \frac{\langle \mu^2 \rangle \mu_o}{4\pi} \right)^2 \left\langle \frac{1}{d^6} \right\rangle$$

El número de partículas ( $N$ ) y la distancia entre partículas ( $d$ ), de volumen  $V$  y densidad  $\rho$ , se calcula a partir de la concentración del coloide ( $[x]$ ), suponiendo que las NPM se encuentran homogéneamente distribuidas en la suspensión:

$$139. \quad d = \left( \frac{\rho V}{[x]} \right)^{1/3}$$

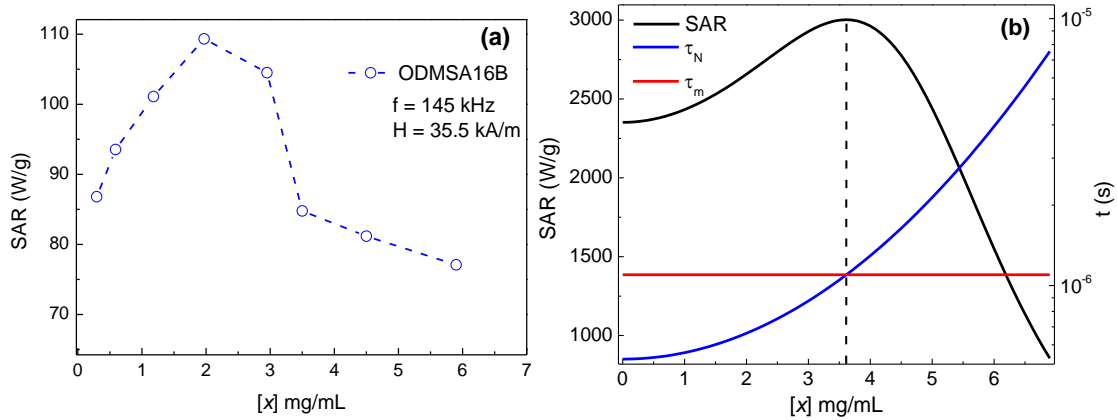
Los resultados de  $T_o$  y de  $E_{dd}$  obtenidos a partir de este modelo, utilizando los parámetros determinadas por magnetización d.c., SAXS y TEM, se presentan en la Tabla 7. 4. Los resultados indican, al igual que los otros modelos estudiados, que las muestras HD y ODMSA16B tienen menor energía de interacción dipolar en comparación a sus pares del mismo sistema.

Coloide	$T_o$ (K)	$E_{dd}$ ( $10^{-3}$ eV)	SAR <sub>Landi</sub> (W/g)	SAR <sub>exp</sub> (W/g)
LD	1588.0	136.9	0.28	8.2
HD	802.6	69.2	5.77	79.0
ODMSA10	1018.0	87.8	68.14	22.6
ODMSA11	255.2	22.0	933.50	21.0
ODMSA16B	75.4	6.5	1640.80	67.7

**Tabla 7. 4.** Determinación de  $T_o$ , la energía dipolar y el SAR calculado a partir del modelo de campo medio de Landi.

En el modelo de Landi se propone un cambio en la energía de barrera de las NPM adicionando un término energético proporcional a  $\gamma$  que representa a las contribuciones debidas a las interacciones dipolares y que además es inversamente proporcional a  $\langle d^6 \rangle$ , puesto que el primer momento del campo dipolar, inversamente proporcional a  $\langle d^3 \rangle$  se anula. Por lo tanto la concentración del coloide, que define la distancia entre partículas, influye de manera significativa en el SAR.

Para determinar experimentalmente la influencia de la concentración en el SAR, se elige la muestra ODMSA16B debido a que, de las muestras con baja polidispersión de tamaño, es la que presenta mayor SAR. Las medidas de SAR de los coloides diluidos en función de la concentración se presentan en la Figura 7. 8.



**Figura 7. 8.**(a) Comportamiento del SAR en función de la concentración del coloide para la muestra ODMSA16B. (b) Simulación de SAR vs [x] utilizando el modelo de Landi para la muestra ODMSA16B.  $\tau_m$  corresponde al periodo del campo de radiofrecuencia.

Los modelos utilizados anteriormente, aunque no reproducen con exactitud el valor del SAR medido experimentalmente, si establecen un comportamiento del mismo con relación a un cambio en los parámetros magnéticos o estructurales de la suspensión coloidal. Del valor de SAR obtenido a partir de las medidas calorimétricas es posible determinar el factor de frecuencia (fac. frec.) de la muestra en función de la concentración. El factor de frecuencia de una partícula depende de su tamaño ya que el tiempo de relajación es una cantidad dependiente del volumen. Por esto, si se considera un tamaño de partícula medio, el factor de frecuencia de un conjunto de nanopartículas lo aproximamos por:

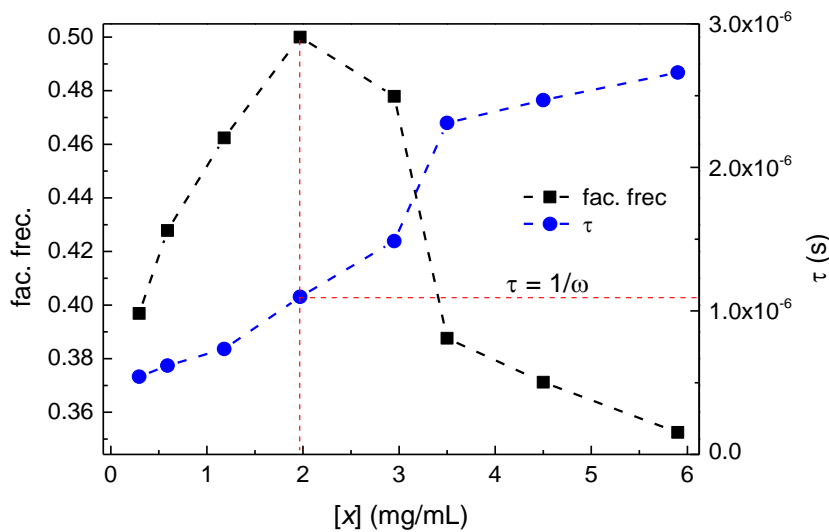
$$fac. frec \approx \frac{6k_B T \rho}{\mu_0^2 M_s^2 \langle V \rangle H_0^2 \omega} SAR_{exp}$$

donde  $\langle V \rangle$  es el volumen medio del conjunto de NPM.

En la Figura 7. 9 se presenta el factor de frecuencia normalizado a 1/2 que es el valor máximo esperado en condición de resonancia para la frecuencia de excitación  $\omega/2\pi = 145$  kHz. A partir del este factor es posible obtener los valores del tiempo de relajación utilizando la expresión:

$$fac. frec = \frac{\omega\tau}{1 + \omega^2\tau^2}$$

En la Figura 7. 9 se muestran los valores del tiempo de relajación obtenido en función de la concentración del coloide. Como se dijo anteriormente, la concentración del coloide permite controlar la interacción dipolar entre las partículas, por lo tanto dicha gráfica puede entenderse como la dependencia del tiempo de relajación con la intensidad de las interacciones entre partículas. Se observa que el tiempo de relajación aumenta a medida que las interacciones aumentan. Esto se debe a que estas últimas modifican la altura de la barrera entre los dos mínimos de energía, a mayor energía dipolar mayor altura de la barrera.



**Figura 7. 9.**Factor de frecuencia (*fac. frec.*) y tiempo de relajación en función de la concentración de la muestra ODMSA16B.

Al igual que para los datos de la simulación de la Figura 7. 8(b), la concentración para la cual el tiempo de relajación de las NPM es igual al tiempo de medida experimental coincide con el valor de la concentración para el cual se obtiene el mayor SAR. Por otro lado, puesto que el modelo de Landi es sensible a cambios pequeños en la concentración, es necesario tener en cuenta la concentración localizada de NPM en los agregados y así determinar la influencia de estos agregados en las medidas de SAR.

Debido a que las medidas de SAXS, dan razón de la organización de las NPM en el coloide es posible determinar, utilizando esta técnica, la concentración del agregado.

Utilizando el modelo de Beaucage, donde  $G$  es la constante de Guinier del agregado, se tiene que:

$$G = N_{\xi} \Delta\eta^2 V_{\xi}^2$$

Donde  $N_{\xi}$  es el número de NPM que forman el agregado,  $V_{\xi}$  es el volumen del agregado y  $\Delta\eta$  es el contraste electrónico que da cuenta de la diferencia electrónica entre el agregado y la matriz en la cual está disperso. Para el caso de NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  dispersas en agua  $\Delta\eta = 3.10 \times 10^{11} \text{cm}^{-2}$  y para el caso de NPM de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  dispersas en agua  $\Delta\eta = 2.80 \times 10^{11} \text{cm}^{-2}$ .

De esta forma, considerando una aproximación monodispersa tanto para las NPM como para los agregados, se tiene que el número de agregados ( $n_{\xi}$ ) es:

$$n_{\xi} = \frac{GV_s}{\Delta\eta^2 V_{\xi}^2}$$

donde  $V_s$  es el volumen de la muestra.

La concentración de la muestra  $[x]$ , definida como la masa de NPM en un volumen  $V_s$  se puede escribir de la forma:

$$[x] = \frac{n_p \rho V}{V_s}$$

Donde  $n_p$  es el número de NPM de volumen  $V$  dispersas en el volumen  $V_s$ . De forma que

$$n_p = \frac{V_s [x]}{\rho V}$$

Considerando que la fracción  $\alpha$  de todas las partículas se encuentran distribuidas en  $n_{\xi}$  agregados se tiene que el número de partículas por agregado ( $n_{p\xi}$ ) es:

$$n_{p\xi} = \frac{\alpha n_p}{n_{\xi}} = \frac{\alpha [x] \Delta\eta^2 V_{\xi}^2}{\rho V G}$$

Así la concentración de masa de NPM por unidad de volumen dentro del agregado ( $[x]_{\xi}$ ) es:

$$140. \quad [x]_{\xi} = \frac{\alpha [x] V_{\xi} \Delta \eta^2}{G}$$

De esta forma se obtiene la concentración local, que puede ser utilizada para calcular el SAR producido por el agregado utilizando el modelo de Landi. Los resultados son presentados en la Tabla 7.5.

Coloide	$G(\text{cm}^{-1})$	$\alpha$	$n_p \xi$	$[x]_{\xi}$ (mg/mL)	$\text{SAR}_{\text{Landi}}$ (W/g)	$\text{SAR}_{\text{exp}}$ (W/g)
LD	-	0	160	633.4	0.05	8.2
HD	808.8	1	5817	35.7	1.33	79.0
ODMSA10	816.9	0.28	535	26.5	20.33	22.6
ODMSA11	352.3	0.60	161	30.0	95.44	21.0
ODMSA16B	347.64	0.13	51	10.0	1264.30	67.7

**Tabla 7.5.** Concentración local ( $[x]_{\xi}$ ) obtenida a partir del análisis de coeficiente de Guinier ( $G$ ).  $N_p$  es el número de NPM por agregado,  $\text{SAR}_{\text{Landi}}$  es el resultado del SAR calculado con  $[x]_{\xi}$  y  $N_p$ . Los resultados se comparan con el valor de SAR experimental  $\text{SAR}_{\text{exp}}$ .

Considerando una concentración local, el modelo de Landi no reproduce los valores de SAR obtenidos experimentalmente, pero sí reproduce la tendencia en cuanto a qué sistema de NPM disipan más calor.

Hay un mejor acuerdo, entre el SAR calculado y el SAR medido para las muestras ODMSA10 y ODMSA11 que son las que presentan menor polidispersión de tamaño. Mientras que el desacuerdo se mantiene para la muestra ODMSA16B. El número de partículas que componen los agregados de la muestra ODMSA16B es menor que el número de partículas en los agregados de ODMSA10 y ODMSA11, además, la muestra ODMSA16 presenta un porcentaje de agregación solo del 13% en comparación con el 28y 60 % para las muestras ODMSA10 y ODMSA11 respectivamente.

Aunque los agregados de ODMSA16B estén compuestos por menos NPM el momento magnético de cada partícula individual es mayor que para las NPM de las muestras ODMSA10 y ODMSA11, por lo cual se tiene una mayor energía dipolar entre partículas, tal como se observó en la Tabla 7. 2, lo cual se traduce en un campo dipolar mayor (Tabla 7. 3). Esto hace que el valor de SAR calculado usando una concentración local, sea para esta muestra, mayor que el encontrado utilizando una distribución homogénea de las NPM (Tabla 7. 4).



La discrepancia entre los valores de SAR obtenidos a partir del modelo de Landi, también podría estar asociada con la polidispersión de tamaño. Mientras que las NPM de los coloides HD, LD y ODMSA16B presentan alta polidispersión de tamaño, las NPM de los coloides ODMSA10 y ODMSA11 son poco polidispersas, por lo cual la aproximación polidispersa se acomoda mejor al análisis de los datos experimentales.

Para finalizar, podemos afirmar que las interacciones dipolares influyen en la medida del SAR de una suspensión coloidal. Una forma de controlar las interacciones es variar la concentración del coloide, a mayor concentración menor distancia entre partículas y el SAR se incrementa. Un incremento excesivo de la concentración puede llevar a la formación de agregados, motivo por el cual es necesario considerar una concentración local para el agregado, que puede diferir de la concentración total del coloide.

Por este motivo, se hace necesario una descripción magnética y estructural del coloide: conocer el estado de las NPM, su tamaño y dispersión, así como sus propiedades magnéticas permite aplicar el mejor método para cada caso.



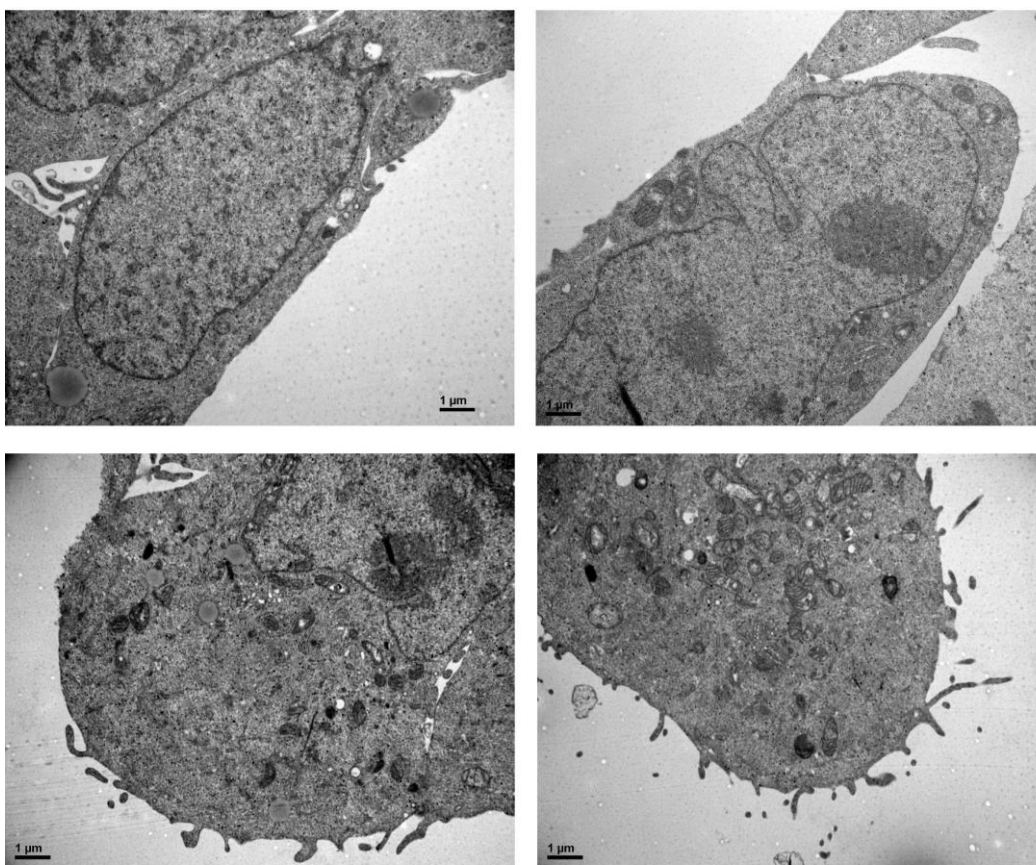
## **CAPÍTULO 8: INTERNALIZACIÓN DE CULTIVOS CELULARES CON NPM**

Con la finalidad de estudiar la organización de las NPM dentro de los endosomas celulares, se realizaron procedimientos de internalización de NPM ODMSA11 en cultivos de la línea celular A549. Las NPM utilizadas son del tipo  $\text{DMSA}@Fe_3O_4$  y fueron elegidas para las experiencias *in vitro* debido a su biocompatibilidad, a sus propiedades físicas como baja polidispersión y alta magnetización de saturación. La baja polidispersión da lugar a un patrón SAXS, de las NPM en el estado de suspensión coloidal estable, de características bien definidas (frangas en el patrón 2D que resultan en máximos y mínimos de intensidad en el patrón integrado). Partículas con momento magnético elevado aseguran mejor respuesta a los campos aplicados en las configuraciones que la estufa de cultivo permite.

En un primer experimento, se realizaron internalizaciones incubando la monocapa de células con diferentes concentraciones del coloide disueltas en el medio de cultivo. Estas muestras fueron analizadas con TEM de baja resolución con el fin de elegir la concentración más adecuada para el estudio con campo aplicado. En un segundo experimento, se dejó la concentración constante y se aplicó campo magnético durante y después de la internalización de NPM.

## 8.1 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE ENDOSOMAS MAGNÉTICAS: TEM Y SAXS

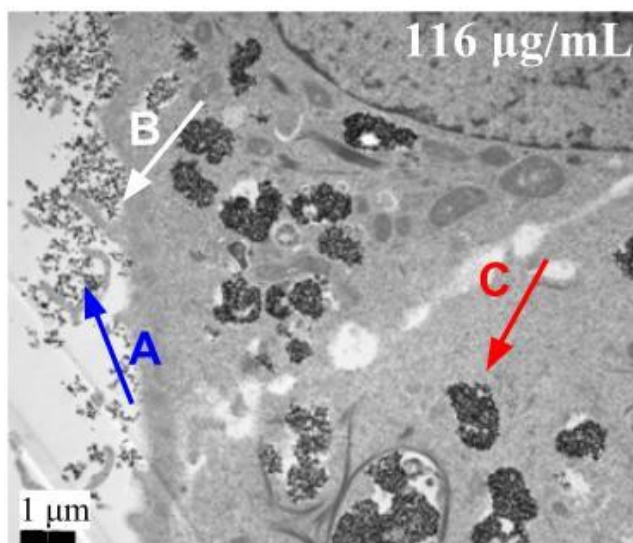
Con el objetivo de estudiar los efectos de la concentración en el coloide, después de la formación de la monocapa del cultivo celular con una confluencia del 60 % en disco de Petri, se incubó con 58, 90, 116, 250  $\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  de la suspensión coloidal. Después se dejó en una estufa de cultivo a 37°C durante 24 horas para dar lugar al proceso de internalización de las NPM en las células. Paso siguiente, se lava con PBS para retirar el exceso de NPM y se fija el cultivo en monocapa con glutaraldehído para su observación con microscopía TEM. Para control, se realiza el mismo procedimiento sobre un cultivo que no fue puesto en contacto con el coloide, incluido el paso de lavado, renovación de medio de cultivo y 24 horas de cultivos después del 60 % de confluencia. Las fotografías TEM obtenidas sobre este cultivo se presentan en la Figura 8. 1.



**Figura 8. 1.** Células A549 observadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM).

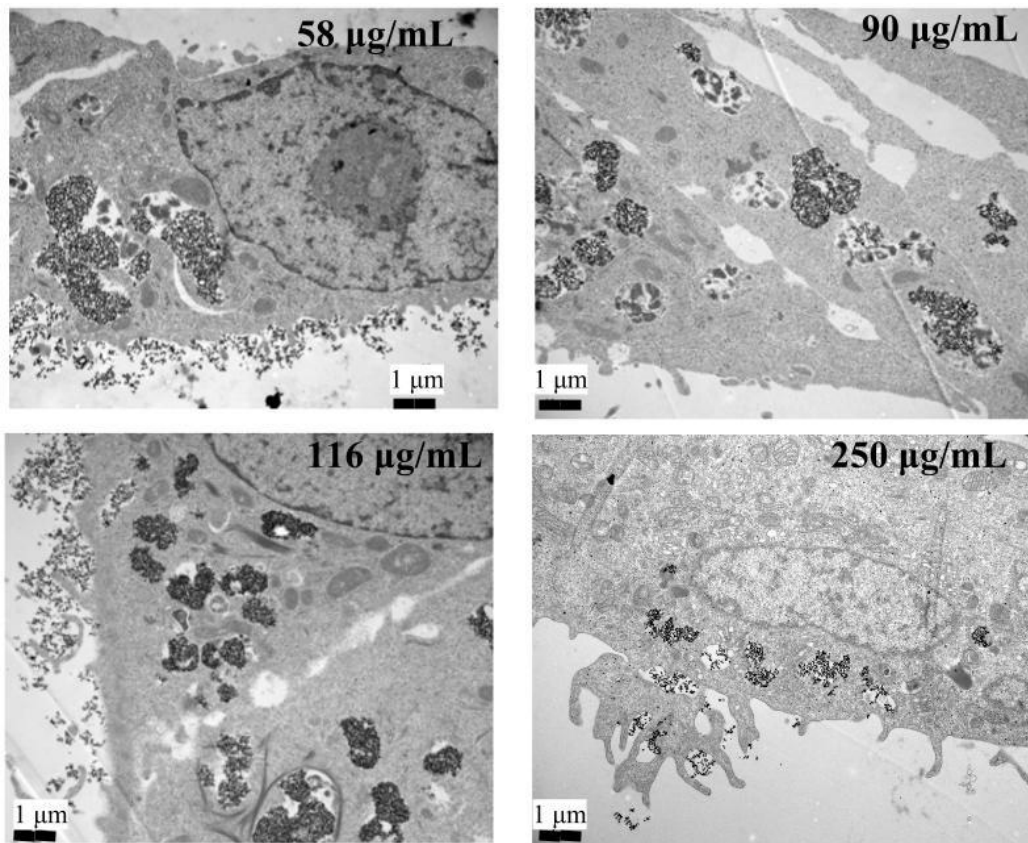
En la figura 8.2 se muestran las imágenes TEM sobre un cultivo internalizado a una concentración de  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$ . En la misma se puede observar todo el proceso de fagocitosis por medio del mecanismo de endocitosis inespecífica por el cual las NPM son incorporadas en la célula. La endocitosis es un proceso que consta de múltiples pasos que incluyen la unión a la membrana plasmática, internalización, formación de endosomas que engloban el material internalizado, fusión con lisosomas y lisis.

En el interior de los endosomas y lisosomas, el pH es extremadamente bajo, lo cual podría degradar los recubrimientos de las NPM e inclusive generar cambios en la composición del carozo magnético de la partícula. En la figura 8.2 se observan las NPM en el exterior de la célula formando agregados (flecha A en la imagen), también se observan NPM en el estadio inicial de la fagocitosis en el que aglomerados de estas comienzan a ser abrazados por los pseudópodos (flecha B), y por último se observan las NPM dentro de los endosomas en el interior de la célula (flecha C). Esto permite concluir que la internalización se da a partir de agregados en la superficie de la célula, sin observar partículas individuales dentro de la misma.



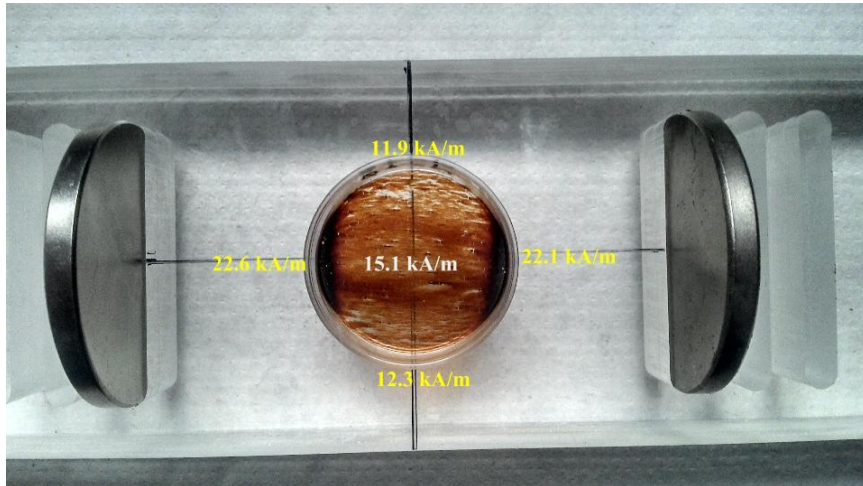
**Figura 8. 2.**Proceso de endocitosis de NPM por células A549.

Se tomaron imágenes TEM sobre los cultivos internalizados con diferentes concentraciones del coloide ODMSA11. Una imagen representativa de lo observado para cada concentración se presenta en la Figura 8.3. Cabe resaltar que, después de la observación de varias células de cada cultivo, para la concentración de  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  se observa la mayor cantidad de endosomas magnéticos dentro de la célula, por lo cual se utiliza esta concentración para realizar medidas de SAXS y HR-TEM. Para concentraciones más altas la citotoxicidad del coloide aumenta.



**Figura 8. 3.** Células A549 con NPM de ODMSA11 internalizadas a diferentes concentraciones. Se observa la formación de los endosomas magnéticos dentro de la célula.

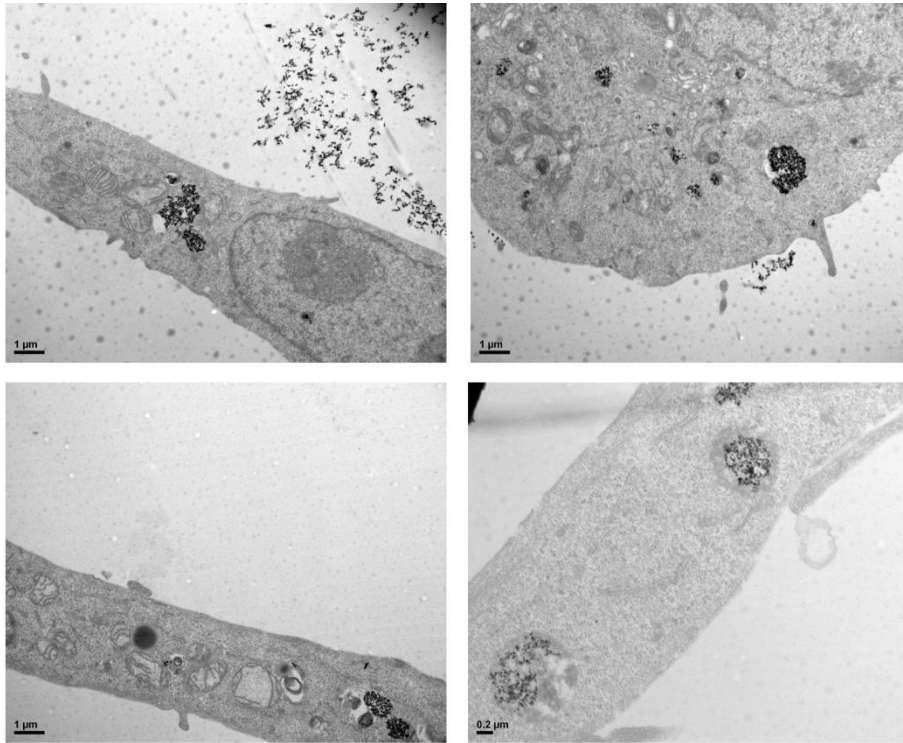
Para determinar la conformación de endosomas magnéticos y su consecuente respuesta a campos magnéticos externos, durante y después de la internalización, se montaron los imanes en la configuración presentado en la Figura 8. 4 para aplicar campo en los cultivos. El campo magnético fue aplicado con dos imanes de NdFeB con forma de disco de 5.0 cm diámetro y 0.5 cm de altura. La intensidad de campo en diferentes puntos del cultivo celular se detalla en la Figura 8. 4.



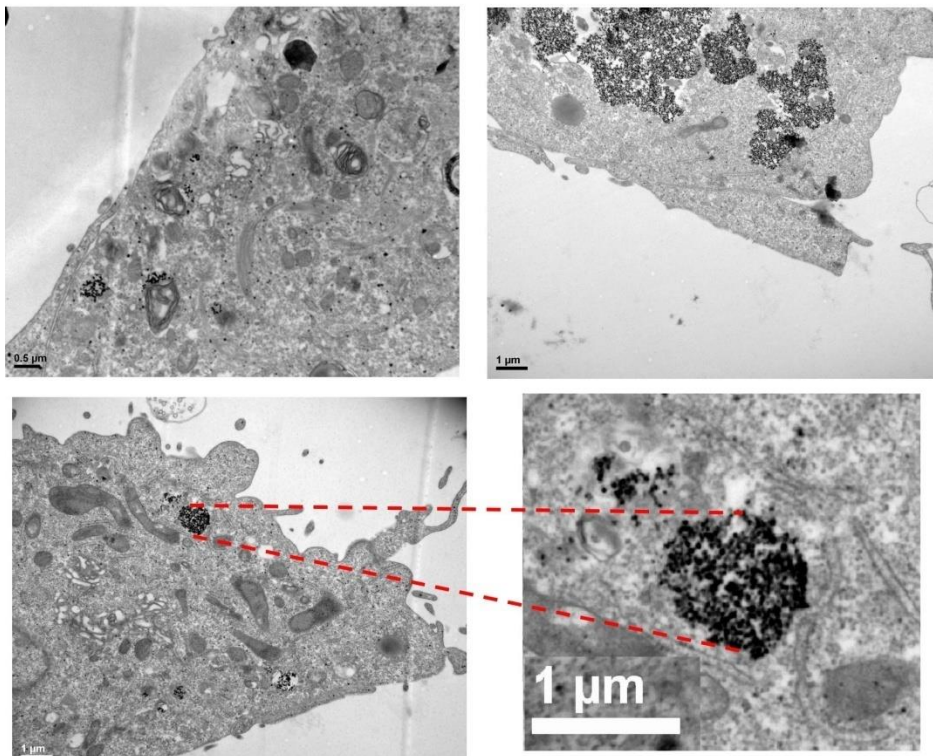
**Figura 8. 4.** Aplicador de campo para realizar la incubación de células con NPM en presencia de campo magnético. Se observa la distribución de las líneas de campo en un coloide magnético y los valores de campo obtenidos en diferentes puntos de la placa de Petri utilizada para los cultivos celulares.

En un primer experimento, después de las 24 horas de incubación y del lavado con PBS para desechar el exceso de NPM que no fueron internalizadas, se expone a las células a un campo de 15.1 kA/m durante 15 minutos. Luego se agrega la cantidad correspondiente de glutaraldehído para realizar el fijado de las células y se aplicó el campo por 15 minutos más en una heladera a 4°C . Por último se retira el campo y se preparan las células según se detalla en la sección 3.3.2 para ser observadas por TEM.

Las imágenes TEM correspondientes a células internalizadas a las diferentes concentraciones utilizadas y en presencia de campo magnético durante el fijado se presentan en las Figuras 8.5 a 8.8.

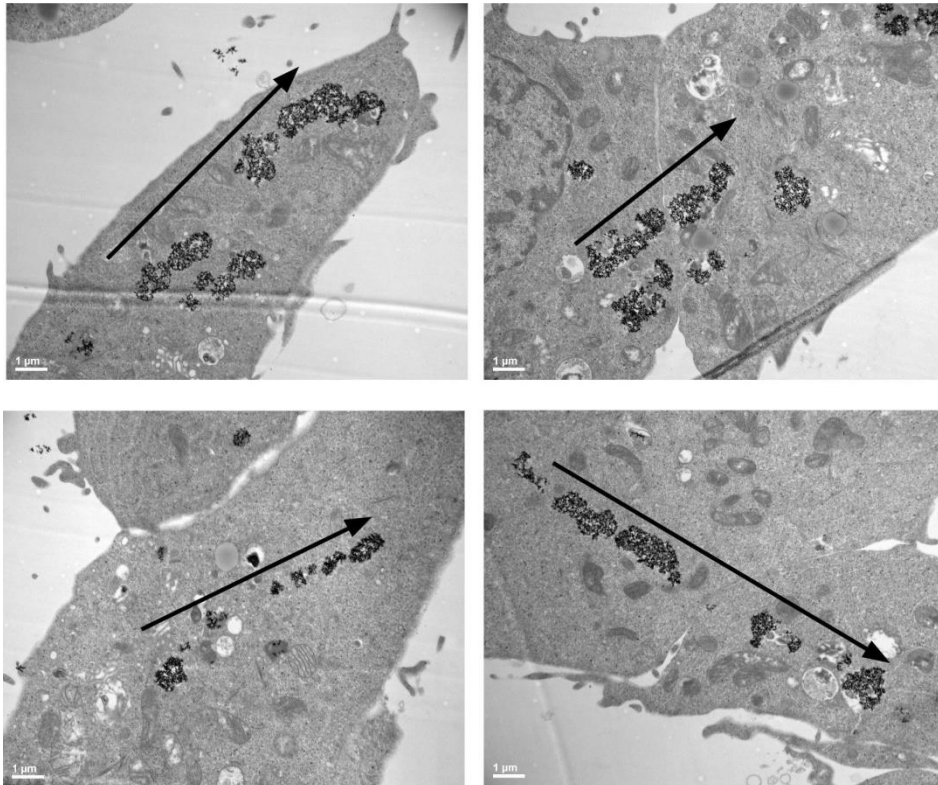


**Figura 8. 5.** Imágenes TEM del cultivo celular con 58  $\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  fijado con campo magnético.

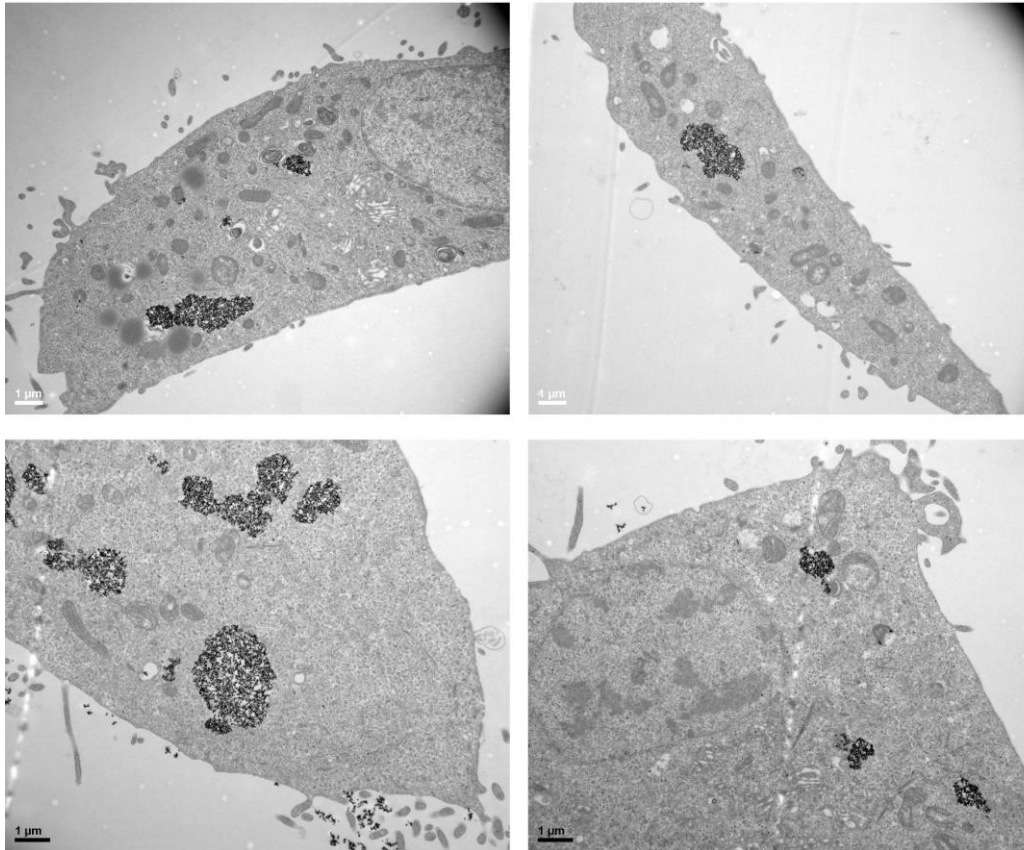


**Figura 8. 6.** Imágenes TEM del cultivo celular con 90  $\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  fijado con campo magnético.





**Figura 8. 7.** Imágenes TEM del cultivo celular con  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  fijado con campo magnético. Se observa la alineación de los endosomas magnéticos en la dirección del campo aplicado.



**Figura 8. 8.** Imágenes TEM del cultivo celular con  $250 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  fijado con campo magnético.

De este experimento se pudo observar para las células con  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  la alineación de los endosomas magnéticos en una dirección preferencial. Debido al proceso de preparación de las muestras para su observación por TEM no es posible conocer en qué dirección fue aplicado el campo magnético. Ya que en preparados sin la presencia de campo magnético no se observa la alineación de endosomas mencionada, es posible concluir que la presencia del campo es la responsable de esta alineación. Siendo esta su causa, se puede presumir que tal alineación coincide con la dirección en la que fue aplicado el campo, ya que esta es la única ruptura de simetría en el experimento. Para las otras concentraciones no se observó esta alineación de endosomas.

Debido a que el cultivo con  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  fue el que presentó mayor cantidad de endosomas con NPM y un alto grado de alineación de los mismos en respuesta al campo magnético externo, se realizó un segundo experimento que consistió en aplicar el campo magnético en diferentes momentos de la internalización de NPM.

Dependiendo del momento en que se aplicó campo magnético se nombran los siguientes grupos de células:

**Control:** Cultivo celular sin NPM.

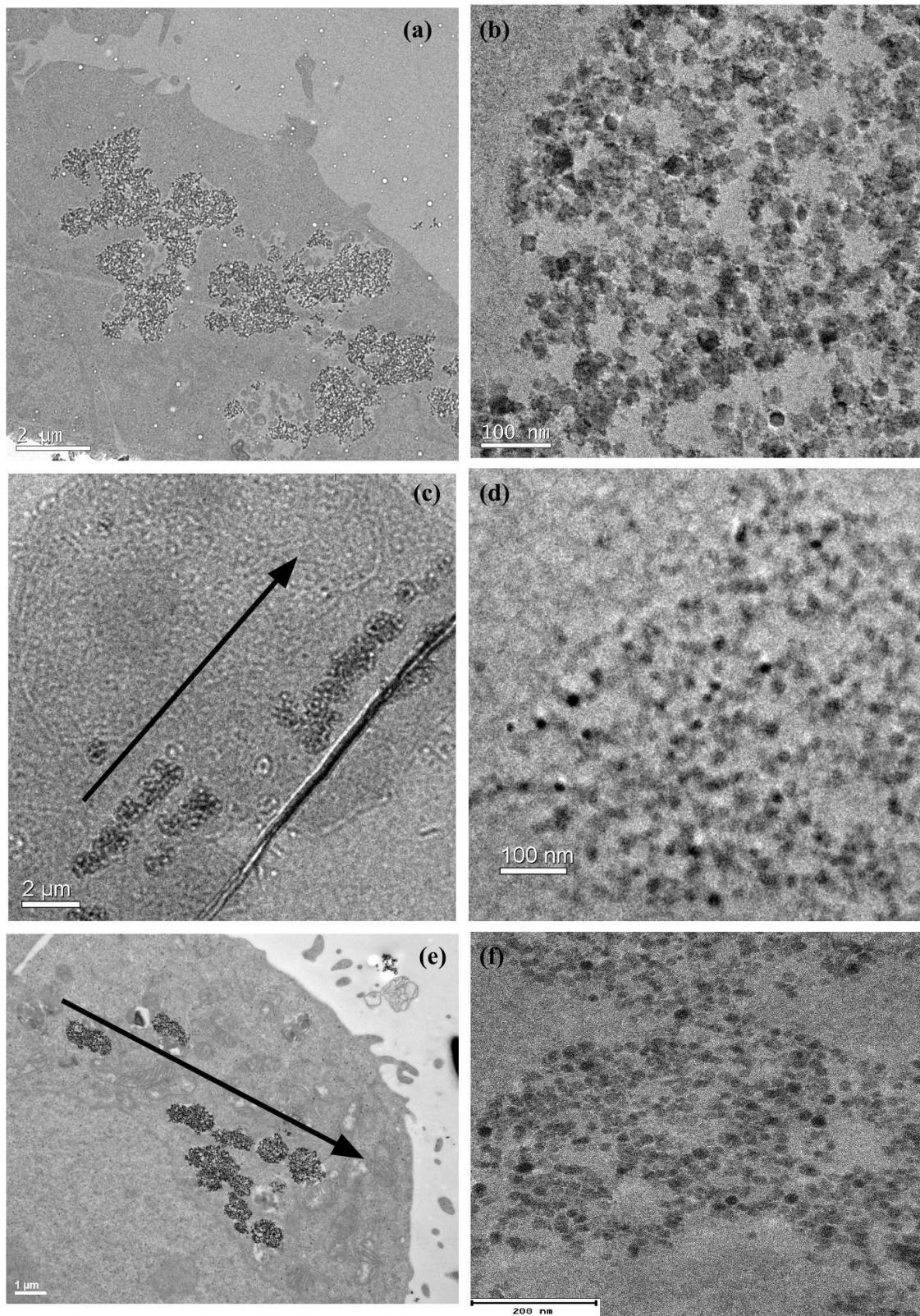
**SCM (Sin Campo Magnético):** no se aplicó campo magnético en ninguna fase de la internalización.

**CMIF (Campo Magnético durante Internalización y Fijado):** se aplicó campo magnético durante el proceso de 24 horas de internalización y durante el proceso de fijado.

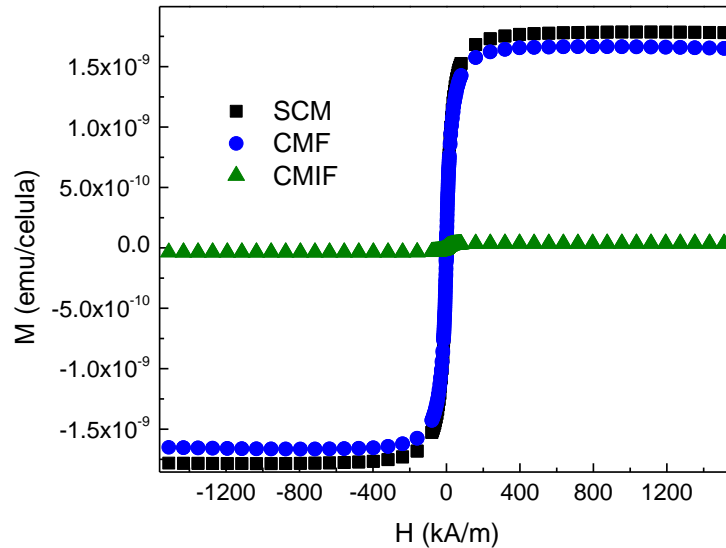
**CMF (Campo Magnético durante Fijado):** no se aplicó campo magnético durante la internalización pero sí durante la fase de fijado.

De igual forma que en el primer experimento de internalización y fijado con campo, se observa para los cultivos celulares CMF y CMIF una organización de los endosomas en una dirección preferencial, la cual no se observa en el cultivo SCM y por lo tanto es causada por la presencia de campo magnético.

La respuesta magnética de los cultivos también se estudia por VSM. En la Figura 8.10 se presentan las curvas de  $M$  vs  $H$  para las diferentes muestras.



**Figura 8. 9.** Células A549 con NPM ODMSA11 internalizadas con una dosis de 116 µg/mL. (a) y (b). Células con NPM internalizadas sin campo magnético (SCM). (c) y (d). Células fijadas bajo campo magnético (CMF). (e) y(f). Células internalizadas y fijadas con campo magnético (CMIF). Las flechas indican la presumible dirección del campo magnético durante el procedimiento.



**Figura 8. 10.** Curvas de  $M$  vs  $H$  obtenidas por VSM para los tres cultivos celulares estudiados.

El cultivo CMIF es el que menor respuesta magnética tiene en comparación a los cultivos CMF y SCM, siendo el cultivo CMF el que mayor respuesta presenta.

Conociendo la magnetización de saturación específica del coloide ODMSA11 con el cual fueron internalizados los cultivos se puede conocer la masa de NPM internalizado por célula en valor medio llamado grado de internalización o captación (*up-take* en Inglés) usando la ecuación:

$$141. \quad up - take = \frac{\mu_{cel}}{M_s^{coloide} N_{cel}}$$

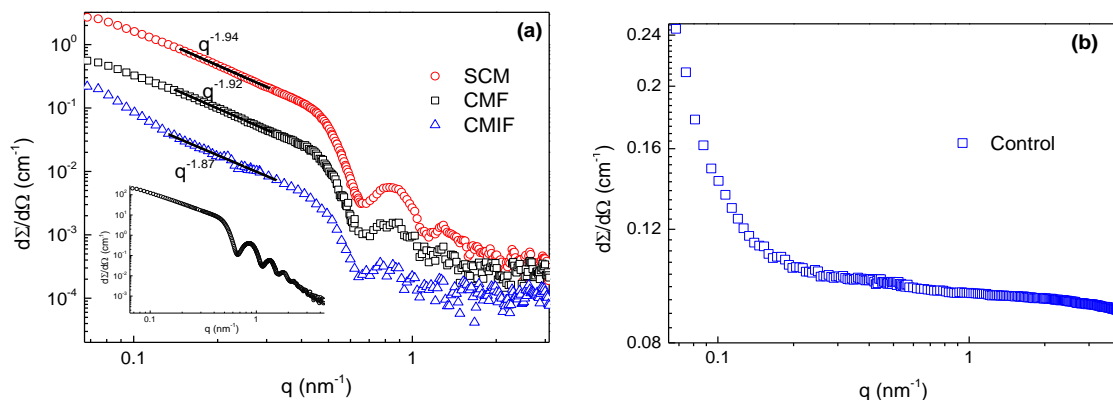
Donde  $\mu_{cel}$  es el momento magnético medido a partir de la magnetización de saturación del cultivo celular y  $N_{cel}$  es el número de células utilizadas en el experimento de VSM según se determina con cámara de Neubauer. Los resultados se presentan en la tabla 8.1.

Cultivo	up-take (pg <sub>Fe304</sub> /célula)
SCM	21.71
CMF	21.10
CMIF	0.46

**Tabla 8. 1.** *Up-take* calculado a partir de las curvas de magnetización.

Los resultados del *up-take* demuestran que la aplicación de campo magnético en la configuración descrita durante el proceso de internalización causa que el proceso no sea tan efectivo, puesto que, el campo magnético desplaza las NPM que se encuentran en suspensión en el medio de cultivo. La presencia del campo genera líneas de mayor concentración de NPM y zonas de menor concentración, redundando esto en una disminución del *up-take*. Debido a que los cultivos SCM y CMF fueron internalizados bajo las mismas condiciones, el *up-take* tiene un valor similar y no tiene relación con la aplicación de campo magnético.

La caracterización de la estructura interna de las NPM dentro de las células fue llevada a cabo con SAXS, según el protocolo presentado en la sección 3.3.1. Los patrones obtenidos para las diferentes muestras se presentan en la figura 9.10. A nuestro entender, estos experimentos son los primeros que logran medir el patrón SAXS de NPM internalizadas en células.



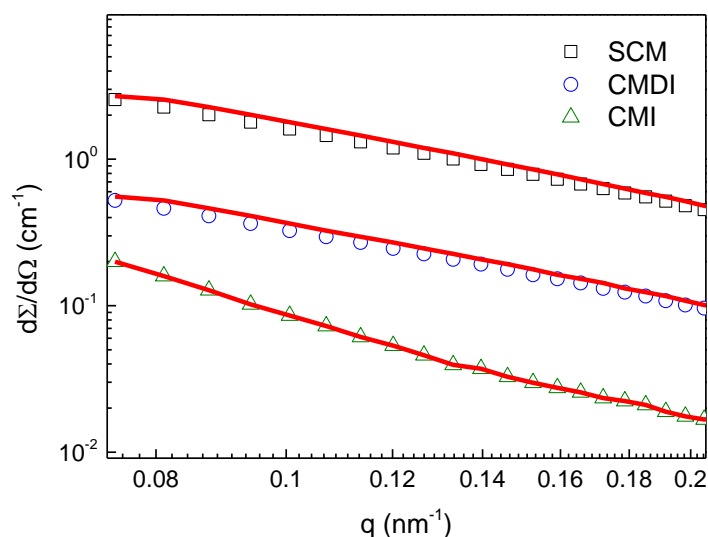
**Figura 8. 11.** (a) Curvas SAXS obtenidas para los cultivos celulares. La figura interna muestra la medida SAXS de la suspensión coloidal.(b). Patrón SAXS obtenido para el cultivo control.

Se observa que los patrones SAXS de la figura 8.11(a) correspondientes a las células internalizadas con el coloide ODMSA11 son similares a los obtenidos para el mismo coloide ODMSA11, el patrón SAXS de esta muestra se puede observar en el *inset* de la Figura 8.11(a) y que difieren totalmente del patrón observado para la muestra control. Por lo tanto, podemos afirmar que la respuesta observada en los cultivos celulares internalizados corresponde a las NPM y no a estructuras biológicas propias de las células. Cabe resaltar que a pesar de las bajas concentraciones de NPM dentro de las células, y en la suspensión de células en general, se aprecia claramente la estructura de las NPM en la medida.

En la figura 8.11 se puede observar como la intensidad dispersada disminuye para los cultivos sobre los cuales se aplicó campo magnético en comparación con el cultivo SCM. Este comportamiento indica una disminución en la concentración de NPM endocitadas por las células. Cabe aclarar que todas las muestras para las medidas SAXS se prepararon de manera tal que todas tengan el mismo número de células por unidad de volumen. Por lo tanto, la disminución de la intensidad de la medida SAXS indica un menor valor de *up-take* de NP por célula. La comparación del *up-take* entre las diferentes muestras que se puede deducir a partir de las medidas SAXS coincide con el determinado a través de medidas magnéticas.

La dependencia de la sección eficaz de dispersión para valores pequeños del vector de onda también varía de muestra a muestra, observando un comportamiento proporcional a  $q^{-1.94_1}$  para la muestra SCM,  $q^{-1.92_1}$  para la muestra CMF y  $q^{-1.87_4}$  para la muestra CMIF.

Para valores de  $q$  tal que  $qR < 1$  se puede aplicar el modelo de Beaucage para determinar el radio de giro del agregado y la dimensión fractal de las NPM dentro de los endosomas. En la figura 8.12 se observan los ajustes con el modelo de Beaucage para esta región de valores de  $q$ . En la tabla 9.3 se presentan los valores de radio de giro y dimensión fractal obtenidos a partir del ajuste con el modelo de Beaucage.



**Figura 8. 12.** Comportamiento de la zona de Guinier para los patrones SAXS de las NPM internalizadas. La línea continua roja representa el ajuste usando el modelo de Beaucage.

La disminución del tamaño del agregado, así como el aumento del exponente fractal coinciden con lo observado en la figura 4.11 donde se estudió el comportamiento de este tipo de suspensiones coloidales en función de la concentración.

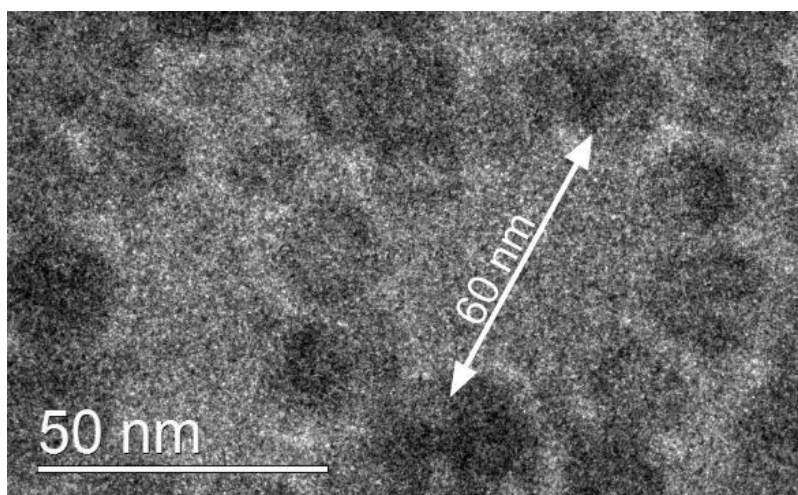
En la suspensión coloidal, tal como se muestra en la tabla 4.3, el tamaño del agregado era de más de 200 nm por lo cual no era posible registrar su comportamiento. Las bajas concentraciones de NPM dentro de las células hacen que este agregado sea visible en SAXS a pesar de estar en endosomas de varios micrómetros de tamaño.

<i>Cultivo</i>	$R_g$ (nm)	$d_f$	$D_{TEM}$ (nm)
SCM	56.51	1.67	103
CMIF	29.23	1.87	76
CMF	28.64	2.69	60

**Tabla 8. 2.** Radio de giro del agregado y dimensión fractal obtenidas a partir de los análisis de SAXS.

Este comportamiento también fue evidenciado en las imágenes TEM donde se observa que las NPM dentro del endosoma se encuentran formando estructuras cerradas tipo anillo, las cuales son más grandes para los cultivos sin campo magnético y se van volviendo más pequeñas para las muestras CMF y CMI.

Una de estas estructuras presentes en la muestra CMIF se presenta en la figura 8.13.



**Figura 8. 13.** Imagen TEM de una estructura tipo anillo formada en la muestra CMI.

Como puede observarse, tanto las imágenes TEM como los patrones SAXS demuestran la existencia de estructuras formadas por NPM dentro de los endosomas. La formación de este tipo de estructuras se debe a un proceso de adhesión electrostática entre las NPM



y la membrana celular y al proceso de fagocitosis que encierra las NPM en los endosomas.

De esta forma, para la aplicación de este tipo de NPM en un tratamiento de hipertermia intracelular, es necesario que se tenga en cuenta que el comportamiento de las NPM no es solo de carácter individual, sino que está influenciado por la presencia de las otras NPM. Tal como se explica en el modelo de Landi y en el modelo DBF, esta interacción genera un campo magnético desmagnetizante que modifica las propiedades magnéticas y por lo tanto la capacidad de las NPM de absorber energía del campo magnético de radiofrecuencia y liberarla en forma de calor.

Además, otro parámetro a tener en cuenta es la concentración de NPM dentro de las células. Una concentración alta tiende a aumentar la interacción dipolar, puesto que la distancia entre partículas dentro de la célula es cada vez más pequeña. Como se observó en la figura 8.13 algunas de estas estructuras tienen forma de anillo para las NPM de ODMSA11, las cuales, como se presentó anteriormente son altamente interactuantes.

Una buena determinación de las propiedades magnéticas y estructurales de la suspensión coloidal, así como una dosis exacta de internalización son necesarios para lograr un buen tratamiento de hipertermia magnética intracelular.



## CONCLUSIONES

En esta investigación se analizó la influencia de las interacciones dipolares en la velocidad específica de absorción (SAR) de energía por parte de NPM de óxidos de hierro en suspensiones coloidales al ser expuestas a campos magnéticos de radiofrecuencia. El estudio se fundamenta en la determinación de las propiedades estructurales y magnéticas de las NPM suspendidas en medios acuosos u orgánicos, e incluso internalizadas en cultivos de la línea celular derivada de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y en el establecimiento de la correlación de estas propiedades y la eficiencia de las NPM para disipar calor al ser expuestas a los campos mencionados. Este trabajo demuestra que es de fundamental importancia realizar las determinaciones de las propiedades estructurales y magnéticas en los mismos medios y en las mismas condiciones ambientales en que se realizará su aplicación, ya que las propiedades de las nanopartículas varían significativamente si se cambia el medio que las soporta o las condiciones en las que se encuentran, especialmente la temperatura.

Con el objetivo de cubrir una variedad estructural completa se analizó un conjunto amplio de suspensiones coloidales estables formadas por NPM de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  recubiertas con ácido oleico ( $\text{AO@CoFe}_2\text{O}_4$ ) dispersas en hexano; NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con ácido oleico y quitosano ( $\text{CS/AO@Fe}_3\text{O}_4$ ) dispersas en agua; NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con ácido cítrico ( $\text{AC@Fe}_3\text{O}_4$ ) dispersas en agua; NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ácido oleico ( $\text{AO@Fe}_3\text{O}_4$ ) dispersas en hexano y NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas ácido dimercatosuccínico ( $\text{DMSA@Fe}_3\text{O}_4$ ) dispersas en agua, estas últimas fueron obtenidas a partir del cambio de ligando de las NPM de  $\text{AC@Fe}_3\text{O}_4$ . El conjunto de coloides estudiado contempla estabilización estérica en los casos de recubrimiento con ácido oléico y ácido oléico/polímero de quitosano y electrostática en el caso de ácido polipróticos (ácido cítrico y dimercatosuccínico) como así también diversos grados de polidispersión de tamaño.

Del análisis estructural de las suspensiones coloidales con SAXS se concluye que los coloides pueden estar en estado de dispersión completamente homogénea o como un sistema bidisperso en el cual coexisten nanoclusters con partículas libres. A diferencia de otras técnicas, la SAXS es apropiada para investigar estructuras en varias longitudes de escala simultáneamente por lo cual determina, además de parámetros usuales como forma, tamaño y dispersión de tamaño de las nanopartículas que componen el coloide,

la presencia de agregación y cuantificar su magnitud y tamaño. Otra diferencia fundamental reside en la factibilidad de llevar a cabo la observación en el estado fluido real e incluso en cultivos celulares, es decir en el mismo estado en que luego son utilizados en una aplicación de hipertermia magnética.

Se demostró que la nanoestructuración resultante se debe a la competencia entre interacciones atractivas de carácter anisótropo como las dipolares magnéticas, de carácter isótropo con las de van der Waals y repulsivas estéricas en el caso de los sistemas estéricamente estabilizados. Se observaron estructuras tipo cadena cuando la interacción dipolar es dominante y estructuras más compactas tridimensionales cuando la interacción dominante es de tipo van der Waals. También se demostró que la agregación en los sistemas electrostáticamente estabilizados fue producida durante los procesos de síntesis. Independientemente de la instancia en la cual se produce la agregación, SAXS determina su existencia y se prueba que ésta tiene una fuerte influencia en el SAR.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la aplicación de un campo magnético en coloides con la técnica SAXS, se desarrolló y fabricó en el marco de este trabajo de tesis un dispositivo adecuado para la adquisición de este tipo de datos en la línea SAXS2 del LNLS. El análisis estructural de los coloides en presencia de campo magnético estático (SAXS con campo), se realizó con campos de intensidades en el mismo orden de magnitud que la amplitud del campo de radiofrecuencia utilizado en la medida SAR. Se demostró que los agregados preexistentes se orientan en la dirección del campo aplicado y que el campo induce agregación en las nanopartículas libres, dando lugar a la formación de nuevos agregados, o al aumento del tamaño de los agregados ya existentes.

Las medidas magnéticas indicaron que los coloides con agregación presentan mayor magnetización de saturación y mayor constante de anisotropía efectiva, en comparación con las mismas NPM aisladas.

Se observa un aumento en la constante de anisotropía efectiva ( $K_{eff}$ ) de NPM agregadas en comparación con las mismas NPM aisladas, este hecho se debe a que en este estado, la energía de dipolar aumenta lo cual se ve reflejado en un aumento de  $K_{eff}$ . Este aumento, se debe a un incremento de la barrera de energía como predice el modelo de Dormann-Bessais-Fioranni. Este comportamiento fue comprobado experimentalmente en esta tesis.

El SAR medido de un sistema de NPM en suspensión coloidal depende del estado de agregación de las mismas. Se determinó que para sistemas de NPM agregadas se obtiene mayor SAR que en sistemas con agregación baja o nula. Se verificó que el tamaño de partícula influye de modo que a mayor tamaño de partícula mayor SAR.

Del análisis de la influencia de la polidispersión de tamaño en el SAR a campo y frecuencia constante, se concluye que en sistemas para los cuales el tamaño medio de las NPM no coincide con el tamaño para el cual la componente de la susceptibilidad fuera de fase ( $\chi''(D)$ ) presenta un máximo, un incremento en la polidispersión puede resultar en un mayor SAR. Esto se debe a que mayor cantidad de NPM entran en resonancia con el campo aplicado y así aumenta el SAR. En el caso en que el tamaño medio y el máximo de  $\chi''(D)$  coinciden, aumentar la dispersión de tamaños manteniendo el valor medio, lleva a una disminución del SAR porque las partículas salen de la condición de resonancia.

En general a una dada condición de medida del SAR de una suspensión coloidal de NPM monodispersas, el máximo SAR se obtiene cuando el tiempo de relajación de las NPM es igual al periodo del campo de radiofrecuencia. El tiempo de relajación de las NPM se ve modificado por presencia de interacciones dipolares.

Se corroboró que las interacciones son de carácter dipolar mediante mediciones de magnetización y desmagnetización remanente isotérmicas. La dependencia del tiempo de relajación con las interacciones dipolares, fue comprobada con medidas de SAR de una suspensión coloidal a varias concentraciones. Usando la concentración como parámetro de control de las interacciones, se puede afirmar que el tiempo de relajación aumenta a medida que se aumentan las interacciones dipolares.

Las medidas de SAR de una suspensión coloidal a varias concentraciones, demuestran que existe un máximo SAR para un valor óptimo de concentración tal que, las interacciones dipolares determinen un valor de tiempo de relajación coincidente con el periodo del campo de radiofrecuencia.

Los modelos teóricos para calcular el SAR, basados en la teoría de respuesta lineal, no reproducen los valores experimentales obtenidos de medidas magnetocalorimétricas, pero sí reproducen la tendencia observada y discutida en esta tesis.

Una mejor coincidencia se obtiene si se considera la dependencia del tiempo de relajación con la concentración de las NPM en el coloide, tal como se deriva de un

modelo de campo medio con campo dipolar fluctuante de primer momento nulo (modelo de Landi).

Para un sistema completamente homogéneo, esta concentración es homogénea y se utilizan los valores determinados experimentalmente. Mientras que a un sistema bidisperso, con agregados coexistiendo con partículas libres, se lo analiza como un sistema de mayor concentración en los agregados, y estas concentraciones se derivan del contraste electrónico que resulta de los ajustes de los patrones SAXS. Los valores obtenidos a partir de estas consideraciones tienen un mejor, pero no total, acuerdo con los valores medidos de SAR.

En búsqueda de una contribución a la terapia médica de hipertermia magnética intracelular, se utilizó la suspensión coloidal biocompatible con las mejores propiedades magnéticas y estructurales para realizar experimentos de internalización de NPM en células A549 con diferentes concentraciones de la suspensión. Los resultados indican que las NPM se agregan en los endosomas celulares y existe una mejor internalización de NPM para la concentración de  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$ .

Se realizaron exitosamente las medidas SAXS de los cultivos celulares internalizados con de  $116 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{mL}$  del coloide compuesto por NPM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 11 nm de diámetro recubiertas con ácido dimercatosuccínico. A nuestro entender, es la primera vez que se registran patrones SAXS de nanopartículas internalizadas en células y se deriva información sobre las NPM y su estructuración dentro del entorno celular. Este tipo de medidas permite inferir si se producen cambios en las partículas originados en su interacción con la membrana celular, por la acides de los endosomas, como así también determinar la nanoestructuración de las partículas en los endosomas celulares.

Experimentos de internalización de estas nanopartículas en presencia de campo magnético, del mismo orden de magnitud que las amplitudes de campo utilizadas en las experiencias con campos de radiofrecuencia, indican que estos campos son suficientemente intensos como para alinear los endosomas, que alojan NPM, en la dirección del campo. Este resultado sugiere que el SAR disipado dentro de la célula podría estar influenciado por las interacciones entre partículas y por las interacciones entre endosomas magnéticos.

## **AGRADECIMIENTOS**

El desarrollo de esta investigación contó con el apoyo tanto de instituciones como de personas a quienes quiero agradecer en esta sección.

En primer lugar, agradezco el apoyo económico de COLCIENCIAS-Colombia, la cual fue la institución otorgante de la beca para realizar mi doctorado. A CONICET-Argentina, por el apoyo económico otorgado mediante mi participación en proyectos de investigación: PIP112-200801-01111 a cargo del Dr. Francisco Sánchez y PIP 112201101-00720 a cargo de la Dra. Marcela B. Fernández van Raap.

A la Universidad Nacional de La Plata, en especial a la Facultad de Ciencias Exactas y al Departamento de Física, por el apoyo económico mediante proyectos de investigación: UNLPX556 y UNLPX680 a cargo de la Dra. Marcela B. Fernández van Raap. Proyectos de movilidad de personal propios de la UNLP como el Subsidios para Viajes y Estadías 2014 con el cual pude realizar la visita al LNNano-Brasil para adquirir imágenes TEM. Proyectos en colaboración como el Programa de Movilidad de Estudiantes de Posgrado 2013 de la Asociación de Universidades del Grupo Montevideo con el cual pude realizar una estadía en la Universidad de Sao Paulo para realizar medidas de SAXS.

Agradezco al Instituto de Física La Plata (IFLP), por permitirme el uso de los equipos y recibirme como uno de sus miembros. En especial quiero agradecer al Grupo de Magnetismo y Materiales Magnéticos, en cabeza de su director, el Dr. Francisco Sánchez.

Especial agradecimiento a mi directora de tesis, Dra. Marcela B. Fernández van Raap, y a mi co-director, Dr. Pedro Mendoza Zélis, quienes me guiaron por el camino de la Investigación Científica y fueron un apoyo académico y moral durante mi formación.

También quiero agradecer la ayuda del Dr. Diego Muraca del Instituto de Física “Gleb Wataghin” de la Universidad de Campinas por la adquisición de imágenes TEM y por su apoyo académico y por su amistad incondicional.

Agradezco al Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiales y al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS) por avalar las propuestas de trabajo D11ASAXS1-29293, D01BSAXS2-13714, D01BSAXS2-14429 y D01BSAXS2-16920 y por su

programa de Auxilio Financiero del cual fui beneficiario y financió parte de mis estadías en sus instalaciones para realizar la adquisición de datos SAXS.

Agradezco al personal científico y técnico del LNLS, en especial a la Dra. Leide Cavalcanti, quien gestionó parte de los recursos para mi estadía del LNLS, durante la etapa de diseño y prueba del portamuestras para realizar las medidas de SAXS con campo magnético. Al Dr. Jean Marie Polli quien participó en el diseño y fabricación del portamuestras y también participó en el diseño del sistema motorizado para generar el desplazamiento de los imanes dentro del portamuestras.

Al Dr. Jefferson Bettini y al Dr. Carlos Ospina del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LNNano), con quienes realicé el curso de entrenamiento de TEM de alta resolución y quienes me ayudaron en la adquisición de imágenes.

También agradezco el apoyo del Dr. Aldo Craievich y del Dr. Cristiano Luis Pinto de Oliveira del Instituto de Física de la Universidad de Sao Paulo, por su apoyo durante mi estadía en el Laboratorio de Cristalografía donde se realizó una parte de las medidas de SAXS presentados en esta investigación.

Especial agradecimiento a la Dra. María del Puerto Morales y a la Dra. Marzia Marciello del Instituto de Ciencia de los Materiales de Madrid, al Dr. Gerardo Goya y Lic. Teobaldo Torres del Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza, a la Dra. Verónica Lasalle del Instituto de Química del Sur (Bahía Blanca-Argentina) y a la Lic. Elisa de Sousa del IFLP, quienes sintetizaron las suspensiones coloidales, sin las cuales esta investigación no hubiese sido posible.

Además un agradecimiento al Dr. Rodolfo Goya y a la Sra. Yolanda Sosa del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) y a la Cátedra de Patología B de la Facultad de Medicina (UNLP) quienes facilitaron los infraestructura para realizar los cultivos celulares y a la Lic. Elisa de Sousa con quien realizamos los cultivos. La Sra. Yolanda Sosa me brindó todo su conocimiento y me introdujo en el mundo de los cultivos celulares, su apoyo fue de gran ayuda para mi entendimiento del manejo de técnicas de trabajo con material biológico.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia por todo su apoyo incondicional, y a Lorena por tantos años de comprensión.



## Referencias.

---

- <sup>1</sup>A. K. Gupta, M. Gupta. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials* Vol. 26. 3995. 2005.
- <sup>2</sup>Q.A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*. Vol. 36, R167–R181. 2003.
- <sup>3</sup>A. Jordan, R. Scholz, P. Wust, H. Fähling, R. Felix, Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol.201, 413-419. 1999.
- <sup>4</sup>K. A. Brown, A. Wijaya, J. D. Alper, K. Hamad-Schifferli. Synthesis of water-soluble, magnetic Fe/Au nanoparticles. *MRS Proceedings*. Vol. 900. 2005.
- <sup>5</sup>R. E. Rosensweig. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 252. 370-374. 2002.
- <sup>6</sup>M. Lévy, C. Wilhelm, J.M. Siaugue, O. Horner, J.C. Bacri, F. Gazeau. Magnetically induced hyperthermia: size-dependent heating power of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Journal of Physics: Condensed Matter*. Vol. 20. 204133. 2008
- <sup>7</sup>Ren Y, Zhang H, Chen B, Cheng J, Cai X, Liu R, Xia G, Wu W, Wang S, Ding J, Gao C, Wang J, Bao W, Wang L, Tian L, Song H, Wang X. Multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles combined with chemotherapy and hyperthermia to overcome multidrug resistance. *International Journal of Nanomedicine* 2012, 7:2261-2269. 2012
- <sup>8</sup>C. Wilhelm, F. Gazeau. Magnetic nanoparticles: Internal probes and heaters with living cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 321, 671. 2009.
- <sup>9</sup>A. Urtizberea, E. Natividad, A. Arizaga, M. Castro, A. Mediano. Specific absorption rates and magnetic properties of ferrofluids with interaction effects at low concentrations. *Journal of Physical Chemistry C*. Vol. 114(11), 4916–4922. 2010.
- <sup>10</sup>P. Allia, M. Coisson, P. Tiberto, F. Vinai M. Knobel, M.A. Novak, W.C. Nunes. Granular Cu-Co alloys as interacting superparamagnets. *Physical Review B*. Vol. 64. 144420. 2001.
- <sup>11</sup>G.T. Landi. Role of Dipolar Interaction in Magnetic Hyperthermia. *Physical Review B*. Vol. 89. 014403. 2014
- <sup>12</sup>J.L. Dormann, L. Bessais, D. Fiorani. A dynamic Study of Small Interacting Particles: Superparamagnetic Model and Spin-Glass Laws. *Journal of Physics C: Solid State Physics*. Vol. 21. 2015-2034. 1988
- <sup>13</sup>G. C. Papaefthymiou. Nanoparticle Magnetism. *Nano Today*. Vol. 4, 438-447. 2009.
- <sup>14</sup>R.C. O’Handley. *Modern Magnetic Materials, Principles and Applications*. Ed. John Wiley and Sons, New York, 2000.

- 
- <sup>15</sup>W. Heisenberg, Zur Theorie des Ferromagnetismus. *Zeitschrift für Physik*. Vol. 49 (9–10): 619–636. 1928.
- <sup>16</sup>J.C. Slater. The Ferromagnetism of Nickel. *Physical Review*. Vol. 49, 537. 1936.
- <sup>17</sup>P. Bruno. Tight-binding approach to the orbital magnetic moment and magnetocrystalline anisotropy of transition-metal monolayers. *Physical Review B*. Vol. 39. 865. 1989.
- <sup>18</sup>Han-Chun Wu, S. K. Arora, O. N. Mryasov, I. V. Shvets. Antiferromagnetic interlayer exchange coupling between Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> layers across a nonmagnetic MgO dielectric layer. *Applied Physics Letters*. Vol. 92. 182502. 2008.
- <sup>19</sup>E.C. Stoner, E.P. Wohlfarth. A Mechanism of Magnetic Hysteresis in Heterogeneous Alloys. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. Vol. 240 (849), 599. 1948.
- <sup>20</sup>F.E. Luborsky. Development of Elongated Particle Magnets. *Journal of Applied Physics*. Vol. 32, S171. 1961.
- <sup>21</sup> N.A. Spaldin. *Magnetic Materials, Fundamentals and Applications*. Segunda Edición. Ed. Cambridge University Press. Cambridge, 2011.
- <sup>22</sup> C.P. Bean, J.D. Livingston. Superparamagnetism. *Journal of Applied Physics*. Vol. 30 (4). S120-S129. 1959.
- <sup>23</sup> E.C. Stoner. The Internal Energy of Ferromagnetics. *Philosophical Transactions of The Royal Society A*. Vol. 235(750). 165-193. 1936
- <sup>24</sup> Pfeiffer, H. Relaxation Behaviour of Magnetic Particle Assemblies Due to Thermal Fluctuations. *Physica Status Solidi A*. Vol. 120. 233. 1990.
- <sup>25</sup> J. García-Otero, A.J. García-Bastida, J. Rivas. Influence of temperature on the coercive field of non-interacting fine magnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 189 (3)- 377-383. 1998.
- <sup>26</sup> M.I. Shliomis. Magnetic Fluid. *Soviet Physics Uspekhi*. Vol. 17(2). 153-169. 1974
- <sup>27</sup> W.F. Brown Jr. Thermal Fluctuations of a Single Domain Particle. *Physical Review*. Vol. 130 (5). 1677-1668. 1963
- <sup>28</sup> L. Néel. Théorie du traînage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites. *Ann. Géophys.* Vol. 5. 99–136. 1949.
- <sup>29</sup> K. Bromberg, *Molecular Driving Forces: Statistical thermodynamic in Chemistry and Biology*. Ed. Garland Science. 2003.
- <sup>30</sup>M. Jeun, S. Bae, A. Tomitaka, Y. Takemura, K. Ho Park, S. Ha Paek, K. W. Chung. Effects of particle dipole interaction on the ac magnetically induced heating characteristics of ferrite nanoparticles for hyperthermia. *Applied Physics Letters*, Vol.95. 082501. 2009.

- 
- <sup>31</sup>D. Serantes, D. Baldomir, C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, M. Angelakeris, E. Natividad, M. Castro, A. Mediano, D.-X. Chen, A. Sanchez, L. I. Balcells, and B. Martínez, Influence of dipolar interactions on hyperthermia properties of ferromagnetic particles. *Journal of Applied Physics*. Vol. 108. 073918. 2010.
- <sup>32</sup> B. Mehdaoui, R. P. Tan, A. Meffre, J. Carrey, S. Lachaize, B. Chaudret, and M. Respaud. Increase of magnetic hyperthermia efficiency due to dipolar interactions in low-anisotropy magnetic nanoparticles: Theoretical and experimental results. *Physical Review B*. Vol. 87. 174419. 2013.
- <sup>33</sup> G.T. Landi. The random dipolar-field approximation for systems of interacting magnetic particles. *Journal of Applied Physics*. Vol. 113. 163908. 2013.
- <sup>34</sup> Guinier, A., Fournet, G. *Small-angle scattering of X-rays*. New York: Wiley. 1955
- <sup>35</sup>Porod, G. Die Röntgenkleinwinkelstreuung von dichtgepackten kolloiden Systemen. *Kolloid-Zeitschrift*, Vol. 133(1), 51-51. 1953.
- <sup>36</sup>Guinier, A. La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann. Phys.* Vol. 12, 161-237. 1939.
- <sup>37</sup> Glatter, O., Kratky, O. *Small angle x-ray scattering*. London: Academic Press. 1982.
- <sup>38</sup> Pedersen, S. Determination of size distributions from small-angle scattering data for systems with selective hard-sphere interactions. *Journal of Applied Crystallography*. Vol. 27, 595-608, 1994.
- <sup>39</sup>Schaefer, D. W. *Polymers, Fractals, and Ceramic Materials*. *Science*, Vol. 243, 1023-1027. 1989.
- <sup>40</sup>Freltoft, T., Kjems, J., Sinha, S. Power-law correlations and finite-size effects in silica particle aggregates studied by small-angle neutron scattering. *Physical Review B*, Vol. 33(1), 269-275. 1986.
- <sup>41</sup> Chen, S., Teixeira, J. Structure and Fractal Dimension of Protein-Detergent Complexes. *Physical Review Letters*. Vol. 57(20), 2583-2586. 1986.
- <sup>42</sup>Beaucage, G. Approximations Leading to a Unified Exponential/Power-Law Approach to Small-Angle Scattering. *Journal of Applied Crystallography*. Vol. 28, 717-728. 1995.
- <sup>43</sup> Beaucage, G., Kammler, H. K., Pratsinis, S.E. Particle Size Distribution from Small Angle Scattering Using Globing Scattering Functions. *Journal of Applied Crystallography*. Vol. 37, 523-535. 2004.
- <sup>44</sup> Lovel, R., Mitchell, G.R. Molecular Orientation Distribution Derived from an Arbitrary Reflection. *Acta Crystallographica A*. Vol. 37, 390-395. 1981.
- <sup>45</sup>Deas, H.D. The Diffraction of X-Rays by a Random Assemblage of Molecules Having Partial Alignment. *Acta Crystallographica A*. Vol. 5, 542-546. 1952.
- <sup>46</sup>Sun, S., Zeng, H., Robinson, D.B., Raoux, S., Rice, P.M., Wang, S.X., Li, G. Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Fe, Co, Mn) nanoparticles. *Journal of American Chemical Society*. Vol. 126(1), 273–279. 2004.

- 
- <sup>47</sup> Roca, A. G., Morales, M. P., O'Grady, K., Serna, C. J. Structural and Magnetic Properties of Uniform Magnetite Nanoparticles Prepared by High Temperature Decomposition of Organic Precursors. *Nanotechnology*. Vol. 17(11), 2783-2788. 2006.
- <sup>48</sup> Fernández van Raap, M. B., Zélis, P. M., Coral, D. F., Torres, T. E., Marquina, C., Goya, G. F., Sánchez, F. H. Self-organization in Oleic Acid-Coated CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> Colloids: A SAXS Study. *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 14(9). 2012.
- <sup>49</sup> Nicolás, P., Saleta, M., Troiani, H., Zysler, R., Lassalle, V., Ferreira, M.L. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues. *Acta Biomaterialia*. Vol. 9(1), 4754-4762. 2013.
- <sup>50</sup> Gaihre, B., Myung Seob Khil, Douk Rae Lee, Hak Yong Kim. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study. *International Journal of Pharmaceutics*. Vol. 365, 180-189. 2009.
- <sup>51</sup> V. Lassalle, M. Ferreira. Nano and microspheres based on Polylactide (PLA) polymers and copolymers: An overview of their characteristics as a function of the obtention method. *Macromolecules Bioscience*. Vol. 7, 767-783. 2007.
- <sup>52</sup> Salas, G., Casado, C., Teran, F. J., Miranda, R., Serna, C. J., Morales, M. P. Controlled synthesis of uniform magnetite nanocrystals with high-quality properties for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 22(39), 21065. 2012
- <sup>53</sup> M. E. de Sousa, M. B. Fernández van Raap, P. C. Rivas, P. Mendoza Zélis, P. Girardin, G. Pasquevich, J. Alessandrini, D. Muraca, F. H. Sánchez. Stability and Relaxation Mechanisms Of Citric Acid Coated Magnetite Nanoparticles For Magnetic Hyperthermia. *Journal of Physical Chemistry C*. Vol. 117(10), 5436–5445. 2013.
- <sup>54</sup> Giard, D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H., Parks W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. Vol. 51(5), 1417-1423. 1973.
- <sup>55</sup> Bonini, M., Fratini, E., Baglioni, P. SAXS study of chain-like structures formed by magnetic nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*. Vol. 27(5-8), 1377-1381. 2007.
- <sup>56</sup> Kruse, T., Krauthäuser, H., Spanoudaki, A., Pelster, R. Agglomeration and chain formation in ferrofluids: Two-dimensional x-ray scattering. *Physical Review B*. Vol. 67(9). 094206. 2003.
- <sup>57</sup> Kellermann, G., Vicentin, F., Tamura, E., Rocha, M., Tolentino, H., Barbosa, A., Craievich, A., Torriani, I. The Small-Angle X-ray Scattering Beamline of the Brazilian Synchrotron Light Laboratory. *Journal of Applied Crystallography*, Vol. 30(5), 880-883. 1997.
- <sup>58</sup> <http://lnls.cnpem.br/beamlines/saxs/>
- <sup>59</sup> Huang, T. C., Toraya, H., Blanton, T. N., Wu, Y. X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *Journal of Applied Crystallography*, Vol. 26(2), 180-184. 1993.

---

<sup>60</sup>Orthaber, D., Bergmann, A., Glatte, O. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *Journal of Applied Crystallography*. Vol. 33(2), 218-225. 2000.

<sup>61</sup> <http://Innano.cnpem.br/laboratories/Ime/facilities/tem-hr-jeol-3010/>.

<sup>62</sup>[http://www.fcv.unlp.edu.ar/index.php?option=com\\_content&view=article&id=499&Itemid=1238](http://www.fcv.unlp.edu.ar/index.php?option=com_content&view=article&id=499&Itemid=1238).

<sup>63</sup> W.I. Goldberg. *Dynamic Light Scattering*. American Journal of Physics. Vol. 67. 1152. 1999.

<sup>64</sup>J.S. Micha, B. Dieny, J.R. Régnard, J.F. Jacquot, J. Sort. Estimation of the Co nanoparticles size by magnetic measurements in Co/SiO<sub>2</sub> discontinuous multilayers. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Suplemento a Vol. 272–276, pág. e967–e968. 2004.

<sup>65</sup> D. F. Coral, P. Mendoza Zélis, M. E. de Sousa, D. Muraca, V. Lassalle, P. Nicolás, M. L. Ferreira, M. B. Fernández van Raap. Quasi-static magnetic measurements to predict specific absorption rates in magnetic fluid hyperthermia experiments. *Journal of Applied Physics*. Vol. 115, 043907. 2014.

<sup>66</sup> Roca, A.G., Venitemillas-Verdaguer, S., Port, M., Robic, C., Serna, C.J., Morales, M.P. Effect of Nanoparticle and Aggregate Size on the Relaxometric Properties of MR Contrast Agents Based on High Quality Magnetite Nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*. Vol. 113, 7033-7039. 2009.

<sup>67</sup>J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud “Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization” *J. Appl. Phys.* 109, 083921 (2011); doi: 10.1063/1.3551582

<sup>68</sup> K. Gilmore, Y. U. Idzerda, M.T. Klem, M. Allen, T. Douglas, M. Young. Surface contribution to the anisotropy energy of spherical magnetite particles. *Journal of Applied Physics*. Vol. 97, 10B301. 2005.

<sup>69</sup> E. Lima Jr., T. E. Torres, L. M. Rossi, H. R. Rechenberg, T. S. Berquo, A. Ibarra, C. Marquina, M. R. Ibarra and G. F. Goya. Size dependence of the magnetic relaxation and specific power absorption in iron oxide nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*. Vol. 15, 1654. 2013.

<sup>70</sup>M. Kallumadil, M. Tada, T. Nakagawa, M. Abee, P. Southern, Q.A. Pankhurst. *Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 321(10), 1509-1513. 2009.

<sup>71</sup> Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. *Fenómenos de Transporte*. Ed. Limusa Wiley. 2da Edición. 2006.

<sup>72</sup> Hamaker H.C. The London-van der Waals attraction between spherical particles. *Physica* Vol. 4(10):1058–1072. 1937.

<sup>73</sup> Rosensweig R.E. *Ferrohydrodynamics*. Dover Books on Physics. Dover Publications, New York. 1997.

<sup>74</sup> Kruglyakov P.M. *Hydrophile-Lipophile Balance of Surfactants and Solid Particles Physicochemical Aspects and Applications*, Studies in Interface Science, Vol. 9, Ed. Elsevier, pp 100–145. 2000.

<sup>75</sup> Croucher M.D., Hair M.L. Hamaker constants and the principle of corresponding states. *Journal of Physical Chemistry*. Vol. 81(17):1631–1636. 1977.

---

<sup>76</sup> Wu N, Fu L, Su M, Aslam M, Wong KC, Dravid VP. Interaction of fatty acid monolayers with cobalt nanoparticles. *Nano Letters*. Vol. 4(2), 383–386. 2004.

<sup>77</sup> *Handbook of Chemistry & Physics* 65th Edition CRC Press

<sup>78</sup> Faure B., Salazar-Alvarez G., Bergström L. Hamaker Constants of Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir*. Vol. 27(14), 8659-8664. 2011.

<sup>79</sup> Garcia-Otero, J., Porto, M., Rivas, J. Henkel Plots of Single-Domains Ferromagnetic Particles. *Journal of Applied Physics*. Vol. 87. 7376. 2000.

<sup>80</sup> Curiale, J., Sánchez, R.D., Troiani, H.E., Ramos, C.A., Pastoriza H., Leyva, A.G. Levy, P. Magnetism of Manganite Nanotubes Constituted by Assembled Nanoparticles. *Physical Review B*. Vol. 75. 224410. 2007.

<sup>81</sup> Henkel, O., Remanenzverhalten ud Wechselwirkungen in hartmagnetischen Teilchenkollektiven. *Phys. Status. Solidi*. Vol. 7. 919-924. 1964.

<sup>82</sup> Spratt, G.W.D., Bissell, P.R., Chantrell, R.W., Wohlfarth. E.P. Static and dynamic experimental studies of particulate recording media. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Vol. 75. 309. 1988.