



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

---

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

**Nanopartículas magnéticas para hipertermia intracelular: sensibilidad de células  
A549.**

---

María Elisa L. de Sousa  
Directora: Dra. Marcela B. Fernández van Raap  
Co-Director: Dr. Ricardo A. Dewey

2015

*A mis hijas Rocío, Julieta  
y a mi marido Willy  
que sin su sostén y afecto nada de esto hubiera sido posible*

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer a mi directora Dra. Marcela B. Fernández van Raap por haberme guiado en las actividades de investigación, que condujeron a la realización de la presente tesis y más aún por haberme permitido continuar solidamente con mi formación en el ámbito de la ciencia.*

*Dr. Francisco H. Sánchez que lidera el grupo de Magnetismo y materiales magnéticos (G3M) ámbito en el cual se desarrolló este trabajo y a todos los miembros de este grupo, en especial al Dr. Pedro Mendoza Zélis por su amistad y ayuda incondicional durante esta investigación.*

*A mis compañeros de trabajo, Gustavo Pasquevich, Ignacio Bruvera y Diego Coral quienes de innumerables formas ayudaron y colaboraron con mi formación de doctorado. A la Dra. Patricia Rivaspor siempre estar dispuesta a discutir, analizar y enseñar todo lo relacionado con la química, pero sobre todo lo que mas le agradezco es el cariño que me brindo durante este tiempo.*

*A Sra. Yolanda Sosa y al Dr. Rodolfo G. Goya por su tiempo y dedicación para transmitirme sus conocimientos en las experiencias invitro realizadas en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP)- cátedra de Patología B.*

*A Pablo Girardin con quien compartimos gran parte de los trabajos biológicos realizados en esta tesis y por la adquisición de las imágenes AFM de las células, pero sobre todo por su amistad.*

*Al Dr. Ricardo A. Dewey quien codirigió la parte biológica de esta tesis y a su grupo quienes me recibieron cálidamente, en especial a la Dra. Alejandra Carrea por su ayuda en los trabajos de biología molecular realizados en forma conjunta y por sobre todo por brindarme sus conocimientos y apoyarme en todo momento.*

*A la Dra. Olga Mykhaylyk por aportar la suspensión coloidal  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$  que fue utilizada para las experiencias invitro.*

*Al Dr. Diego Muraca por la adquisición de imágenes TEM.*

*Al Dr. Jose Luis Alessandrini por la adquisición de medidas por DLS.*

*Al Ingeniero Nolo Martínez, Gustavo Sieben y a todos los miembros del laboratorio de electrónica que diariamente me brindaron su apoyo.*

*Asimismo a toda la comunidad educativa de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), Instituto de Física de la Plata (IFLP), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnología (ANPCyT), al Consejo de Investigación Científica y Técnicas (CONICET) por haberme dado el soporte necesario para llevar adelante este trabajo de tesis.*

*Finalmente quiero agradecer a mi amiga Yamil Chain por su gran apoyo e incentivo.*



# Indice

Motivación y justificación .....	1
1. Introducción y estado del arte.....	5
1.1. Síntesis y estabilización de coloides magnéticos.....	5
1.1.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas (NPMs). .....	5
1.1.2. Mecanismo de formación de la magnetita.....	8
1.1.1. Características ácido/básicas de la superficie de la magnetita .....	9
1.1.2. Estabilización de las NPMs en suspensión .....	11
1.2. Magnetismo en coloides .....	13
1.2.1. Cantidades magnéticas de interés y curva de histéresis. ....	17
1.2.1. Superparamagnetismo. ....	21
1.2.2. Mecanismos de relajación magnética en coloides.....	25
1.2.3. Tasa de absorción específica (SAR).....	26
1.3. Hipertermia magnética (HM).....	29
1.4. Línea celular A549.....	32
1.5. Vectores lentivirales.....	32
2. Materiales y métodos.....	34
2.1. Técnicas de caracterización de los coloides.....	34
2.1.1. Difracción de rayos x (DRX). ....	34
2.1.2. Microscopía de transmisión de electrones (TEM) y Difracción de electrones.....	35
2.1.3. Termogravimetría (TG) y Análisis térmico diferencial (DTA): .....	35
2.1.4. Dispersión dinámica de luz (DLS).....	36
2.2. Técnicas de caracterización magnéticas .....	36
2.2.1. Magnetometría DC (VSM y SQUID). ....	36
2.2.2. Magnetocalorimetría (SAR por aplicación de campos de radiofrecuencia RF).....	37
2.3. Técnicas de manipulación de cultivos celulares. ....	41
2.3.1. Protocolos de mantenimiento de los cultivos celulares.....	41
2.3.2. Protocolo de fijado del cultivo celular .....	41
2.3.3. Protocolos de incubación de células con NPMs.....	42
2.3.4. Protocolo de medida de expresión de EGFP inducido por radiofrecuencia .....	42
2.3.5. Protocolo de medida de expresión de EGFP inducido por incubación con NPMs. ....	42
2.4. Protocolos generales de trabajo con plásmidos .....	42
2.4.1. Transformación de bacterias. ....	42
2.4.2. Obtención de plásmidos en escala analítica (minipreparación) .....	43
2.4.3. Digestión con enzimas de restricción.....	43
2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	43
2.4.5. Obtención de plásmidos en escala preparativa (maxipreparación) .....	44
2.4.6. Construcción de los vectores lentivirales <i>HSP70B/EGFP</i> y <i>CMV/EGFP</i> . ....	44
2.4.7. Titulación de los sobrenadantes virales.....	45
2.4.8. Transducción de la línea celular A549 con vectores lentivirales .....	45
2.5. Técnicas de visualización y cuantificación de cultivos celulares .....	45

2.5.1.	Microscopía de contraste de fases con fluorescencia.....	45
2.5.2.	Microscopía de transmisión de electrones (TEM). ....	46
2.5.3.	Microscopía de fuerza atómica (AFM) .....	46
2.5.4.	Medida de la viabilidad y conteo celular. ....	47
2.6.	Técnicas de citometría de flujo .....	49
2.6.1.	Estudio de citotoxicidad con doble marca fluorescente: Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio.....	51
2.6.2.	Protocolo de citotoxicidad utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio. ....	52
3.	Síntesis de un coloide biomédico para aplicación en la terapia por Hipertermia Magnética	54
3.1.	Síntesis por coprecipitación química. ....	54
3.1.1.	Desarrollo del reactor de síntesis: .....	54
3.1.2.	Síntesis de nanopartículas de $Fe_3O_4$ y su recubrimiento con ácido cítrico.....	55
3.2.	Caracterización estructural y magnética. ....	58
3.2.1.	Caracterización de las NPMs .....	58
3.2.2.	Caracterización de las suspensiones coloidales. ....	62
3.2.3.	Caracterización magnética .....	68
3.2.4.	Respuesta a campo de radiofrecuencia: .....	76
3.2.5.	SAR en términos de la caracterización física del coloide. ....	79
4.	Interacción célula A549/ NPMs: .....	85
4.1.	Visualización topográfica de las células con AFM.....	85
4.2.	Características de la suspensión coloidal para experiencias de HM <i>invitro</i> . ....	86
4.3.	Visualización con microscopías óptica y TEM de las NPMs internalizadas.....	89
4.4.	Cuantificación de NPMs internalizadas por las células A549 .....	92
4.4.1.	Citotoxicidad causada por NPMs sin recubrir del tipo $Fe_3O_4$ .....	96
4.4.2.	Citotoxicidad causada por NPMs recubiertas del tipo $AC-Fe_3O_4$ .....	97
4.4.3.	Citotoxicidad $Fe_3O_4@A549$ por aplicación de campos de radiofrecuencia .....	99
4.5.	Generación de las células A549 transducidas con vectores lentivirales <i>HSP70B-EGFP</i> y <i>CMV-EGFP</i> .....	101
4.5.1.	Caracterización térmica de las células A549( <i>HSP70B-EGFP</i> ).....	103
5.	Metodología de evaluación del aumento de temperatura celular .....	105
5.1.	Estrés en células <i>A549(HSP70B-EGFP)</i> por aplicación de radiofrecuencia .....	107
5.2.	Estrés en células $X@A549(HSP70B-EGFP)$ .....	107
5.3.	Estrés en células $X@A549(HSP70B-EGFP)$ inducido con campos de RF .....	108
5.3.1.	Efecto de campos de RF en $AC-Fe_3O_4@A549 (HSP70B-EGFP)$ .....	109
5.3.2.	Efecto de campos de RF en $X@A549(HSP70B-EGFP)$ (con $X=Fe_3O_4, AC-Fe_3O_4$ y $SiO_x-Fe_3O_4$ ) .....	110
6.	Resumen y conclusiones.....	118



# Motivación y justificación

El uso de nanopartículas de óxido de hierro para el calentamiento de tumores fue propuesto por primera vez por R.K.Gilchrist<sup>1</sup> en el año 1957 utilizando partículas micrométricas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en una proporción de 5 mg de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por gramo de tejido para calentar nodos linfáticos. Esta idea fue posteriormente retomada por el grupo de A. Jordan en año 1996<sup>2</sup> momento en el que se comienzan a definir las bases experimentales y teóricas, para el establecimiento de la hipertermia magnética (HM) como terapia para el tratamiento de tumores cancerígenos.

La terapia por hipertermia magnética<sup>3</sup> se realiza mediante la aplicación de un campo de radiofrecuencia (típicamente 100 kHz, 15 kA/m) del cual las nanopartículas magnéticas (NPMs), absorben energía del campo y la disipan al medio que las circunda, es decir líquido en el caso de un ferrofluido o suspensión coloidal magnética, cultivo celular en el caso de experiencias *invitro* con células que han internalizado NPMs y tejido tumoral en el caso real de una aplicación terapéutica. Cuando las NPMs han sido localizadas en un tumor se induce su hipertermia (elevación de temperatura hasta 43-45°C), que provoca la apoptosis (muerte) selectiva de las células cancerígenas. La HM surge como una terapia alternativa para tratamiento de tumores malignos debido a que se ha observado que varios tipos de células tumorales poseen una mayor sensibilidad a un incremento de temperatura superior a 41°C que las células normales<sup>3,4</sup>. La aplicación de esta terapia en forma conjunta con terapias convencionales como la quimioterapia o la radioterapia hace que las células se vuelvan más sensibles al tratamiento convencional<sup>5</sup>. La hipertermia es denominada termoablación, cuando el incremento de temperatura va hasta valores en el rango de 45 a 55 °C. Si bien este tratamiento asegura una mayor destrucción del tumor, tiene la desventaja de inducir la muerte de las células por necrosis, generando un fuerte efecto citotóxico<sup>6</sup> en ambos tipos de células, las tumorales como las normales<sup>3</sup>.

Se utiliza como parámetro de mérito del proceso la potencia específica absorbida: parámetro SAR<sup>1</sup> (*Specific Absorption Rate*) que es la potencia por unidad de masa de NPMs. Este parámetro se determina experimentalmente en forma calorimétrica bajo la aplicación de campos de radio frecuencia de amplitud  $H_0$  y frecuencia  $f$ . Teóricamente se lo modela<sup>7</sup> para un conjunto de partículas, cada una de volumen  $V$  y densidad  $\rho$  como:

$$SAR = \mu_0 \pi f H_0^2 \rho^{-1} V \chi''(f) \quad (1)$$

donde  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío y  $\chi''$  es la componente disipativa de la susceptibilidad que depende de las propiedades del coloide a través de los mecanismos de relajación de Néel y Brown<sup>8</sup>.

De la expresión (1) se infiere que la potencia liberada por la NPMs se incrementa al aumentar  $f$  y  $H_0$ . Sin embargo la estrategia de aumentar estas cantidades está limitada por cuestiones fisiológicas, que establecen un valor máximo del producto  $f H_0$  al cual una persona puede ser expuesta sin sentir malestar. El límite fisiológico<sup>9,10,11,12</sup> que no debe

---

<sup>1</sup> En la literatura esta magnitud aparece también con la sigla SLP que significa *Specific Loss Power* (Potencia Específica Disipada). Ambos, SAR y SLP representan la misma cantidad física.

excederse está dado por  $fH_0 < 5 \times 10^9 \text{ A m}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Debido a esta limitación, la mejora en el rendimiento de proceso recae en la optimización de las propiedades físicas de las NPMs.

Para una dada aplicación biomédica específica las NPMs deben ser diseñadas de modo tal que alcancen una mejora en los procesos físicos involucrados sin dejar de satisfacer los requerimientos biomédicos. Los requisitos físicos y biomédicos suelen apuntar en direcciones contrarias. Por ejemplo, en el caso de la terapia por HM, se inyecta una suspensión de partículas superparamagnéticas biocompatibles, directamente al tumor o a la arteria que suplementa al mismo, a fin de evitar la agregación y la consecuente obstrucción de vasos sanguíneos, las NPMs deben presentar alta estabilidad en suspensión. Un incremento de SAR se obtiene aumentando el tamaño de las NPMs y así su momento magnético, lo cual también favorece la agregación de las NPMs, siendo esta última una situación indeseada desde el punto de vista biomédico.

Las suspensiones mencionadas son coloides magnéticos. Estos coloides están constituidos por pequeñas partículas (monodominios magnéticos) dispersas en un líquido portador, como por ejemplo agua, líquidos orgánicos, aceites etc. Las partículas tienen un tamaño que pueden ir desde los pocos nanómetros hasta  $1 \mu\text{m}$ , pero siempre deben ser significativamente más grandes que las moléculas del medio dispersante. Ambas fases la dispersa y la dispersante deben ser inocuas. Entre los diversos materiales ferro o ferrimagnéticos ampliamente estudiados solamente el Fe y sus óxidos son aceptados por *US Food and Drug Administration* para su utilización en seres humanos. Debido a requisitos de biocompatibilidad, optamos por trabajar con óxidos de Fe, con ácido cítrico (AC) para su estabilización electrostática a pH neutro y como fase dispersante el agua. Elegimos trabajar con la fase magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) debido a que presenta mayor constante de anisotropía magnética y alta magnetización de saturación, situación que favorece la disipación de potencia en experiencias de HM. En este contexto se trabajó en el desarrollo de un coloide biomédico de características óptimas para la aplicación de HM.

Aunque, los estudios realizados hasta ahora, sugieren que la HM es una terapia prometedora para el tratamiento de tumores cancerígenos, hay incerteza acerca de los mecanismos involucrados que induzcan la muerte celular durante el tratamiento de HM, por lo cual es importante investigar estos mecanismos, para entender el rol específico de las NPMs en el proceso. Otros autores<sup>13,14</sup> han detectado muerte celular por apoptosis en células tumorales en experimentos de hipertermia magnética celular *invitro*, sin detectar un aumento significativo de temperatura en el cultivo durante el tratamiento. En la referencia 13, se discuten experiencias en células tumorales HeLa (humanas de útero) internalizadas con óxido de perovskita tipo  $\text{La}_{0.56}(\text{SrCa})_{0.22}\text{MnO}_3$ , donde se registró el disparo de la apoptosis celular inducida por el tratamiento con campos de 100 kHz y 12 kA/m, registrándose un incremento de temperatura menor de  $0.5^\circ\text{C}$ , respecto a la temperatura inicial del medio de cultivo ( $37^\circ\text{C}$ ). En la referencia 14, se reportó un decrecimiento de la viabilidad de células dendríticas internalizadas con NPMs de óxido de Fe desde 90 % a 2-5 % después de 30 min de exposición a campos de radiofrecuencia de 260 kHz y amplitud 13 kA/m, con un incremento de temperatura en el medio de cultivo de  $2^\circ\text{C}$  por encima de la temperatura inicial ( $26^\circ\text{C}$ ). Estos incrementos de temperatura registrados tanto en la referencia 13 como en la 14, son insuficientes para alcanzar la temperatura que induce la apoptosis celular. Este contexto nos llevó a intentar corroborar la hipótesis de que la muerte celular es causada por un calentamiento intracelular local, siguiendo la idea de que este calentamiento alcanza para inducir la muerte pero no para incrementar la temperatura global del cultivo. Para este fin, se diseñó e implementó una metodología de evaluación del aumento local de la temperatura celular debido a la incorporación de NPMs y estimulación con campos de radiofrecuencia a través de la inducción génica. En la Figura

1 se muestra un diagrama esquemático de la metodología mencionado, que involucra la síntesis y optimización de NPMs de  $Fe_3O_4$  y  $AC-Fe_3O_4$ , la transducción de células de la línea celular A549 (adenocarcinoma de pulmón humano) con un virus que posee la información genética que codifica la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) bajo la acción del promotor HSP70B (*Heat Shock Protein*)<sup>15</sup> inducible por temperatura, el análisis de la interacción entre las células y las NPMs  $Fe_3O_4$  y  $AC-Fe_3O_4$  y la evaluación de los efectos de la aplicación de campos de radiofrecuencia en las células que han internalizado las NPMs del tipo X@A549(HSP70B-EGFP) con X=  $Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$ .

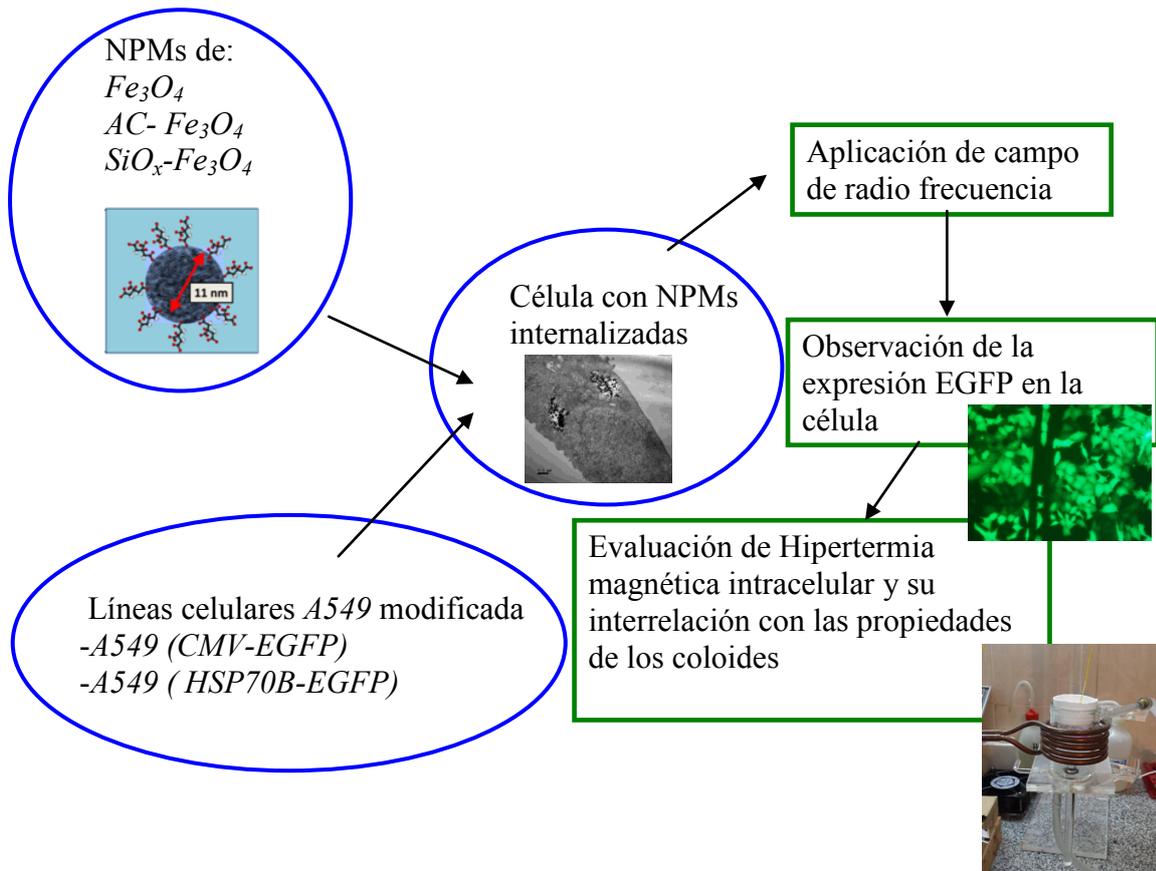


Figura 1: esquema de la metodología de evaluación del aumento de temperatura celular.

Las NPMs endocitadas en las células al ser expuestas a un campo magnético alterno causan un incremento de temperatura celular que activa el promotor y desencadena la expresión de la proteína EGFP, la cual emite bioluminiscencia en el verde del espectro visible.

La tesis se organiza con la siguiente estructura:

**Capítulo 1** se presenta una breve introducción y estado del arte sobre síntesis, estabilización y comportamiento magnético de los coloides, hipertermia magnética en células tumorales y transducción de células con vectores lentivirales.

**Capítulo 2** contiene una descripción de materiales y métodos utilizados.

**Capítulo 3** se discuten los resultados relacionados con la síntesis de un coloide biomédico para su aplicación en HM. Específicamente se analiza la optimización de la técnica de síntesis de NPMs de óxidos de Fe por co-precipitación química y de su recubrimiento para

estabilización en suspensión coloidal. Se establecen los parámetros de síntesis adecuados para alcanzar un valor de SAR óptimo según requisitos de biocompatibilidad, estabilidad en suspensión, tamaño y polidispersidad. Se presenta también una caracterización detallada de las propiedades fisicoquímicas y magnéticas de estos sistemas y la determinación experimental del SAR de las NPMs en el estado de suspensión acuosa estable.

**Capítulo 4** se describen resultados relacionados con la generación de las células transducidas con los vectores lentivirales *A549 (HSP70B-EGFP)* y las características magnéticas de las suspensiones coloidales que se van a utilizar en la metodología de evaluación de hipertermia intracelular, descrita en el capítulo 5. Por otro lado, se discuten resultados relacionados con la interacción de las células *A549* con las NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y AC-  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , en términos de la captación (*uptake*), de la citotoxicidad y las determinaciones experimentales del SAR *invitro*.

**Capítulo 5** se discuten resultados del efecto (incremento de temperatura intracelular) del tratamiento de HM en células *A549 (HSP70B-EGFP)* mediante la determinación del porcentaje de células que expresan EGFP respecto a la población estudiada.

**Capítulo 6** resumen y conclusiones.

# 1. Introducción y estado del arte.

## 1.1. Síntesis y estabilización de coloides magnéticos.

### 1.1.1. Síntesis de nanopartículas magnéticas (NPMs).

Se conocen diferentes técnicas tanto físicas como químicas para sintetizar Nanopartículas Magnéticas NPMs. Entre las técnicas físicas podemos citar a la deposición de vapor<sup>16</sup>, evaporación /condensación<sup>17,18</sup>, ablación láser y litografía<sup>19</sup>. Estas técnicas generan NPMs con un buen grado de cristalinidad, pero poseen la desventaja de ser muy costosas y tener bajo rendimiento de producción. Por otro lado, las técnicas químicas como por ejemplo la descomposición térmica<sup>20</sup>, microemulsión<sup>21</sup>, síntesis hidrotérmica<sup>22</sup> y coprecipitación química<sup>23,24,25</sup> presentan la ventaja de que se obtienen NPMs que ya se encuentran dispersas en un medio líquido y no en un sustrato como en los métodos físicos, con la excepción de la ablación láser que se obtiene en líquido pero a concentraciones muy bajas. Las principales características de los 4 métodos químicos recién mencionados son resumidas en la *Tabla 1.1*.

Si bien la coprecipitación química es una técnica simple que se realiza a temperaturas bajas (20 - 90 °C) y presión atmosférica posee la desventaja de producir partículas con polidispersidad de tamaños y un pobre control de la forma de las mismas. La microemulsión es un método bastante complicado y de muy bajo rendimiento. Por otro lado la descomposición térmica si bien permite un amplio control de la forma, tamaño y de la distribución de tamaños de las NPMs posee la dificultad de que estas NPMs son hidrofóbicas y solo pueden ser resuspendidas en solventes orgánicos los cuales no son biocompatibles, lo cual presenta una dificultad para las aplicaciones biomédicas.

Nosotros elegimos la coprecipitación como técnica para la obtención de las NPMs de magnetita, ya que esta técnica permite obtener las NPMs en agua de manera sencilla y con alto rendimiento lo cual beneficia y facilita su posterior caracterización. Dentro de las técnicas químicas, la coprecipitación posee la ventaja de permitir variar las condiciones de síntesis, como por ejemplo: el pH, los tipos de reactivos iniciales y temperatura de reacción, con el propósito de optimizar las características de las NPM obtenidas. Se sabe que ajustando el pH y la fuerza iónica del medio precipitante es posible controlar el tamaño medio de las partículas en un rango (1.6 – 12.5 nm)<sup>26</sup>. Estudios realizados por G. Gnanaprakash<sup>27</sup>, establecieron que el tamaño promedio de las NPMs obtenida, depende del pH inicial de la mezcla de reacción, previa al agregado del agente precipitante. Además encontraron que si este pH inicial es inferior a 5 la cantidad de otros óxidos de Fe contaminantes, como por ejemplo la goetita,  $\alpha$ -FeOOH es menor. Por otro lado Kim<sup>28</sup>, encontró que aumentando la concentración de la base precipitante utilizada para un pH final fijo se incrementa el tamaño de la partícula obtenida y que si el pH final se incrementaba el tamaño de la partícula disminuía. L. Andreade y colaboradores<sup>29</sup> verificaron que si el pH final de la síntesis caía en el rango entre 9.7 y 10.6 la cantidad de impurezas disminuía.

Método de Síntesis	Síntesis	T de reacción (°C)	Tiempo de reacción	solvente	Recubrimientos superficiales	Ancho de distribución de tamaños	Control de forma	Rendimiento
Coprecipitación	Muy simple y cond. amb.	20-90	min	agua	Durante o después de la reacción	Relativamente estrecho	No	alto
Descomposición térmica	Atmosfera inerte, complicado	100-320	Días-h	Comp. Org.	Durante la reacción	Muy estrecho	Muy bueno	alto
microemulsión	Complicado, condiciones ambientales	20-50	H	Comp. Org.	Durante la reacción	Relativamente estrecho	Bueno	Bajo
Síntesis Hidrotermica	Simple, alta presión	220	H, casi días	Agua o etanol	Durante la reacción	Relativamente estrecho	Muy Bueno	Medio

*Tabla 1.1: Características principales de métodos químicos para obtener NPMs de magnetita.*

El método de coprecipitación que proporcionan partículas con tamaño nanométrico ha sido ampliamente usado para sintetizar óxidos de hierro y en este sentido resultan bien conocido el método de Massart<sup>23</sup>, con el que se obtienen coloides magnéticos constituidos por NPMs de magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) de alrededor de 12 nm, a través de la coprecipitación de iones de Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup> en relación molar de 2:1 usando una disolución de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH) como agente precipitante, según la siguiente reacción.



Tanto el pH final de la mezcla de reacción, como la relación molar entre Fe<sup>+3</sup> y Fe<sup>+2</sup> determinan el tipo de óxido de hierro que se obtiene en la síntesis por coprecipitación química. Jean Pierre Jolivet<sup>30</sup> estudió el mecanismo de reacción y estudió las diferentes fases de óxido de hierro obtenida en función de las condiciones de reacción.

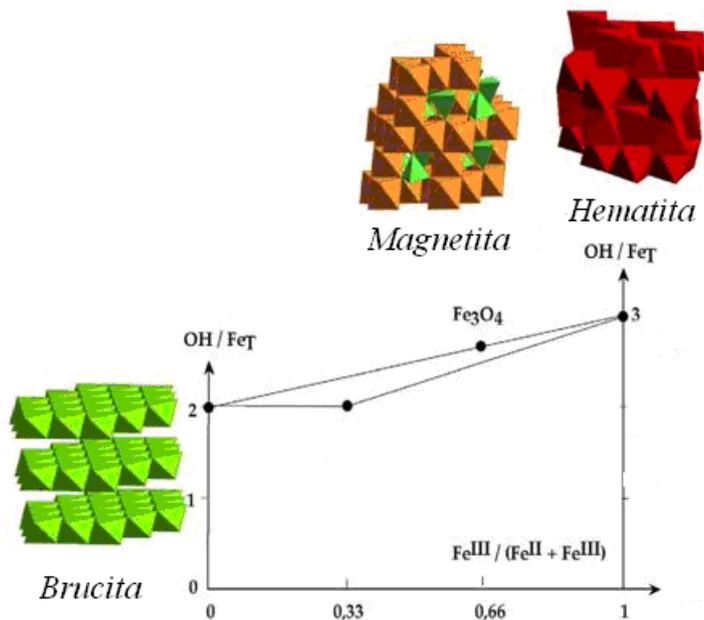


Figura 1.1: Esquema de las diferentes fases de óxido de hierro obtenidos en función de las condiciones de reacción.

En la Figura 1.1 1.1 se muestra las condiciones necesarias para obtener magnetita. De este gráfico se infiere que para obtener magnetita como producto final de reacción es necesario que el pH de la solución se encuentre entre (9-14), o lo que es lo mismo que la concentración de oxidrilos (OH<sup>-</sup>) sobre la concentración de hierro total (Fe<sub>T</sub>) sea mayor a dos y que la fracción molar de Fe<sup>+3</sup> / [Fe<sup>+2</sup>+Fe<sup>+3</sup>] sea igual a 0.66 (esta fracción molar se corresponde con una relación molar de Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> igual a dos 2). El medio de reacción durante la síntesis debe mantenerse libre de oxígeno para evitar la oxidación de magnetita a maghemita (γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ya que la superficie de las partículas es muy reactiva (alta relación de superficie/volumen) y por lo tanto son susceptibles a la oxidación.

Se conocen 16 tipos de óxidos, hidróxidos y oxi-hidróxidos<sup>31</sup> de Fe en la Tierra, la principal diferencia entre ellos es el estado de oxidación del Fe: el óxido de Fe<sup>+2</sup> (FeO) se lo conoce como wustita, al óxido de Fe<sup>+2</sup> y Fe<sup>+3</sup> se lo conoce como magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) y los óxidos de Fe<sup>+3</sup> son la hematita (α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), β-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemita) y ε-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. La hematita es la fase más estable en el *bulk* y a escala manométrica la maghemita es la que posee menor energía superficial y mayor estabilidad. Las principales características de estos óxidos se listan en la Tabla 1.2.

La fase maghemita puede ser obtenida por deshidratación de la lepidocrocita (γ-FeOOH) o por oxidación de la magnetita. Se sabe que la oxidación del Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup> para obtener maghemita produce vacancias (□) en las posiciones octaédricas de la estructura de la magnetita  $3Fe^{+2} \rightarrow 2Fe^{+3} + \square$ . Por lo tanto se hace muy importante conocer sobre la diversa química de los óxidos de Fe antes de sintetizarlos ya que podríamos transformar una fase en otra de diferentes maneras como las ejemplificadas en la Figura 1.2.

Fase	Fe <sup>+n</sup>	Estruc. Cristalina	Parámetro de celda (Å)	Orden magnético	M <sub>s</sub> (Am <sup>2</sup> /kg)	K (J/m <sup>3</sup> )	color
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Fe <sup>+2</sup> , Fe <sup>+3</sup>	Espinela cúbica invertida	a= 8.394	Ferrimagnético	90	~10 <sup>5</sup>	Negro
γ Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sup>+3</sup>	Espinela cúbica invertida	a= 8.346	Ferrimagnético	60	~10 <sup>5</sup>	Marrón rojizo
α-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sup>+3</sup>	Hexagonal	a=b=5.034 c=13.752	Antiferromagnética	0.4	~3.10 <sup>4</sup>	Rojo brillante
ε-Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sup>+3</sup>	Rómbica	a=5.087 b=8.784 c=9.469	Ferrimagnético	15	~5.10 <sup>5</sup>	Rojizo

Tabla 1.2: Propiedades estructurales y magnéticas de óxidos de Fe. Fe<sup>+n</sup> catión de Fe con “n” estado de oxidación, M<sub>s</sub> magnetización de saturación a temperatura ambiente y K constante de anisotropía magnética del bulk.

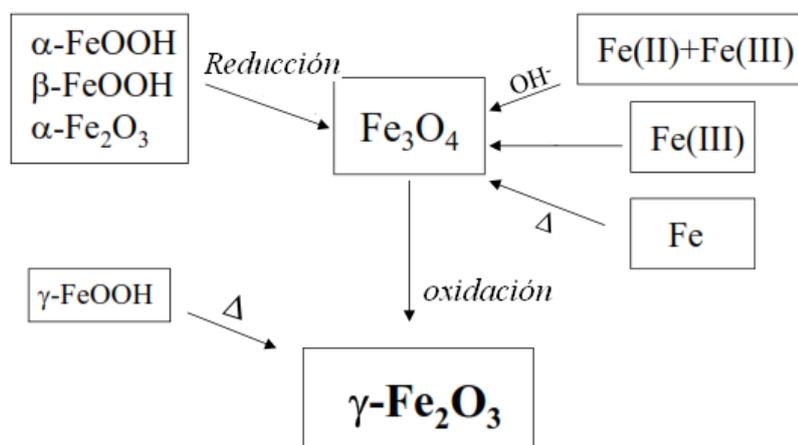
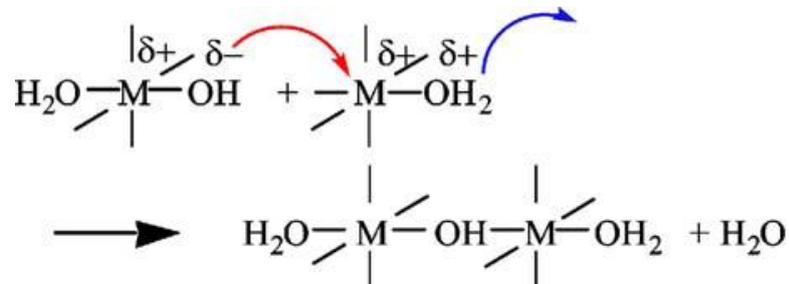


Figura 1.2: Rutas de transformación entre los diversos óxidos de Fe

### 1.1.2. Mecanismo de formación de la magnetita

Cuando los cationes de Fe (Fe<sup>+2</sup> - Fe<sup>+3</sup>) se los disuelve en agua forman acuocomplejos hexahidratados [Fe (OH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>]<sup>+z</sup>, donde z es la carga del catión. Como el Fe<sup>+3</sup> posee una alta relación (carga/tamaño) hidroliza las moléculas del agua dando lugar a los acuohidroxo complejos inestables. Como el Fe<sup>+3</sup> forma acuocomplejos más ácidos que el Fe<sup>+2</sup> la hidroxilación de éstos ocurren en un rango de pH muy distinto. La hidrólisis del Fe<sup>+2</sup>

ocurre a valores de pH entre siete y ocho, mientras que la correspondiente al  $Fe^{+3}$  sucede a partir de un pH de cuatro. Estos acuohidroxo complejos son especies muy inestables y tienden a reaccionar entre sí a través de un mecanismo de condensación formando estructuras cristalinas como por ejemplo la que se esquematiza en la *Figura 1.3*, donde M representa a los cationes de Fe y  $\delta+$ ,  $\delta-$  son la densidad de carga positiva o negativa sobre cada uno de los átomos.

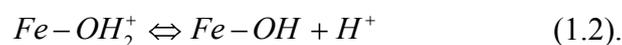


*Figura 1.3: Mecanismo de condensación entre dos acuohidroxo complejos.*

Este mecanismo desencadena la formación de una estructura ferrihidratada inestable en cuya red cristalina se incorporan los cationes de  $Fe^{+2}$  y la mezcla de valencias conduce a una estructura cristalina tipo espinela inversa<sup>30</sup>.

### 1.1.1. Características ácido/básicas de la superficie de la magnetita

En medio acuoso la superficie de las partículas de los óxidos de  $Fe^{32}$  se encuentra hidratada, recubierta de grupos del tipo Fe-oxidrilos ( $Fe-OH$ ). Estos grupos funcionales son los que controlan la carga superficial de las partículas, a través de reacciones de adsorción y desorción de protones ( $H^+$ ). Esto quiere decir que los grupos  $Fe-OH$  pueden desarrollar tanto carga positiva ( $Fe-OH_2^+$ ) como negativa ( $Fe-O^-$ ) dependiendo del pH de la solución. Es decir la superficie presenta un carácter anfotérico. Las reacciones mencionadas se muestran en (1.2) y (1.3).



Por lo tanto alrededor de cada partícula cargada se distribuyen iones de la solución que tienen carga opuesta formando una “doble capa eléctrica”<sup>33</sup>. Una representación esquemática<sup>34</sup> de la interfase de la fase magnética en solución acuosa se muestra en la *Figura 1.4*. En este modelo se representa la capa de densidad de carga difusa ( $\sigma_d$ ), la densidad de carga superficial producida por la ionización de los grupos oxidrilos sobre el plano superficial ( $\sigma_0$ ) y los contraiones que complejan estos sitios ionizados y que desarrollan carga sobre el plano Helmholtz ( $\sigma_\beta$ ). Aunque este sistema es eléctricamente

neutro, hay una densidad de carga neta cerca de la superficie de las NPMs, debida a la diferente densidad de iones y contraiones presentes.

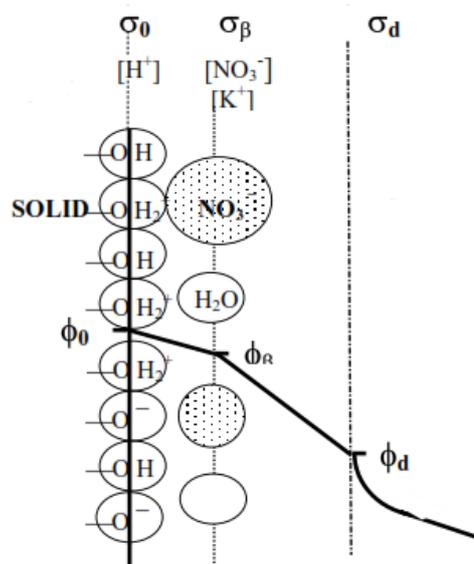


Figura 1.4: Representación esquemática de la doble capa eléctrica

Entre la superficie de la partícula y el plano Helmholtz indicado en la figura, el potencial eléctrico decae linealmente con la distancia. A partir del plano de Helmholtz ( $\sigma_\beta$ ) hacia el seno de la solución el potencial decae exponencialmente. El plano deslizamiento que se encuentra cercano al ( $\sigma_\beta$ ) separa el área de los electrolitos que están ligados a la partícula y se mueven conjuntamente con ella, del seno de la solución. Al potencial de este plano se lo llama potencial Z ( $\zeta$ ) y se utiliza como indicador de la carga superficial de las NPMs y de la estabilidad del coloide.

La densidad de carga superficial como función del pH ha sido determinada por titulación potenciométrica sobre NPMs de maghemita<sup>34</sup>. El pH al cual la densidad de carga superficial se hace cero se llama punto de carga cero, *point of zero charge* (PZC). Por otro lado el punto isoeléctrico, *point isoeléctrico* (IEP) es el pH al cual las NPMs no se mueven cuando se las expone a un campo eléctrico. En general los óxidos de Fe poseen un valor de PZC entre el rango de 6 a 10<sup>35</sup>. La densidad de carga superficial como función del pH ha sido determinada por titulación potenciométrica sobre NPMs de maghemita<sup>34</sup>. Para valores de pH menores que el PZC la superficie del óxido se encuentra cargada positivamente, mientras que para valores de pH mayores que el PZC la superficie se encuentra cargada negativamente. Debido a que el PZC de la magnetita está cercano a 7 las NPMs de magnetita no poseen carga superficial a pHs fisiológicos<sup>36</sup>. Si se le adsorbe a los grupos  $Fe-OH$  moléculas orgánicas con grupos funcionales ácidos, como por ejemplo ácido cítrico (AC) el valor de PZC varía hacia un valor cercano a dos. De esta manera, la superficie de las partículas adquiere alta carga negativa para valores de pH cercanos al fisiológico.

### 1.1.2. Estabilización de las NPMs en suspensión

Para las aplicaciones biomédicas las NPMs deben ser estabilizadas en el coloide para evitar su agregación y sedimentación.

A través de las fuerzas de van der Waals las NPMs forman agregados entre sí, los cuales se atraen a través de interacciones magnéticas formando aglomerados. En la literatura se reporta que si estos aglomerados superan un cierto radio crítico ( $d_{crit}$ )<sup>37</sup> definido como se muestra en la ecuación (1.4) sedimentan inestabilizando el coloide.

$$d_{crit} = \sqrt[3]{\frac{6k_B T}{\pi \Delta \delta g h}}, \quad (1.4)$$

donde,  $k_B$  es la cte. de Boltzman,  $T$  la temperatura,  $\Delta \delta$  la diferencia de densidad entre la partícula y el solvente,  $g$  la gravedad y  $h$  la altura de la muestra.

La estabilidad de un coloide de NPMs estabilizado eléctricamente ha sido estudiada por Derjaguin y Landau<sup>38</sup> y por Verwey y Overbeek<sup>39</sup> dando lugar a la formulación de la teoría denominada DLVO. Esta teoría solo considera las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas electrostáticas entre dos partículas. Pero como las suspensiones coloidales que trabajamos durante esta tesis son de NPMs de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) o maghemita ( $Fe_2O_3$ ) las interacciones dipolares magnéticas deben tenerse en cuenta<sup>40</sup>. Para partículas monodominio con un momento magnético<sup>2</sup>  $\mu$ , la energía de interacción dipolar ( $E_{dip}$ ) de las partículas esféricas de radio ( $r$ ), con sus momentos magnéticos  $\mu$  paralelos y apuntando en la dirección de la línea que conecta los dos centros está dada por la ecuación (1.5):

$$E_{dip} = -\frac{\mu^2}{2\pi\mu_0 r^3} \quad (1.5)$$

Las fuerzas dipolares magnéticas entre 2 NPMs actúan a larga distancia, pero como el momento magnético es proporcional al volumen de la partícula<sup>40</sup>, se sabe que suspensiones coloidales de partículas de maghemita menores que 10 nm suelen ser sumamente estables y que la energía magnética entre las NPMs es menor que la energía térmica a temperatura ambiente<sup>41</sup>.

Pero para partículas de tamaño mayor la interacción dipolar magnética se hacen importante y las NPMs agregan inestabilizando el coloide. Por lo tanto es necesario estabilizar al coloide a través del recubrimiento de las NPMs.

Los métodos más comunes para la estabilización de las NPMs en el coloide son la adsorción de electrolitos, surfactantes, recubrimiento con polímeros y estabilización con sílice. La adsorción de electrolitos es un método fácil pero se da en condiciones de pH restringidas. Un ejemplo de este tipo de estabilización es el que se consigue cuando las NPMs se sintetizan por coprecipitación ya que para valores de pH tan alcalinos, como los

---

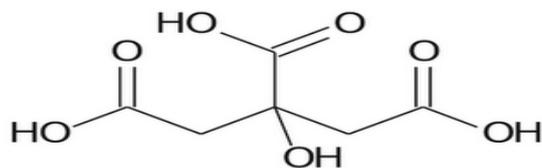
<sup>2</sup> El símbolo  $\mu$  empleado para designar el momento magnético de una NPM no debe confundirse con la permeabilidad del material. En este trabajo no se hace referencia a la permeabilidad como la magnitud física que caracteriza la respuesta magnética sino que en su lugar se emplea la susceptibilidad, una cantidad más adecuada para este tipo de materiales.

que se obtienen ni bien finaliza la síntesis, los iones oxidrilos se adsorben sobre la superficie de las NPMs estabilizándolas eléctricamente. Pero a medida que neutralizamos el exceso de base las NPMs comienzan a inestabilizarse. La repulsión estérica se da cuando el recubrimiento se adsorbe sobre la superficie manteniendo las NPMs alejadas entre sí y evitando que se agreguen, ya que aleja los centros magnéticos disminuyendo la atracción dipolar magnética. Un ejemplo de este tipo de recubrimiento son las capas de metales nobles<sup>42</sup>. Por repulsión electrostática se entiende cuando el recubrimiento le confiere a las partículas una carga eléctrica, repeliéndose de esta manera entre sí manteniéndose estables en suspensión, por ejemplo cuando se la recubre con un surfactante iónico.

Otro ejemplo de estabilización se da con los polímeros. Estos son moléculas grandes y flexibles, las cuales evitan que se acerquen entre sí las NPMs debido a una fuerza elástica repulsiva. Los más frecuentemente utilizados son el carboxidextrano, el polivinilalcohol (PVA), el polietilenglicol (PEG), la gelatina, el dextrano y el quitosano.

Dentro de las diferentes maneras de conseguir coloides acuosos estables a pH fisiológico, la utilización de moléculas orgánicas de bajo peso molecular, tales como aminoácidos<sup>43</sup>, péptidos<sup>44</sup>, ciclodextrina<sup>45</sup> y ácido cítrico<sup>46,47,48</sup> presentan la ventaja de estabilizar a las NPMs a través de los dos mecanismos tanto por repulsión estérica como electrostática lográndose así una mayor estabilidad de las NPMs en el coloidal. Por otro lado, estos tipos de recubrimientos poseen grupos funcionales reactivos los cuales permiten unir a la superficie de las NPMs moléculas químicas de interés.

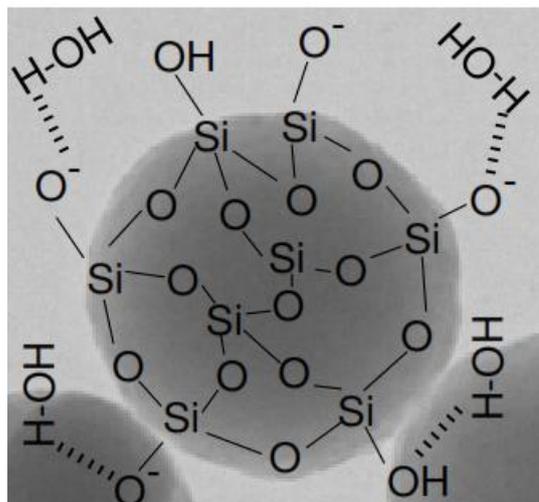
Para esta tesis se eligió estabilizar las NPMs recubriéndolas con ácido cítrico (AC). Este es un ácido poliprótico que posee tres grupos carboxilos, con valores de constante ácidas<sup>49</sup>  $K_{a1}=7.10e^{-4}$ ,  $K_{a2}=1.68e^{-5}$  y  $K_{a3}=6.4e^{-6}$  y un grupo hidroxilo. En la *Figura 1.5* se muestra la fórmula desarrollada del AC. Este ácido se une a través de la quimisorción de uno o dos de sus grupos carboxílicos con los grupos oxidrilos de la superficie de la NPM. Así los grupos carboxílicos que no están implicados en la unión quedan libres y se disocian a pH fisiológicos confiriendo carga negativa a la superficie de las NPMs. Por otro lado, estos grupos funcionales libres pueden unirse a otras moléculas de interés biológico funcionalizando de esta manera a las NPMs. Algunos ejemplos de estas NPMs funcionalizadas son las NPMs recubiertas con rodamina<sup>50</sup> o con doxorubicina<sup>51</sup>.



*Figura 1.5: Representación esquemática del ácido cítrico, Acido 2-Hidroxi-1,2,3-propano tricarbóxico ( $HOC(CH_2CO_2H)_2CO_2H$ ).*

Los coloides magnéticos sintetizados son soluciones acuosas de NPMs de ( $Fe_3O_4$ ) suspendidas a un pH=7, los cuales se encuentran estabilizadas electrostáticamente, mediante un recubrimiento AC, por lo tanto se las rotula como (AC-  $Fe_3O_4$ ).

Otro método de estabilización de coloides es el recubrimiento de las NPMs con sílice ( $\text{SiO}_x$ ), este compuesto provee carga negativa a las NPMs para un amplio intervalo de pH y por otro lado posee la ventaja que puede ser fácilmente funcionalizable<sup>52</sup>. Los grupos silanoles de la sílice son los responsables de la carga negativa en la superficie de las partículas. Una simple representación esquemática de NPMs recubiertas con sílice se muestra en la *Figura 1.6*, donde se ven los grupos silanoles cargados negativamente y formando puentes de hidrogeno con moléculas de agua.



*Figura 1.6: Representación esquemática de NPM recubiertas con sílice.*

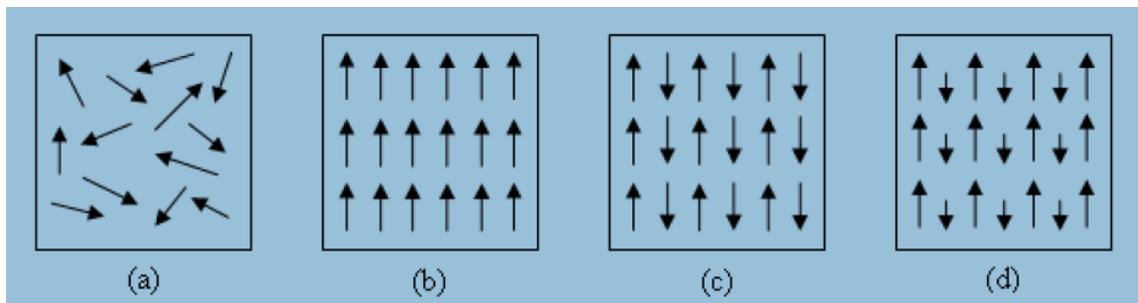
La modificación de las NPMs magnéticas recubiertas con sílice con grupos fosfonatos condujo a una alta estabilización electrostática de estas NPMs en agua. Los grupos ( $\text{SiO}_x/\text{Fosfonato}$ ) permitieron posteriormente unir moléculas de polietilénimina (PEI) confiriéndoles carga positiva a las NPMs y ser utilizadas de esta manera en una terapia génica denominada magnetofección<sup>53</sup>. Es importante la elección del recubrimiento debido a que este determina las características del coloide. Se sabe que las NPMs con recubrimientos de carga positiva ingresan mejor en las células tumorales que las NPMs recubiertas con carga negativa, pero les produce un efecto citotóxico mayor probablemente debido a su mayor afinidad por la carga negativa de la membrana plasmática<sup>54</sup>. Las nanopartículas del tipo  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$  utilizadas en este trabajo fueron provistas por el Dra. Olga Mykhaylyk del Klinikum rechts der Isar, Institut für Experimentelle Onkologie und Therapie Forschung. Technische Universität München, Munich, Alemania.

## 1.2. Magnetismo en coloides

Debido a que las NPMs son la principal herramienta en este trabajo, se describirán algunos conceptos básicos del magnetismo que son necesarios para entender los fundamentos de las técnicas que se utilizarán para la caracterización física de las NPMs y en la evaluación de sus respuestas a campos magnéticos alternos.

El orden magnético que adopta un material depende del acoplamiento entre sus momentos magnéticos atómicos. Cada uno de éstos tiene componentes orbital y de espín que son proporcionales a los momentos angulares correspondientes. El acoplamiento entre los momentos magnéticos atómicos posee un origen cuántico y se denomina interacción de

intercambio. Es de corto alcance pero da como resultado un orden magnético de largo alcance, el cual genera diferentes arreglos magnéticos en el material, los mismos se muestran esquematizados en la *Figura 1.7*.



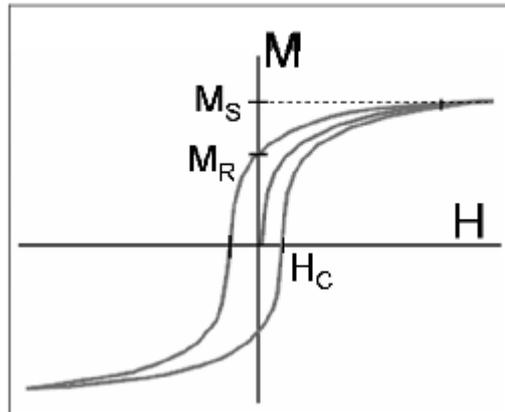
*Figura 1.7: distribución espacial de los momentos magnéticos atómicos en los estados (a) Paramagnético, (b) Ferromagnético, (c) Antiferromagnético y (d) Ferrimagnético*

En algunos materiales no hay una interacción entre los momentos magnéticos atómicos (diamagnéticos y paramagnéticos), mientras que en otros hay una interacción de intercambio entre los momentos magnéticos atómicos (ferromagnéticos, ferrimagnéticos y antiferromagnéticos). La respuesta de un material a un campo magnético aplicado ( $\mathbf{H}$ ) es medida por la densidad de momento magnético o Magnetización ( $\mathbf{M}$ ). La relación entre estas dos magnitudes se denomina susceptibilidad magnética ( $\chi$ ). Por lo tanto  $\chi$  indica el grado de magnetización de un material cuando se le aplica un campo magnético  $\mathbf{H}$ .

$$\chi = \frac{M}{H} \quad (1.6)$$

Los materiales dia o paramagnéticos presentan valores de  $\chi$  muy bajos y magnetización sólo en presencia de un campo  $\mathbf{H}$ , con valores de  $\chi = -10^{-5} / -10^{-4}$  y  $10^{-5} / 10^{-2}$ , respectivamente. Otros tipos de materiales, los ferro, ferri y antiferromagnéticos presentan un estado magnético ordenado y son magnéticos aún en ausencia de campo. Estos materiales difieren en el acoplamiento de sus momentos magnéticos atómicos. En el caso de los ferromagnéticos se encuentran alineados paralelamente entre sí y aparecen regiones extendidas (dominios) que poseen un momento magnético neto. En estos materiales la susceptibilidad toma valores típicos entre  $\chi = 10 - 10^5$ . Por otro lado, en los Ferri los momentos se ordenan de manera antiparalela pero sin compensarse por lo cual también presentan dominios con momento magnético neto y valores de  $\chi = 50 - 10^4$ . Por último los materiales antiferromagnéticos poseen un ordenamiento de los momentos magnéticos de manera antiparalelas sin un momento magnético neto y con una susceptibilidad del orden de la observada en paramagnetos.

En los materiales ferromagnéticos<sup>55</sup> los momentos magnéticos atómicos interactúan entre sí debido a la interacción de intercambio y se alinean paralelamente. En estos materiales es frecuente observar una magnetización neta en ausencia de un campo magnético aplicado, llamada Magnetización remanente ( $M_R$ ). El campo necesario para llevar a la  $M_R$  a cero se denomina campo coercitivo  $H_C$ , estas magnitudes están indicadas en el ciclo de histéresis  $M$  vs.  $H$ , que se muestra en la *Figura 1.8*. Cuando todos los momentos magnéticos se encuentran alineados con  $H$  se alcanza el valor máximo de  $M$  denominado Magnetización de saturación ( $M_S$ ). Éste es un parámetro intrínseco del material.



*Figura 1.8: curva de magnetización típica de materiales Ferro-Ferrimagnético, donde  $M_S$  es la magnetización de saturación,  $M_R$  es la magnetización remanente y  $H_C$  es el campo coercitivo.*

Para una cierta temperatura conocida como temperatura de Curie, la energía térmica es suficientemente grande, en comparación con la energía de intercambio, como para desordenar los momentos atómicos transformando el material en paramagnético.

Los materiales ferromagnético a su vez pueden encontrarse en un estado macroscópico no magnetizado debido a la existencia de dominios (regiones donde todos los momentos se encuentran ordenados) de tamaños del orden de los micrones. Las diferentes orientaciones de las magnetizaciones en los dominios de un material en equilibrio termodinámico en ausencia de un campo aplicado, resultan en una magnetización macroscópica nula. Dentro de un monocristal tales direcciones son pocas y dependen de sus propiedades de simetría, determinadas por la estructura cristalina. Estas propiedades definen una anisotropía, es decir, direcciones fáciles para la magnetización para las cuales la energía es mínima. En adición, en un material policristalino, los granos cristalinos suelen estar aleatoriamente orientados.

También contribuyen a la anisotropía otros efectos, tales como la forma de la partícula o porción del material, la presencia de esfuerzos aplicados, y en el caso de partículas pequeñas, efectos de la superficie. Algunos de estas contribuciones se tratarán más adelante. Esta propiedad se introduce a través de la constante de anisotropía  $K$  que es la densidad de energía de anisotropía, o energía por unidad de volumen.

La creación de dominios disminuye la energía magnetostática pero aumentan las energías de intercambio y de anisotropía debido a la formación de paredes de dominio. Este aumento es consecuencia de que dentro de la pared los momentos se apartan de la dirección fácil y además no se encuentran perfectamente alineados entre sí.

Los materiales ferromagnéticos como los ferrimagnéticos están compuestos por pequeños dominios, cada uno de los cuales posee una magnetización espontánea en una cierta dirección como se esquematiza en la *Figura 1.9*. La suma de todos los vectores de magnetización es menor que si todos los momentos de los dominios estuvieran paralelos. El cambio de la dirección de  $M$  en una partícula multidominio necesita del desplazamiento de una pared de dominio. Este corrimiento puede conseguirse con campos magnéticos bajos ya que es un proceso de baja energía. A medida que disminuye el tamaño de la partícula disminuye el tamaño y número de dominios magnéticos hasta llegar a un valor de

radio crítico  $R_c$  por debajo del cual es energéticamente desfavorable crear dominios y la partícula queda como un monodominio en el cual todos los momentos están alineados en la dirección de fácil magnetización, es decir estado de saturación magnética. El comportamiento de las partículas monodominio, que son las herramientas de la terapia por HM, se discute en la sección 1.3

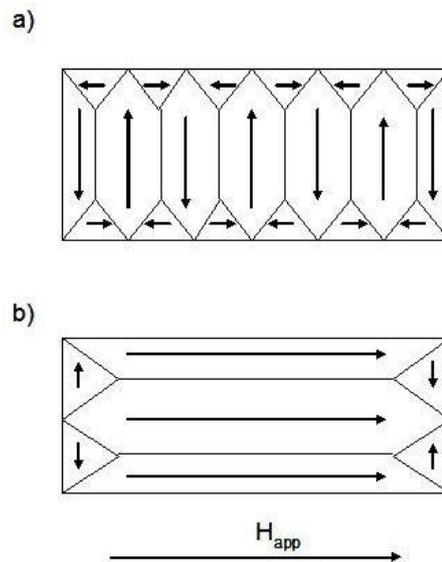


Figura 1.9: Material Ferromagnético multidominio, se esquematizan en **a)** como cada dominios magnético del material se magnetiza en una dirección diferente y en **b)** como cambia la dirección de la magnetización de los dominios y la paredes de dominio cuando se le aplica un campo externo  $H$ .

El comportamiento ferrimagnético se encuentra generalmente en compuestos iónicos como por ejemplo los óxidos. Dicho ordenamiento tiene origen en el acoplamiento de superintercambio en el que dos iones magnéticos se acoplan indirectamente a través de un ión oxígeno. Debido a la existencia de momentos magnéticos iónicos de valores diferentes (asociados a iones diferentes), el momento magnético neto es no nulo. Los materiales ferrimagnéticos al igual que los ferromagnéticos poseen magnetización espontánea, temperatura de Curie, histéresis y remanencia.

La magnetita ( $Fe_3O_4$ ), que es un ejemplo bien conocido de materiales ferrimagnéticos, presenta una estructura espinela que consiste en una red cúbica compacta *fcc* de iones  $O^{2-}$ . La mitad de los iones  $Fe^{+3}$  ocupan los intersticios tetraédricos (*t*) de dicha red y la otra mitad junto con los  $Fe^{+2}$  ocupan los intersticios octaédricos (*o*), según la relación  $[Fe^{+3}]_t[Fe^{+3} Fe^{+2}]_o O_4$ . En este caso domina la interacción de superintercambio entre los momentos de los iones  $Fe^{+3}$  en sitios vecinos *o* y *t* que resultan orientados de manera opuesta. La estructura magnética queda entonces determinada por este acoplamiento antiferro (ver estructura de este óxido en la Figura 1.10 1.10). El momento resultante por fórmula unidad  $Fe_3O_4$  es provisto por el ión  $Fe^{+2}$  ubicado en el sitio *o* y posee un valor de  $4 \mu_B$ . Como cada celda cristalina tiene 8 formulas unidad, hay  $32 \mu_B$  por celda cristalina.

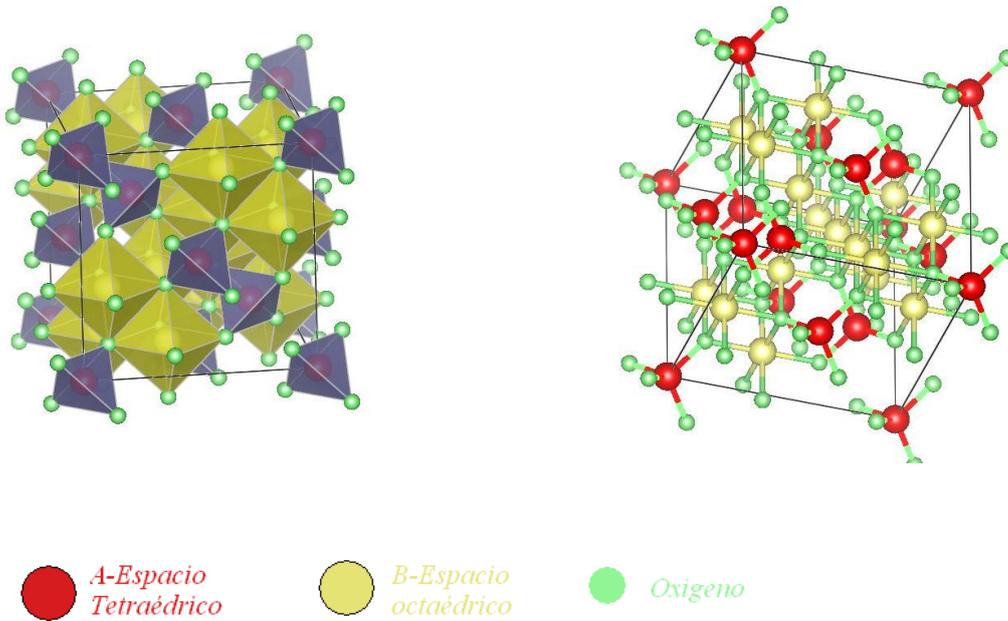


Figura 1.10: Sitios intersticiales donde se ubican los iones de Fe en la magnetita. A la izquierda se muestran los espacios octaédricos ocupados por  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$  y tetraédricos ocupados por  $Fe^{+3}$  y a la derecha se muestra la celda cristalina de la estructura espinela.

### 1.2.1. Cantidades magnéticas de interés y curva de histéresis.

El momento magnético  $\mu$  resultante de una muestra de material es la suma vectorial de sus momentos iónicos. El momento  $\mu$  es justamente la cantidad que mide un magnetómetro. Es usual definir a la magnetización  $\mathbf{M}$  como el cociente entre  $\mu$  y una propiedad extensiva del material, tal como su volumen  $V$  o su masa  $m$ . En el sistema internacional  $\mu$  tiene unidades de  $Am^2$ , la magnetización volumétrica tiene unidades de  $A/m$  y la magnetización másica posee unidades de  $Am^2/kg$  ( $emu/g$  en el cgs). Por lo tanto  $\mu$  se puede expresar en términos de la magnetización másica como

$$\mu = M \rho V \quad (1.7),$$

donde,  $\rho$  es la densidad del material.

Cuando un campo  $\mathbf{H}$  es aplicado a un material magnético, los momentos atómicos individuales del material contribuyen a la inducción magnética total  $\mathbf{B}$  del material como se indica en la ecuación (1.8).

$$\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H} + \mathbf{M} \quad (1.8)$$

donde  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío.

La caracterización experimental de los materiales magnéticos suele efectuarse siguiendo protocolos especiales diseñados para obtener información específica. Los ejemplos más

comunes consisten en medir su magnetización  $\mathbf{M}$  en función de un campo magnético aplicado  $\mathbf{H}$  a una temperatura fija, o en función de la temperatura a un campo fijo. Estos experimentos permiten obtener información sobre los mecanismos de magnetización, como por ejemplo del movimiento de paredes de dominio, de la rotación del momento neto dentro de un dominio, de la magnitud de las barreras de energía para la rotación del momento en una nanopartícula o para caracterizar tiempos de relajación del momento y procesos de histéresis magnética. Experimentalmente, el momento magnético se mide con instrumentos basados en diferentes propiedades físicas que reciben el nombre genérico de magnetómetros. En esta tesis se presentarán resultados obtenidos con un *Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM)* y con un *Superconducting Quantum Interference Device (SQUID)*. Estas técnicas se describen con mayor detalle en la sección 2.2.

Cuando un material magnético se encuentra fuera del equilibrio termodinámico las medidas de  $M$  en función de  $H$  o  $T$  presentan histéresis. En cambio, si se encuentra en equilibrio la magnetización es una función de estado y no depende de la historia previa. Este es el caso de un superparamagneto (SPM). Un ejemplo de estos dos casos se ve en la

*Figura 1.11*, donde se muestran las curvas de  $M(H)$  de una suspensión coloidal sintetizada en este trabajo, rotulada como *AC - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4.91)*, medida a 240 K y a 10 K.

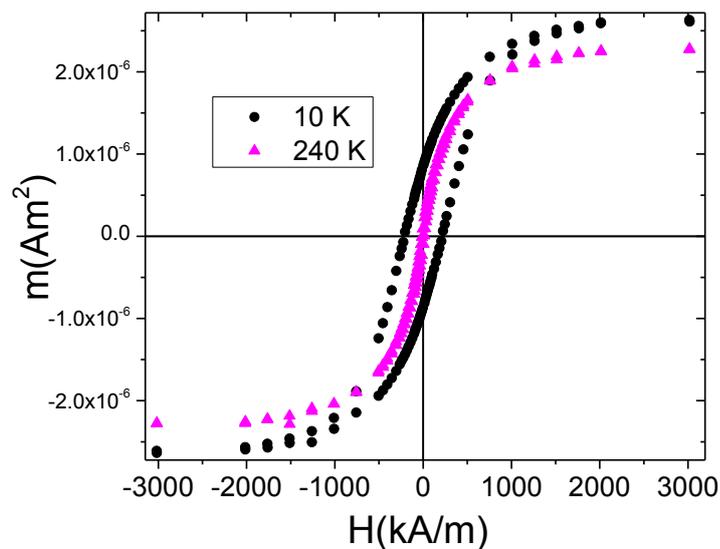
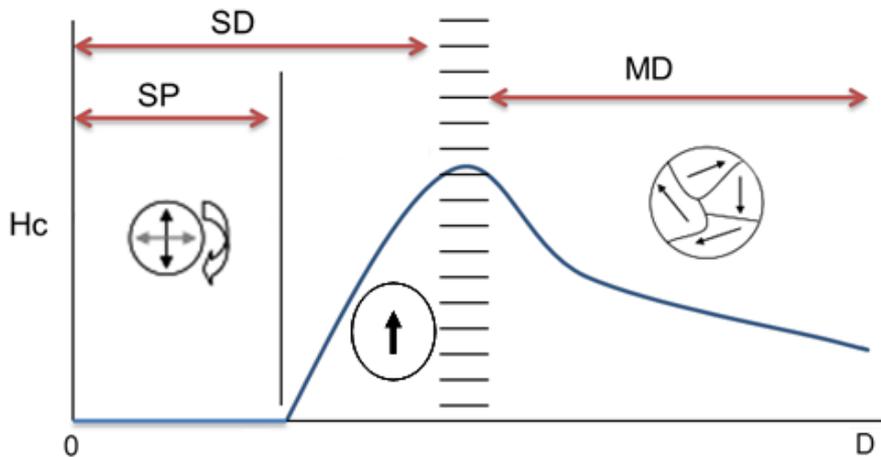


Figura 1.11: se muestran las curvas de  $M(H)$  medidas a 240 K (símbolos color magenta, sistema en equilibrio) y a 10 K (símbolos negros, histéresis, fuera del equilibrio) de la suspensión coloidal de partículas monodominio AC - Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(4.91)

El área de histéresis está relacionada con el tamaño de la partícula. En partículas grandes del orden de los micrones, es frecuente observar un estado fundamental multidominio (*MD*) que da lugar a un ciclo de histéresis angosto dado que se necesita un campo relativamente pequeño para hacer que las paredes de dominio se muevan; mientras que en partículas más pequeñas, como por ejemplo en una partícula monodominio (*single domain SD*) se suele observar un ciclo de histéresis más ancho. En partículas SD el momento magnético tiene que rotar pasando una barrera de energía dada por el producto de su volumen y su anisotropía  $K$  (que puede tener diversos orígenes, ver más adelante). En el caso de la magnetita la transición entre partículas MD y SD ocurre para un diámetro  $\leq 20$  nm<sup>56</sup>. En esta tesis, todas las partículas utilizadas tienen tamaños correspondientes al

estado monodominio. Reducciones del tamaño aún mayores provocan una disminución de la barrera de energía de anisotropía magnética  $KV$ , tan acentuada que la hace comparable e incluso menor que la energía térmica ( $k_B T$ ). Como resultado de esta reducción el momento magnético fluctúa libremente por activación térmica, en forma análoga al comportamiento de un momento elemental en un material paramagnético. Este tipo de comportamiento describe a los materiales superparamagnéticos ( $SP$ ). En este tipo de material se observan curvas sigmoideas de  $M(H)$  las cuales no presentan histéresis. La variación de la coercitividad con el diámetro de la partícula se muestra en la *Figura 1.12*.



*Figura 1.12: variación de la coercitividad con el diámetro de la partícula ( $D$ ), tamaños menores que  $2R_c$  se consideran partícula monodominio ( $SD$ ) y tamaños mayores que  $R_c$  se las considera multidominio ( $MD$ ).*

Las partículas magnéticas en el rango de tamaño nanométrico son necesariamente estructuras monodominio ( $SD$ ) y por lo tanto están magnéticamente saturadas aun en ausencia de campo externo. Se puede estimar un tamaño crítico ( $R_c$ ) de partícula por debajo del cual una partícula esférica puede considerarse monodominio. Éste ha sido estimado por Kittel<sup>57,58</sup>. Utilizando esta expresión calculamos para el caso de la magnetita y nos da un valor  $\sim 9$  nm de radio.

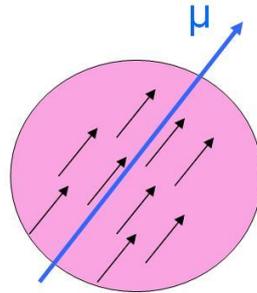
$$R_c = \frac{36\sqrt{K_{eff} \cdot A}}{\mu_0 \cdot M_s^2},$$

donde  $K_{eff}$  es la constante efectiva de anisotropía magnética y  $A$  es la densidad de energía de intercambio.

La respuesta de las NPMs a un campo magnético externo es diferente a la respuesta del material macroscópico, las NPMs rotan para orientar su momento magnético  $\mu$  en la dirección del campo  $H$  en lugar de mover sus paredes de dominio. El resultado de los acoplamientos magnéticos de los espines magnéticos dentro de un sistema de partículas monodominios es la formación de un supermomento  $\mu$  con un momento magnético relativo por unidad de partícula muy grande del orden de  $10^4$ - $10^5 \mu_B$ . Este es el fenómeno conocido como superparamagnetismo<sup>59,60</sup>. En este caso la coercitividad se acerca a cero ya que la fluctuación térmica evita la existencia de una magnetización remanente. Estos materiales al igual que los paramagnetos, poseen un momento magnético neto cuando se

les aplica un campo magnético externo y cuando este es removido su momento magnético neto se hace cero.

En la *Figura 1.13* se representa de manera esquemática el supermomento  $\mu$  para una partícula superparamagnética.



*Figura 1.13: El supermomento  $\mu$  se representa por un vector (clásico) mostrado con la flecha azul, cada  $\mu_{at}$  se representa con una flecha negra y  $N$  es el número de átomos magnéticos que conforman dicha partícula.*

En ausencia de campo aplicado la dirección que adopta la magnetización está en una dirección preferencial, denominada eje de fácil magnetización, el cual queda determinado a través de la energía de anisotropía. Como se mencionó, la anisotropía depende de la estructura cristalina (anisotropía magnetocristalina), forma del material (energía desmagnetizante), esfuerzos aplicados (magnetostricción) y en partículas pequeñas de efectos inducidos por la superficie de las mismas. Las interacciones entre partículas pueden también contribuir a la anisotropía. La inclusión de todos estos efectos anisotrópicos conduce a la definición de una constante efectiva  $K_{eff}$ .

Para los materiales magnéticos nanométricos, las principales contribuciones a la energía de anisotropía son la anisotropía magnetocristalina que se origina en la interacción de los electrones con la estructura cristalina, la anisotropía de forma que es extrínseca al material y por último la anisotropía de superficie, que es generada por la discontinuidad de sus propiedades debidas a la presencia de esta superficie. Este efecto se vuelve más significativo cuando el tamaño de las partículas disminuye ya que aumenta el número relativo de átomos en la superficie, estos átomos presentan un número de coordinación menor al número de coordinación de los átomos mas internos, por lo tanto los espines de la superficie se encuentran desordenados o presentan ordenamientos diferentes. Teniendo en cuenta que el efecto de la superficie es dependiente del tamaño de la partícula, para partículas esféricas no interactuantes se puede definir una constante de anisotropía efectiva ( $K_{eff}$ ), que incluye, además de la contribución magnetocristalina, la energía de anisotropía de superficie. En casos más complejos habrá contribuciones adicionales a  $K_{eff}$ .

$K_{eff}$  está dada por,<sup>61</sup>

$$K_{eff} = K + \frac{6}{d} \times K_s \quad (1.9)$$

donde,  $K_s$  es la constante de anisotropía de superficie,  $K$  es la constante de anisotropía magnetocristalina y  $d$  es el diámetro de la partícula.

### 1.2.1. Superparamagnetismo.

#### a) Modelo de Stoner y Wohlfarth

Según un modelo simple reportado por Stoner y Wohlfarth<sup>62</sup>, para partículas esféricas monodominio con anisotropía uniaxial que no interactúan entre sí, y en ausencia de campo magnético, la energía de anisotropía magnética  $E_{eff}$  se puede expresar como:

$$E_{eff} = K_{eff}Vsen^2\theta \quad (1.10)$$

donde  $\theta$  es el ángulo que forma el momento  $\mu$  de la partícula con el eje de fácil magnetización y  $E_{eff}$  es la energía de anisotropía, como se muestra en la ecuación (1.10). En el modelo de Stoner y Wohlfarth se asume una rotación coherente de los momentos magnéticos atómicos, los cuales permanecen colineales y rotan al unísono. Al aplicar un campo magnético  $H$  en la dirección del eje fácil se modifica la función (1.10) haciendo más probable el estado en el que el momento magnético de la partícula se alinea con  $H$ . En esta situación la energía  $E_{eff}$  contendrá también un término de energía Zeeman:

$$E_{eff} = K_{eff}Vsen^2\theta - \mu H \cos(\alpha - \theta) \quad (1.11).$$

Se muestra en la

Figura 1.14 de manera esquemática los ángulos  $\theta$  y  $\alpha$  que forma el vector  $\mu$  con el eje de fácil magnetización y este eje con el campo  $H$ .

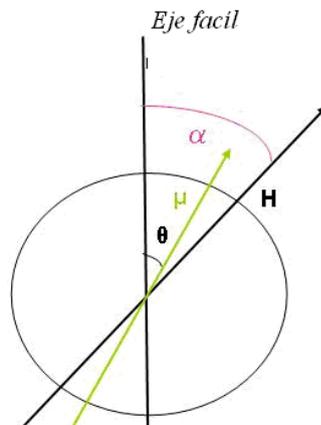


Figura 1.14: Se muestra de manera esquemática los ángulos  $\theta$  y  $\alpha$  que forma el vector  $\mu$  con el eje de fácil magnetización y con el campo  $H$ .

En el gráfico (a) de la Figura 1.15 se muestra la dependencia de la energía de anisotropía  $E$  para los diferentes valores de  $\theta$  en ausencia de un campo magnético. Se observa que para los valores de  $\theta = 0$  y  $\theta = \pi$ , que están simétricamente separadas por una barrera de energía igual a  $K_{eff}V$ , la energía  $E_{eff}$  se hace mínima. Por otro lado, en el gráfico (b) se muestra como varía la barrera de energía  $\Delta E$  cuando se aplica un campo magnético  $H$  en la dirección dada por  $\theta = 0$ .

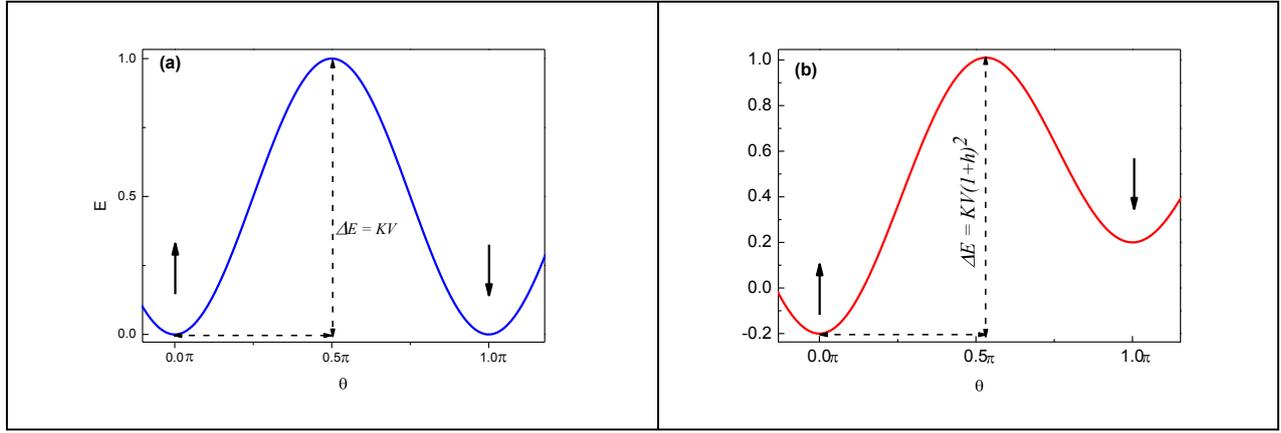


Figura 1.15: Se muestra esquemáticamente la dependencia de la energía de anisotropía  $E_{eff}$  para los diferentes valores de  $\theta$  en ausencia (a) y en presencia (b) de un campo magnético  $H$  en la dirección dada por  $\theta=0$ .

Así la anisotropía magnética funciona como una barrera de energía para la reorientación total del momento. Para un momento que puede fluctuar entre los dos estados correspondientes a ambos sentidos del eje fácil, en ausencia de campo magnético (ver Figura 1.15) la probabilidad por unidad de tiempo de que el momento magnético venza por activación térmica la barrera de energía, es proporcional al factor de Boltzman y se expresa a través de la inversa de la expresión (1.12), donde  $\Delta E$  es la barrera de energía de anisotropía magnética para una partícula aislada definida como  $K_{eff}V$ . Las partículas monodominio se caracterizan por un tiempo de relajación dado por:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right) = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{eff}V}{k_B T}\right) \quad (1.12)$$

donde,  $\tau_0$  es la inversa de la frecuencia de intentos de salto del momento magnético de la partícula entre los sentidos opuestos del eje de fácil magnetización. Se observa que las fluctuaciones de los momentos disminuyen a medida que la temperatura se reduce.

En presencia de un campo aplicado<sup>63</sup> existe un tiempo de relajación para cada sentido de inversión, a causa de que la barrera de energía  $\Delta E$  es diferente si el momento apunta en dirección  $\theta=0$  o  $\theta=\pi$ . En ese caso

$$\tau_{\pm} = 2\tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E_{\pm}}{k_B T}\right) = 2\tau_0 \exp\left(\frac{K_{eff}V (1 \pm h)^2}{k_B T}\right).$$

Aquí  $h = H / H_K$ , donde hemos definido el campo de anisotropía  $H_K = 2K_{ef} / \mu_0 M_S$ . De puede observar que cuando  $h = 0$ ,  $\tau_+ = \tau_- = 2\tau$

Frecuentemente y en especial durante protocolos de medidas ZCF-FC (ver sección 2.2.1) se emplean campos relativamente pequeños, que alteran poco la altura de la barrera de energía, por lo que se suele aproximar el tiempo de relajación usando la ecuación(1.12). Para una temperatura dada si el tiempo de medición  $t_m$  es mucho mayor que el tiempo de relajación  $\tau$ , el momento magnético se invierte varias veces durante el tiempo de observación y está equilibrio. Este régimen se denomina superparamagnético. Por el contrario si el tiempo de medida es mucho más corto que el tiempo de relajación, el momento magnético permanecerá en el mismo estado durante la observación, fuera del equilibrio, y se dice que está bloqueado. La temperatura de bloqueo se define como aquella

a la cual el tiempo de relajación es igual al tiempo de medición ( $\tau = t_m$ ).<sup>3</sup>

La temperatura de bloqueo depende del tiempo de medición de cada técnica ( $t_m$ ). Algunos tiempos típicos son, para el magnetómetro SQUID de  $\sim 100$  s y entre  $10^{-7}/10^{-9}$  s para espectroscopía Mössbauer.

Utilizando la ecuación (1.12) e imponiendo  $T = T_B$  se deduce una expresión para estimar la  $T_B$

$$T_B = \frac{K_{eff}V}{k_B \ln\left(\frac{t_m}{\tau_0}\right)} \quad (1.13)$$

A pesar de depender de la técnica experimental,  $T_B$  sigue siendo un parámetro que describe al sistema ya que brinda información acerca de la energía de la barrera (por lo tanto del valor de la constante de anisotropía, del volumen de partícula).

De la ecuación (1.13), se observa que la  $T_B$  aumenta cuando el tamaño de la partícula se incrementa y está relación se da a través de la barrera de energía, por otro lado se ve que disminuye cuando aumenta el tiempo de medida experimental.

En la Figura 1.16 se muestra a modo de ejemplo una medida  $M(T)$  realizada con un SQUID bajo protocolos ZFC/FC (descritos con detalle en la sec. 2.21), de donde se infiere un valor de  $T_B = 25$  K y se ve que para temperaturas menores a ésta el sistema se observa bloqueado y que para temperaturas superiores el sistema se comporta como un superparamagneto. La temperatura por encima de la cual la  $M_{ZFC}(T)$  coincide con  $M_{FC}(T)$  se denomina temperatura de irreversibilidad  $T_{irr}$ . En ese rango ambas curvas presentan un comportamiento tipo ley de Curie ( $M \sim H/T$ ).

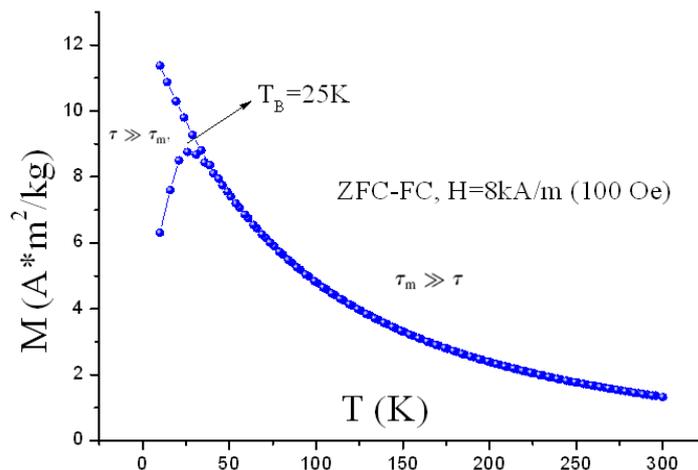


Figura 1.16: curva  $M(T)$  típica para mostrar como se comporta un sistema como SPM para temperaturas mayores que  $T_B$ .

<sup>3</sup> En este trabajo, a los efectos prácticos, aproximaremos la temperatura de bloqueo por aquella a la cual la magnetización registrada en un proceso ZFC (ver sección 3.2.3) presenta su máximo.

## Uso de la función de Langevin en un modelo superparamagnético:

Nos ocuparemos ahora del comportamiento de equilibrio de la magnetización de un sistema de nanopartículas monodominio en función del campo magnético aplicado. La energía de una partícula está dada por la expresión (1.11), la cual normalizada por la energía térmica  $k_B T$ , queda

$$\frac{E_B}{k_B T} = \sigma \sin^2(\theta) - \zeta \cos(\alpha - \theta), \text{ donde } \sigma \text{ y } \zeta \text{ son:}$$

$$\sigma = \frac{K_{eff} V}{k_B T} \quad (1.14)$$

$$\zeta = \frac{\mu_0 \mu H}{k_B T} \quad (1.15)$$

Si  $\sigma \rightarrow 0$ , (1.11) es idéntica a la energía de un paramagneto caracterizado por un superespín<sup>4</sup>, situación en la cual la curva de magnetización  $M(H)$  queda descrita con la función de Langevin  $L(\xi)$ .

$$M = M_s L(\xi) \quad (1.16)$$

En esta situación de equilibrio el supermomento de las nanopartículas responde a la aplicación de campo en forma similar a un paramagneto y no se observa coercitividad. Las NPMs se encuentran en un régimen superparamagnético.

Según Carrey<sup>64</sup> si  $\sigma \neq 0$  el uso de la función de Langevin es incorrecto pues desprecia la existencia de una anisotropía en el sistema. Cuando  $\sigma \rightarrow \infty$  (1.11) corresponde a la energía de un sistema con únicamente dos estados orientacionales posibles ( $\theta = 0$  y  $\theta = \pi$ ) cuya magnetización se describe mediante una tangente hiperbólica

$$M = M_s \tanh(\xi) \quad (1.17)$$

Sin embargo, cuando un sistema de NPMs tiene sus ejes fáciles orientados aleatoriamente, la descripción (1.16) continúa siendo una buena aproximación, pese a la existencia de anisotropía de partícula. Esto se explica porque el sistema como un todo no posee una dirección preferencial. Bajo esta aproximación

$$M = M_s L(\xi) = M_s \left( \coth(\xi) - \frac{1}{\xi} \right) \quad (1.18)$$

Utilizando las ecuaciones (1.16) y (1.18) se ve que

$$M(H, T) = N \int_0^\infty \mu L\left(\frac{\mu_0 \mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu + \chi_a H \quad (1.19)$$

Donde  $f$  es la distribución log Normal de momentos  $\mu$ .

---

<sup>4</sup> El superespín  $\mathbf{S}$  y el supermomento  $\boldsymbol{\mu}$  de la MNP están relacionados por  $\boldsymbol{\mu} = g\mu_B \mathbf{S}$  donde  $g$  es el factor de Landé.

$$f(\mu) d\mu = \frac{1}{\sqrt{2\pi w\mu}} \exp\left(-\frac{\ln^2(\mu / \mu_{LN})}{2w^2}\right) d\mu \quad (1.20)$$

$w$  y  $\mu_{LN}$  son los parámetros que definen la distribución.

Por otro lado  $\chi_a$  es la susceptibilidad a campos altos<sup>65</sup>. La magnetización de saturación específica o másica está dada por,  $M_s = N\langle\mu\rangle = N\int_0^\infty \mu f(\mu) d\mu$  donde  $N$  es el número de partículas por unidad de masa. Los ciclos de histéresis son bien ajustados utilizando la ecuación (1.19) la cual permite determinar  $\chi_a$ , el valor medio del momento  $\langle\mu\rangle = \mu_{LN} \exp(w^2/2)$ , su desviación estándar  $\sigma_{SD} = \mu_{LN} \exp(w^2/2) \sqrt{\exp(w^2) - 1}$  y  $N$ . A partir de estos se determina  $M_s = N\langle\mu\rangle$ .

### 1.2.2. Mecanismos de relajación magnética en coloides.

Existen dos mecanismos a través de los cuales las orientaciones de los momentos de las NPMs monodominio fluctúan como consecuencia de la energía térmica. Estos mecanismos son los responsables de la cinética de aproximación al equilibrio cuando se modifican las condiciones experimentales y se denominan mecanismos de relajación del momento.

El mecanismo de relajación Brown se origina en la rotación física aleatoria de la partícula dentro del fluido. Es debido a colisiones de la NPM con moléculas del medio. Cada colisión inicia una rotación la cual se detiene rápidamente debido a la viscosidad del medio. El tiempo promedio que permanece el momento en cada estado orientacional se conoce como tiempo de relajación de Brown ( $\tau_B$ ) y viene dado por la siguiente relación

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (1.21)$$

donde  $\eta$  es el coeficiente de viscosidad del fluido matriz y  $V_H$  es el volumen hidrodinámico de la partícula.

El mecanismo de relajación de Néel se origina en la rotación aleatoria del momento magnético  $\mu$  dentro de la partícula, respecto de un sistema de referencia fijo en la misma. Este mecanismo fue descubierto por Néel en 1949. En su descripción más simple posible se trata de una rotación coherente de todos los momentos iónicos de la NPM. Las posibles orientaciones del momento dependen del tipo de anisotropía de la partícula. Por ejemplo para anisotropía uniaxial el momento sólo puede fluctuar entre dos orientaciones opuestas, alineadas con el eje fácil de magnetización. El tiempo promedio que permanece el momento en cada estado orientacional se conoce como tiempo de relajación de Néel ( $\tau_N$ ) y viene dado por la relación

$$\tau_N = \tau_0 \exp \sigma \quad (1.22)$$

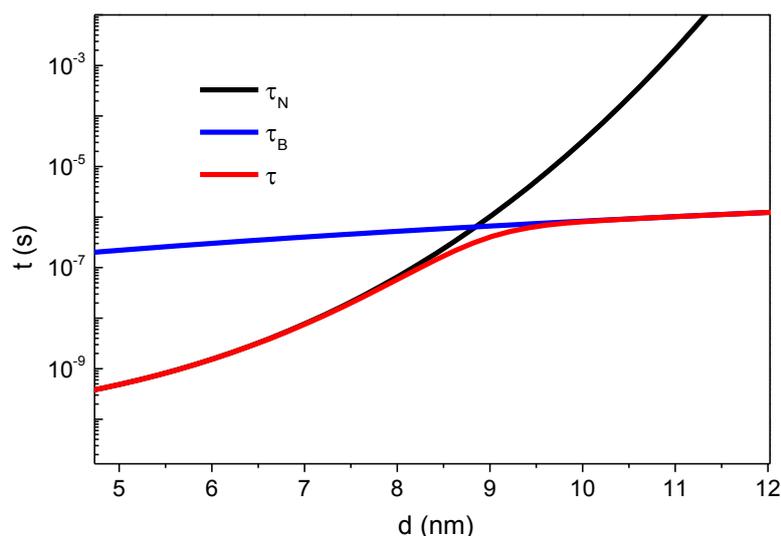
donde  $\sigma = \frac{K_{ef} V}{k_B T}$ .

En el caso de independencia entre mecanismos, los procesos de Brown y Néel tienen lugar en paralelo, entonces el tiempo de relajación efectivo viene dado por:

$$\tau^{-1} = \tau_B^{-1} + \tau_N^{-1} \quad (1.23)$$

De la ecuación (1.23) se ve que el tiempo de relajación más corto es el que dominará el proceso de fluctuación del momento.

Observando los dos tiempos de relajación en la *Figura 1.17*, se puede observar que la constante de tiempo más corta tiende a dominar el tiempo de relajación efectivo<sup>66</sup>.



*Figura 1.17: Se muestra como varían los tiempos de relajación de los distintos mecanismos en función del radio característico de la partícula. La simulación se realiza con valores de constante efectiva de anisotropía  $K_{eff} = 100.2 \text{ kJ/m}^3$ , espesor de recubrimiento = 2 nm, viscosidad del agua a temperatura ambiente igual a  $0.7978 \times 10^{-3} \text{ Pa.s}$  y  $\tau_0 = 10^{-10} \text{ s}$ .*

### 1.2.3. Tasa de absorción específica (SAR)

De la primera ley de la termodinámica, para un sistema con densidad constante

$$dU = dQ + dW$$

donde  $U$  es la energía interna,  $Q$  el calor suministrado y  $W$  el trabajo realizado por el sistema. Para un proceso adiabático donde  $dQ=0$  y exista un diferencial de trabajo magnético  $dW = \mathbf{H} \cdot d\mathbf{B}$

$$dU = \mathbf{H} \cdot d\mathbf{B} \quad (1.24)$$

donde,  $\mathbf{H}$  es el campo magnético y  $\mathbf{B}$  la inducción magnética, ambos en la muestra. De la ecuación (1.24) podemos obtener, llevando a cabo una integración por partes, la variación de energía interna en un ciclo como:

$$\Delta U = \mathbf{H} \times \mathbf{B} \Big|_{\text{ciclo}} - \oint \mathbf{B} \times d\mathbf{H} \quad (1.25)$$

El primer término de la derecha de la igualdad es nulo por ser proporcional a la energía magnética, la cual se conserva durante un ciclo. Como  $\mathbf{B} = \mu_0 \mathbf{H} + \mathbf{M}$ , sustituyendo en la ecuación (1.25), se muestra que el aumento cíclico de energía interna puede ser escrita, para el caso en que  $H$  y  $M$  son colineales, como:

$$\Delta U = -\mu_0 \oint H + M dH = -\mu_0 \oint M dH \quad (1.26)$$

De esta expresión se ve que cuando la magnetización tiene un desfase respecto al campo, la integración da un resultado positivo indicando la conversión del trabajo magnético en energía interna. Para estudiar esto, es conveniente expresar la magnetización en términos de la susceptibilidad compleja de una suspensión coloidal como,

$$\chi = \chi' - i\chi'' \quad (1.27)$$

Por lo tanto, si suponemos la aplicación en un campo magnético variable de la forma:

$$H(t) = H_0 \cos \omega t = \text{Re } H_0 e^{i\omega t} \quad (1.28)$$

Entonces en la aproximación de respuesta lineal, válida cuando  $\zeta = \frac{\mu_0 \mu H}{\kappa_B T} \ll 1$ , la magnetización resultante es

$$M(t) = \text{Re} [\chi H_0 e^{i\omega t}] = H_0 [\chi' \cos \omega t + \chi'' \sin \omega t] \quad (1.29)$$

donde,  $\chi'$  es la componente de la susceptibilidad en fase y  $\chi''$  es la componente desfasada.

Sustituyendo  $M$  y  $H$  en la ecuación (1.26), suponiendo que  $\chi''$  es constante y realizando un cambio de variables llegamos a que:

$$\Delta U = \mu_0 H_0^2 \chi'' \omega \int_0^{2\pi/\omega} \sin^2 \omega t dt \quad (1.30)$$

Donde solo sobrevive la componente  $\chi''$ . Integrando y multiplicando el resultado por la frecuencia  $f = \frac{\omega}{2\pi}$ , se obtiene la siguiente expresión para la disipación de potencia por unidad de volumen:

$$P = f \Delta U = \mu_0 \pi \chi'' f H_0^2 \quad (1.31)$$

Para hacer uso de la ecuación (1.31) debemos conocer como se relaciona  $\chi''$  con los parámetros del coloide magnético.

De la ecuación de relajación de Shliomis<sup>67</sup> se deduce la siguiente forma de  $\mathbf{M}(t)$  para un fluido sin movimiento en un campo oscilatorio:

$$\frac{dM(t)}{dt} = \frac{1}{\tau} M_0(t) - M(t) \quad (1.32)$$

Donde  $\tau$  es el tiempo de relajación,  $M_0(t) = \chi H_0 \cos \omega t = \text{Re } \chi H_0 e^{i\omega t}$  es la

magnetización de equilibrio en el campo aplicado cuyo valor está dado por la ecuación (1.28). Sustituyendo las representaciones complejas de  $M_0$  y  $M(t)$  en la ecuación (1.32) obtenemos:

$$\chi' = \frac{\chi_0}{1 + \omega\tau^2} \quad (1.33)$$

$$\chi'' = \frac{\omega\tau}{1 + \omega\tau^2} \chi_0 \quad (1.34)$$

Por lo tanto sustituyendo la ecuación (1.34) en la (1.31), la disipación de potencia se expresa como:

$$P = \pi \mu_0 \chi_0 H_0^2 f \frac{2\pi f \tau}{1 + 2\pi f \tau^2} \quad (1.35)$$

La ecuación (1.35) expresa la densidad de potencia disipada para una suspensión de NPMs monodispersas. Como un estimador de  $P$ , se asume que  $\chi_0$  es la susceptibilidad correspondiente a la ecuación de Langevin (1.19)

$$\chi_0 = \frac{N\mu_0 \mu^2}{3k_B T} = \frac{\mu_0 M_s^2 V}{3k_B T}$$

Reemplazando esta expresión en la ecuación (1.35) y dividiendo por la densidad del material magnético  $\rho$ , podemos llegar a la expresión para la potencia específica disipada (por unidad de masa de nanopartícula) SAR,

$$SAR = \frac{\pi \mu_0^2 V H_0^2 M_s^2}{3k_B T \rho} f \frac{2\pi f \tau}{1 + 2\pi f \tau^2} \quad (1.36)$$

Se observa que es proporcional a  $H_0^2 M_s^2$ . Sus dependencias con el tamaño de partícula y la frecuencia son más complejas. En cuanto al tamaño, el volumen aparece implícitamente a través del tiempo de relajación. Asimismo SAR depende de la constante de anisotropía efectiva a través de  $\tau$ .

Cabe recordar que (1.36) se dedujo a partir de (1.26) y que ésta representa el área encerrada en la curva  $M$  vs.  $H$ . La expresión (1.36) da un resultado nulo cuando  $\tau \ll \tau_{\text{exp}}$  siendo este último el tiempo de observación experimental  $\tau_{\text{exp}} = 1/2\pi f$ . Ésto corresponde a una situación de equilibrio termodinámico. Teniendo en cuenta (1.26), esta situación implica que bajo estas condiciones el área del ciclo de magnetización es nula. A medida que se reduce  $\tau_{\text{exp}}$  (o aumenta la frecuencia) las NPMs se apartan del equilibrio y el área del ciclo deja de ser nula, alcanzando su máximo valor cuando  $\tau = \tau_{\text{exp}} = 1/2\pi f$ , como se ilustra en la *Figura 1.18*:. Como se verá más adelante los coloides sintetizados en este trabajo presentan una respuesta de equilibrio durante los experimentos realizados en un VSM ( $\tau \ll \tau_{\text{exp}}$ ) pero se encuantran apartados del equilibrio durante los experimentos realizados bajo campos de radiofrecuencia ( $\tau \sim \tau_{\text{exp}}$ ). La determinación experimental de este parámetro se muestra en la sección 2.2.2.

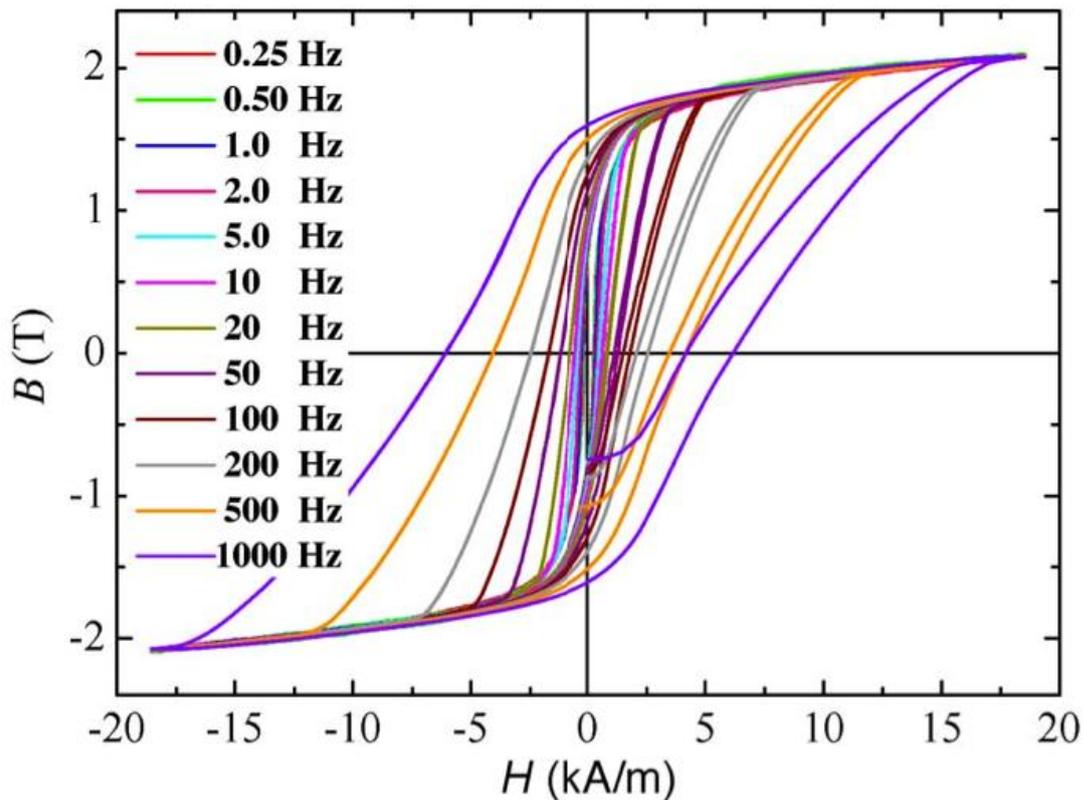


Figura 1.18: Ejemplo de un ciclo  $B(H)$  de NPMs medidos a diferentes valores de  $f$

### 1.3. Hipertermia magnética (HM)

La idea de utilizar partículas magnéticas para el tratamiento de cáncer por HM comenzó en 1957 con Gilchrist y colaboradores<sup>1</sup>, quienes utilizaron partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de tamaño en el orden de los micrones, para calentar nodos linfáticos. Posteriormente, Gordon y colaboradores<sup>68</sup> utilizaron partículas de tamaño nanométrico de  $\sim 6$  nm, para producir calentamiento por HM. Cuando las partículas poseen tamaño nanométrico disipan calor a través de mecanismos de relajación y presentan valores de SAR comparables con el calor liberado por el ciclo de histéresis de partículas del tamaño de los micrones para valores de  $f$  y  $H_0$  tolerables clínicamente. Por otro lado, Chan y colaboradores<sup>69</sup> detectaron que no había una diferencia significativa en el porcentaje de muerte en células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 cuando se las sometía a tratamiento de HM en comparación con exponerlas a calor con baño térmico. Posteriormente en 1999 Jordan y colaboradores<sup>70</sup> encontraron mayor muerte celular cuando se sometía a las células malignas humanas (WiDr, BT20, RuSi) a calentamiento utilizando magnetita recubierta con dextran para HM que con baño térmico. Por lo tanto se mostró cada vez más interés en utilizar partículas nanométricas para tratamientos de HM. En 1993 se estableció el rango de  $f$  e intensidad de  $H_0$  tolerables clínicamente para el ser humano<sup>71</sup>.

La HM altera la estructura y la función de las proteínas y de las enzimas de la célula alterando el crecimiento y diferenciación de las mismas induciéndoles apoptosis<sup>72</sup>. Por otro lado causa deterioro en la integridad de las estructuras celulares tales como en la membrana plasmática, citoesqueleto y mitocondria. Se produce una modificación en la

estructura normal de fosfolípidos, proteínas, ácido nucleico y una pérdida en la actividad enzimática particularmente en los sistemas de reparación de DNA.

Aunque la HM produce una disminución significativa de la síntesis de proteínas celulares<sup>73</sup>, hay un incremento en la expresión de las proteínas HSP (*Heat Shock Protein*). Estas proteínas representan un grupo heterogéneo de chaperonas moleculares y se clasifican en 5 familias dependiendo de su peso molecular (PM),  $\alpha$ HSP (< 40kDa), HSP60, HSP70, HSP80, HSP90 y HSP100. Todas ellas tienen la misma función que consiste en ligarse a secuencias de aminoácidos hidrofóbicos de las proteínas parcialmente desnaturalizadas evitando que se unan entre ellas y que se agreguen.

El incremento en la expresión de este tipo de proteínas no se restringe únicamente al incremento de temperatura sino que también aumenta su síntesis cuando las células se encuentran bajo condición de otros tipos de estrés, como por ejemplo exposición a alcoholes, metales pesados y estrés oxidativo<sup>74,75</sup>.

La muerte celular puede deberse a dos posibles mecanismos<sup>76</sup>. Por un lado la necrosis que es un daño patológico de la célula, el cual es seguido de una respuesta inflamatoria en el organismo y por el otro lado la apoptosis que es la muerte celular programada que mantiene una homeostasis en el tejido evitando así la respuesta inflamatoria.

La HM puede desencadenar por uno o ambos mecanismos de muerte dependiendo de la manera y de la forma en que se incrementa la temperatura celular. Por ejemplo, se ha reportado que en mastocitos de ratón hay un marcado aumento de la apoptosis celular para incrementos de la temperatura a 42-45 °C, para un aumento de temperatura a 45 °C ambos mecanismos se desencadenan y para una temperatura de 46 °C se ve un aumento significativo de necrosis<sup>77</sup>. Generalmente se consigue la muerte de las células<sup>78</sup> cuando se las expone a temperaturas por encima de 43 °C, este incremento de temperatura depende del tipo de línea celular pero se sabe que está relacionado con la cantidad de calor necesaria para desnaturalizar las proteínas tanto citoplasmáticas como de la membrana celular<sup>79</sup>.

Estudios realizados por Yan y colaboradores<sup>80</sup>, utilizando NPMs de maghemita y células de hepatocarcinoma humano (SMMC-7721), mostraron que hay un control de la proliferación celular y un aumento de la condensación de la cromatina de las células luego de someterla a HM. Esto indicó que el tratamiento generó un efecto apoptótico en las células y también observaron que este efecto dependía de la concentración de NPMs.

La principal limitación de la HM es la baja eficiencia de calentamiento de la mayoría de las NPMs por lo cual se necesitan grandes cantidades de las mismas en el tumor para que produzca un efecto terapéutico<sup>81</sup>. Por lo tanto se dedicó mucho esfuerzo en aumentar la eficiencia de calentamiento de las NPMs, variando sus características morfológicas y magnéticas, tales como el tamaño, la forma, la anisotropía magnética y magnetización de saturación<sup>82</sup>. El cambio en la forma en las NPMs adicional un término más a la anisotropía, optimizando de esta manera las características magnéticas de las mismas para el tratamiento por HM. Se han sintetizado NPMs con forma de nanocubos<sup>83,84</sup> y formando estructuras del tipo carozo-capa<sup>85,86</sup> o en forma de agregados multicarozo<sup>87,88</sup> con altísimos valores de SAR de ~1kW/g. Durante los últimos años se han reportado una enorme cantidad de valores experimentales de SAR determinados bajo condiciones experimentales ( $H_0$  y  $f$ ) diferentes, por lo cual no se puede hacer una comparación directa entre ellos. Por lo tanto se hace dificultosa la elección de las NPMs reportadas en la literatura para utilizarlas en experiencias de HM. En un trabajo reciente<sup>89</sup>, se definió un nuevo parámetro denominado ILP (*power loss intrinsic*), el cual se muestra en la ecuación (1.37), caracterizando NPMs comerciales. Este parámetro fue introducido con la intención de facilitar la comparación de resultados de SAR obtenidos en diferentes condiciones

experimentales y por diferentes autores. El ILP es un parámetro que caracteriza las NPMs de forma más general que el SAR, pero sin embargo continúa dependiendo de la frecuencia de trabajo a través del factor  $\frac{2\pi f \tau}{1 + 2\pi f \tau^2}$  como se ve en la ecuación (1.47)

por lo que sí depende de las condiciones experimentales.

$$ILP = \frac{SAR}{fH_0^2} \quad (1.37)$$

El mayor valor de ILP reportado en este trabajo fue para NPMs comerciales de un diámetro hidrodinámico de 70 nm, con un  $ILP = 3.1 \frac{nH m^2}{kg}$ , de manera comparativa calculé el valor de ILP para las NPMs sintetizadas durante esta tesis y se obtienen valores de ILP en el rango de  $ILP \square 0.1 - 1 \frac{nH m^2}{kg}$ .

El valor de SAR generalmente se determina en suspensión coloidal pero se conoce muy poco del valor de este parámetro en el entorno celular. Por lo cual, se estudió<sup>106,90</sup> una amplia cantidad de nanomateriales con el propósito de entender los fenómenos de la HM en el entorno celular y se encontró que hay una rápida caída en la capacidad de calentamiento correlacionada con la inhibición del mecanismo de relajación de Brown cuando las NPMs se encuentran dentro de la célula. Los mecanismos de relajación de Brown y Néel explican como las NPMs superparamagnéticas absorben energía del campo magnético y la convierten en calor. Pero es difícil distinguir experimentalmente cual de estos procesos dominan en cada sistema NPMs-celular particular. Conocer que mecanismo gobierna permitiría optimizar las características de las NPMs para incrementar su eficiencia de calentamiento para la terapia por HM. Las formas de las curvas de calentamiento son consecuencia de los mecanismos de relajación implicados. En la *Figura 1.19*, se muestran las curvas de calentamiento magnético<sup>91</sup> para dos partículas de diferente tamaño (8 nm (a) y 100 nm (b)) las cuales fueron suspendidas en un gel que posee un punto de fusión de 30 °C. Se observa que para las partículas de mayor tamaño hay una abrupta subida de temperatura cuando funde el gel debido, hecho que estos autores asocian a un cambio en el mecanismo de relación de Néel a Brown. Mas recientemente, G. Salas y col.<sup>92</sup> muestran un efecto similar de reducción de la capacidad de disipación de NPMs debido al cambio de viscosidad del medio. De manera similar Dutz<sup>93</sup> demostró que el mecanismo de relajación de Brown es suprimido cuando las NPMs se internalizan dentro del tumor.

Es importante investigar los mecanismos que se desencadenan en las células durante el tratamiento de HM, para entender el rol específico de las NPMs en el proceso. En el 2012, F. Noyan y colaboradores<sup>15</sup> desarrollaron un lentivirus con un promotor HSP70B (*Heat Shock Protein 70B*) humano inducible por estrés, para el tratamiento de tumores a través de terapia génica. Con el fin de discernir si se genera un incremento de temperatura intracelular durante el tratamiento de HM, en esta tesis se hizo uso de este tipo de lentivirus con promotor inducible por estrés. En particular, se empleó un lentivirus que codifica para la proteína fluorescente verde aumentada, EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) bajo la acción del promotor HSP70B para transducir células A549. A estas células posteriormente se les realiza tratamiento de HM. De esta manera se evalúa, mediante una metodología que consiste en determinar el porcentaje de células que expresan EGFP en 3 ensayos y 2 controles, si ocurre un incremento intracelular de temperatura durante dicho tratamiento. Esta metodología se desarrolla en la sección 5.3.

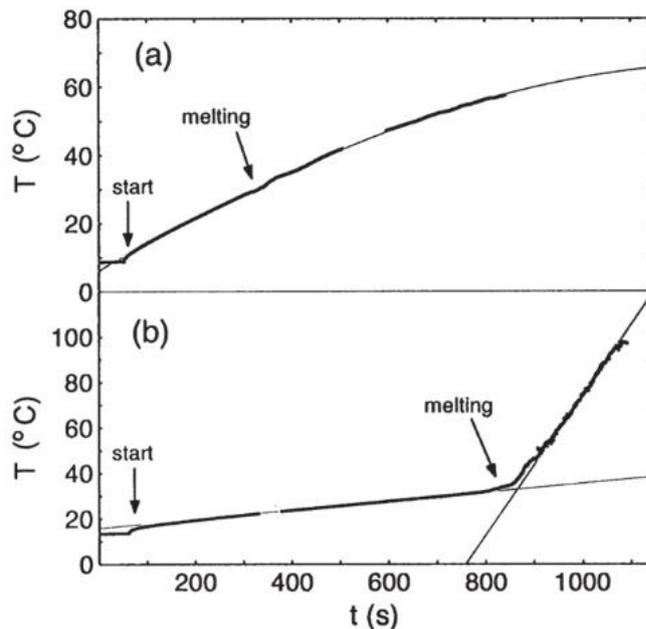


Figura 1.19: curvas de calentamiento magnético para dos partículas de diferente tamaño 8 nm (a) y 100 nm (b) suspendidas en un gel<sup>91</sup>

#### 1.4. Línea celular A549

La línea tumoral A549 deriva de un carcinoma humano de células alveolares. El tejido utilizado originalmente para comenzar esta línea tumoral, provino de una lobectomía practicada en 1972<sup>94</sup>. Las células A549 se comportan como una línea celular transformada presentando los criterios de crecimiento *invitro* tradicionales: formación de colonias en agar blando y crecen como una monocapa, con un tiempo de duplicación de 48 h en fase logarítmica de crecimiento, alcanzando esta fase a las 48 h de ser repicadas.

#### 1.5. Vectores lentivirales

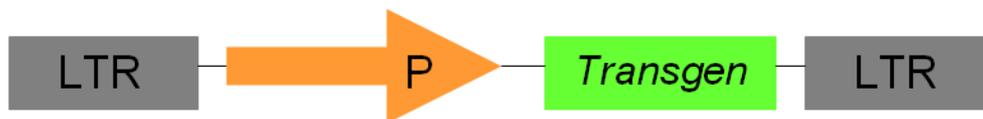
Los retrovirus son una familia de virus envueltos de forma esférica con un tamaño de 80 a 100 nm de diámetro. Su genoma consiste en ARN de simple cadena (+)<sup>95</sup>. Algunos retrovirus se consideran complejos, como es el caso de los lentivirus, porque además de poseer los tres genes estructurales típicos, *gag*, *pol* y *env* de los retrovirus simples, poseen secuencias génicas regulatorias adicionales. El gen *gag* codifica para proteínas estructurales tales como la proteína de la matriz y de la cápside. El gen *pol* que codifica para la transcriptasa reversa y la integrasa y el gen *env* que codifica para las proteínas de la envoltura. Un ejemplo de lentivirus es el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

(HIV-1)<sup>96</sup>, el cual posee los genes, *tat* y *rev*, para regular la expresión del genoma viral, y *vpu*, *vif*, *vpr* y *nef*, importantes en la replicación viral<sup>97</sup>.

Estos virus infectan células transformando su genoma de ARNm en moléculas de ADN de doble cadena, las cuales se integran en el genoma de la célula huésped (provirus) en una posición aleatoria. El genoma del virus se transmite de esta manera a la progenie de la célula. El provirus puede alterar la función de los genes celulares y dar lugar a la activación de oncogenes promoviendo el desarrollo de cáncer. Esto constituye un inconveniente cuando se desea emplear vectores lentivirales en terapia génica<sup>97</sup>.

Los retrovirus además poseen en cada uno de sus extremos del genoma secuencias terminales repetidas largas (LTR), de la forma U3-R-U5. Las LTRs en la forma de ARN (genómico) contienen secuencias importantes para la transcripción reversa, mientras que en la forma de ADN (provirus), la LTR del extremo 5' (LTR 5') actúa como un promotor transcripcional y la LTR del extremo 3' (LTR 3') como señal de poliadenilación<sup>97</sup>.

La estructura genética de los retrovirus y la constitución del provirus hacen sencilla la manipulación de estos virus en el desarrollo de vectores retrovirales recombinantes de replicación defectiva<sup>97</sup>. Para tal propósito, se puede eliminar la mayor parte de los genes virales y en su lugar se procede a la inserción de un casete de expresión (constituido por un promotor interno **P** y el *transgen* que se desea expresar. Estos vectores se muestran de manera esquemática en la *Figura 1.20*. Para la generación de estos vectores es necesario aportar en *trans* las proteínas eliminadas<sup>98</sup>. Para ello, se transfectan las células con plásmidos que codifican para estas proteínas, además del plásmido portador del *transgén* de interés (plásmido de transferencia).



*Figura 1.20: Esquema de un vector lentiviral (plásmido de transferencia), donde se muestra el promotor interno (P) que es el que transcribe el transgen y sus extremos terminales LTR.*

Los vectores generados a partir de retrovirus reúnen una serie de características<sup>99</sup> que los hacen muy atractivos como portadores de genes, ya que integran el material genético que llevan en los cromosomas de las células diana, un requisito imprescindible para una expresión duradera y estable, no codifican proteínas víricas, lo que evita una respuesta del sistema inmune hacia ellas y permiten clonar fragmentos de DNA de hasta 10 kpb de longitud. Una ventaja de los vectores basados en el VIH-1 respecto de los otros vectores retrovirales es que integrar y expresar genes exógenos en células que no se están dividiendo como por ejemplo las neuronas<sup>100</sup>.

Para prevenir la posible activación oncogénica mencionada anteriormente, se desarrollaron vectores auto-inactivantes, SIN (*self-inactivating*)<sup>101,102</sup>. La seguridad que aporta este tipo de vectores se debe a que no pueden replicarse de manera competente ya que se les eliminó el promotor-enhancer de la región U3 del extremo LTR 3'. Durante la transcripción reversa del ARN viral la eliminación U3 del LTR 3' es transferida al LTR 5' (del ADN), lo que resulta en la inactivación del promotor transcripcional en el provirus.

El lentivirus autoinactivante que utilizamos en esta tesis, para modificar las células A549 fue construido por F. Noyan y colaboradores<sup>15</sup> y consiste de un promotor interno HSP70B humano inducible por hipertermia, que codifica para la proteína verde fluorescente EGFP aumentada, el cual se describirá con mayor detalle en la sección 4.5.

## 2. Materiales y métodos.

En este capítulo se describe muy brevemente las técnicas experimentales que se utilizan para la caracterización fisicoquímica, estructural y magnética de los coloides cuya síntesis se describe en el capítulo 3. También se incluye una breve descripción de técnicas de visualización celular, las cuales permiten visualizar y comprobar el ingreso de las nanopartículas en las células. Por otro lado, se describen los fundamentos de las técnicas que determinan el efecto citotóxico de las NPMs en las células. Se incluyen también los protocolos de trabajo para medir hipertermia magnética intracelular y para determinar el estrés, a través de la medida de EGFP, inducido por incremento de temperatura durante la aplicación de campos de radio frecuencia en células que internalizaron NPMs.

### 2.1. Técnicas de caracterización de los coloides.

#### 2.1.1. Difracción de rayos x (DRX).

Tanto para la identificación de las fases cristalinas de las NPMs sintetizadas en las suspensiones coloidales, como para la determinación del tamaño de partícula se empleó la Difracción de Rayos X (DRX) utilizando un difractómetro X-Pert, APD1700X'Pert (CuK<sub>α</sub> con  $\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$ ).

La difracción de rayos X permite determinar la estructura cristalina de un sólido o identificarlo a partir de su estructura. Una estructura cristalina actúa como una red de difracción, debido a que el espaciado interatómico en un sólido es del mismo orden que la longitud de onda de los rayos X. La posición de los picos de difracción depende de la especie cristalina estudiada. La salida de un difractograma consiste en un registro de intensidad (cuentas por segundo) en función de la posición angular del detector respecto del haz incidente, esto es dos veces el ángulo de Bragg. La ley de Bragg define las condiciones para obtener difracción de rayos X cuando estos inciden sobre un material cristalino:

$$2d_{hkl} \sin\theta_{hkl} = n\lambda \quad (2.1)$$

Siendo  $d_{hkl}$  la distancia entre los planos (hkl),  $\theta$  es el ángulo entre el haz incidente y colimado de rayos X para un plano atómico de la red cristalina,  $n$  es un número entero que da el orden de difracción,  $hkl$  son los índices de Miller asociados al plano, y  $\lambda$  es la longitud de onda de la línea característica de rayos X.

Las suspensiones coloidales a ser analizadas por DRX, se secaron en estufa a 60 °C durante 48 h, luego se recogió el polvo negro obtenido, se lo molió utilizando un mortero de ágata y finalmente se coloca en forma de una fina película sobre el portamuestra del equipo. Para realizar el difractograma de las muestras en polvo hay que tener el cuidado

que la cantidad de muestra a medir no sea poca para redispersar en el porta muestra ya que la relación señal a ruido puede ser muy baja. Los datos se adquirieron en un rango de  $2\theta$  de 20 a 80 °, con un paso de 0.02° por segundo. Para ajustar los datos experimentales a fin de identificar la fase cristalina y determinar el tamaño de la partícula se utilizó el programa de ajuste MAUD<sup>103</sup> (Material Analysis Using Diffraction), que se basa en el método de Rietveld.

### **2.1.2. Microscopía de transmisión de electrones (TEM) y Difracción de electrones.**

Para obtener forma, tamaño y dispersión de tamaño en de las NPMs y su visualización en cultivos celulares se utilizó la Microscopía Electrónica de Trasmisión (TEM). El equipo empleado es un JEOL JEM 2100 sito en Center for Nanoscience and Nanotechnology/MCT en el marco de la propuesta # 13872 del LNNano, Campinas Brasil.

La microscopía por trasmisión de electrones (TEM) es una técnica que permite obtener información sobre la microestructura cristalina de una muestra. La técnica consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre una muestra el cual es transmitido a través de la misma y por la interacción de los electrones transmitidos con la muestra se forman imágenes de su estructura. Esta imagen es aumentada y enfocada en un dispositivo tal como una pantalla fluorescente, para ser detectada por un sensor tal como una cámara CCD. La técnica TEM es capaz de lograr imágenes con más resolución que los microscopios ópticos, debido a la pequeña longitud de onda de Broglie de los electrones, típicamente para un potencial de 200 kV y una  $\lambda \sim 2.5 \times 10^{-2} \text{ \AA}$

Para llevar a cabo la observación, las muestras se prepararon colocando una gota de la suspensión coloidal diluida sobre una grilla de cobre, en la cual el solvente evapora a temperatura ambiente. Del análisis estadístico de alrededor de 100 partículas se estima un tamaño medio ( $d_{\text{TEM}}$ ) para cada muestra.

### **2.1.3. Termogravimetría (TG) y Análisis térmico diferencial (DTA):**

El *TG* registra la pérdida de peso de una muestra, el cual está asociado a alguna transformación de la misma, como una función de la temperatura. Estas curvas, son características de un compuesto o material dado, debido a la secuencia única de las transiciones físicas y las reacciones químicas que ocurre sobre intervalos definidos de temperatura. Los cambios de peso resultan de la formación y/o del rompimiento de los enlaces físicos o químicos a temperaturas elevadas. Estos procesos pueden dar lugar a la formación de productos volátiles o a productos de reacción que conllevan a un cambio de peso de la muestra. Los datos obtenidos por TG son útiles en la caracterización de materiales al igual que en la investigación de las transiciones que ocurren por aplicación de calor.

En el *Análisis térmico diferencial (DTA)*, Mide la diferencia de temperatura  $\Delta T$  entre la muestra y un material inerte de referencia mientras son sometidos al mismo programa de

temperaturas  $T$ . Si para alguna temperatura dada la muestra experimenta alguna transformación (por ejemplo una fusión) la energía aportada por el horno se empleará para llevar a cabo la fusión en lugar de emplearla para aumentar la temperatura de la muestra, mientras que la temperatura de la referencia seguiría aumentando según la rampa de temperaturas programada. Por lo tanto se registrará un  $\Delta T$  para ese valor de  $T$ .

Las medidas de Termogravimetría (TG) y Análisis Térmico Diferencial (DTA) se hicieron, utilizando los equipos Shimadzu TG-50 y DTA-50 respectivamente.

Las muestra se midieron en forma de polvo sobre un portamuestra de platinum cruciales y fueron calentadas a 10 K /min bajo un flujo de  $N_2$  de 50 ml/min.

#### 2.1.4. Dispersión dinámica de luz (DLS)

El diámetro hidrodinámico ( $d_h$ ) fue determinado con la técnica Dynamic light scattering (DLS) a un ángulo de dispersión de  $90^\circ$  equipado con un goniómetro ALV/CGS-5022F con Multiple Tau digital correlator ALV-5000/EPP. La fuente de luz fue un laser de helio-neón que opera a 22 mW. Para los cálculos se utiliza la transformada de Laplace. Se levantaron 200  $\mu$ l de suspensión coloidal a estudiar y se la diluyo a 50 ml utilizando un matraz con agua bidestilada, luego se la sonicó 15 min y por último se la filtró utilizando una membrana de 200 nm de poro, para eliminar cualquier partícula de polvo indeseada, las cuales interfieren con las medidas.

## 2.2. Técnicas de caracterización magnéticas

### 2.2.1. Magnetometría DC (VSM y SQUID).

#### *Magnetómetro de Muestra Vibrante (VSM)*

Este dispositivo nos permite medir las curvas de magnetización o lazos de histéresis de un material. Su funcionamiento está basado<sup>104</sup> en el cambio de flujo en una espira cuando se hace vibrar una muestra magnetizada cerca de la espira. Comúnmente, la muestra está dentro de una cápsula pequeña que se encuentra adosada al extremo de una varilla no magnética, la cual está fijada a un vibrador mecánico. El campo magnético oscilante que genera la vibración de la muestra, induce una *fem* alterna en las espiras de detección, cuya magnitud es proporcional al momento magnético de la muestra. La *fem* alterna es amplificada, usualmente usando un amplificador *lock-in* que es sensible únicamente a las señales con la frecuencia de la vibración.

De esta manera, es posible medir el momento magnético de la muestra, y por ende, la magnetización. El VSM puede ser adaptado para llevar a cabo mediciones a altas y bajas temperaturas, ya que únicamente la muestra y la varilla vibrante deben ser calentadas o enfriadas.

El equipo utilizado fue un magnetómetro de muestra vibrante LakeShore 7404. En nuestra experiencia, este dispositivo se utilizó para medir ciclos de histéresis entre -2 y 2 T. Todas las medidas se llevaron a cabo a temperatura ambiente 300K.

#### *Quantum Design magnetometer (SQUID):*

Las medidas de magnetización (M) en función del campo magnético aplicado (H) se realizaron también utilizando un magnetómetro SQUID (Quantum Design magnetometer)<sup>105</sup>. Este último se empleó también para medir la dependencia de la magnetización con la temperatura siguiendo el protocolo ZFC/FC.

El funcionamiento de este dispositivo se basa en el tuneo de electrones superconductores a través de una o dos interfases aislantes muy angostas, llamadas unión Josephson, que interrumpen una bobina superconductora. En principio este dispositivo permite medir variaciones de flujo tan pequeñas como un cuanto de esta cantidad:  $h/2e = 2,07 \times 10^{-7}$  gauss  $\text{cm}^2$  (donde h es la constante de Planck).

Dado que este dispositivo utiliza un superconductor, requiere bajas temperaturas para su funcionamiento. La muestra es desplazada lentamente a través de una espira superconductora detectora acoplada al SQUID mientras se cuentan los cuantos de flujo adicionales que atraviesan la misma. En términos de momento magnético la sensibilidad de un magnetómetro SQUID es generalmente alrededor de  $10^{-7}$  emu o  $10^{-10}$  Am<sup>2</sup>.

Las medidas realizadas para todas las muestras con este dispositivo consistieron en ciclos de FC-ZFC (Field Cooling - Zero Field Cooling) realizados a campo fijo en función de la temperatura y ciclos M vs. H a diferentes temperaturas fijas (entre 5 y 300 K) con un campo máximo de 7 T.

#### ***Protocolos ZFC-FC:***

Para las medidas presentadas en esta tesis este protocolo fue el siguiente.

ZFC: se congeló la muestra y se llevó hasta 5 K sin aplicación de campo magnético, luego se aplicó un campo de 100 Oe y se registró la magnetización calentando desde 5 K hasta 250 K a una tasa de 5 K/min.

FC: Se volvió a enfriar la muestra hasta 5 K en el campo de 100 Oe y luego se registró la magnetización desde 5 K a 250 K bajo este mismo campo y a la misma tasa de calentamiento que en ZFC.

Para realizar las medidas se prepararon las muestras de dos maneras diferentes, por un lado en forma seca para lo cual se dejó a la suspensión coloidal secar durante 12 hs. en estufa a 40 °C. Se recogió el polvo, se lo pesó para tener el valor de la masa de las NPMs secas. Por otro lado se midieron las suspensiones coloidales en forma líquida, para lo cual se preparó un sachet con 50  $\mu\text{l}$  de suspensión coloidal de concentración conocida. La alícuota del coloide se tomó con micropipeta y se vertió en un tubo de material termocontraíble. El sachet se fabricó sellando el termocontraíble con calor en ambos extremos.

### **2.2.2. Magnetocalorimetría (SAR por aplicación de campos de radiofrecuencia RF)**

La potencia específica disipada (SAR)<sup>106</sup> permite comparar las eficacias en cuanto a la disipación de cada suspensión coloidal magnética. Para determinar caloriméricamente este parámetro se someten las suspensiones a campos magnéticos alternos utilizando un generador de radiofrecuencia y se registra con una fibra óptica la temperatura T en función del tiempo transcurrido (t). Se obtiene  $dT/dt$  de la pendiente inicial de la curva T(t).

Conociendo el calor específico volumétrico del solvente  $C$  y la concentración  $[X]$  de NPMs en la suspensión coloidal se determina experimentalmente el valor de

$$SAR = \frac{C}{[X]} dT / dt, \quad (2.2)$$

donde, todas las cantidades están expresadas en el sistema internacional, excepto  $[X]$  que se da en g de NPM por kg de suspensión. De esta forma las unidades de SAR son W disipados por gramo de NPMs.

Para generar el campo magnético alterno, se utilizó un generador de radiofrecuencia (RF), HF Generator TIG 2.5 /300 Huttinger cuya foto se muestra en la *Figura 2.1 2.1*. Este equipo consiste de dos partes, una unidad de potencia y un circuito oscilador, que conjuntamente se comportan como un circuito RLC. El resonador consiste de un circuito resonante formado por un conjunto de capacitores e inductores que pueden ser interconectados en diferentes configuraciones para variar la inductancia ( $l$ ) y la capacidad ( $c$ ) y por lo tanto, la frecuencia de resonancia, dada por:

$$\omega = \frac{1}{\sqrt{l \times c}} \quad (2.3)$$

Uno de los inductores es la bobina externa o de trabajo, dentro de la cual se colocan las suspensiones coloidales o los cultivos celulares a estudiar. Además, también es posible controlar la corriente que circula a través de la bobina (la cual es directamente proporcional al campo que se genera en la bobina).

Para las medidas de SAR de las suspensiones coloidales magnéticas la bobina consiste de 5 espiras y tiene 2.5 cm de diámetro interno. Para evitar pérdidas de calor en las medidas calorimétricas, se colocan las suspensiones coloidales magnéticas dentro de un termo (*dewar*) el cual consiste en un tubo de vidrio de 1 cm de diámetro interno, rodeado de otro entre los cuales se hace vacío para lograr tener la muestra de la manera más adiabática posible. Este tubo termo se coloca dentro de la bobina de 2.5 cm permitiendo mantener suficientemente aislada la suspensión coloidal, tanto del ambiente como de la bobina, ya que ésta se calienta por efecto Joule. Además, se hace circular agua por la bobina y se utiliza un ventilador pequeño para enfriarla continuamente. Este dispositivo de medida se muestra del lado izquierdo de la *Figura 2.1 2.1*. La temperatura ambiente se controla a través de un aire acondicionado a 21°C. Antes de llevar a cabo una medida de SAR se homogeniza la suspensión coloidal con un *Vortex*. Luego de la agitación, se toma con micropipeta un mililitro de la misma y se la introduce en el dewar el cual se coloca dentro de la bobina, y el sistema es sometido al campo magnético RF.

Para los cultivos celulares se utilizó una bobina de 5 cm de diámetro, es decir un tamaño adecuado para colocar las placas de cultivo de 3.2 cm de diámetro envueltas en telgopor. Por otro lado, con el propósito de aplicar la radiofrecuencia a cultivos celulares en baño térmico a 37 °C se fabricó un baño térmico que consiste en un doble tubo de vidrio, que permite recircular agua a dicha temperatura. Éste tiene un diámetro de 6.5 cm que requiere el uso de una bobina de mayor tamaño que las ya mencionadas. Para este caso se usó una bobina de 7 cm, lo cual conlleva a un cambio en la frecuencia e intensidad del campo RF. Las placas de cultivo se colocan adentro del baño térmico como se muestra en la *Figura 2.2 2.2*. Las 3 bobinas utilizadas se muestran en la *Figura 2.3*, la bobina de 2.5 cm se utilizó para medir el SAR de las suspensiones coloidales magnéticas a 267 kHz y amplitudes hasta 41 kA/m, la de 5 cm usada para irradiar los cultivos a 170 kHz y

amplitudes hasta 34 kA/m y la de 7 cm para irradiar cultivos celulares inmersos en baño térmico a 37 °C a 128 kHz y amplitudes hasta 20.3 kA/m .

El registro de la temperatura se realizó a través de un acondicionador de señales Neoptix Reflex cuyos sensores son fibras ópticas con una precisión de  $\pm 0.1$  °C. Este dispositivo incluye un software NeoLink que permite un registro digital de los datos de temperatura en función del tiempo. Para la medición, la sonda pasa a través del tapón que cierra el dewar o de la tapa del baño térmico y se la ubica en el centro de la suspensión o en el centro del cultivo. Para acelerar el enfriamiento de la muestra entre mediciones de SAR se coloca el dewar en un recipiente con hielo durante aproximadamente 10 min.

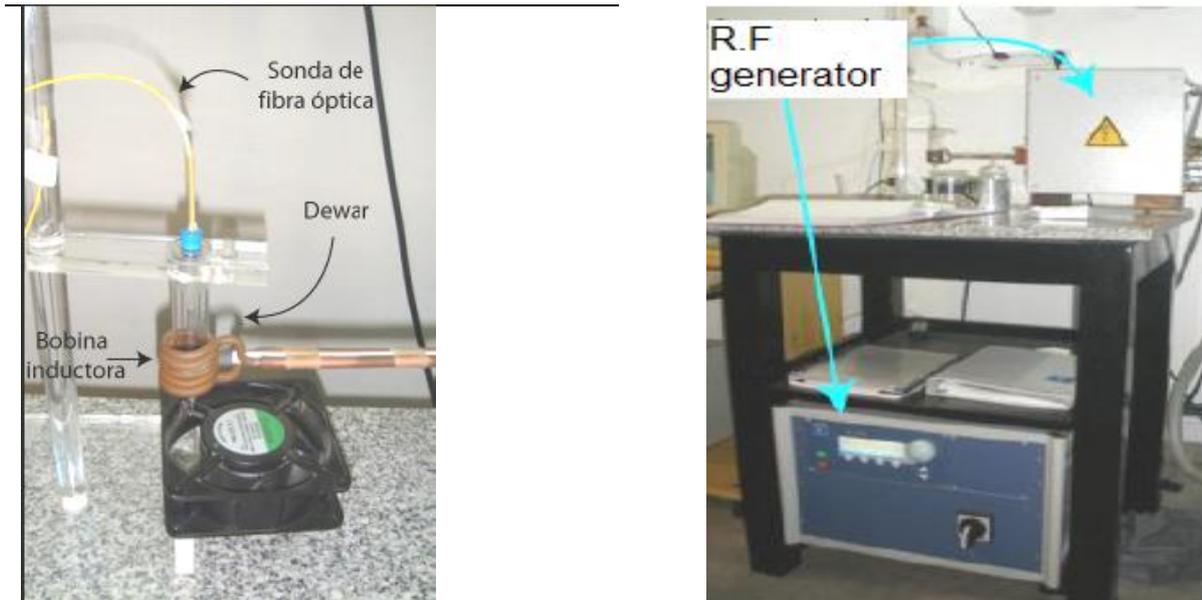


Figura 2.1: Equipo de RF



Figura 2.2: Imagen de la bobina de 7 cm conteniendo el recipiente para aplicación de RF en cultivos celulares en baño térmico a 37 °C



Figura 2.3: Bobinas utilizadas para aplicar campo de RF a la suspensión coloidal magnética, al cultivo celular y cultivo celular en baño térmico a 37 °C.

Para determinar la pendiente inicial ( $dT/dt$ ) de las curvas de calentamiento  $T(t)$ , las cuales presentan una dependencia exponencial con el tiempo se realizó un ajuste con la función (2.4)

$$T(t) = T_{\infty} - (T_{\infty} - T_0) e^{-t/\lambda} \quad (2.4)$$

Donde  $T_0$  y  $T_{\infty}$  están indicados en la Figura 2.4 y  $\lambda$  es la constante de tiempo que caracteriza la adiabaticidad del Dewar. El valor de  $T_0$  es la temperatura de equilibrio que se alcanza cuando el Dewar contiene sólo agua desmineralizada y se determina experimentalmente. La pendiente inicial  $(T_{\infty} - T_0) / \lambda$  se determina obteniendo los parámetros correspondientes a través del ajuste de la función (2.4) al conjunto de datos experimentales. Cuando  $\lambda$  es mucho mayor que el intervalo temporal de la medida la exponencial se puede aproximar por la recta  $T(t) = T_0 + (T_{\infty} - T_0) t / \lambda$ . En este caso se puede usar una función lineal para ajustar a los datos.

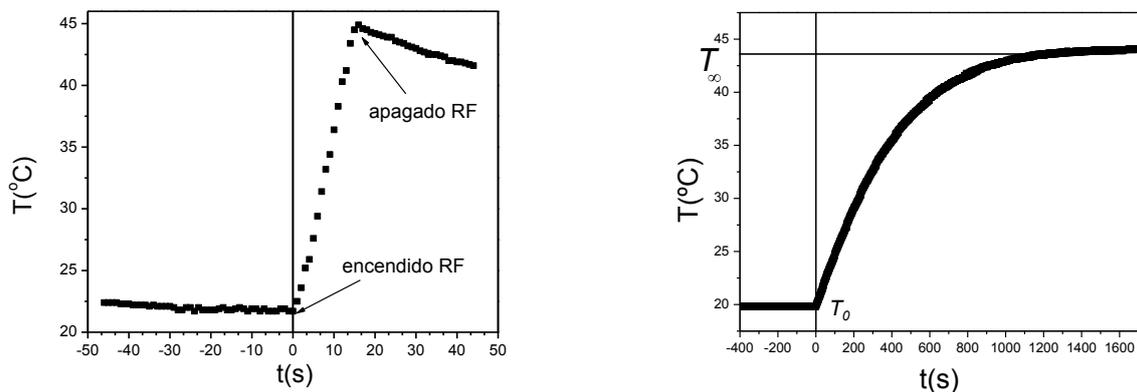


Figura 2.4: Registro de temperatura en función del tiempo de una suspensión coloidal sometida a un campo de radiofrecuencia. Del lado izquierdo se muestra el caso de una curva de calentamiento lineal y del lado derecho una curva de calentamiento con forma exponencial.

## **2.3. Técnicas de manipulación de cultivos celulares.**

### **2.3.1. Protocolos de mantenimiento de los cultivos celulares.**

Las líneas celulares se cultivaron en un incubador en atmósfera controlada al 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C 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), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba) y penicilina/estreptomicina (20 mg/l) (PAA Laboratory, GMBH). La esterilidad del medio de cultivo se realizó haciendo pasar el medio a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro. El volumen final del medio varió con el envase utilizado para el crecimiento celular. Para botellas de 75 cm<sup>2</sup> se utilizó 16 ml medio de cultivo y para placas de petri de 2.3 cm de diámetro 2 ml.

#### **Repique de cultivos celulares**

Cuando las células alcanzan el 80-90 % de confluencia se las dividió, diluyéndolas 1/3. Para las células adherentes crecidas en botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (o placa de petri) se les retiró el medio de cultivo y se las lavó con 3 ml o 1ml, respectivamente de buffer fosfato salina PBS (*phosphate buffered saline*). Se retiró el PBS y se despegó la monocapa de células con una solución salina isotónica de tripsina estéril (0,5 mg/ml). Se incubó 2-5 min hasta que las células se desprendieron (análisis bajo microscopio Olympus IX-71) y se inhibió rápidamente la tripsina, agregando medio DMEM, suplementado con 10% de FBS. Por último se colocó las células en un recipiente nuevo, estéril o se las congeló para su conservación.

#### **Criopreservación y descongelamiento de las células**

Parte de las células fueron conservada en Nitrógeno líquido, utilizándose Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 %, en 50 % de DMEM suplementado con 40% de SFB, como agente criopreservante. Para descongelar las células, se las retiraron de su sitio de almacenamiento de Nitrógeno líquido y se las descongelaron en un baño térmico a 37 °C. Se las sembraron en botella de 75 cm<sup>2</sup> con 16 ml medio de cultivo a fin de diluir el DMSO. Luego, se las resuspendieron para disgregarlas y por último se incubaron en estufa a 37 °C con atmósfera controlada al 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente del descongelamiento se renovó el medio de cultivo.

### **2.3.2. Protocolo de fijado del cultivo celular**

Para lo cual, se lavó el cultivo con PBS, luego se le agregó paraformaldehído al 4% durante 20- 25 min y por último se centrifugaron las células y se resuspendieron en PBS.

### 2.3.3. Protocolos de incubación de células con NPMs

- a) Cultivo en botella mediana (75 cm<sup>2</sup>): se siembran 5 x10<sup>5</sup> células en botellas de 75 cm<sup>2</sup> de superficie en medio DMEN adisionado con 10% SBF y se las incuba durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 60 % de confluencia.
- b) Cultivo en placas de Petri de 3.2 cm de diámetro: se siembran 10<sup>5</sup> células en placa y se las incuba a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> hasta alcanzar un 60% de confluencia. En el caso de cultivos de células modificadas *A549(HSP70B-EGFP)* y *A549(CMV-EGFP)*, se agrega neomicina (G418 sulfato) a una concentración de 0.5 mg/ml al medio de cultivo, como antibiótico selectivo para garantizar su pureza.
- c) Incubación de células con NPMs en botella mediana (75 cm<sup>2</sup>): las células previamente incubadas en placas de cultivo hasta un 60 % de confluencia fueron incubadas durante 17 h más en contacto con la suspensión coloidal a la concentración ( $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$ ) seleccionada. Luego se las lavaron tres veces con 5 ml de PBS para asegurar sacarle bien el exceso de coloide.
- d) Incubación de células con NPMs en placa de petri de 3.2 cm de diámetro: se procedió igual que en c), pero utilizando 1 ml de PBS para los lavados.

### 2.3.4. Protocolo de medida de expresión de EGFP inducido por radiofrecuencia

Se prepararon cultivos de células *A549 (HSP70B-EGFP)* con un 60 % de confluencia. Luego a cada placa se las somete durante un tiempo seleccionado a campos de RF ( $H_0, f$ ). Luego de 24 h de la aplicación del campo se realizó el fijado de las células, según el protocolo descrito en la sección 2.3.2. Posteriormente, se determina el % de células que expresan EGFP respecto del total de células analizadas con citometría de flujo.

### 2.3.5. Protocolo de medida de expresión de EGFP inducido por incubación con NPMs.

Una vez realizado el protocolo de incubación de las células con las NPMs en placa de petri descrito en la sección 2.3.3. se incuban a 37 °C durante 24 h más, luego se realiza el fijado de las células según el protocolo descrito en la sección 2.3.2. Posteriormente, se determina el % de células que expresan EGFP respecto del total de células analizadas con citometría de flujo.

## 2.4. Protocolos generales de trabajo con plásmidos

### 2.4.1. Transformación de bacterias.

Para tal fin, se adicionaron 20 ng de ADN plasmídico a 50  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* y se incubaron en hielo durante 30 min. A

continuación se les realizó el shock térmico incubándolas 90 segundos a 42 °C y, luego, transfiriéndolas rápidamente a hielo durante 60 segundos. Finalmente se agregaron, 200 µl de medio de cultivo LB (Luria Bertani) y se lo incubó a 37 °C, con agitación suave durante 30 min. Las bacterias así transformadas se siembran en placa de LB-ágar con ampicilina (100 µg/ml de medio de cultivo) e incubaron en estufa a 37°C durante 16 h.

#### **2.4.2. Obtención de plásmidos en escala analítica (minipreparación)**

Los plásmidos de *Escherichia coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Maniatis y colaboradores<sup>107</sup> con algunas modificaciones según se describe a continuación: se tomaron 1.5 ml del cultivo de bacterias que contienen el plásmido de interés a 2 ml de medio LB conteniendo ampicilina (100 µg / ml) y se incubaron 16 h a 37 °C con agitación fuerte. El cultivo se centrifugó a 13400 rpm durante 2 min. El *pellet* de bacterias se resuspendió en 100 µl de solución I (25mM Tris-HCl pH 8.0; 10mM EDTA pH 8.0; Glucosa 50 mM), se agregaron 200 µl de solución II (NaCl 0,2 M; 1 % SDS) y se mezcló suavemente por inversión y se mantuvo la mezcla en hielo por 5 min. A continuación se adicionaron 150 µl de solución III (60 ml de Acetato de potasio 5M; 11,5ml de ácido acético; agua destilada 100 ml), se lo mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min y se recogió el sobrenadante a un tubo limpio. Se le adicionó el mismo volumen que de sobrenadante recogido de Isopropanol. Luego se lo centrifugó 20 min a 13400 rpm. Se lavó el precipitado con 500 µl de etanol 70 % frío, se lo centrifugó 7 min a 13400 rpm y se descartó el sobrenadante. Por último se lo resuspende en 50 µl de agua destilada estéril y guardar a -20°C en un tubo eppendorf. La cuantificación del ADN plasmídico se realizó por absorbancia a 260 nm.

#### **2.4.3. Digestión con enzimas de restricción**

Las digestiones de ADN se llevaron a cabo con las enzimas de restricción elegidas en las condiciones óptimas para cada una de ellas, siguiendo las indicaciones del fabricante (Promega, New England Biolabs). Las mezclas de digestión con enzimas de restricción (ER) realizadas consistió en: agua destilada estéril, buffer 10X adecuado, DNA (0,5 a 1 µg de ADN plasmídico) y enzimas de restricción (1U/ µg de ADN). Se realiza la digestión de manera secuencial, para lo cual se agregó primero al ADN, Age I y se lo deja reaccionando 1.5 hs a 37 °C. Luego se agregó SaiI y se lo deja nuevamente reaccionando en la misma condición. Finalizada la incubación se procedió a su siembra en un gel de agarosa.

#### **2.4.4. Electroforesis en geles de agarosa**

La separación y detección de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa (0.8-1.5 %) en presencia de bromuro de etidio (2 µg/ml). La electroforesis se realizó en buffer TBE 1X, a 80-100 V durante 20-40 min. La presencia de ADN se evidenció usando un transiluminador UV Hoefer MacroVue UV-20 (Amersham Biosciences, USA) ( $\lambda=260$  nm). Los tamaños de los fragmentos de ADN se estimaron comparándolos con marcadores de peso molecular: peqGOLD 100 pb DNA-Ladder (peqlab, Biotechnologie GmbH, Alemania), 1 Kb DNA Ladder y 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA).

### 2.4.5. Obtención de plásmidos en escala preparativa (maxipreparación)

Una vez elegida la minipreparación que contenía el plásmido de interés, se procedió a realizar una expansión a mayor escala (maxipreparación) con el fin de obtener cantidades preparativas del plásmido. Para lo cual se utilizó plásmidos de alta pureza que se obtuvieron con el kit comercial QIAGEN Plasmid Maxi prep Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 2.4.6. Construcción de los vectores lentivirales *HSP70B/EGFP* y *CMV/EGFP*.

Para la generación de los vectores lentivirales se utilizaron los siguientes plásmidos:

- **pRSV-Rev<sup>108</sup>**: plásmido de empaquetamiento que codifica para *rev*, gen regulador del HIV-1.
- **pMDLg/pRRE<sup>108</sup>**: plásmido de empaquetamiento que codifica para los genes *gag* y *pol*, genes estructurales comunes de retrovirus, y para la secuencia que contiene RRE (elemento de respuesta a Rev) del HIV-1.
- **pCMV-VSV-G<sup>109</sup>**: plásmido de envoltura que codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G (*G glycoprotein of the vesicular stomatitis virus*), que media la entrada viral a la célula.
- **pRRL-Sin18-CMV.EGFP-PGK.neo(CMV/EGFP)**: plásmido de transferencia lentiviral.
- **pRRL-Sin18-Hsp70B.EGFP-PGK.neo(HSP70B/EGFP)**: plásmido de transferencia lentiviral.

Los vectores lentivirales se generaron mediante la transfección de células 293 T con 8 µg del plásmido de transferencia junto a 12 µg del plásmido pMDLg/pRRE, 2 µg de pCMV-VSVG y 5 µg de pRSV-REV, utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio como se describe en el artículo de Schambach y colaboradores<sup>110</sup>. Brevemente, se cultivaron 5x10<sup>6</sup> células 293T en placa de cultivo de 10 cm de diámetro en presencia de DMEM suplementado. Luego de la incubación durante 6 h a 37 °C con 25 µM de cloroquina, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco, para disminuir la degradación lisosomal de los plásmidos transfectados. Por otra parte, se preparó una mezcla compuesta por los 4 plásmidos antes mencionados y 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2 M, en un volumen final de 500 µl. Esta mezcla fue agregada a un tubo que contenía 500 µl de HBS 2X y rápidamente, se agitó durante 15 segundos utilizando un vórtex. La mezcla de ADN con fosfato de calcio se agregó, gota a gota, sobre la monocapa de células 293T. Las células se incubaron durante 16 h a 37 °C, luego de lo cual se lavaron y se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. El sobrenadante celular, que contenía las partículas del vector lentiviral, se cosechó tres veces reemplazándolo por medio de cultivo fresco cada vez, con una periodicidad de 8 h. Los sobrenadantes con las partículas del vector lentiviral se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y se purificaron mediante la utilización de un filtro con diámetro de poro de 0.22 µm. Los sobrenadantes con las partículas lentivirales se

fraccionaron en alícuotas y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

#### **2.4.7. Titulación de los sobrenadantes virales**

Para la determinación de los títulos virales se sembraron  $10^5$  células A549 por pocillo en una placa de 6 pocillos. Luego de incubar las células durante 6 h a 37 °C, se agregaron distintas diluciones del sobrenadante con las partículas virales y 8 µg/ml de polibreno. Tres días después, las células se cosecharon y el porcentaje de células que expresaban EGFP se evaluó mediante citometría de flujo con un equipo BD FACS calibur. Con los valores obtenidos se calcularon los títulos virales correspondientes, expresados en unidades de transducción (UT) ml. Para ello, se multiplicó el número de células sembradas por pocillo por el factor de dilución y por el porcentaje de células que expresaban EGFP y, luego, se dividió por el volumen en el que se sembraron las células

$$\text{Título viral (UT / ml)} = \frac{n^{\circ} \text{ células} \times \text{factor de dilución} \times \text{EGFP}}{\text{volumen}}$$

#### **2.4.8. Transducción de la línea celular A549 con vectores lentivirales**

Las células A549 fueron transducidas con los vectores lentivirales a una multiplicidad de infección (MOI) de 50 unidades de transducción (UT) por célula, en presencia de 8 µg/ ml de polibreno, durante 3 días. La eficiencia de la transducción se determinó mediante citometría de flujo, midiendo el porcentaje de células que expresaban EGFP, con un equipo BD FACSCalibur

### **2.5. Técnicas de visualización y cuantificación de cultivos celulares**

#### **2.5.1. Microscopía de contraste de fases con fluorescencia**

Utilizamos la microscopía de contraste de fase para visualizar, contar y controlar la morfología de las células durante el crecimiento de los cultivo (confluencia). Se utilizó como microscopio invertido de contraste de fases Olympus IX71 sito en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), ubicado en la Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Este microscopio permite visualizar células sin teñir. Esta técnica se fundamenta en las pequeñas diferencias de los índices de refracción que poseen las distintas partes de una célula. Las partes oscuras de la imagen se corresponden con las partes más densas o de mayor índice de refracción de la célula. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas sin la necesidad de teñirlas. Este microscopio es de configuración invertida, posee la fuente de luz ubicada por encima de la platina y el principio de funcionamiento y formación de la imagen es el mismo que el del microscopio óptico tradicional. Estos se utilizan principalmente para el seguimiento de cultivos celulares (células vivas) sin una preparación previa. Por otro lado, dispone de una

lámpara de excitación UV de longitud de onda de 340 nm, combinada con 6 filtros de emisión para la medida de fluorescencia. Para la visualización de la luz fluorescente verde se utilizó el filtro U-MWIBA3.

### 2.5.2. Microscopía de transmisión de electrones (TEM).

Para confirmar la internalización de la NPMs en las células se utilizó microscopía de transmisión de electrones (TEM) utilizando un microscopio electrónico JEOL JEM 1200 – EX II y las micrografías fueron tomadas con una cámara digital Erlangshen ES 1000W haciendo uso del servicio de Microscopía Electronica TEM de la cátedra de Patología Animal de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNLP. Para la observación TEM las células se suspenden en glutaraldehído al 2% durante dos h a 4° C y se lavaron con buffer fosfato. Luego se postfijaron con Tetróxido de Osmio al 1% durante 2 h a 4 °C. Una vez postfijadas se lavaron con buffer fosfato y se deshidrataron en una batería de alcoholes desde 50 °C hasta alcohol absoluto y finalmente Acetona. Posteriormente las muestras se infiltraron e incluyeron en resina Epoxi durante 36 hs a 35, 45 y 60 °C para su polimerización.

Finalmente se realizan cortes ultrafinos de 60 nm de espesor, con un Ultramicrotomo Reichert-J Super Nova. Luego se montaron sobre grillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo al 1% y citrato de plomo.

### 2.5.3. Microscopía de fuerza atómica (AFM)

El AFM consiste de una sonda que es una pequeña punta montada en una palanca (*cantilever*), que se utiliza para barrer la superficie de la muestra que se desea estudiar. Durante este barrido, las fuerzas interatómicas que se generan entre los átomos de la punta y los de la superficie provocan una deflexión del *cantilever*. Estas fuerzas dependen principalmente de la distancia de separación entre la punta y la muestra, siendo atractiva cuando están suficientemente separadas y repulsiva cuando se acercan. Esta deflexión del *cantilever* es registrada por un sensor adecuado (normalmente un sistema óptico), este consiste de un láser que se hace incidir sobre la parte superior del *cantilever*, el cual lo refleja hacia un fotodetector, que registra los cambios en el ángulo del haz láser reflejado, producidos por las distintas deflexiones del *cantilever*, esta señal obtenida se introduce en un lazo de realimentación. El esquema experimental se ejemplifica en la *Figura 2.5 2.5*. Este último controla un piezoeléctrico el cual varía la distancia de separación de la punta a la muestra para mantener algún parámetro de control (fuerza, distancia o amplitud de oscilación, etc) constante. Podemos obtener información acerca de la topografía de la muestra y generar una imagen. La resolución lateral obtenida en este tipo de imágenes depende de la morfología de la superficie de la muestra y del radio de curvatura de la punta, mientras que la resolución en z depende solamente del piezoeléctrico cuyo paso mínimo en z es de 0.012 nm. Para el análisis de las células se empleó el de modo semicontacto, porque permite la caracterización de materiales blandos o elásticos sin dañarlos. En este modo la punta oscila a una frecuencia seleccionada y se usa como parámetro de control la amplitud de oscilación.

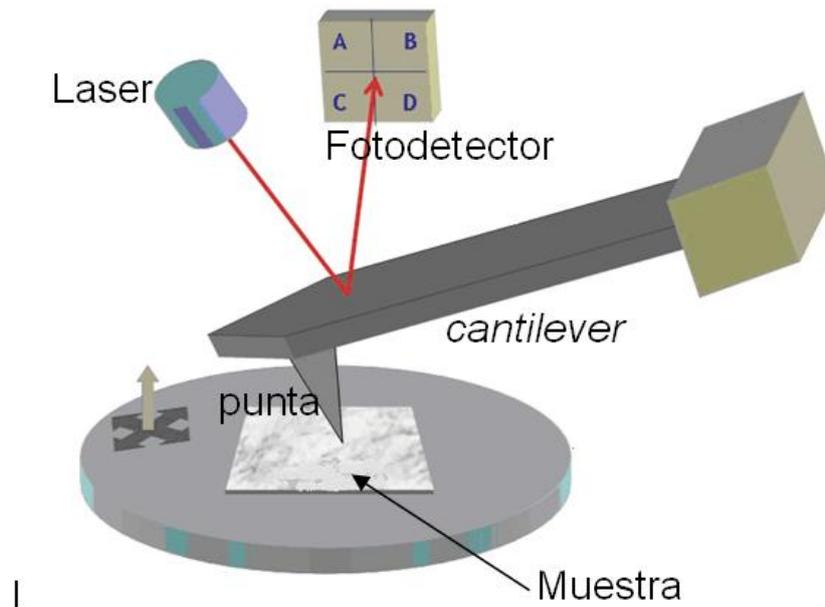


Figura 2.5: Esquema del funcionamiento del AFM

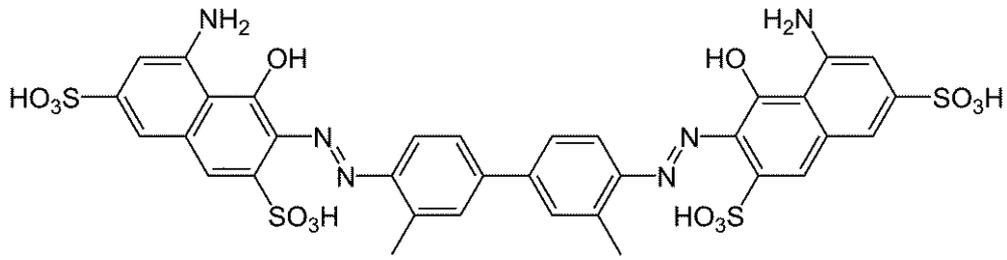
Para la preparación de las muestras se colocó un cubreobjetos en cada pocillo de una placa de 12 pocillos, se resuspendió y homogenizó una suspensión celular de  $\sim 10^5$  cel/ml y se sembró 0.25, 0.5, 0.75, 1 y 2 ml de suspensión de células, en cada pocillo. Luego se incubó durante 6 h, o hasta que estén pegadas al cubreobjetos. Se lavaron los cultivos con 1 ml de PBS, 3 veces y se colocó 1 ml por pocillo de paraformaldehído al 4 % durante 20 – 25 min. Se los lavó con 1 ml de PBS y se los secó completamente en estufa a 40 °C.

Las medidas se realizaron con un microscopio Solver Pro de la marca NT-MDT del Laboratorio de fuerzas atómicas y magnéticas (LFAyM) del IFLP. Todas las medidas se obtuvieron en modo semicontacto utilizando la punta sensora, NSG20/20 de NT-MDT, de silicio cristalino, material reflector Au, constante de fuerza  $k = 48$  N/m y frecuencia de resonancia 386 kHz.

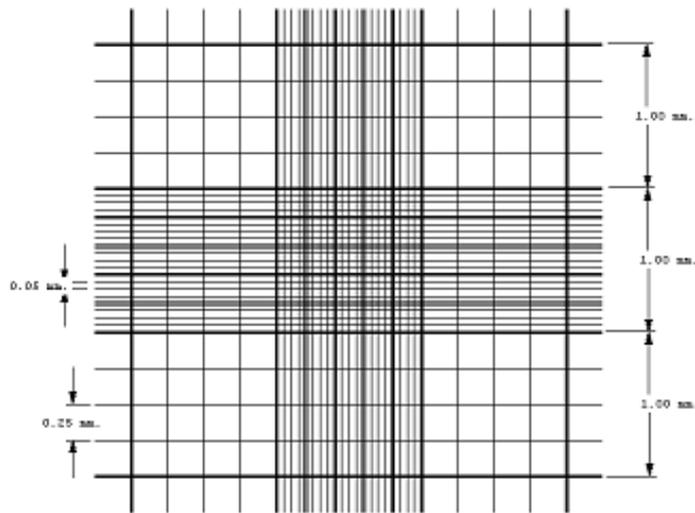
#### 2.5.4. Medida de la viabilidad y conteo celular.

La técnica de Azul de Tripán (*Trypan Blue*) permite contar la cantidad de células vivas en la suspensión celular. Este método se fundamenta en la exclusión del Azul de Tripán (SIGMA, solución isotónica al 0,2%) en células vivas ya que el colorante penetra en la membrana plasmática solo si esta se encuentra dañada, por lo tanto las células muertas se tiñen de azul y las células sanas no presentan tinción. Esta molécula se muestra en la Figura 2.6 .

Para realizar el conteo celular, se mezcló 100  $\mu$ l de suspensión celular con 100  $\mu$ l de Azul Tripán 0.2% y se los dejó 5 min reaccionando. Luego se cargó la cámara de Neubauer con la mezcla, que posee un reticulado de dimensiones conocidas que permiten saber el volumen de suspensión celular en la zona a medir. Luego se contó el número de células viables promedio en los cuadrantes mostrados en la Figura 2.7 2.7. Cada cuadrante de la cámara permite cargar un volumen de suspensión celular fijo y en base a esta cantidad, se obtiene el número de células viables por ml.

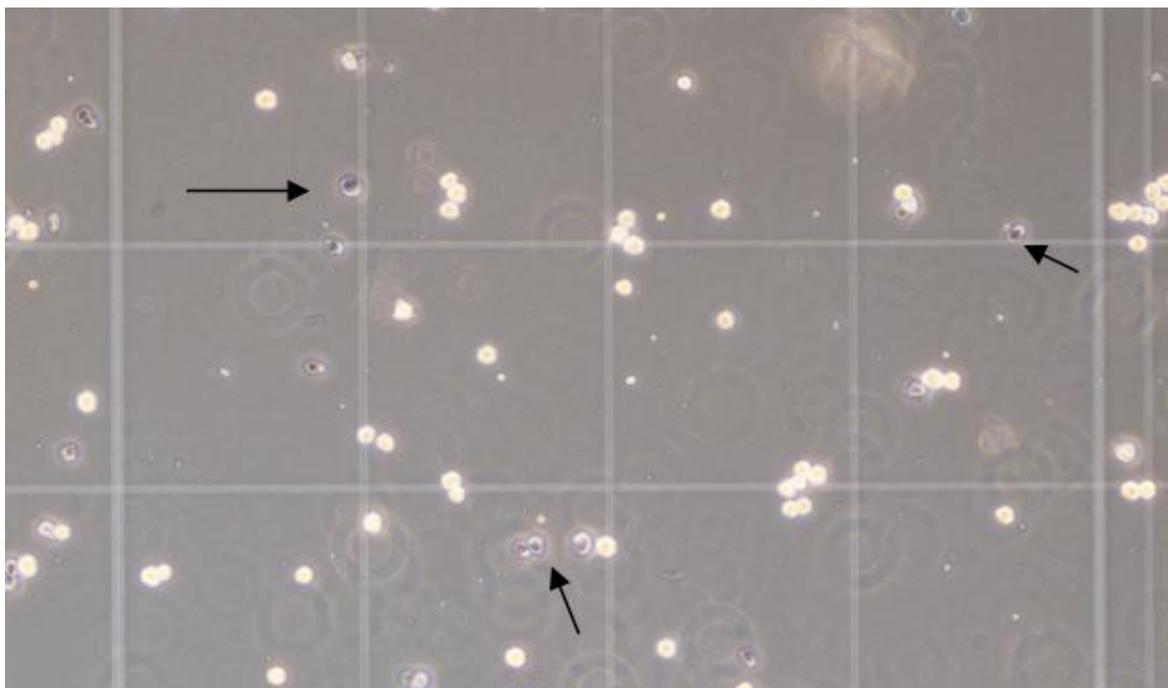


*Figura 2.6: Molécula de Azul de Tripan*



*Figura 2.7: cámara de Neubauer: Se cuentan las células viables contenidas en los cuatro cuadrantes de los vértices del retículo central.*

En la *Figura 2.8* se muestra una imagen obtenida con el microscopio invertido de contraste de fases, donde se muestran las células muertas que incorporaron el azul de tripan (células azules indicadas con la flecha negra) y células sanas las cuales se ven birrefringentes.



*Figura 2.8: Imagen donde se muestran células muertas que incorporaron el azul de tripan (células azules indicadas con la flecha negra) y células sanas birrefringentes.*

## 2.6. Técnicas de citometría de flujo

Las medidas se hicieron con dos citómetro FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*) diferentes:

Citómetro de Flujo, marca Calibur BD Biosciences USA, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas-Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH), dependiente de la UNSAM y del CONICET. Este citómetro usa dos líneas de iluminación (Láser refrigerado por aire de Argón de 15mw, operando a 488nm y Láser diodo 635nm).

Citómetro de Flujo, marca PARTEC PAS III, perteneciente al servicio de tecnológicos de Alto Nivel (STAN). Resol N° 1432 Directorio del CONICET, de la cátedra de Inmunidad Humoral dirigida por el Profesor Ricardo A. Margni (IDEHU, CONICET-UBA). Posee tres líneas de iluminación (UV, laser argón 488 nm y diodo rojo 625 nm) y 8 canales de recolección de luz incluyendo 6 canales de fluorescencia entre 480 nm y 760 nm, además de dispersión frontal y lateral de luz.

Estos equipos permiten el paso de una célula por vez a través de una cámara de flujo sobre la que incide un haz de luz Láser y detecta la luz dispersada por la célula y la emitida por fluoróforos. La importancia del análisis por citometría de flujo, reside en que se analiza varios parámetros de cada célula individualmente y en que se sensan del orden de  $10^4$  eventos en pocos min, lo cual asegura una alta estadística. Las desventajas son los costos de instrumentación y la incapacidad de visualizar las células que se están analizando. De manera esquemática se muestra el fundamento del equipo en la *Figura 2.9 2.9*.

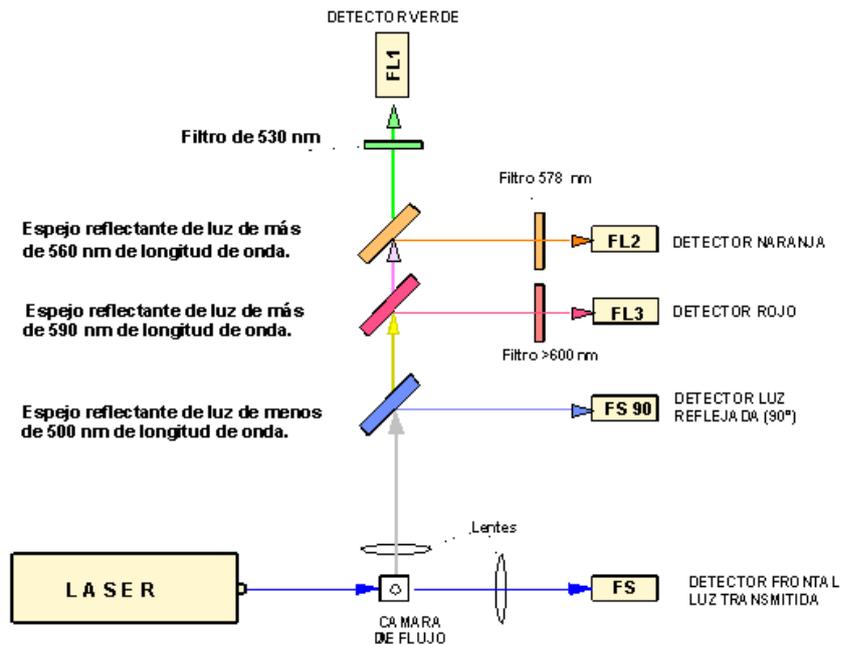


Figura 2.9: Esquema un citómetro de flujo

Los datos se analizaron con el software Win MDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*). En esta tesis los datos se muestran en un diagrama de puntos donde cada célula queda representada por un punto.

Los parámetros de la célula que se determinan son: el tamaño a partir de la luz que dispersa hacia delante *FSC* (*Forward Scattering*), la complejidad intracelular a partir de la luz que dispersa hacia el costado *SSC* (*Side Scattering*) y la fluorescencia verde la cual es captada en el canal (*FL1*) y la fluorescencia roja detectada en el canal (*FL3*).

Para realizar el análisis se hace una selección (*gate*) de las células viables de la población total. En la *Figura 2.10* se ve como se define esta población (rectángulo negro) entre ciertos valores límites de *FSC* y *SSC*. Solo se analizan las células que quedan dentro del área de este rectángulo. Durante esta tesis se muestran gráficos de complejidad vs tamaño (*SSC*) vs. (*FSC*) para definir el *gate* y para analizar la viabilidad de la población celular, (*FL1*) vs. (*FSC*) para los ensayos de expresión de EGFP (capítulo 5) y de (*FL3*) vs (*FL1*) para la determinación de citotoxicidad con Anexina V y Ioduro de Propidio discutidos en la sección 4.4.2.

El análisis estadístico de los datos provenientes del citómetro (% células que expresan EGFP respecto de la población total analizada) se realizó mediante el test t de Student para contrastar dos ensayos. En todos los casos, valores de  $p < 0.05$  indican diferencias estadísticamente significativas.

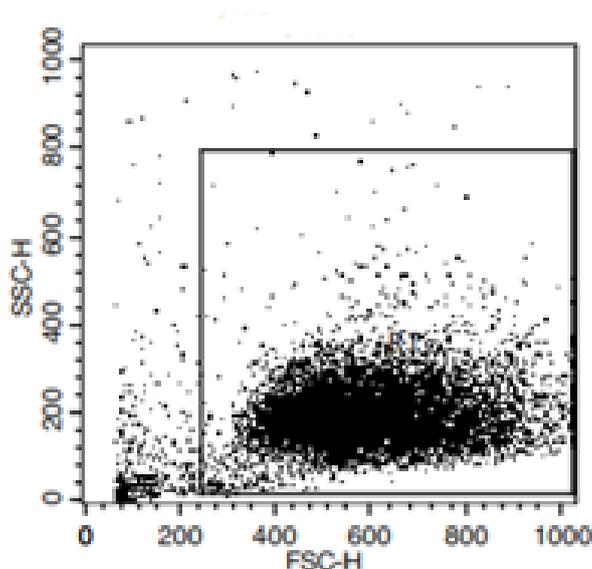


Figura 2.10: Se muestra un diagrama de puntos de un cultivo de A549 el cual fue utilizado para seleccionar la población de células a analizar (rectángulo negro).

### 2.6.1. Estudio de citotoxicidad con doble marca fluorescente: Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio.

En el curso de este trabajo realizamos ensayos de citotoxicidad a fin de verificar que las NPMs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  cuya síntesis y caracterización se detalla en la sección 3 son aptas para los ensayos *in-vitro*. Estos ensayos se realizaron para las distintas condiciones de internalización, tiñendo las células con doble marca fluorescente naranja de acridina y bromuro de etidio<sup>111</sup>. Esta marca permite contar y distinguir entre células vivas, necróticas y apoptóticas. El método de conteo fue a mano identificando el estado de cada célula en las imágenes adquiridas con microscopio de fluorescencia descrito en la sección 2.5.1. Posteriormente para obtener un análisis más representativo (mayor precisión y estadística) se utilizó la técnica citometría de flujo descrita en la sección 2.6, usando el isotiocianato de fluoresceína de la anexina V e ioduro de propidio como marcadores celulares<sup>112</sup>.

La membrana citoplasmática es permeable al naranja de acridina para todas las células y tiñe el núcleo de color verde. Por otro lado, el bromuro de etidio ingresa solo a la célula cuya membrana plasmática han perdido la integridad y marca el núcleo de color rojo, este predomina respecto del color generado por la tinción con naranja de acridina. Por lo tanto el núcleo de las células vivas se tiñe de verde y mantiene su morfología. Un núcleo verde brillante con la cromatina fragmentada indica una célula en apoptosis temprana mientras que un núcleo de cromatina fragmentada pero de color naranja es característico de células apoptóticas tardías. Las células necróticas presentan un núcleo naranja de estructura normal. En la *Figura 2.11* se muestra una foto obtenida para un cultivo incubado con suspensión coloidal de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

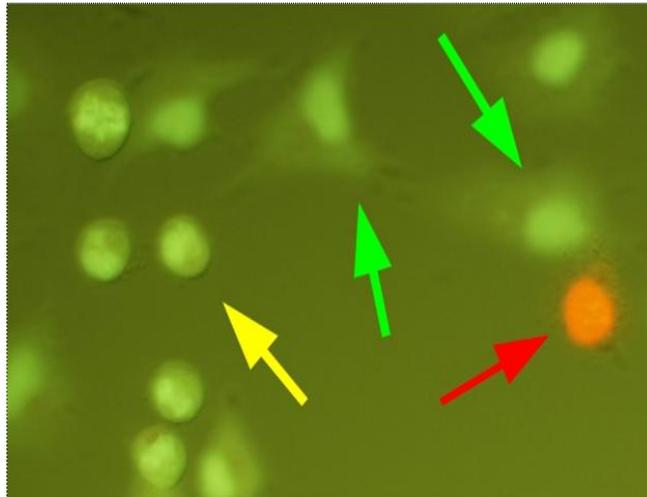


Figura 2.11: Medida de doble marca fluorescente (naranja de acridina y bromuro de etidio). Las flechas verdes señalan células sanas, la amarilla señala una célula apoptótica temprana y la roja indicada una célula necrótica.

### 2.6.2. Protocolo de citotoxicidad utilizando Anexina V e Ioduro de Propidio.

El teñido de las células con Anexina V e Ioduro de Propidio conforma una buena herramienta para distinguir el mecanismo de muerte de las células. Este método<sup>13</sup> se fundamenta en la pérdida de simetría en la distribución de fosfolípidos de la membrana plasmática de las células apoptóticas. Las moléculas de fosfatidilserina se exponen del lado externo de la membrana y las moléculas de Anexina V que poseen Isotiocianato de Fluoreceína (FITC), se une fuertemente a ella. Esto permite distinguir a las células que se encuentran en apoptosis. De manera esquemática se muestra este mecanismo en la Figura 2.12

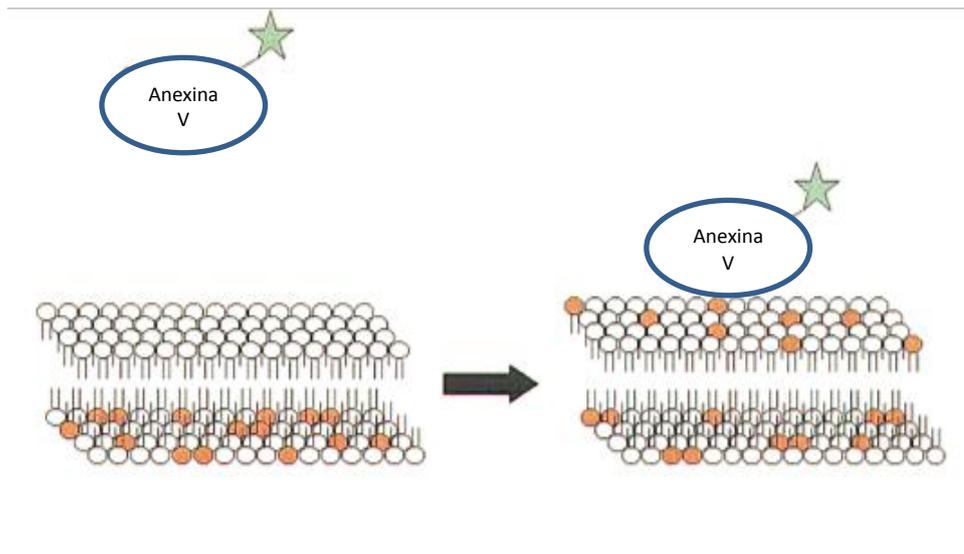


Figura 2.12: Se muestra la distribución de la fosfatidilserina (esfera naranja) en la membrana plasmática en células vivas (izquierda) y en células apoptótica (derecha). La FITC unida a la molécula de Anexina V se muestra representada con una estrella verde.

Por otro lado las moléculas de Ioduro de Propidio (IP) solo puede ingresar en células que han sufrido Necrosis y poseen su membrana plasmática dañada.

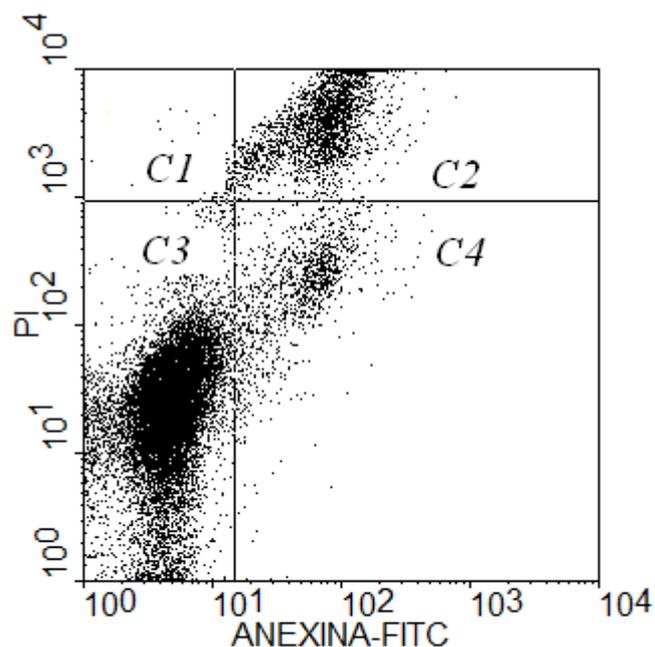
Un gráfico FACS de puntos tipo, se muestra en la

*Figura 2.13* donde se representa la intensidad de fluorescencia roja del IP (*FL3*) vs la intensidad de fluorescencia verde de la molécula de Isotiocianato de Fluoreceina (FITC) ligada a la Anexina V (*FL1*). Las células apoptóticas se marcan con Anexina-V y no con IP ya que en la apoptosis temprana no hay daño de la membrana plasmática (cuadrante C4 en la

*Figura 2.13*). Por otro lado, las células que sufrieron necrosis son marcadas con IP, pero pueden ser negativas o positivas para la Anexina-V dependiendo del nivel de daño que haya sufrido la membrana (C1, C2). La molécula de Anexina-V es mucho más grande que la molécula de IP, por lo tanto el daño en la membrana debe ser suficiente grande como para permitir el ingreso de la Anexina V. En la

*Figura 2.13* la población de células sin teñir (negativas para ambas marcas Annexina V y PI) son las viables (C3).

Para realizar este ensayo se utilizó un kit comercial (*Annexin V FITC kit*), el cual contiene un buffer de pegado (*binding buffer*) (10 mM HEPES/NaOH, pH=7.4, 140 nM NaCl y 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>) donde se resuspenden las células antes del agregado de las marcas (IP y Anexina-V).



*Figura 2.13: Ejemplo de un gráfico de FACS representado en forma de puntos. En el eje X se representa la intensidad de fluorescencia verde y en el eje Y la fluorescencia roja. IP es Ioduro de Propidio y FITC es el Isotiocianato de Fluoresceina de la Anexina.*

### **3. Síntesis de un coloide biomédico para aplicación en la terapia por Hipertermia Magnética**

El objetivo de esta parte del trabajo fue generar coloides magnéticos que cumplan con los requisitos tanto físicos como biológicos necesarios para ser utilizados en experiencias de hipertermia magnética intracelular.

Por ejemplo en su diseño y fabricación, además de controlarse las propiedades morfológicas y físicas de las NPMs, las cuales determinan su comportamiento magnético, es necesario considerar su biocompatibilidad y su estabilidad en suspensión a pH fisiológicos, cercanos a 7. Para este fin se utilizó el ácido cítrico como agente estabilizante de las NPMs, ya que al adsorberse en su superficie, les confiere carga superficial manteniéndolas estables en la suspensión. Se estudió sistemáticamente la influencia de la acidez del medio durante el paso de adsorción del AC ( $pH_{ads}$ ) a la superficie de las NPMs. El mayor contenido de NPMs estables en suspensión a pH neutros, se obtuvieron a un  $pH_{ads}=4.58$ , donde la mayor fracción de moléculas de AC, se unen a través de un carboxilo mientras que los restantes se mantienen ionizados a  $pH=7$ , confiriéndoles carga superficial a las NPMs. Con el fin de analizar la dependencia del parámetro SAR con las propiedades estructurales y magnéticas de los coloides mencionados se determinó este parámetro calorimétricamente a un valor de  $f=267$  kHz y amplitud de campo en el rango de 20-40.1kA/m. Se observó que las interacciones dipolares incrementan el tiempo de relajación de Néel en comparación con el de Brown aumentado de esta manera la capacidad de calentamiento por radiofrecuencia del coloide. Cada modificación en las condiciones de síntesis produce cambios en el comportamiento magnético de las NPMs, por lo tanto cada suspensión coloidal es única y debe ser estudiada en detalle.

#### **3.1. Síntesis por coprecipitación química.**

##### **3.1.1. Desarrollo del reactor de síntesis:**

El reactor fue diseñado a fin de sintetizar las suspensiones coloidales bajo atmosfera inerte con agitación permanente y a temperatura controlado. Para lo cual se armo un dispositivo que consistió en un vaso de precipitado de 250 ml, con una tapa de acrílico con 5 aberturas, a través de las cuales se ingresaron, los sensores de temperatura y pH, la bureta con el agente precipitante, el tubo para burbujear  $N_2$  y la última la dejamos para salida de gases.

Este dispositivo se colocó sobre una platina calefactora con agitador magnético, a la cual se le adicionó un controlador de temperatura a lazo cerrado que permite regular la temperatura con una precisión de  $\pm 1^\circ C$ . Con el propósito de mejorar el aislamiento de la mezcla de reacción de la atmosfera, se reemplazó el vaso de precipitado por un balón de 500 ml con 4 bocas selladas con tapones de goma perforados, por las cuales se ingresan, los sensores de temperatura y pH, la bureta con el agente precipitante, el tubo para el flujo de  $N_2$  y una salida de los gases a fin de evitar sobrepresión. Una foto de este reactor se muestra en la *Figura 3. 1*.



Figura 3.1: Fotografía del reactor

### 3.1.2. Síntesis de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ y su recubrimiento con ácido cítrico.

#### a) Síntesis con base débil ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

Como estas primeras síntesis fueron realizadas en un reactor previo al recién descrito, el cual no aseguraba una atmósfera inerte, existía la posibilidad de que parte del  $\text{Fe}^{+2}$  se oxidara a  $\text{Fe}^{+3}$ , por lo tanto elegimos trabajar en las condiciones de síntesis reportadas en el trabajo de Lei Fu et al.<sup>114</sup>, quienes sintetizaron magnetita partiendo de una relación molar  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  menor a dos según el protocolo que se describe a continuación.

Se disolvieron 3.091 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 20.0 ml de HCl (2 M) dentro del vaso de precipitado y se lo dejó estabilizar a 60 °C. Luego se le adicionaron 1.999 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  disueltos en 5.0 ml de HCl (2 M). Se homogenizó la solución utilizando el agitador magnético y se agregaron desde bureta gota a gota, 75 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (28 % p/p). A esta mezcla de reacción se la dejó reaccionar durante 30 min, para asegurar la finalización de la reacción. Se observó durante el agregado de la base un cambio de coloración de amarillento a negro característico de la formación de la magnetita. Inmediatamente, se procedió a la separación de las NPMs utilizando un imán permanente de 0.1 T. Luego, se neutralizó el exceso de base con una solución diluida de HCl (0.2 M). Por último, se lavó dos veces con agua bidestilada para eliminar cualquier impureza superficial. El coloide sintetizado a través de esta técnica, con una relación molar de  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  de 1.2, se lo rotuló  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (60dx).

Posteriormente utilizando el reactor mostrado en la *Figura 3.1* el cual mantiene la atmósfera inerte, nos permitió sintetizar magnetita bajo una relación de  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  igual a 2 como lo sugiere la estequiometría del compuesto. El protocolo empleado se describe a

continuación. Se disolvieron 2.750 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 50.0 ml de agua bidestilada y se dejó reaccionado esta mezcla dentro del balón bajo burbujeo de  $\text{N}_2$  durante 5 min. A continuación se adicionaron 1.010 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 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  $\text{NH}_4\text{OH}$  (25 % p/p) alcanzando un valor de pH final cercano a 10.5, luego se dejó reaccionar la mezcla de reacción durante 30 min más. Posteriormente, se procedió a la separación de las NPMs utilizando un imán permanente de 0.1 Tesla. Luego se continuó con el proceso de neutralización y lavado igual al recién descrito y por último se neutralizó el coloide hasta un pH final de suspensión ( $\text{pH}_{\text{susp}}$ ) de  $\sim 7.4$ .

Para recubrir las NPMs con ácido cítrico se procedió de la siguiente manera. Una vez finalizada la síntesis de las NPMs, se adicionó al precipitado negro de NPMs húmedas lavado y neutralizado, una solución de ácido cítrico de concentración 0.02 g/ml. Inmediatamente se observó que el precipitado negro se transformaba en una solución de color verdoso cuyo pH era cercano a dos, por lo tanto se infirió que parte de las NPMs estarían disolviéndose formando  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  de color verdoso.

Con el fin de evitar esta disolución, se procedió directamente a adicionar el ácido cítrico al precipitado negro de NPMs sin neutralizar. De esta forma se aprovecha el exceso de base retenido en el precipitado ( $\text{pH} \sim 10.5$ ) para neutralizar el primer protón del ácido cítrico, evitando de esta manera la disolución de las NPMs.

Por lo tanto se adicionó al precipitado húmedo gota a gota la solución AC (0.02 g/ml), hasta alcanzar un valor de pH de adsorción ( $\text{pH}_{\text{ad}}$ ) dado. Los  $\text{pH}_{\text{ad}}$  en el rango entre comprendido entre 4.58 y 7.08, luego se dejó reaccionar la mezcla durante 90 min a  $60^\circ\text{C}$  bajo flujo de  $\text{N}_2$  y finalmente se llevó a un pH final de suspensión  $\text{pH}_{\text{susp}} \sim 7.4$  empleando una solución diluida de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (0.25 % p/p).

Experimentalmente se observa que si no se estabilizan las NPMs, la suspensión coloidal se desestabiliza, separándose en dos fases, por un lado el precipitado, el cual contiene a las NPMs que se agregaron sedimentando y por el otro el sobrenadante. En la *Figura 3.2* se muestran en forma comparativa fotos tomadas luego de dejar 15 min en reposo tanto la suspensión coloidal de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sin recubrir, como de la recubiertas con ácido cítrico AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Se observa que el coloide AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  es una suspensión homogénea, mientras que el coloide de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sin recubrir, se desestabiliza.



*Figura 3.2* Se muestra de manera comparativa suspensiones coloidales de NPMs de AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y de NPMs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a  $\text{pH} \sim 7$ .

separándose en dos fases. Este aumento de estabilidad en los coloides AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, se debe a la estabilización electrostática que le provee el recubrimiento de AC a las NPMs, evitando que éstas se agreguen desestabilizando el coloide. Los coloides AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> se mantienen estables durante varios meses. A estas suspensiones se la rotula como AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60).

#### b) Síntesis con base fuerte NaOH.

Con el fin de estudiar como afecta al tamaño de la NPMs, el tipo de base utilizada y la temperatura de reacción, se sintetizaron suspensiones coloidales para diferentes temperaturas utilizando, el NaOH como agente precipitante.

Se disolvieron en el balón 6.430 g de *FeCl<sub>3</sub>·4H<sub>2</sub>O* que fueron disueltos en 50.0 ml de *HCl* (2 M), y se dejó bajo flujo de *N<sub>2</sub>* estabilizar a la mezcla de reacción a la temperatura de síntesis seleccionada. Luego se le adicionaron 2.38 g de *FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O* disueltos previamente en 5 ml de *HCl*(2M). Una vez obtenida la solución homogénea se agregó desde bureta a una tasa de una gota por segundo 75 ml de NaOH (3M).

Luego de un tiempo de reacción de 15 min medido desde el instante en que se agrega la última gota de base se procedió a su separación y lavado, siguiendo el procedimiento explicado más arriba.

Se procedió al recubrimiento con AC de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60f), omitiendo el paso de neutralización y lavado del precipitado. Para la unión de AC a la superficie de la NP, se tomó parte del precipitado obtenido (aproximadamente entre 2 a 4 g) al que se le agregó la solución de AC (0.02 g/ml) hasta alcanzar un pH<sub>ads</sub> de 5, luego se lo dejó reaccionar durante 90 min a 60 °C bajo flujo de *N<sub>2</sub>*. Finalmente, se neutralizó la mezcla con una solución de NaOH diluido a 0.3M, hasta obtener un pH final ~ 7.4. Esta muestra se la denominó AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60f). Este protocolo de síntesis se repitió para varias temperaturas de reacción: 40 °C, 60 °C y 80 °C. A los coloides resultantes se los rotuló como Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (40f), Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60f) y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(80f). Las diferentes suspensiones coloidales se lista en la *Tabla 3.1 3.1*

Muestra	<i>T</i> (°C)	Base utilizada	<i>r</i>
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60dx)</i>	60	<i>NH<sub>4</sub>OH</i>	1.2
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60d)</i>	60	<i>NH<sub>4</sub>OH</i>	2
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(80d)</i>	80	<i>NH<sub>4</sub>OH</i>	2
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(40f)</i>	40	<i>NaOH</i>	2
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60f)</i>	60	<i>NaOH</i>	2
<i>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(80f)</i>	80	<i>NaOH</i>	2

*Tabla 3.1: muestras sintetizadas con una relación molar Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> (r) a la temperatura de reacción T para base débil y fuerte.*

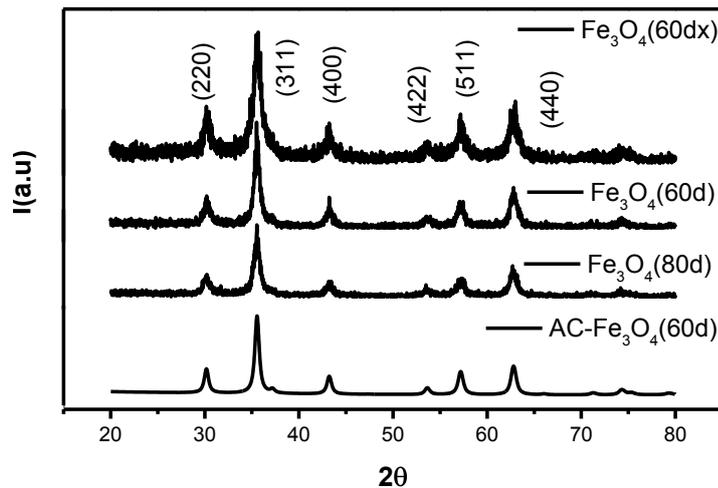
## 3.2. Caracterización estructural y magnética.

### 3.2.1. Caracterización de las NPMs

Las suspensiones coloides sintetizadas siguiendo los protocolos descritos en la sección 3.1.2 fueron caracterizadas en su estado líquido y como polvo luego de ser secadas en estufa a 40 °C. Las técnicas de caracterización utilizadas han sido descritas en el capítulo 2.

a) Caracterización estructural de las nanopartículas con y sin recubrimiento:

En la *Figura 3.3* se muestran los patrones de DRX, de las NPMs resultantes del secado de los coloides  $Fe_3O_4(60dx)$ ,  $Fe_3O_4(60d)$ ,  $Fe_3O_4(80d)$ ,  $AC-Fe_3O_4(60d)$ . En todos estos patrones se observan las mismas líneas de reflexión bien definidas que se corresponden con la estructura de la espinela cúbica. Estos resultados son consistente con la presencia de una sola fase tipo magnetita o maghemita e indican que el recubrimiento no altera la fase cristalina obtenida. Se observa también el ensanchamiento de las líneas característico de nanopartículas. Por otro lado en la *Figura 3.4* se muestran los patrones correspondientes a las NPMs sintetizadas utilizando la base fuerte como agente precipitante (NaOH).



*Figura 3.3: Patrón de DRX de muestras sintetizadas con base débil  $NH_4OH$ .*

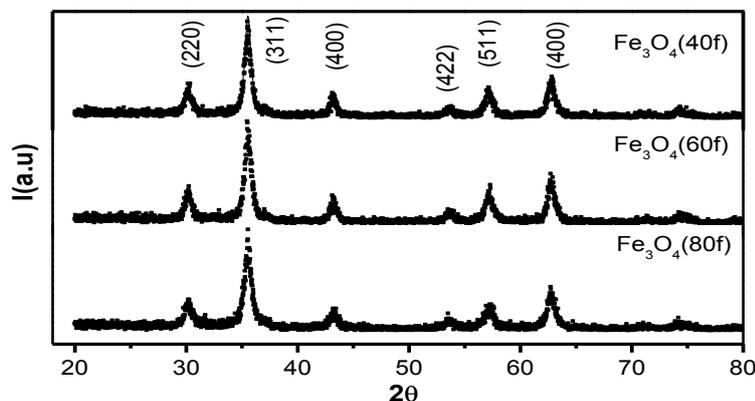


Figura 3.4: Patrón de DRX de muestras sintetizadas con base fuerte NaOH.

Los resultados de este análisis indican que la única fase presente es la magnetita. Por último se presentan de manera comparativa, los patrones de difracción de los coloides  $Fe_3O_4$  (60f) y  $AC-Fe_3O_4$  (60f) en la Figura 3.5 3.5

En el patrón de difracción de la muestra  $AC-Fe_3O_4$ (60f), que se muestra en la parte superior de la Figura 3.5 3.5, se observa que a las líneas de reflexión correspondientes de la magnetita, se superponen líneas en las posiciones 27.3, 31.7 y 45.5 °, que se corresponden con las reflexiones principales (111), (200) y (220) de la fase NaCl identificados en la tarjeta (PDF win #1000041). Se infiere a través de este resultado, que el uso de la base fuerte como agente precipitante, conjuntamente con la omisión del paso de neutralización y lavado del precipitado previo al paso de la adsorción del AC, necesario este último para alcanzar el pH de adsorción evitando la disolución de la magnetita, resulta en la contaminación del coloide con cristales de NaCl. A partir de este resultado descartamos el uso de esta base fuerte para la obtención de carozos de magnetita recubiertos con ácido cítrico.

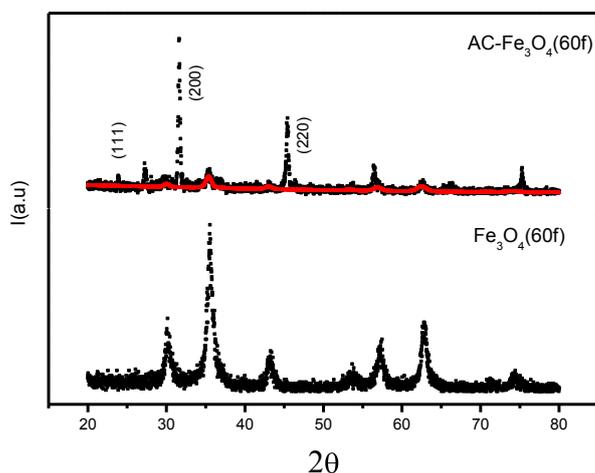


Figura 3.5: Patrón de DRX de muestras sintetizadas con base fuerte NaOH, recubiertas en la parte superior  $AC-Fe_3O_4$ (60f) y sin recubrir  $Fe_3O_4$ (60f) en la parte inferior

Luego de realizada la caracterización de las NPMs de los coloides estables  $AC-Fe_3O_4$  obtenidos utilizando bases débiles ( $NH_4OH$ ), en comparación con los que se obtuvieron utilizando base fuerte ( $NaOH$ ), se decidió sintetizarlas utilizando base débil debido, a que cuando se utilizaba la base fuerte como agente precipitante, se encontraban restos de sales de  $NaCl$  como fase contaminante, las cuales se veían en el patrón de difracción de rayos X, de las NPMs de la suspensión, por lo tanto se descarta este protocolo ya que estas sales de  $NaCl$  son nociva para las células en los ensayos in vitro.

Para todos los coloides estudiados el patrón de difracción completo fue refinado con a la estructura espinela cúbica con parámetro de red  $a=8.378 \text{ \AA}$  (grupo espacial  $Fd3m$ ), utilizando la tarjeta #19-0629 de la base de datos PDF win. Se incluyó el ensanchamiento de línea en el refinamiento del cual se infiere el tamaño de cristalita.

En la Tabla 3.2 se muestran los tamaños para las muestras descritas anteriormente. De la tabla se puede observar, que los tamaños de las NPMs de los coloides obtenidos utilizando base débil como precipitante son mas grandes que cuando se utilizó base fuerte. Por lo

tanto se eligió trabajar con base débil para lograr obtener carozos magnéticos de mayor tamaño y por lo tanto mayor momento magnético  $\mu$ , como se ve en la ecuación (1.7) del capítulo 1.

Muestra	Tamaño de cristalita (nm)
$Fe_3O_4(60d)$	17
$Fe_3O_4(80d)$	14
$AC-Fe_3O_4(60d)$	18
$Fe_3O_4(40f)$	13
$Fe_3O_4(60f)$	13
$Fe_3O_4(80f)$	12

Tabla 3.2: Tamaño de cristalita de los diferentes coloides, sintetizados con base débil y base fuerte.

En las imágenes TEM, mostradas en la Figura 3.6 3.6, se muestra de forma comparativa las NPMs sin recubrir, correspondientes a las del coloide  $Fe_3O_4(60d)$ , mostradas en la parte (a), en comparación con las NPMs recubiertas del coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$ , mostradas en (b). En todas las muestras las partículas presentaron forma esférica. En estas imágenes se observa que las NPMs recubiertas, están menos agregadas, mas aisladas que las NPMs sin recubrir. En la imagen (c) de la Figura 3.6 3.6 se muestra una partícula sola de  $AC-Fe_3O_4(60d)$ , en la cual se visualizan los planos cristalinos. Por otro lado en el inset se muestra el correspondiente patrón de difracción de electrones del cual se infiere un buen grado de cristalinidad de las NPMs y ratifica los resultados de DRX.

En estas imágenes se observa que las NPMs recubiertas, están menos agregadas, mas aisladas que las NPMs sin recubrir. En la imagen (c) de la Figura 3.6 3.6 se muestra una partícula sola de  $AC-Fe_3O_4(60d)$ , en la cual se visualizan los planos cristalinos. Por otro lado en el inset se muestra el correspondiente patrón de difracción de electrones del cual se infiere un buen grado de cristalinidad de las NPMs.

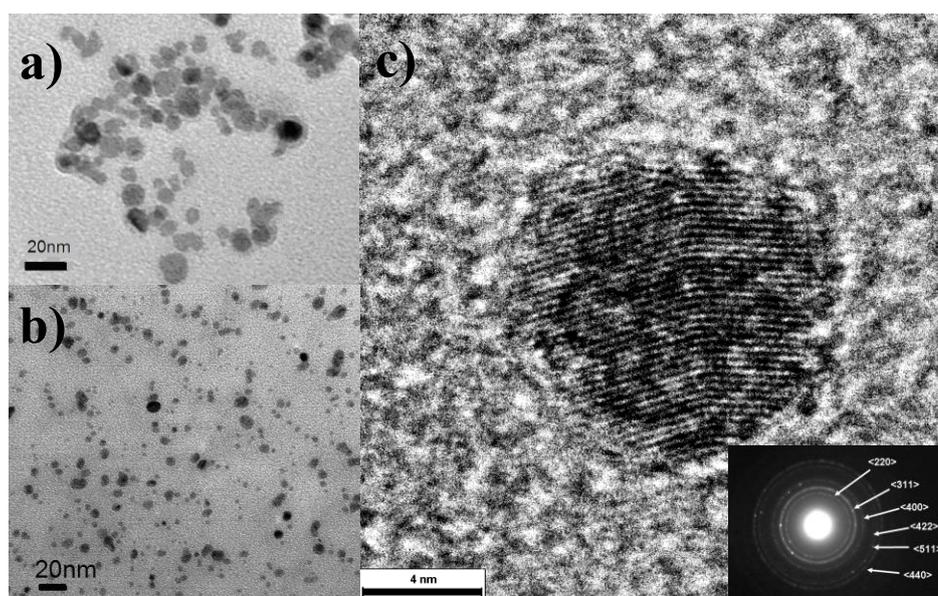


Figura 3.6: Imágenes de TEM de: (a) NPMs sin recubrir, correspondientes al coloide  $Fe_3O_4(60d)$ , en (b) partículas recubiertas con  $AC-Fe_3O_4(60d)$  y en (c) una partícula aislada del coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$  junto a su patrón de difracción de electrones.

Por otro lado se observa que las NPMs del coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$ , son más uniformes en tamaño, y forman estructuras tipo cadenas, debido a las interacciones dipolares entre ellas. Los diámetros promedio  $d_{TEM}$  son de  $10.9 \pm 1.8$ , parecidos a los de las NPMs sin recubrir,  $d_{TEM} = 9.9 \pm 2.4$  nm.

En la *Figura 3.7* se muestran los planos cristalinos de partículas correspondientes al coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$ .



*Figura 3.7: partícula aislada del coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$  donde se visualizan los planos cristalinos*

#### **b) Confirmación de la unión del AC a las NPMs:**

Para confirmar la unión del AC a la superficie de las NPMs se realizaron medidas de potencial-Zeta, medidas de Termogravimetría (TGA) y Análisis Térmico Diferencial (DTA).

Se determinó el TG y el DTA de la sal monohidratada del AC y de las NPMs recubiertas con AC correspondientes al coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$ , a fin de comparar los picos del DTA y las pérdidas de masa del TG de ambas muestras.

En la *Figura 3.8 3.8(a)*, se muestra la corrida del DTA del AC puro. En ella se observa un pico endotérmico estrecho centrado en  $157^\circ\text{C}$ , el cual no se encuentra asociado a una pérdida de masa en el TG. Este pico coincide con la temperatura de fusión del  $AC^{115}$  con una entalpía de fusión de  $\Delta H_{fus} = -0.14\text{KJ/g}$ . Por otro lado en  $217^\circ\text{C}$  se observa otro pico endotérmico ancho el cual está acompañado con una abrupta pérdida de masa en un solo paso de alrededor de  $87.5\%$ . Este pico fue asignado a la descomposición del  $AC^{115}$  con una entalpía de  $\Delta H_{des} = -0.55\text{KJ/g}$ . Es conocido que el AC se descompone antes de llegar a su punto de ebullición a presión atmosférica.

En la *Figura 3.8 3.8(b)* se muestra, el análisis térmico de las NPMs del coloide  $AC-Fe_3O_4(60d)$  donde no se observa el pico correspondiente a la fusión del AC indicando que no hay presente AC sólido precipitado en exceso, por otro lado se observa un pico exotérmico centrado alrededor de los  $200^\circ\text{C}$  y coincidentemente con este pico, se observa en el TG, una pérdida de masa en 2 pasos (la primera cercana a  $175^\circ\text{C}$  y la otra a  $222^\circ\text{C}$ ) del  $7.3\%$  y  $2.5\%$  respectivamente. Esta pérdida de masa se la atribuyó a la desorción de las moléculas AC de la superficie de la NPM y su descomposición, sin embargo en el DTA el pico endotérmico, asociado a la descomposición del AC queda enmascarado por el pico exotérmico correspondiente a la oxidación de la magnetita.

La pérdida de masa en dos pasos indica que el AC recubre a la superficie de las NPMs en forma de doble capa, la primera unida químicamente a la superficie de la misma y la segunda unida a la primera a través de puente de hidrogeno. La segunda al encontrarse mas débilmente unida se desorve a menor temperatura. De esté análisis conjunto de las medidas DTA y TG se confirma la unión del AC a las NPMs.

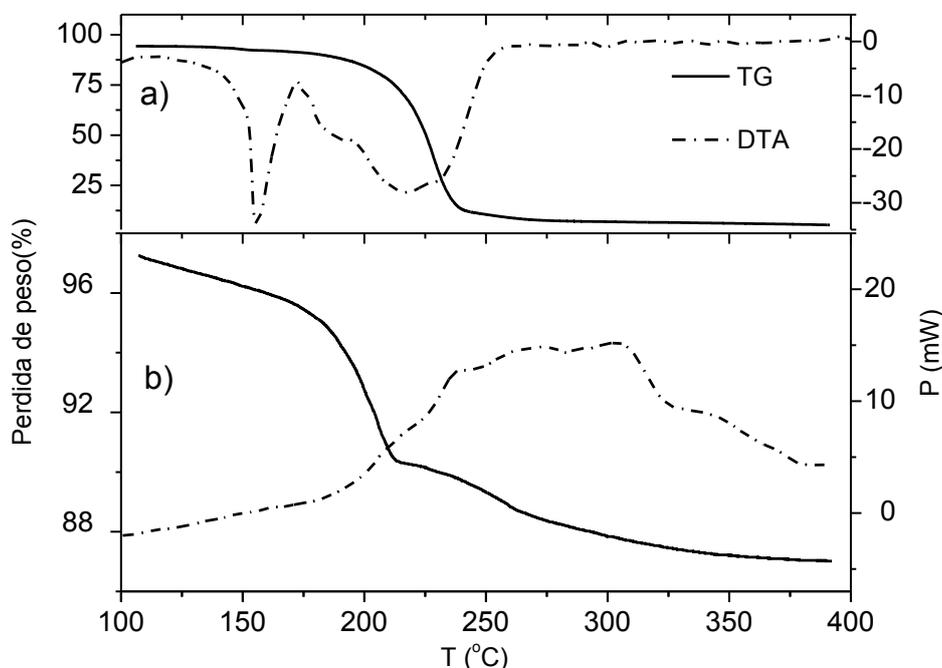


Figura 3.8: Se muestra el gráfico TG y DTA del AC en (a) y de las NPMs correspondientes al coloide AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (60d) en la parte (b).

### 3.2.2. Caracterización de las suspensiones coloidales.

#### a) Concentración por titulación de oxidación-reducción (redox)

Se determinación el contenido de Fe por titulación de oxidación-reducción (redox). La determinación volumétrica de Fe se realizó en cuatro pasos<sup>116</sup>: Disolución de la muestra de Fe, reducción cuantitativa del Fe<sup>+3</sup> a Fe<sup>+2</sup> con un reductor adecuado, seguida de la eliminación del exceso del agente reductor, adición de reactivos especiales y por último la valoración de la solución de Fe<sup>+2</sup> con solución patrón de dicromato de potasio K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>. Todas las valoraciones se realizaron por triplicado.

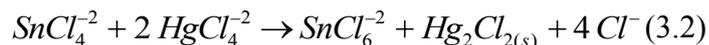
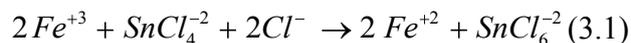
#### Disolución de la muestra:

Los pasos a seguir para disolver, se deben elegir en base a las características de las muestras que se va a tratar.

Los minerales de hierro importantes, entre ellos la magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), se disuelven bien en ácido clorhídrico llevado a ebullición, para lo cual se utilizó HCl concentrado y una vez disueltas, la solución se torno de color amarillo intenso, debido a la presencia de Fe<sup>+3</sup>.

### Reducción del $Fe^{+3}$ a $Fe^{+2}$ :

La valoración final con el dicromato de potasio, requiere que todo el  $Fe$  este como  $Fe^{+2}$ , por ello todo el  $Fe^{+3}$  formado en la disolución previa debe ser reducido a  $Fe^{+2}$  antes de comenzar la valoración. Un método simple para reducir el  $Fe^{+3}$  es la adición de cloruro estagnoso ( $SnCl_2$ ) en exceso a la solución caliente de la muestra de  $Fe$  en  $HCl$ , seguida de la eliminación del exceso de  $Sn^{+2}$  con cloruro mercurioso ( $Hg_2Cl_2$ ). Las series de reacciones son las siguientes (3.1) y (3.2) :



En la cual si se formara mercurio elemental, en estado coloidal finamente dividido y este podría llegar a reaccionar con el agente valorante, echando a perder la determinación de  $Fe$ , sin embargo el cloruro mercurioso sólido o calomel no interfiere en el éxito de la valoración.

El  $Fe^{+3}$  disuelto en  $HCl$  presenta coloración amarilla debida a la formación de complejos tipo  $FeCl_4(H_2O)^{-}$  en la solución, con el agregado de  $Sn^{+2}$  a la solución aseguramos la reducción del  $Fe^{+3}$  lo cual se infiere a través de la desaparición del color amarillo, luego se agregan una o dos gotas mas para asegurar un ligero exceso para asegurar la reducción. Si se sigue el proceso adecuadamente aparece un precipitado blanco, que se debe a la formación de cloruro mercurioso ( $Hg_2Cl_{2(s)}$ ) como se muestra en la reacción. Si la cantidad de  $Sn^{+2}$  usada en el primer paso es demasiado grande la segunda reacción sería remplazada por:

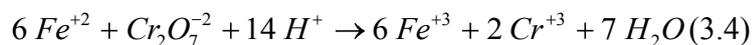


En este caso se observaría un precipitado grisáceo o incluso negro indicando la presencia de  $Hg_{(s)}$  libre, si ocurre esta situación se debe desechar la muestra.

En algunas valoraciones de oxidación-reducción es necesario agregar ciertos reactivos especiales para evitar la reacción espuria del oxidante con otras especies diferentes que con la sustancia deseada y para tener la seguridad de que la reacción deseada transcurra cuantitativamente o que el cambio de color del indicador en el punto final coincida con el punto de equivalencia teórico. En nuestro caso, utilizamos solución sulfofosfórica ya que proporciona el medio que necesita el indicador redox en la valoración.

Por último se realizó la valoración del  $Fe^{+2}$  con  $Cr_2O_7^{-2}$  como agente valorante utilizando una bureta de 25 ml, este paso debe efectuarse inmediatamente después de la reducción del  $Fe^{+3}$  porque sino parte del  $Fe^{+2}$  se puede volver a oxidar nuevamente por el oxígeno atmosférico. Como indicador de esta valoración Redox se utilizó, el ácido difenilaminosulfónico (ADAS).

La reacción de valoración se muestra en la ecuación (3.4)



Para calcular la concentración de  $Fe$  en la suspensión coloidal expresada en mg de  $Fe_3O_4$  por ml de solución se utilizó la expresión (3.5)

$$Fe_{mg/ml} = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} M_{K_2Cr_2O_7} PM_{Fe_3O_4}}{V_{muestra} \times 3} \quad (3.5)$$

Los valores de las concentraciones de las diferentes suspensiones coloidales son mostrados en la *Tabla 3.3*. La propagación de errores indica en las condiciones experimentales utilizadas una precisión en la determinación del 2 %.

Muestra	[x] (mgFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ml)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (60dx)	12.0
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (60d)	4.9
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (80d)	7.7
AC- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (60d)	9.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (40f)	17.4
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (60f)	7.2
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (80f)	6.4

Tabla 3.3: Concentraciones para las suspensiones coloidales, en unidades de mg de magnetita por ml de suspensiones coloidales determinadas por dicromatometría.

### b) Eficiencia de adsorción del AC a la superficie de las NPMs en función del pH

Para optimizar la estabilidad de las NPMs en el coloide se estudió la eficiencia de recubrimiento de AC a la superficie de las mismas, para diferentes valores de pH<sub>ads</sub>. Para lo cual se sintetizaron seis coloides AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, utilizando NH<sub>4</sub>OH como agente precipitante eligiendo un valor de pH<sub>ads</sub> determinado, a estos coloides se los denominó AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i)<sub>T</sub>, donde i es igual al valor pH<sub>ad</sub> elegido para la síntesis de cada coloide.

Luego se expuso durante 10 min cada uno de estos coloides al campo generado por un imán permanente de NdFeB de 0.1 T en su superficie. De esta manera se los separo en dos fracciones, de un lado el sobrenadante al que se los rotulo como AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i) y por el otro el precipitado que fue recogido y resuspendido en agua bidestilada, a esta suspensión coloidal se la denominó CP<sub>i</sub>. Se determinaron las concentraciones de los coloides, AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i)<sub>T</sub>, y de los AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i) y se definió el cociente de las concentraciones *f* entre ellos como:

$$f = \frac{AC- Fe_3O_4(i)}{AC- Fe_3O_4(i)_T}, \quad (3.6)$$

Este cociente *f*, fue utilizado como indicador de la eficiencia de adsorción del AC a la superficie de las NPM, o dicho de otra manera como parámetro de medida de estabilidad del coloide, ya que si la concentración de AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i), es similar a la del AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i)<sub>T</sub>, estaría indicando que las NPMs están mejor estabilizadas electrostáticamente y así son menos atraídas por el imán. Los coeficientes *f* para los diferentes coloides sintetizados se muestran en la *Tabla 3.4 3.4*

Muestra	pH <sub>ads</sub>	AC- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (i) <sub>T</sub> (mgFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ml)	AC- Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (i) (mgFe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /ml)	<i>f</i>
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (4.58)	4.58	15.1	14.8	0.98
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (4.91)	4.91	11.8	10.3	0.87
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (5.50)	5.50	21.2	18	0.85
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (6.25)	6.25	18.8	12.5	0.66
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (6.88)	6.88	13.2	5.6	0.42
AC - Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (7.08)	7.08	26.6	7.5	0.28

Tabla 3.4: Determinación del factor de eficiencia de adsorción del AC a la superficie de las NPMs (*f*) para las *d* muestras sintetizadas para realizar el estudio de eficiencia de adsorción del AC respecto al pH de adsorción (pH<sub>ads</sub>).

Al ser el AC, un ácido poliprótico de la forma (AH<sub>3</sub>) se puede encontrar con diferente grado de disociación AH<sub>2</sub><sup>-</sup>, AH<sup>-2</sup> y A<sup>-3</sup> dependiendo del pH del medio. Las fracciones molares de las especies químicas, denominadas X<sub>y</sub> (y = AH<sub>3</sub>, AH<sub>2</sub><sup>-</sup>, AH<sup>-2</sup> y A<sup>-3</sup>) en función del pH fueron calculadas utilizando las constantes ácidas de disociación pK<sub>a1</sub> = 3.13, pK<sub>a2</sub> = 4.76, y pK<sub>a3</sub> = 6.40. Se muestra en la Figura 3.9 los valores de *f* y X<sub>y</sub> en función del pH, con el objetivo de inferir que especie química se encuentra de manera predominante, en el momento en el que se adsorbe el AC a la superficie de las NPMs, para cada valor de pH<sub>ads</sub> elegido.

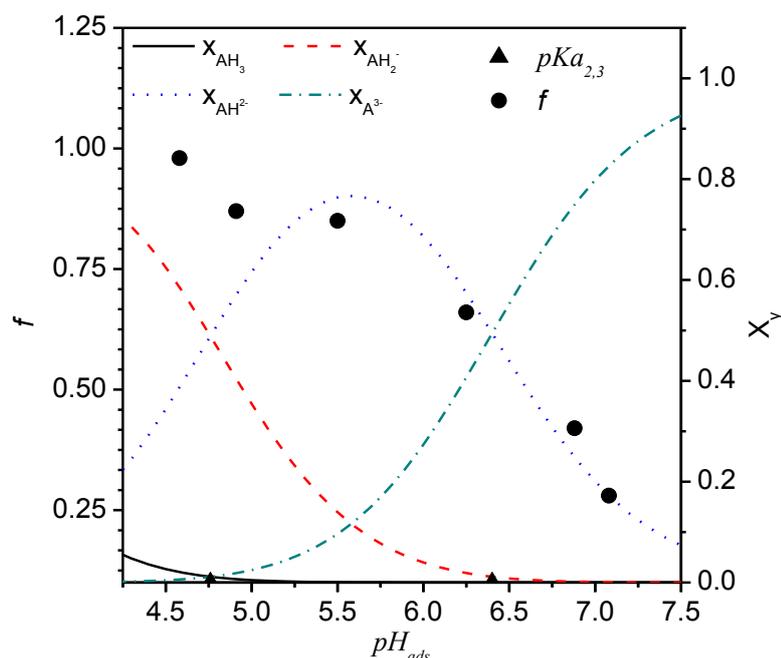
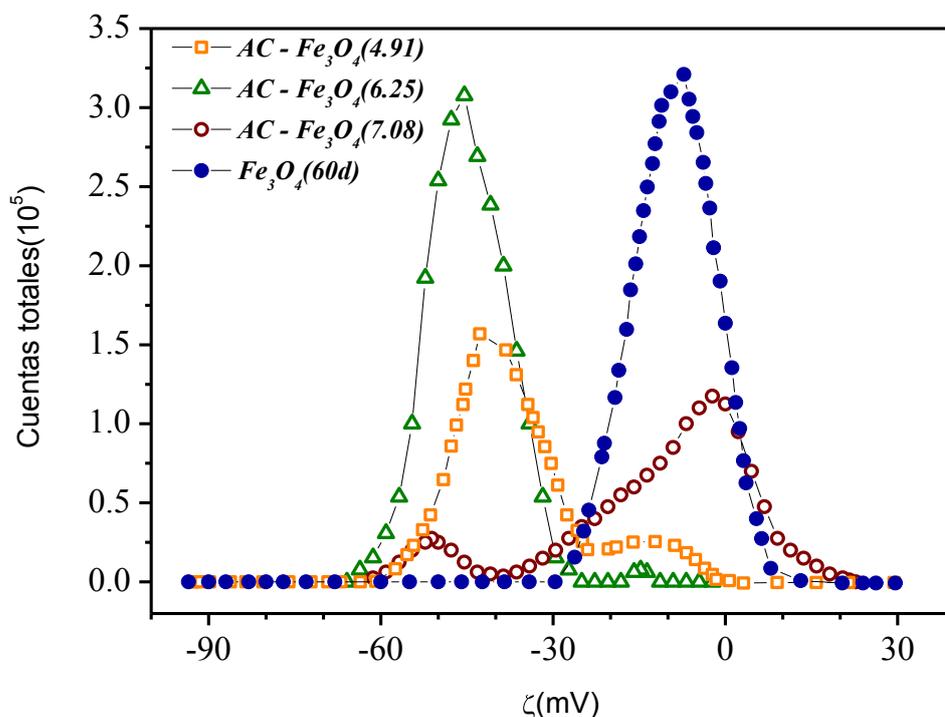


Figura 3.9: Los puntos negros indican los valores *f* para los diferentes pH de adsorción, los triángulos sobre el eje x indican los valores de las constantes ácidas (pKa) del AC y las líneas punteadas indican las fracciones molares (X<sub>y</sub>), calculadas teóricamente, de las diferentes especies del AC para los diferentes pH.

Se infiere de esta curva que el máximo valor de *f* se obtiene para un valor de pH<sub>ads</sub> = 4.58, este valor de pH se corresponde con un valor de X<sub>AH<sub>2</sub><sup>-</sup></sub> de 0.6, lo que indica que el 60 % de

las moléculas de AC se encuentran de la forma  $AH_2^-$  y el 40 % restante de la forma  $AH^-$ , este resultado sugiere que la mayor cantidad de AC se liga a la NPM por un carboxilo, mientras que los otros dos carboxilos se encuentran protonados en el momento de la unión, a medida que el  $pH_{ads}$  se incrementa la eficiencia disminuye consistentemente con la disminución de  $AH^-$  y  $AH_2^-$  para valores de pH superiores a 5.5. No se trabajó para valores de  $pH_{ads}$  más chicos que 4, ya que empieza a ser importante la disolución de la magnetita.<sup>117</sup>

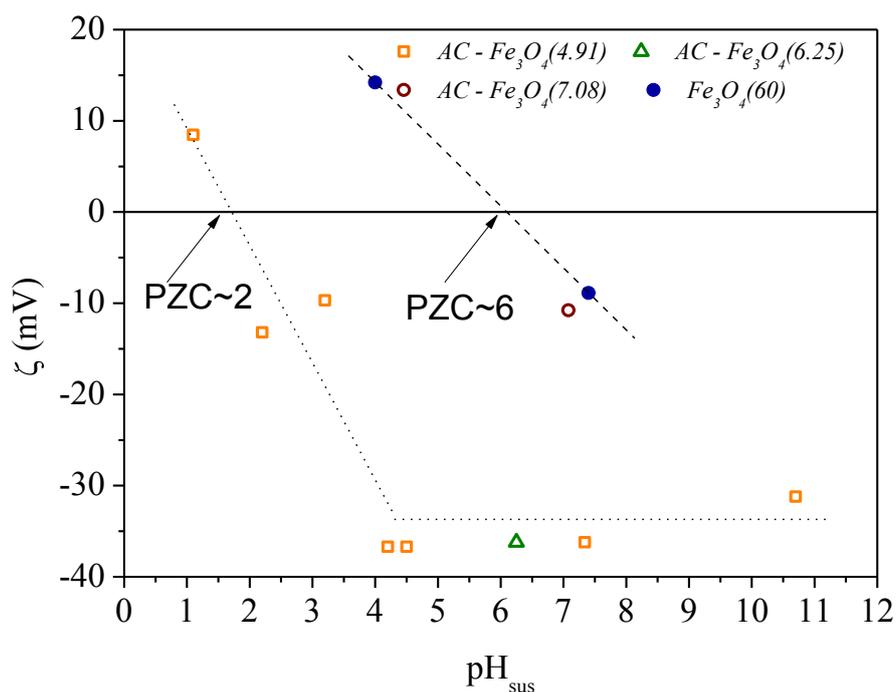
En la *Figura 3.10* se muestran la distribución de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) para las NPMs recubiertas con AC, medidas a pH cercano a la neutralidad, y para NPMs sin recubrir. Las suspensiones coloidales estables que se muestran son  $AC-Fe_3O_4(4.91)$ ,  $AC-Fe_3O_4(6.25)$ ,  $AC-Fe_3O_4(7.08)$  y  $Fe_3O_4(60d)$ . En este gráfico se observó que para los coloides de NPMs recubiertas aparece un pico centrado en valores de  $\zeta(mV) \sim -45mV$ , el cual no se encontró en la suspensión de NPMs sin recubrir, este pico indica que las NPMs adquirieron alta densidad de carga superficial negativa a unirse al AC



*Figura 3.10: distribución de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) para las NPMs de los coloides  $AC-Fe_3O_4(4.91)$ ,  $AC-Fe_3O_4(6.25)$ ,  $AC-Fe_3O_4(7.08)$  medidos a pH cercano a la neutralidad.*

Por otro lado se midieron el valor de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) como función del pH, las curvas se muestran en la *Figura 3.11*, de donde se observa que para la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4(4.91)$  el punto isoeléctrico (IEP) se encuentra cercano a un valor de pH de 2, mientras que para los coloides de las NPMs sin recubrir se encuentra para un valor de IEP  $\sim 6$ , este resultado confirma la unión del AC a las NPMs. Por otro lado se ve que para los coloides de NPMs recubiertas el valor de  $\zeta \sim -36 mV$ , para valores de  $pH_{sus} > 4$ , está alta densidad de carga negativa detectada para las NPM proviene de la disociación de los grupos carboxilos del AC que no se utilizaron para la adsorción.

Por otro lado se midieron el valor de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) como función del pH, las curvas se muestran en la *Figura 3.11*, donde se observa que para la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4(4.91)$  el potencial de carga cero (PZC) o el punto isoeléctrico (IEP) se encuentra a un valor de  $pH \sim 2$ , mientras que para los coloides de las NPMs sin recubrir se encuentra para un valor de  $PZC \sim 6$ , este resultado confirma la unión del AC a las NPMs y por otro lado se ve que para los coloides de NPMs recubiertas el valor de  $\zeta \sim -36$  mV, para valores de  $pH > 4$ , esta alta densidad de carga negativa detectada para las NPM proviene de la disociación de los grupos carboxilos del AC que no se utilizaron para la adsorción.



*Figura 3.11: Potencial Zeta ( $\zeta$ ) para diferentes valores de  $pH_{sus}$ . Las líneas punteadas se muestran como guía visual para inferir el valor de PZC.*

De los estudios realizados sobre los coloides sintetizados en función del  $pH_{ads}$ , se infiere que la mayor estabilidad del coloide se consigue cuando la mayor cantidad de moléculas de AC se unen a través de un carboxilo, dejando los otros dos libres los cuales se desprotonan para un valor de  $pH$  mayor que  $pK_{a3} = 6.40$ , confiriéndole alta estabilización electrostática y estérica a las NPMs en el coloide.

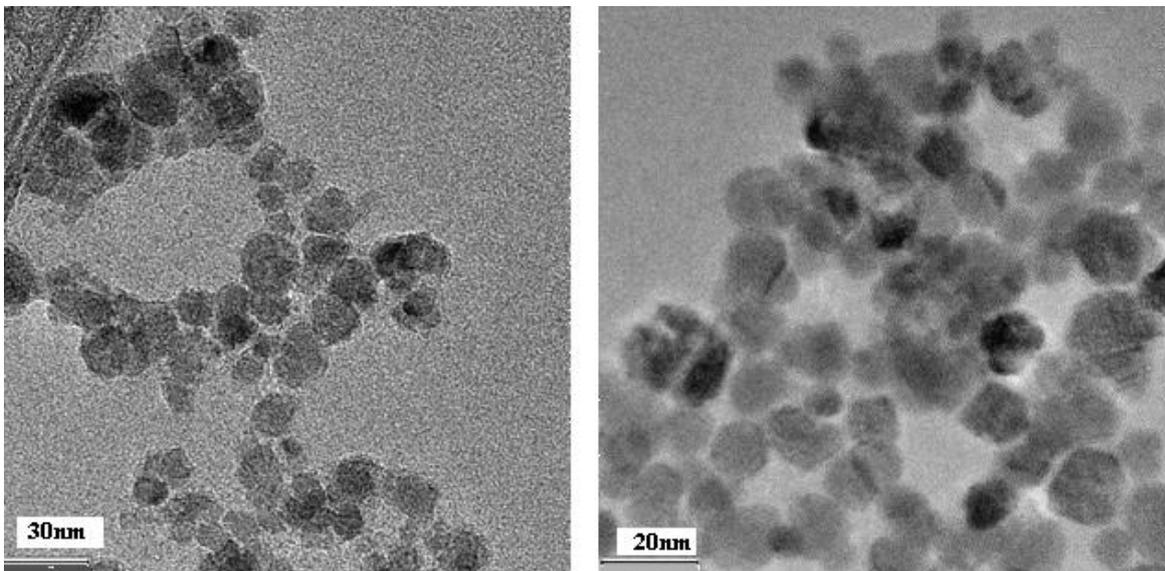
Como ya habíamos mencionado anteriormente a  $pH$  de suspensión neutros o cercanos a la neutralidad la carga superficial de la magnetita desnuda es casi nula, pero si la NPMs adsorbieron AC la carga es altamente negativa para  $pH$  neutros. Nuestros resultados difieren de otros trabajos previos<sup>118</sup> donde se observó que la mayor adsorción se consiguió cuando el  $pH$  de adsorción fue de 5.2, donde la mayor cantidad de AC está de la forma  $AH^{-2}$ , sin embargo ambos trabajos coinciden en que la mayor carga superficial se consigue cuando el  $pH$  es mayor al  $pK_{a3}$  donde los 3 grupos carboxilos se encuentran disociados. En un trabajo reciente<sup>119</sup> el mayor valor de potencial Z de -25.6mV, se obtuvo a  $pH = 6$  donde las NPMs fueron recubiertas con AC para optimizarlas para unirle una droga. Este menor valor de potencial Z podría deberse a que el tiempo de adsorción fue de 30 min, por lo

tanto menor que el nuestro.

Se realizó las medidas TEM para las NPMs de los coloides del tipo AC-  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (i) y CP(i). Los diámetros medidos se muestran en la *Tabla 3.5*. En la *Figura 3.12* se muestra la imagen TEM de las NPMs correspondientes al coloides AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (6.25) y del lado izquierdo las NPMs del coloide CP (6.25). De estos resultados se infiere que no hay una diferencia de tamaño significativa, entre las NPMs de los coloides AC-  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (i), con respecto a las NPMs correspondientes a los CP(i).

Muestra	$d_{TEM}$ (nm)
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (4.58)	9.5±1.6
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (4.91)	8.2±2.4
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (5.50)	9.3±1.7
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (6.25)	11.9±3.5
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (6.88)	9.4±2.0
AC - $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (7.08)	10.9±1.8
CP (6.25)	12.9±2.2
CP (7.08)	11.34±1.8

*Tabla 3.5:* Se indican los valores de diámetros TEM de las NPMs de los coloides AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ (i) y CP(i).



*Figura 3.12:* Se observan del lado derecho de la Imagen TEM de las NPMs correspondientes al coloides AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (6.25) y del lado izquierdo las NPMs del coloide CP(6.25).

### 3.2.3. Caracterización magnética

Se realizó la caracterización magnética de cada uno de los coloides sintetizados durante la tesis. Como técnicas experimentales se utilizaron el VSM, para determinar  $M(H)$  a temperatura ambiente. Por otro lado se utilizó el SQUID, para medir  $M(H)$  a diferentes

temperaturas, y  $M(T)$  con un campo  $H$  aplicado constante, en rampas de temperatura siguiendo protocolos ZFC/FC. Las magnetizaciones registradas siguiendo estos protocolos se denominan  $M_{ZFC}(T)$  y  $M_{FC}(T)$ .

Las muestras están constituidas por un conjunto de partículas monodominio de volumen  $V$  y momento magnético  $\mu = M \rho V$  (donde  $M$  es la magnetización másica de la muestra y  $\rho$  es la densidad de la magnetita). La anisotropía se supone uniaxial y los ejes fáciles de las partículas distribuidos al azar. Esto último está fundamentado en el hecho de que las partículas en suspensión están en continuo movimiento rotacional.

La energía que adquiere cada una de estas partículas cuando se las expone a un campo magnético  $H$ , proviene de tres contribuciones principalmente, la primera es la energía de anisotropía la cual está definida como  $K_{eff} V \sin^2 \theta$ , donde  $\theta$  es el ángulo determinado entre el momento magnético  $\mu$  y el eje de fácil magnetización. La segunda contribución proviene de la interacción entre el momento magnético  $\mu$  y el campo  $H$ . Esta es la energía Zeeman. Por último el tercer término es la energía de interacción dipolar entre las partículas  $E_{dip}$ .

Por lo tanto la energía de una partícula sometida a un campo magnético  $H$  viene dada por (3.7): siendo esta la ecuación (1.11) con un término de interacción dipolar  $E_{dip}$ :

$$E_A = K_{eff} V \sin^2 \theta - \mu H \cos(\alpha - \theta) + E_{dip} \quad (3.7)$$

En esta expresión  $\alpha$  es el ángulo entre  $H$  y el eje fácil. Las contribuciones ubicadas en primer y tercer lugar dominan para valores de  $H$  bajos y pueden ser estudiadas a través de los protocolos ZFC/FC.

En la parte *a*) de la *Figura 3.13 3.13*, se muestran las curvas  $M_{ZFC}(T)$  y  $M_{FC}(T)$  para una suspensión coloidal, de NPMs de magnetita recubiertas con AC pertenecientes al coloide AC-  $Fe_3O_4(4.91)$ . La temperatura de bloqueo es  $T_{Bi} = 92$  K y la temperatura de irreversibilidad (donde se bifurcan las curvas ZFC y FC)  $T_i = 140$  K. A partir de  $T_i$  la respuesta magnética es reversible, ello indica que a  $T_i$  desbloquean las partículas más grandes del coloide y el sistema se encuentra en equilibrio ( $\tau < \tau_{exp}$ ).

En la parte *b*) de la *Figura 3.13 3.13* se observan las curvas  $M_{ZFC}(T)$  y  $M_{FC}(T)$  del coloide  $Fe_3O_4(60d)$  constituido por NPMs de magnetita sin recubrir. Para este caso no se observa un máximo y se infiere que la temperatura de bloqueo ( $T_{Bdip}$ ) se encuentra por encima de la temperatura ambiente. Además en la curva  $M_{FC}(T)$ , la  $M$  varía muy poco con la temperatura. Estos comportamientos se dan generalmente cuando el sistema es altamente interactuante. Ello es razonable ya que en este coloide las NPMs al no estar recubiertas, no experimentan repulsión electrostática, pueden agregarse o estar más próximas entre sí e interactuar fuertemente. En la interacción dipolar al campo aplicado se le superpone el campo dipolar ocasionado por las otras NPMs lo que ocasiona la respuesta marcadamente diferente.

El efecto de las interacciones puede incluso observarse en el caso de la muestra con NPMs recubiertas (*a*), aún cuando en el mismo las temperaturas  $T_B$  y  $T_i$  son claramente identificables. En un sistema sin interacciones, para  $T > T_i$ , las  $M_{ZFC}(T)$  y  $M_{FC}(T)$  deberían seguir la ley de Curie proporcional a  $1/T$ . Sin embargo se aparta mostrando una concavidad opuesta a la esperada.

De estos resultados se infiere que al recubrir las NPMs con AC las interacciones dipolares entre las partículas disminuyen fuertemente, aunque el sistema igual se comporta como un superparamagneto interactuante (SPI)<sup>120</sup>.

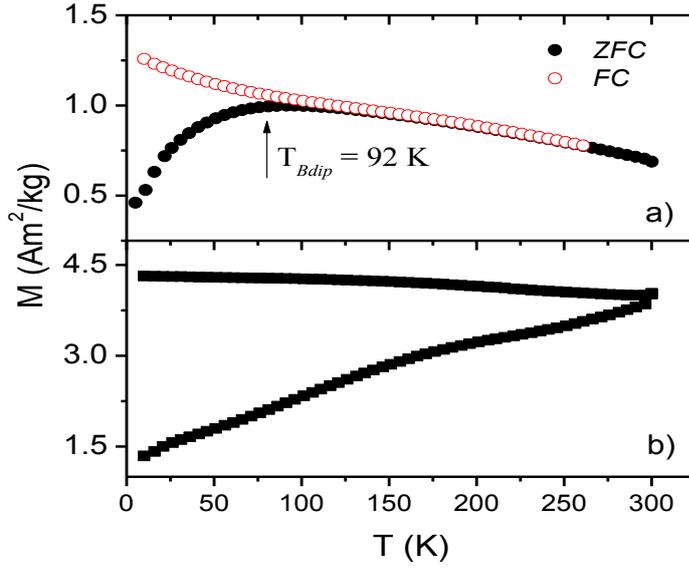


Figura 3.13: Dependencia de la magnetización con la temperatura bajo protocolo ZFC y FC, para AC-  $Fe_3O_4$  (4.91) mostrada en (a) y para  $Fe_3O_4(60d)$  mostrada en (b), a un  $H=100$  Oe y a una velocidad de calentamiento de 2 k/min.

En la Figura 3.14 se muestran las curvas  $M_{ZFC}(T)$  y  $M_{FC}(T)$  para las diferentes suspensiones coloidales AC- $Fe_3O_4(i)$ . A partir de estas curvas se determinaron las temperaturas de bloqueo ( $T_{Bdip}$ ) las cuales se listaron en la Tabla 3.6.

El segundo término de la ecuación de energía (3.7) domina para valores de campos altos. En este caso el comportamiento de  $M$  vs.  $H$  queda determinado principalmente por este término. Como en este caso la barrera de energía de anisotropía  $K_{eff}V$  es mucho menor que la energía de interacción con el campo  $H$  la dependencia de  $M$  con  $H$  puede describirse mediante la función de Langevin. Sin embargo, a campos bajos, esta descripción puede no ser satisfactoria. No obstante, como se anticipó en la sección 1.2.1, cuando la orientación de los ejes fáciles está aleatoriamente distribuida la función de Langevin dada por la ecuación (1.19) continúa siendo una buena aproximación aún a campos bajos.

$$M(H, T) = N \int_0^\infty \mu L\left(\frac{\mu_0 \mu H}{k_B T}\right) f(\mu) d\mu + \chi_a H$$

La magnetización de saturación másica está dada por  $M_s = N \langle \mu \rangle = N \int_0^\infty \mu f(\mu) d\mu$ .

Los ciclos de histéresis (algunas de estas curvas se muestran en la Figura 3.16) son bien ajustados utilizando la ecuación (1.19). De estos ajustes se determinaron las magnitudes del momento magnético medio  $\langle \mu \rangle$  y de la susceptibilidad a campos altos  $\chi_a$  y se observó que para todos los coloides  $\langle \mu \rangle \sim 1.5 \times 10^4 \mu_B$  por partícula y  $\chi_a \sim 10^{-7} \text{ m}^3/\text{Kg}$ .

De los ciclos  $M(H)$  a diferentes temperaturas, se determinó la evolución del momento magnético medio  $\langle \mu \rangle$  con la temperatura y se observó un comportamiento inesperado como se muestra en la Figura 3.15. El aumento de  $\langle \mu \rangle$  con la temperatura es un

resultado incorrecto desde el punto de vista físico. Se ha reportado que, en presencia de interacciones dipolares, los valores de  $\langle \mu \rangle$  obtenidos mediante (1.19) son valores aparentes.

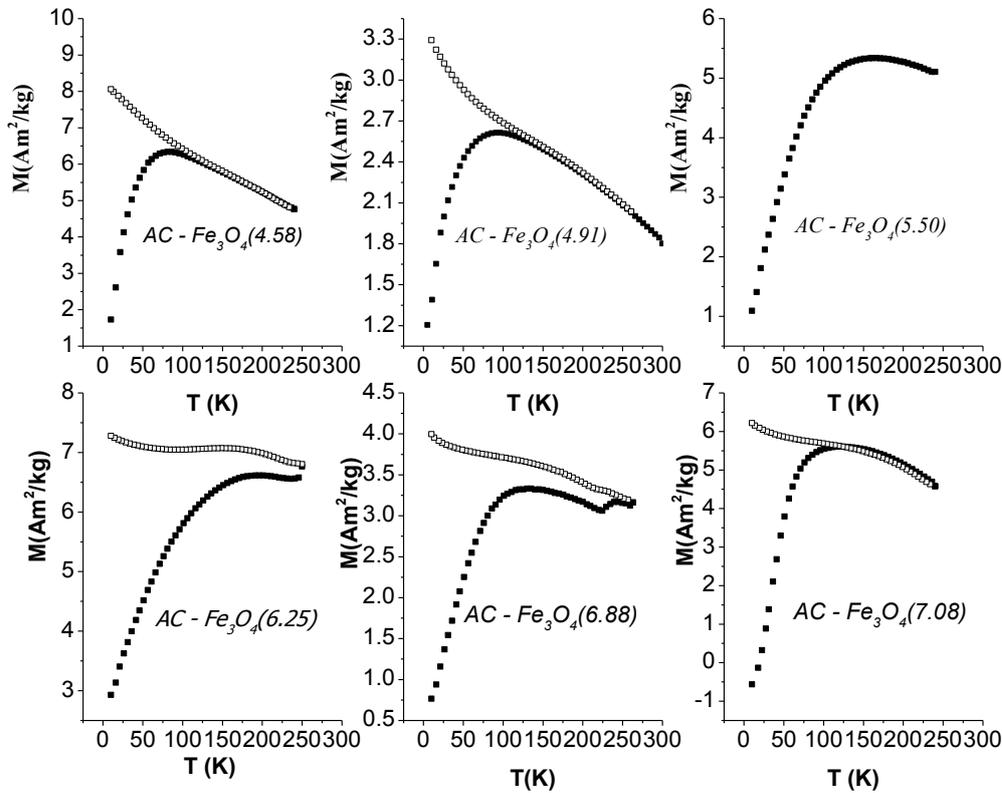


Figura 3.14: Dependencia de la magnetización con la temperatura bajo protocolo ZFC y FC, para  $AC - Fe_3O_4(i)$  a un  $H_{FC}=100$  y a una velocidad de calentamiento de 2 k/min.

Muestra	$T_{Bi}$ (K)
$AC - Fe_3O_4(4.58)$	81
$AC - Fe_3O_4(4.91)$	92
$AC - Fe_3O_4(5.50)$	166
$AC - Fe_3O_4(6.25)$	196
$AC - Fe_3O_4(6.88)$	132
$AC - Fe_3O_4(7.08)$	126

Tabla 3.6: Se muestran las  $T_{Bi}$  para los coloides  $AC - Fe_3O_4(i)$

Para este régimen llamado superparamagnetismo interactuante (ISP) se han propuesto métodos de análisis tendientes a recuperar los valores verdaderos de  $\langle \mu \rangle$ <sup>120</sup>. Es importante destacar que el efecto mencionado se vuelve despreciable a temperaturas suficientemente

altas, en general próximas o superiores a temperatura ambiente. Por este motivo consideramos válidos los valores de  $\langle \mu \rangle$  obtenidos a temperatura ambiente.

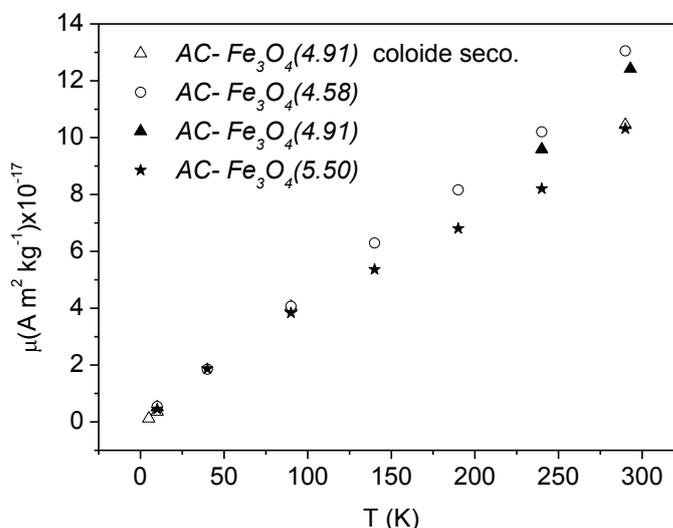


Figura 3.15: Se gráfica el momento magnético aparente medio para los coloides AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i) en función de la temperatura.

En la Figura 3.16 se muestran los ciclos  $M(H)$  para los coloides sintetizados con base débil Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60d) sin recubrir, los recubiertos AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60d) y los CP(i), determinados a temperatura ambiente con el SQUID. Se observa que estos ciclos no presentan histéresis como corresponde a un régimen de equilibrio y que la magnetización de las nanopartículas satura para valores menores que el correspondiente a la magnetita *bulk* ( $M_s^{bulk} = 86 \text{ Am}^2/\text{kg}$ ).

Utilizando  $\mu = M_s^{bulk} \rho V$ , la densidad de la magnetita  $\rho = 5175 \text{ kg/m}^3$  y la magnetización de saturación de la magnetita *bulk* mencionada en el párrafo anterior, se determinó la función distribución lognormal  $f(\mu)$ , y a partir de ésta la de los diámetros magnéticos  $d_m$  de las partículas  $f(d_m)$ .

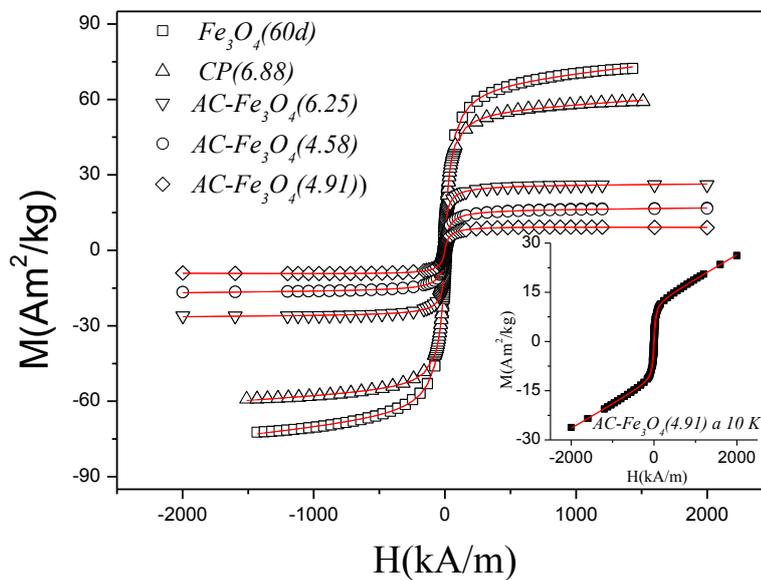
Está  $f(d_m)$  posee un  $d_{LN} = 6 \mu_{LN} / \pi M_s^{bulk} \rho^{1/3}$  y un  $\sigma_{d_m} = w/3$  (considerando a las partículas como esferas). Estas distribuciones se muestran en la Figura 3.17. Los diámetros magnéticos medios  $\langle d_m \rangle$  de las NPMs correspondientes a diferentes coloides se listan en la Tabla 3.7. De los valores de  $M_s$  a temperatura ambiente se infiere que estas partículas poseen una capa con respuesta magnética prácticamente nula. El diámetro total  $d$  de la partícula puede expresarse como el diámetro magnético medio más dos veces el espesor  $\delta/2$  de dicha capa:

$$d = \langle d_m \rangle + \delta \quad (3.8)$$

Suponiendo que la parte magnéticamente ordenada posee la magnetización de saturación de la magnetita en *bulk*  $M_s^{bulk}$ , se infiere que  $\delta$  tiene el valor:

$$\delta = \langle d_m \rangle \left( \left( \frac{M_s^{bulk}}{M_s} \right)^{1/3} - 1 \right) \quad (3.9)$$

Esta capa está formada por los átomos próximos a la superficie, que no poseen la misma coordinación que los del interior, lo cual influye sobre sus propiedades magnéticas. El inset de la *Figura 3.16* sugiere que la susceptibilidad  $\chi_a$  está relacionada con la capa magnéticamente desordenada. Dicho inset ilustra el ciclo a 10K de la muestra  $AC-Fe_3O_4(4.91)$ , donde se ve que la magnetización no satura para valores de campo de hasta 2000 kA/m. Los resultados a temperatura ambiente y 10 K son similares a los que corresponderían a un paramagneto o a un vidrio de espín, materiales en los que la susceptibilidad aumenta notablemente al decrecer la temperatura.



*Figura 3.16: Ciclos de magnetización específica medidos a 290 K en forma de suspensiones coloidales. En el Inset: se muestra la medida del ciclo de  $AC-Fe_3O_4(4.91)$  medido a 10 K. Las líneas muestran los ajustes.*

A partir de estos gráficos de la *Figura 3.17* se determinaron los tamaños medios  $d_m$  de las NPMs, definidos en la ecuación (3.8), para todos los coloides del tipo  $AC-Fe_3O_4(i)$  y  $CP(i)$ . De estos resultados se observó que el tamaño  $d_m$  para los coloides  $AC-Fe_3O_4(4.58)$ ,  $AC-Fe_3O_4(4.91)$  y  $AC-Fe_3O_4(7.08)$  es ligeramente mayor pero consistente con el  $d_{TEM}$  determinado por TEM.

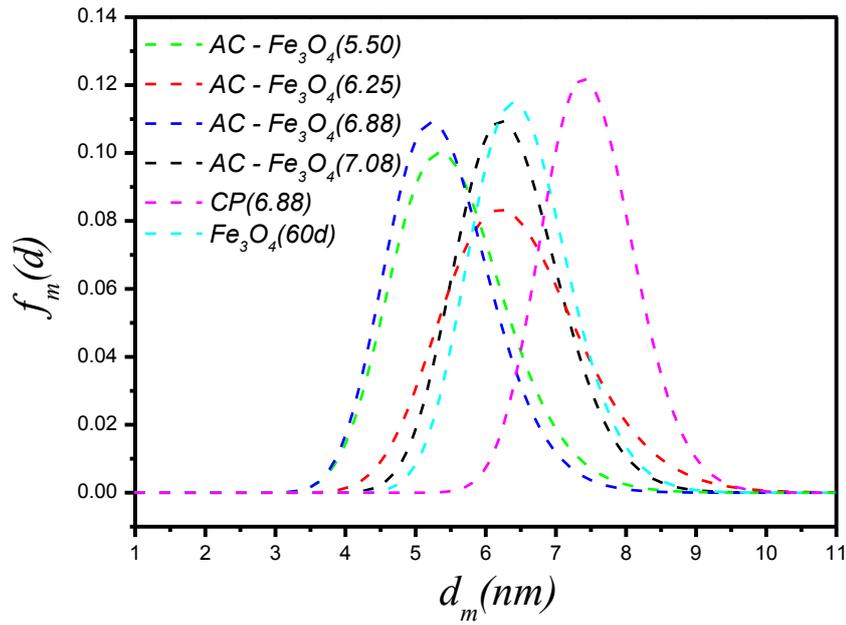


Figura 3.17: Función distribución Log normal de diámetros de magnetita.

Esta discrepancia en los tamaños se puede explicar por el hecho de que si bien TEM es una técnica más directa en comparación con la magnética, el número de partículas determinadas en TEM es mucho menor que en la medida magnética. Por otro lado para las NPMs de los coloides  $AC-Fe_3O_4(5.5)$ ,  $AC-Fe_3O_4(6.25)$  y para  $AC-Fe_3O_4(6.88)$ , los tamaños determinados a través de estas dos técnicas se encuentran en concordancia. Los  $\langle d_m \rangle$ ,  $\delta$ ,  $d_{TEM}$  y  $M_s$  para las diferentes suspensiones coloidales se indican en la Tabla 3.7 3.7

Muestra	$\langle d_m \rangle$ (nm)	$\delta$ nm	$d_{TEM}$ nm	$M_s$ (Am <sup>2</sup> /kg)
$AC-Fe_3O_4(4.58)$	7.1	5.3	9.5±1.6	16.0
$AC-Fe_3O_4(4.91)$	7.0	7.5	8.2±2.4	9.7
$AC-Fe_3O_4(5.50)$	6.0	3.1	9.3±1.7	24.9
$AC-Fe_3O_4(6.25)$	7.1	3.4	11.9±3.5	26.0
$AC-Fe_3O_4(6.88)$	5.8	4.0	9.4±2.0	17.7
$AC-Fe_3O_4(7.08)$	6.7	6.4	6.8±1.9	11.5
$Fe_3O_4(60d)$	6.8	0.6	9.9±2.4	67.1
$CP(6.25)$	7.9	3.2	12.9±2.2	33.6
$CP(6.88)$	7.7	1.2		56.1
$CP(7.08)$	8.4	0.6	11.3±1.8	7.1

Tabla 3.7: Se listan los  $\langle d_m \rangle$ ,  $\delta$ ,  $d_{TEM}$  y  $M_s$  para las diferentes suspensiones coloidales.

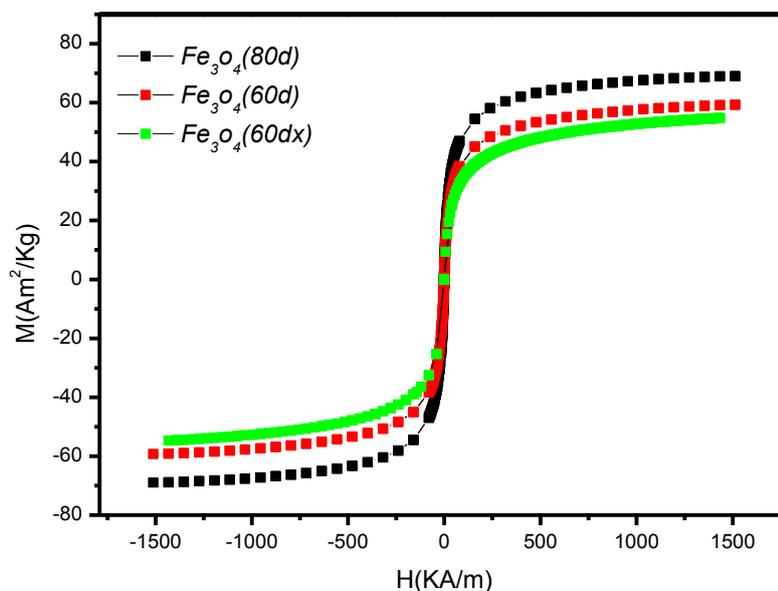
Una partícula cargada que se mueve en un solvente arrastra consigo una capa compuesta por fluido y contraiones conformando así una entidad de tamaño hidrodinámico  $d_H$ . Estos

$d_H$  son de un orden de magnitud más grande que los diámetros de las NPMs obtenidos de TEM y de SQUID. Estos valores se indican en la siguiente *Tabla 3.8*.

Muestra	$d_H$ (nm)
AC- $Fe_3O_4(4.58)$	38.8
AC - $Fe_3O_4(4.91)$	59.8
AC - $Fe_3O_4(5.50)$	42.0
AC - $Fe_3O_4(6.25)$	40.8
AC - $Fe_3O_4(6.88)$	55.8
AC - $Fe_3O_4(7.08)$	53.4

*Tabla 3.8: Se indican los valores de  $d_H$  para cada muestra*

En la *Figura 3.18* se muestran los ciclos  $M(H)$  de los coloides  $Fe_3O_4(60dx)$ ,  $Fe_3O_4(60d)$  y  $Fe_3O_4(80d)$  sintetizados con diferente relación molar ( $r$ ) de  $Fe^{+3}$  y  $Fe^{+2}$  y con diferentes temperaturas, según el protocolo descrito en la sección 3.1.2.



*Figura 3.18: Medidas de magnetización específica en función del  $H$  a una temperatura de 290K. Las medidas se realizaron en un VSM sobre muestras en forma de polvo.*

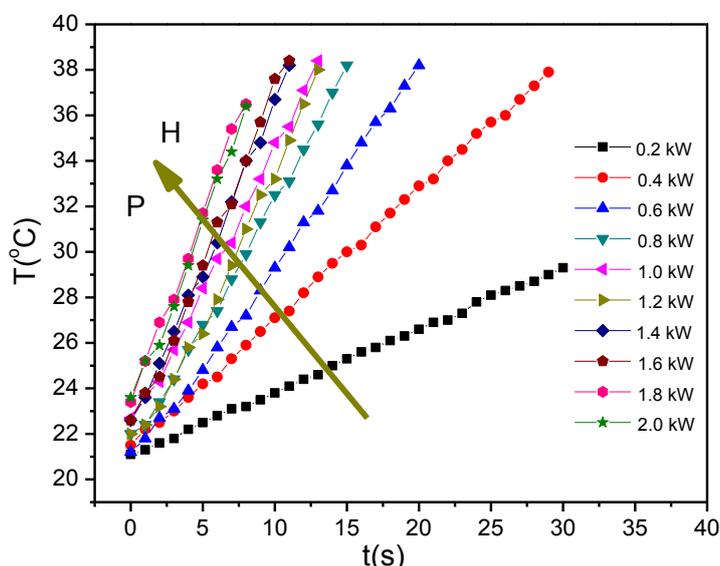
Se puede inferir de los ciclos  $M(H)$  de  $Fe_3O_4(60dx)$  y  $Fe_3O_4(60d)$ , mostrados en la *Figura 3.18* que la  $M_s$  es mayor para los coloides sintetizados bajo una relación molar de  $r=2$  respecto a los sintetizados bajo una  $r=1.2$ . Por otro lado se observó de la comparación de los ciclos de  $Fe_3O_4(60d)$  y  $Fe_3O_4(80d)$  que la muestra sintetizada a 80 °C posee una  $M_s$  mayor que la sintetizada a 60 °C. Todas estas curvas se ajustaron utilizando la función de Langevin según la ecuación (1.19).

### 3.2.4. Respuesta a campo de radiofrecuencia:

Para determinar el SAR de las suspensiones coloidales  $Fe_3O_4(40f)$ ,  $Fe_3O_4(60f)$  y  $Fe_3O_4(80f)$  se sometieron a sucesivos calentamientos con radiofrecuencia como se detalla en la sección 2.2.2, a una la frecuencia de 267 kHz y variando la potencia de la fuente del equipo de RF desde 0.2 kW hasta 2 kW, en pasos de 0.2 kW. Esta potencia es directamente proporcional al cuadrado de la amplitud de la corriente  $I$  que circula por la bobina, y por lo tanto también es directamente proporcional al cuadrado de la amplitud del campo generado por la misma. Cabe señalar que el generador de RF permite variar  $H$  tanto controlandola potencia como la corriente que circula por la bobina. En los experimentos que se presentan a continuación se emplearon ambas modalidades.

En la *Figura 3.19* se muestran los gráficos de  $T(t)$  de la suspensión coloidal  $Fe_3O_4(60f)$  para los diferentes valores de potencia. Se observa que a partir de un valor de de 1.2 kW  $dT/dt$  deja de comportarse linealmente con la potencia. Esto define la región de validez de la teoría de respuesta lineal, por lo tanto se calcula el valor del parámetro SAR, utilizando un ajuste lineal para valores de potencia menores a 1.2 kW, como se muestra del lado derecho de la *Figura 3.20*.

En esta tesis se calcularon los parámetros SAR correspondientes a una frecuencia  $f= 267$  kHz y una potencia de 1kW. Mediante una calibración se determinó que en las condiciones en las que se realizaron estas medidas  $P = 1kW$  corresponden a amplitudes de corriente y de campo de  $I = 10.3$  A y  $H_0 = 41$  kA/m.



*Figura 3.19:* Se muestran las medidas  $T(t)$  de la suspensión coloidal  $Fe_3O_4(60f)$  para cada valor de potencia

El valor SAR de las suspensiones  $Fe_3O_4(40f)$ ,  $Fe_3O_4(60f)$  y  $Fe_3O_4(80f)$  se determinó midiendo  $T(t)$  para varias diluciones de cada coloide. Para ello, se los sometió a un campo de radiofrecuencia de potencia y frecuencia constantes, en este caso  $f= 267$  kHz y  $P = 1kW$ . Luego se ajustó la pendiente inicial  $dT/dt$  para cada dilución y se la graficó en función de la concentración  $[x]$  ( $mgFe_3O_4/ml$ ), como se muestra en la *Figura 3.21*.

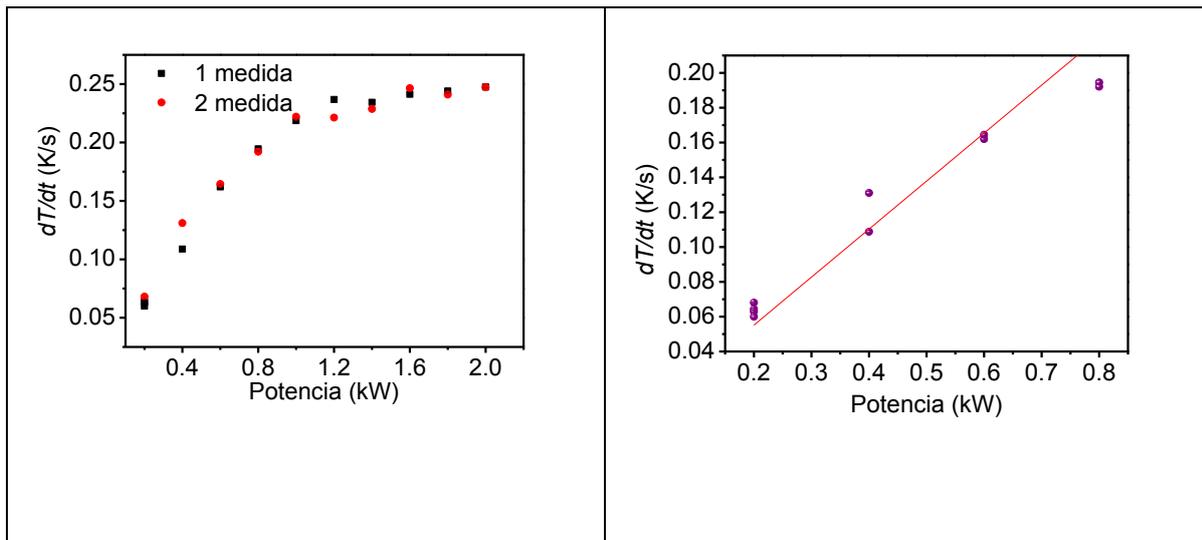


Figura 3.20: Se represente el valor de las pendientes ( $dT/dt$ ) en función de la potencia aplicada para la suspensión coloidal  $Fe_3O_4(60f)$ . Esta medida fue realizada por duplicado. El gráfico de la derecha muestra con más detalle el intervalo de potencia en el cual la relación entre  $dT/dt$  y la potencia es aproximadamente lineal.

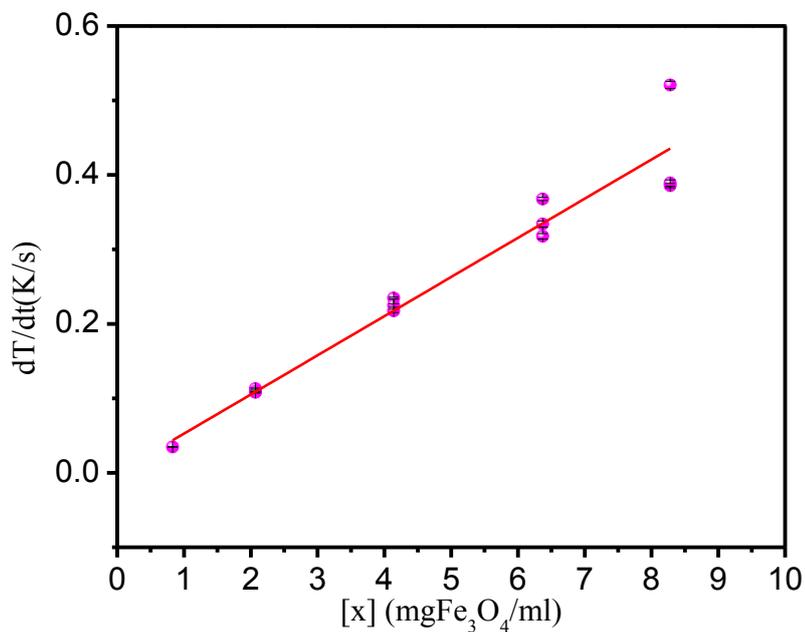


Figura 3.21: Se represente el valor de las pendientes ( $dT/dt$ ) determinadas a 1 kW y 267 kHz para el colide  $Fe_3O_4(60f)$  en función de la concentración  $[x]$  ( $mgFe_3O_4/ml$ ).

La comparación de los valores del parámetro SAR obtenidos barriendo la potencia (para una concentración fija) con los obtenidos barriendo la concentración (a una potencia dada), mostrados en la *Tabla 3.9 3.9*, revela valores similares (para las condiciones estándar  $f=267\text{ kHz}$  y  $P=1\text{ kW}$ ).

La linealidad de la relación SAR versus dilución revela que la absorción específica (por unidad de masa de NPM) no varía con la concentración. Esto implica que la respuesta

magnética de las NPMs no es afectada por la mayor concentración e implica que los efectos de proximidad entre partículas no fueron importantes, indicando que no se produjo un cambio apreciable en el estado de agregación de las mismas.

Muestra	SAR a un 1kW (Determinada según Potencia)	SAR a un 1kW (Determinada según Concentración)
$Fe_3O_4(40f)$	321(12) W/g	[233(11), 274(4)]W/g
$Fe_3O_4(60f)$	200(9) W/g	220(6)W/g
$Fe_3O_4(80f)$	171(7) W/g	151(5)W/g

Tabla 3.9: Determinación del valor de SAR determinado a través de diferentes valores de potencia y determinado para diferentes concentraciones.

Se realizaron medidas calorimétricas  $T(t)$  en los coloides listados en la Tabla 3.10 controlando el campo  $H_0$  aplicado a través de la corriente que alimenta la bobina. En la Figura 3.22 se muestran los gráficos de  $T(t)$  obtenidos del coloide  $AC-Fe_3O_4$  (6.25) para tres valores de campo  $H_0$  de 20 kA/m, 28 kA/m y 41 kA/m y una  $f= 267$  kHz. De esta grafica se observa que el tiempo requerido para alcanzar un valor de temperatura dada disminuye a medida que el valor de campo se incrementa.

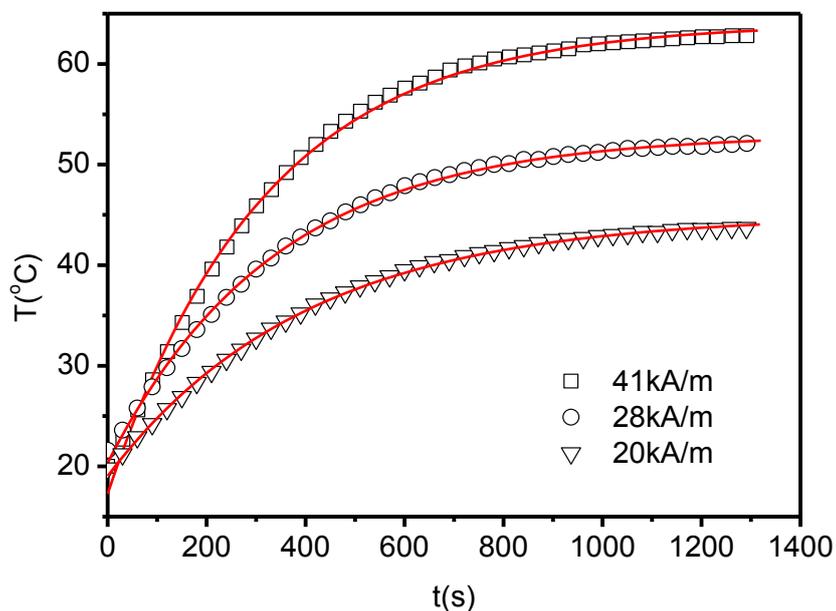


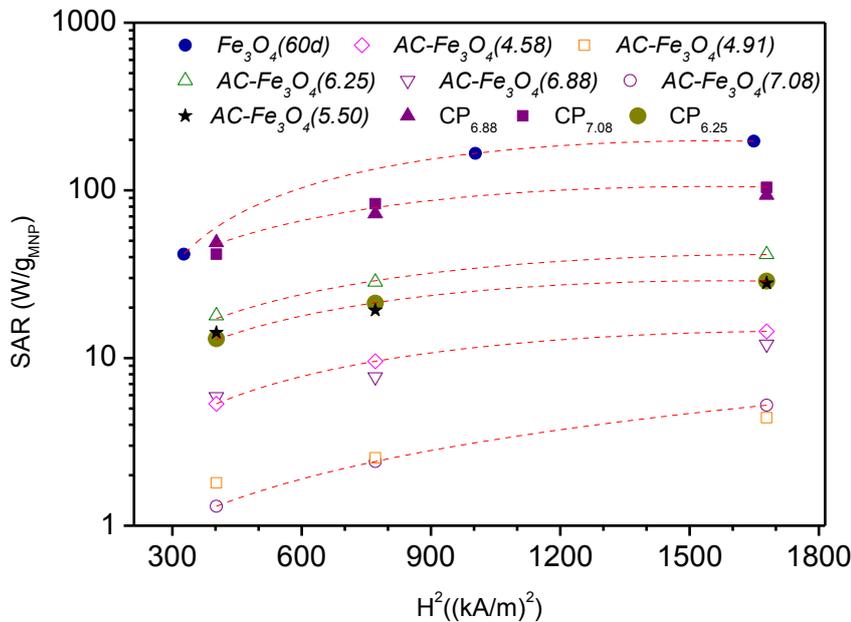
Figura 3.22: Curvas de calentamiento para el coloide  $AC-Fe_3O_4$  (6.25) medidas a una  $f=267$  kHz para los diferentes valores de  $H_0$ .

### 3.2.5. SAR en términos de la caracterización física del coloide.

En esta sección del capítulo se evalúa la potencia específica absorbida SAR del coloide en función de las características físicas de las NPMs del coloide,  $M_s$ ,  $\langle d_m \rangle$ ,  $\delta$  y  $T_{Bi}$  y de la viscosidad del solvente

Como se explicó en la introducción el parámetro SAR para un modelo de respuesta lineal está dado por  $SAR = \frac{\pi\mu_0 H^2 f}{\rho} \int \chi''(\tau(d_m)) f(d_m) dd_m$ , donde  $\mu_0$  es la permeabilidad del vacío igual a  $4\pi \times 10^{-7}$  H/m,  $f(d_m)$  es la función de distribución de tamaño de las NPMs y  $\chi''$  es la componente fuera de fase de la susceptibilidad.

En la *Figura 3.23* se muestra el comportamiento de SAR en función de  $H_0^2$ . Del gráfico se observa que para estos valores de  $H_0$ , la dependencia del SAR con el  $H_0^2$  no es lineal.



*Figura 3.23: dependencia del parámetro SAR con  $H^2$*

Para amplitudes de campo  $H$  pequeñas y NPMs no interactuantes  $\chi''$  es una función del tiempo de relajación ( $\tau$ ) de la forma  $\chi'' = \frac{\omega\tau}{1 + \omega\tau^2} \chi_0$ , con  $\omega = 2\pi f$  y  $\chi_0 = \frac{\mu_0 M_s^2 \rho^2 V}{3k_B T}$ .

Debido a que el coloide se comporta como un superparamagneto interactuante, la dinámica de estos sistemas depende fuertemente de las propiedades físicas de las NPMs y de la magnitud de sus interacciones.

En la *Figura 3.24* se muestran los tiempos de relajación  $\tau$ , calculados a 300 K para los mecanismos de Néel y de Brown en función de los valores de SAR medidos calorimetricamente.

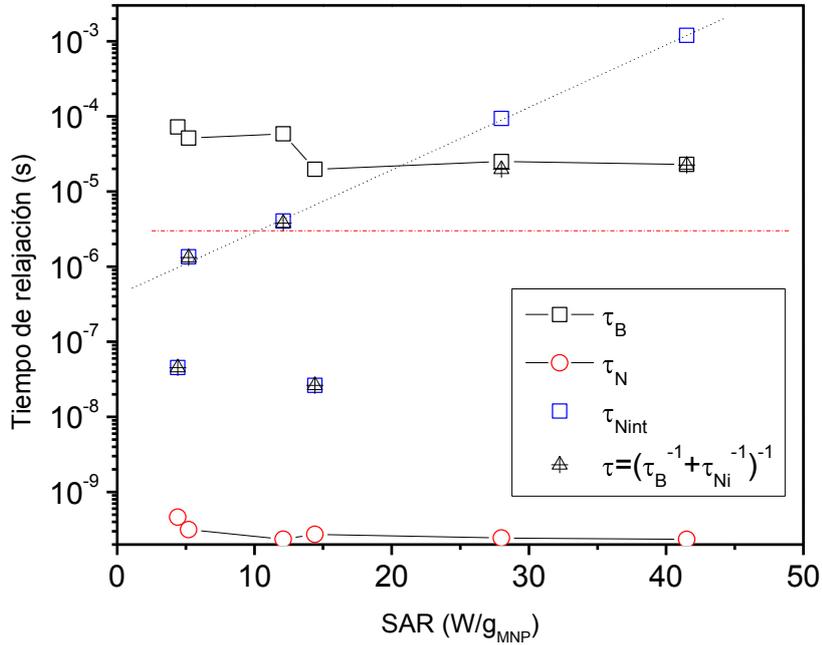


Figura 3.24: Se muestran los tiempos de relajación  $\tau$ (s) en función del parámetro SAR

Para el mecanismo de Brown se usaron los datos de  $d_H$  listados en la *Tabla 3.8 3.8* y el valor de  $\eta = 8.90 \times 10^{-4}$  Pa s. Estos valores caen en el rango de  $0.2 \times 10^{-5}$  a  $0.9 \times 10^{-5}$  s. La línea roja indica el  $\tau_m$ .

Para el mecanismo de Néel se supuso una partícula esférica con anisotropía uniaxial. Teniendo en cuenta el efecto de la superficie la densidad de energía de anisotropía efectiva viene dada por (1.9),  $K_{\text{eff}}(d) = K_{\text{bulk}} + (6/d) K_s$ , donde  $K_{\text{bulk}} = 1 \times 10^4$  J/m<sup>3</sup> y  $K_s$  es la densidad de energía de superficies. Por lo tanto  $K_{\text{eff}}(d)$  es un modelo que relaciona el incremento de la densidad de energía de anisotropía con la disminución del tamaño de las partículas. Este modelo ha sido probado por Gilmore<sup>121</sup>, utilizando partículas de magnetita crecidas dentro de proteínas para controlar el tamaño de las mismas y aislarlas.

Por otro lado se ha propuesto que  $K_s$  depende del tamaño de partícula<sup>121</sup> como  $K_s(d) = K_s^0 \tanh(d/\lambda)$  y los valores reportados para NPMs de magnetita son  $K_s^0 = (2.03 \pm 0.03) \times 10^{-5}$  J/m<sup>2</sup> y  $\lambda = (4.12 \pm 0.12)$  nm. Determinamos el valor de  $K_{\text{eff}}(d)$  para las NPMs de las suspensiones coloidales, incluyendo la capa superficial en los diámetros de NPM,  $d = \langle d_m \rangle + \delta$ . Estos resultados se muestran en la *Figura 3.25 3.25*

Por otro lado el valor de  $\tau_0$  se determino de la interpolación lineal de los datos  $\tau(d)$  extraídos de las referencias 121 y 122, como se muestra en la *Figura 3.26 3.26*. Utilizando los valores de  $\tau_0$  y las  $K_{\text{eff}}$  se determinaron los valores de  $\tau_N$ , para las NPMs de los diferentes coloides sintetizados, estos valores se encuentran en el rango de  $(0.1 - 0.6) \times 10^{-9}$  s. Para realizar estos cálculos no se tuvieron en cuenta a las interacciones entre las

partículas. Estos valores de  $\tau_N$  resultaron 4 órdenes de magnitud más pequeños que los valores calculados para  $\tau_B$ .

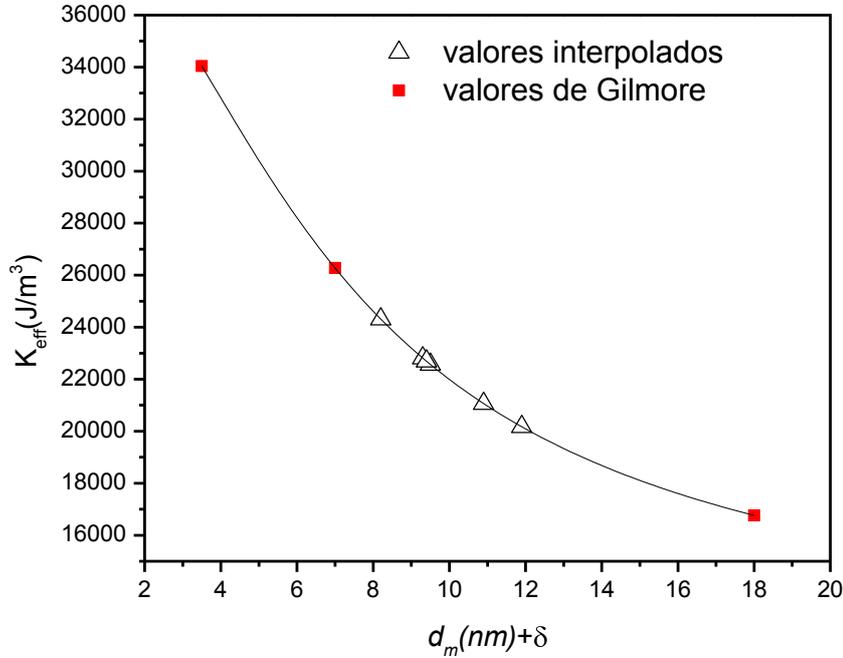


Figura 3.25:  $K_{eff}$  en función de  $\langle d_m \rangle + \delta$

Si las NPMs en el coloide presentan interacciones dipolares la energía de la barrera  $\Delta E$  aumenta de la siguiente manera, según Dorman<sup>123</sup>,  
 $\Delta E = K_{eff}V + E_{dip}$ , donde el término  $E_{dip}$  hace referencia a la energía de interacción dipolar, por lo tanto:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{K_{eff}V + E_{dip}}{k_B T}\right) \text{ y si } \tau = t_m, \text{ entonces la temperatura de bloqueo en presencia de}$$

$$\text{interacciones sería, } T_{Bint} = \frac{K_{eff}V + E_{dip}}{k_B \ln\left(\frac{t_m}{\tau_0}\right)}. \text{ De esta expresión se ve que la } T_B \text{ va a aumentar}$$

en el término  $E_{dip}$ . Las interacciones dipolares dependen de la distancia media entre los

$$\text{centros de las partículas } d_{pp} \text{ como } E_{dip} \propto \frac{V^2}{d_{pp}^3}.$$

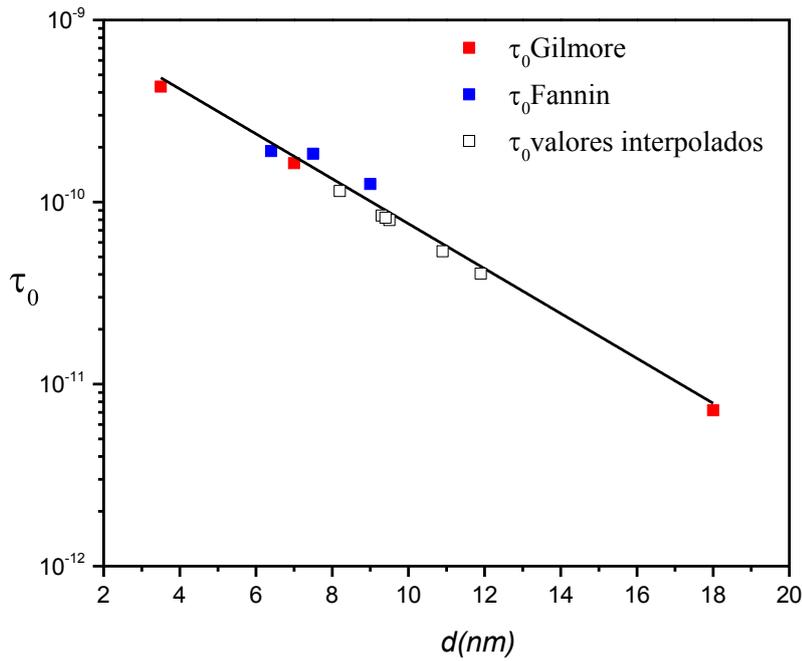


Figura 3.26: curva de  $\tau_0$  en función del  $d_m$

Por lo tanto, para tener en cuenta que el momento de las NPMs interactuantes fluctúa con un tiempo de relajación diferente al de una partícula aislada, se le adiciona a la barrera de energía  $\Delta E$ , un término  $E_{dip}$  el cual tiene en cuenta las interacciones entre las NPMs<sup>123</sup>.

	$M_s$ Am <sup>2</sup> / kg	$\langle d_m \rangle$ nm	$\delta$ nm	$d_{TEM}$ nm	$d_H$ nm	$PI$	$T_{Bdip}$ K	$T_B$ K	SAR W/g
AC - $Fe_3O_4$ (4.58)	16.0	7.1	5.3	9.5±1.6	38.8	0.35	81	28	14.4
AC - $Fe_3O_4$ (4.91)	9.7	7.0	7.5	8.2±2.4	59.8	0.48	92	41	4.29
AC - $Fe_3O_4$ (5.50)	24.9	6.0	3.1	9.3±1.7	42.0	0.19	166	13	28.0
AC - $Fe_3O_4$ (6.25)	26.0	7.1	3.4	11.9±3.5	40.8	0.23	196	18	41.5
AC - $Fe_3O_4$ (6.88)	17.7	5.8	4.0	9.4±2.0	55.8	0.27	132	16	12.1
AC - $Fe_3O_4$ (7.08)	11.5	6.7	6.4	6.8±1.9	53.4	0.46	126	32	5.2
$Fe_3O_4$ (60d)	67.1	6.8	0.6						203
CP(6.25)	33.6	7.9	3.2						28.8
CP(6.88)	56.1	7.7	1.2						94
CP(7.08)	70.6	8.4	0.6						104

Tabla 3.10: Se indican los valores de SAR a valores de la excitación de  $f = 267$  kHz y  $H_0 = 41$  kA/m junto con los parámetros estructurales y magnéticos para los diferentes coloides.

La  $E_{dip}$  puede estimarse mediante  $E_{dip} = k_B T_{Bint} - T_B \ln t_m / \tau_0$ , donde  $T_B$  se calculó a partir de la  $K_{eff}(d)$  y de  $\tau_0$  y la  $T_{Bdip}$  es la temperatura del máximo de la curva  $M(T)_{ZFC}$ . Estas temperaturas, los valores de los parámetros SAR y los parámetros estructurales y magnéticos para los diferentes coloides se listan en la *Tabla 3.10*.

De la comparación de los resultados de los diámetros  $\langle d_m \rangle$  y de los valores de SAR indicados en la *Tabla 3.10*, se observa que los valores de SAR no tienen una relación directa con los tamaños de carozo magnético  $\langle d_m \rangle$  de las partículas, por ejemplo los valores de SAR para *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(7.08)*, *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(6.25)* y *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60d)* son 5.2, 41.5 y 203 W/g mientras que sus tamaños son similares. La principal diferencia de estas muestras está en sus valores de  $M_s$  y  $T_{Bdip}$ . Por otro lado se ve que las muestras que poseen capas magnéticamente frustradas o más grandes poseen  $M_s$  más bajas y  $T_{Bdip}$  altas.

Los tiempos de relajación de Néel, para partículas interactuantes ( $\tau_{Nint}$ ), fueron obtenidos a partir de  $\tau_N = \tau_0 \exp(\sigma)$ , con  $\sigma = K_{eff}V + E_{dip} / k_B T$ . Estos resultados se muestran en la *Figura 3.24* en función del valor SAR. El cruce entre el  $\tau_{Nint}$  y el  $\tau_B$  ocurre para un valor de SAR de 12.8 W/g.

Los mayores valores de SAR se obtienen para los coloides más interactuantes, por ejemplo para las partículas que presentan mayores valores de  $T_{Bdip}$  y por lo tanto una  $E_{dip}$  grande, en estos casos el mecanismo que prevalece es el de Brown. Para los coloides con NPMs sin recubrir los valores del SAR son mucho mayores y del orden de los 200 W/g. Estas partículas presentan un tamaño magnético similar al de las NPMs recubiertas, pero con un volumen hidrodinámico de  $\sim 1.5 \mu m$  (con índice de polidispersidad de  $\sigma_{PI} = 0.5$ ). Esto indica que están formando agregados. Este resultado se corresponde con su valor de  $T_{Bdip}$  de al menos 300K, indicando una fuerte interacción entre ellas. De estos resultados se puede ver que la interacción entre las partículas juega un importante rol en el mecanismo de disipación de energía.

En la *Figura 3.27*, se muestra el SAR ( $M_s$ ) para los coloides del tipo CP (i), *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i)* y *Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(60d)*. De la relación de SAR con  $M_s$  se infiere que para los coloides del tipo *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(i)* el ácido cítrico produce un gran incremento en la estabilidad produciendo una disminución en el valor de SAR, debido a la que produce una capa magnéticamente frustrada disminuyendo de esta manera el valor de  $M_s$ . Estos resultados indican una dependencia  $SAR \propto M_s^{1.75}$  donde el exponente se aparta ligeramente del valor 2 predicho por la teoría de respuesta lineal.

Se pudo observar de estos resultados que la condición de síntesis óptima se obtiene cuando el pH de adsorción es de  $pH_{ads} = 6.25$ , en el cual se consigue una alta estabilidad a pH fisiológico conservando un valor de SAR alto.

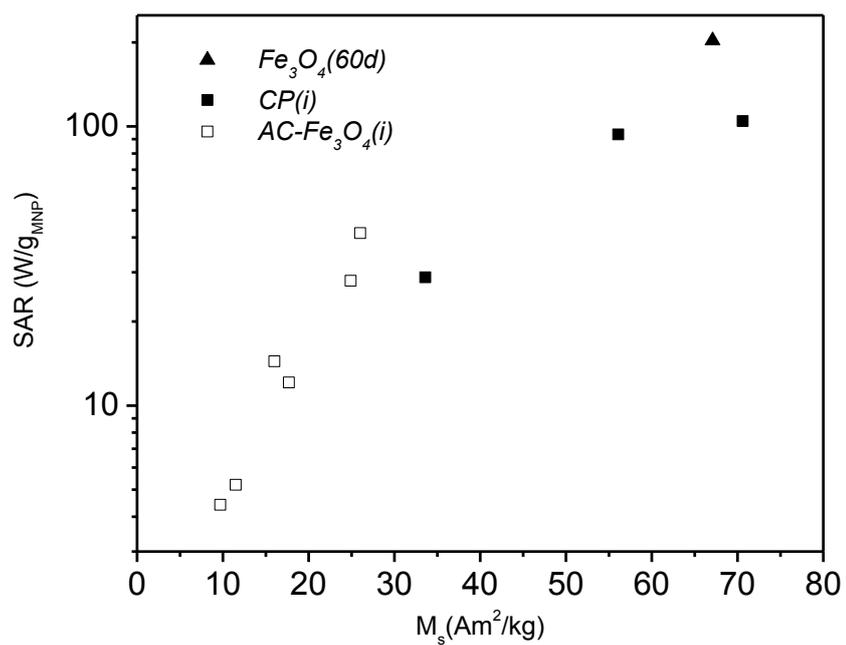


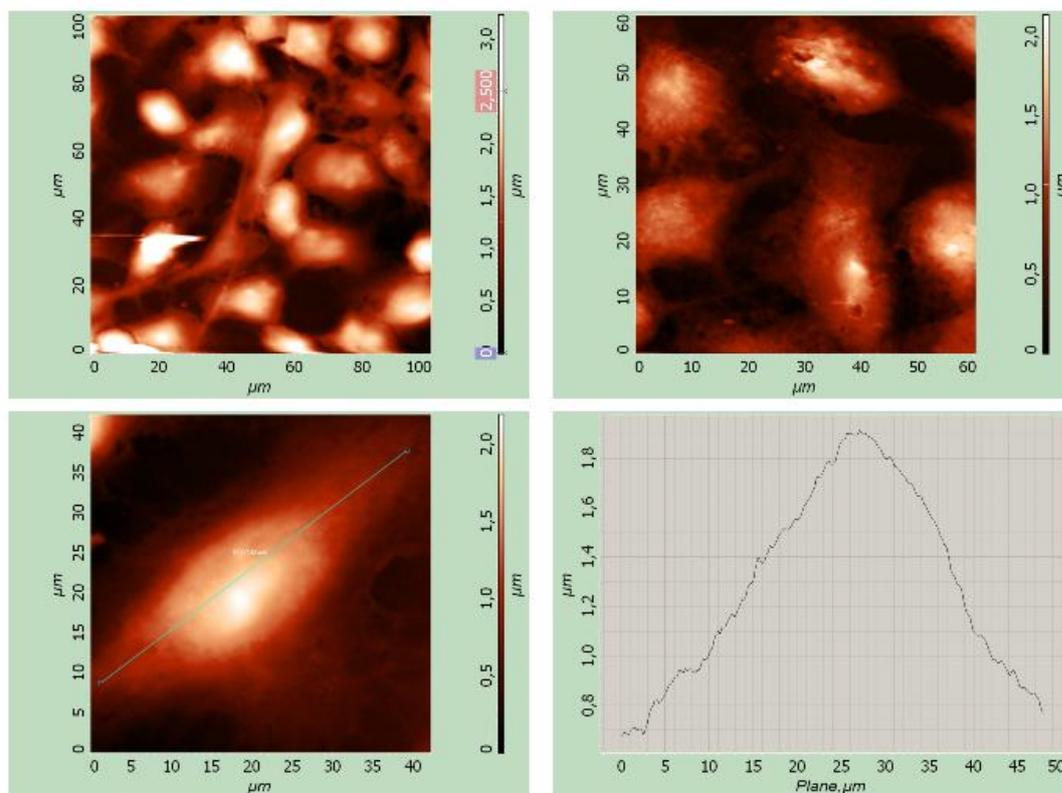
Figura 3.27: dependencia del valor de SAR con la  $M_s$

## 4. Interacción célula A549/ NPMs:

En este capítulo se muestra la caracterización topográfica de las células y la caracterización estructural y magnética de las suspensiones coloidales que se utilizaron en la metodología de evaluación de hipertermia intracelular, descrita en el capítulo 5. Por otro lado, se muestran resultados del testeo de las condiciones experimentales para que las células A549 incorporen los coloides  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y AC-  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Se evalúa el efecto citotóxico, se comprueba la internalización de las NPMs dentro de las células con TEM y se determina el grado de incorporación (*uptake*) de NPMs por célula. Se presenta un estudio de citotoxicidad que demuestra la inducción de muerte luego de exposición a HM. Este último se lleva a cabo utilizando un método magnético y un método químico. Finalmente se describe la generación de las células transducidas con los vectores lentivirales.

### 4.1. Visualización topográfica de las células con AFM

En la *Figura 4.1* se muestra las imágenes topográficas de un cultivo de células A549 fijada en monocapa. Las células fijadas quedan en la disposición que estuvieron por última vez en su vida, por ejemplo si se fija en suspensión, quedan con forma esférica. Por el contrario si se fijan en monocapa adopta una forma ahusada. Se puede apreciar de la *Figura 4.1* que la dimensión de las células están entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ .



*Figura 4.1: Arriba, imagen topográfica de AFM de un cultivo celular A549. Abajo se muestra la topografía de la célula donde se observa la forma ahusada de la misma al ser fijadas en monocapa y su curva de nivel.*

## 4.2. Características de la suspensión coloidal para experiencias de HM *invitro*.

Para los experimentos *invitro* desarrollados durante esta tesis se seleccionaron 3 tipos de suspensión coloidal que se detallan a continuación:

- Suspensiones coloides de NPMs de magnetita sin recubrir denominadas  $Fe_3O_4$  y por otro lado con coloides de NPMs recubiertas con ácido cítrico  $AC-Fe_3O_4$ . Estos coloides fueron sintetizados bajo el protocolo de síntesis descrito en la sección 3.1.2. La principal diferencia entre ellos es que las NPMs de la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4$  poseen alta estabilidad en el coloide a comparación con las del coloide  $Fe_3O_4$ , pero poseen un valor de SAR menor.
- Coloides de NPMs de magnéticas recubiertas con sílice y modificada con grupos fosfonatos. Estos coloides fueron provistos por la Dra. Olga Mykhaylyk<sup>53</sup> y sintetizados bajo el protocolo reportado en la referencia 53 . A este coloide se lo rotuló como  $SiO_x-Fe_3O_4$ .

En la *Figura 4.2 4.2* se muestran la caracterización realizada con DRX, TEM, SAR y VSM para la suspensión coloidales  $Fe_3O_4$ . Del ajuste de los picos de DRX se identificó que estas NPMs se corresponden con la estructura de la espinela cúbica correspondiente con la magnetita con un tamaño de cristalita de 17 nm. Estas NPMs poseen una baja estabilización electrostática con un valor de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) = -8 mV, pero alta Ms y SAR.

En la *Figura 4.3 4.3* se muestra la curva recalentamiento y VSM para la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4$ . Del ajuste de los picos de DRX se identificó que estas NPMs se corresponden con la estructura de la espinela cúbica correspondiente con la magnetita con un tamaño de cristalita de 18 nm. Estas NPMs poseen una alta estabilización electrostática con un valor de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) = -36 mV, pero bajos valores de Ms y SAR.

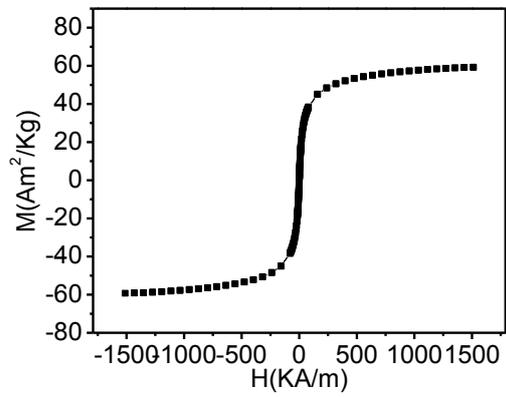
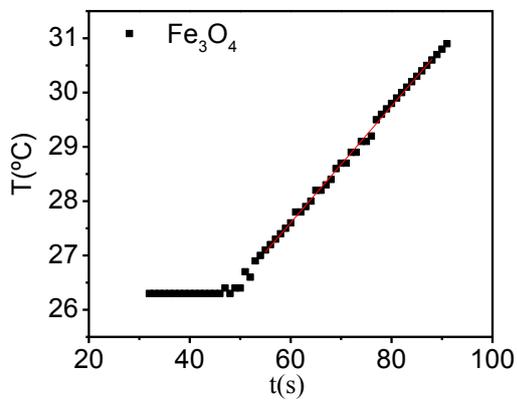
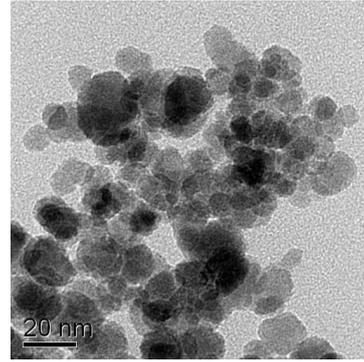
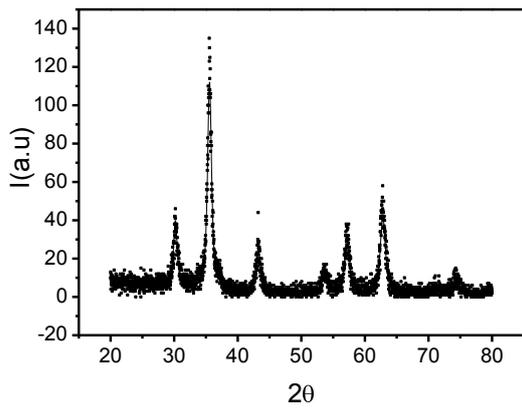


Figura 4.2: DRX, TEM, SAR y VSM a temperatura ambiente de la suspensión coloidal magnética  $Fe_3O_4$ .

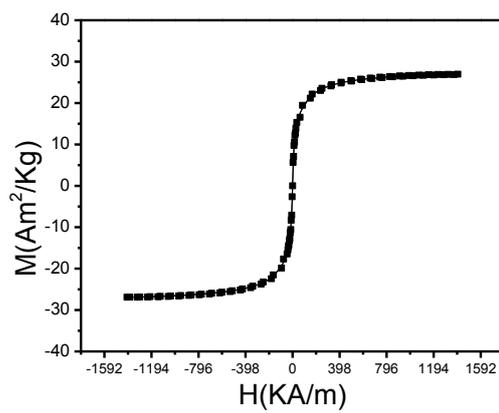
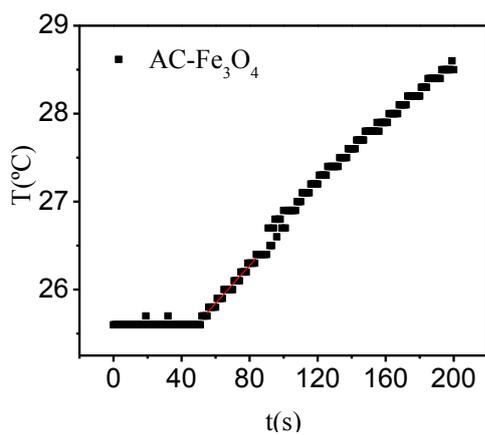
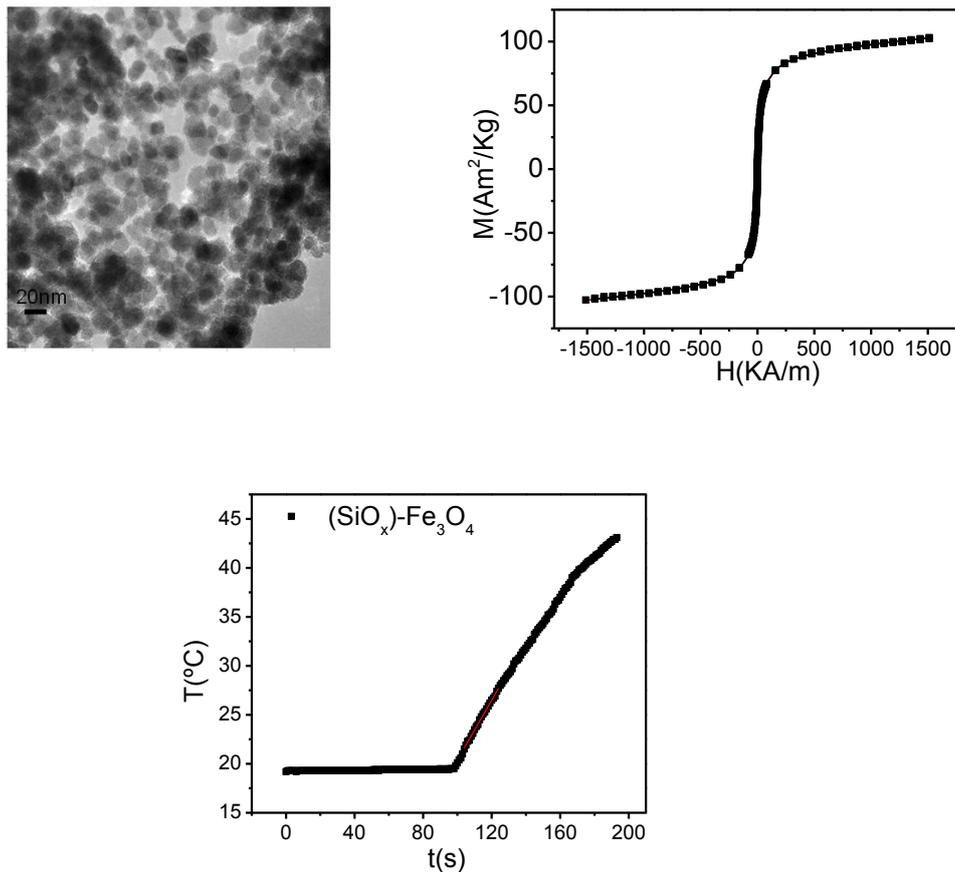


Figura 4.3: Se muestra el gráfico la curva de calentamiento y el VSM para la suspensión coloidal magnética  $AC-Fe_3O_4$

En la *Figura 4.4 4.4* se muestra una imagen TEM, la curva  $M(H)$  y la curva de calentamiento del coloide  $SiO_x-Fe_3O_4$ . Del ajuste de DRX de estas NPMs se estimó un tamaño de cristalita de 10 nm y por DLS se determinó un tamaño hidrodinámico de 121 nm. Estas NPMs poseen una alta estabilización electrostática con un valor de potencial-Zeta ( $\zeta$ ) = -41 mV debido a los grupos ( $SiO_x$ /Fosfonato)



*Figura 4.4: se muestra la imagen TEM, la curva  $M(H)$  y la curva de calentamiento del coloide  $SiO_x-Fe_3O_4$*

Los resultados de caracterización para estos coloides fueron resumidos en la Tabla 4.1 4.1. Del análisis de DRX se pudo identificar que las NPMs para todos estos coloides se corresponden con magnetita y del ajuste de los ciclos  $M(H)$  se determinó el valor de la magnetización  $M_s$ . Se determinó que la  $M_s$  del coloide  $SiO_x-Fe_3O_4$  es alta a comparación con las obtenidas para los otros coloides.

Nombre de la suspensión coloidal	[x] ( $mg_{magn}/ml$ )	Ms ( $Am^2/kg$ )	SAR ( $W/g_{NPM}$ )
$Fe_3O_4$	4.8	60	92.9
$AC-Fe_3O_4$	8.3	28	10.7
$SiO_x-Fe_3O_4$	22.5	92	56.5

Tabla 4.1: propiedades de las NPMs utilizadas para las experiencias invitro, se La concentración de la suspensión coloidal [x], la magnetización de saturación a temperatura ambiente Ms y SAR determinado a valores de la excitación de  $f=128$  kHz y  $H_0=20.3$  kA/m

Con el objetivo de seleccionar la condición de aplicación de RF ( $H_0$  y  $f$ ) para la cual las NPMs de las suspensiones coloidales  $AC-Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$  presentan la mayor disipación de calor, se determinó el SAR para diferentes valores de  $f$ .

En la Figura 4.5 se muestra los valores de SAR de la suspensión coloides  $SiO_x-Fe_3O_4$  a diferentes valores de  $f$ , determinados con una amplitud de  $H_0 = 20.3$  kA/m. El mayor valor de SAR se obtiene para la condición  $f = 128$  kHz. El parámetro SAR para el coloide  $AC-Fe_3O_4$  aumenta cuando se incrementa la  $f$  para un valor de  $H_0= 34$  kA/m. De estas determinaciones se eligieron las condiciones experimentales más óptimas para producir estrés y muerte en las células, indicadas en la figura con flechas rojas.

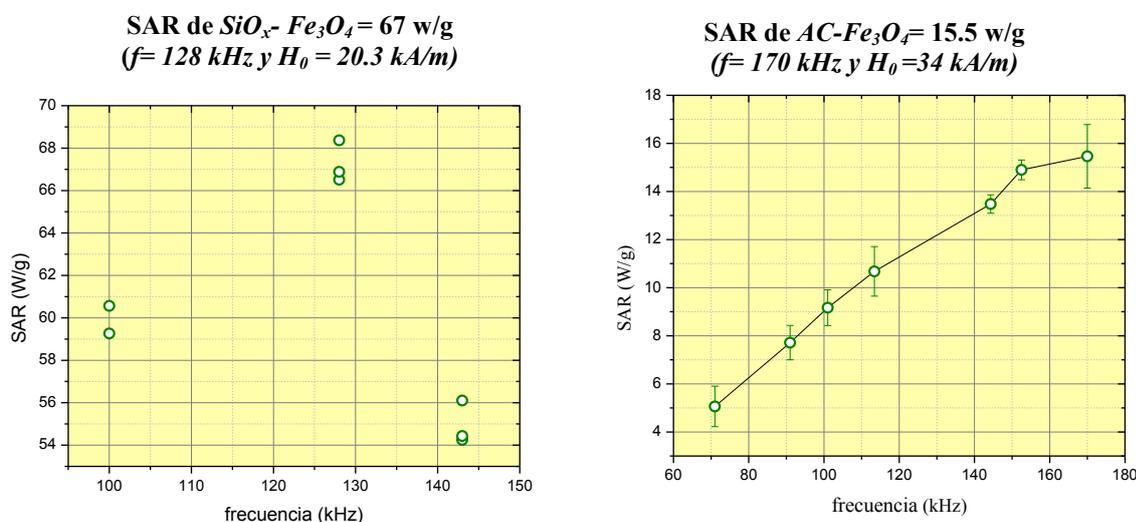


Figura 4.5: SAR medido a diferentes frecuencias para las suspensiones coloidales magnéticas  $SiO_x-Fe_3O_4$  y  $AC-Fe_3O_4$ .

### 4.3. Visualización con microscopías óptica y TEM de las NPMs internalizadas.

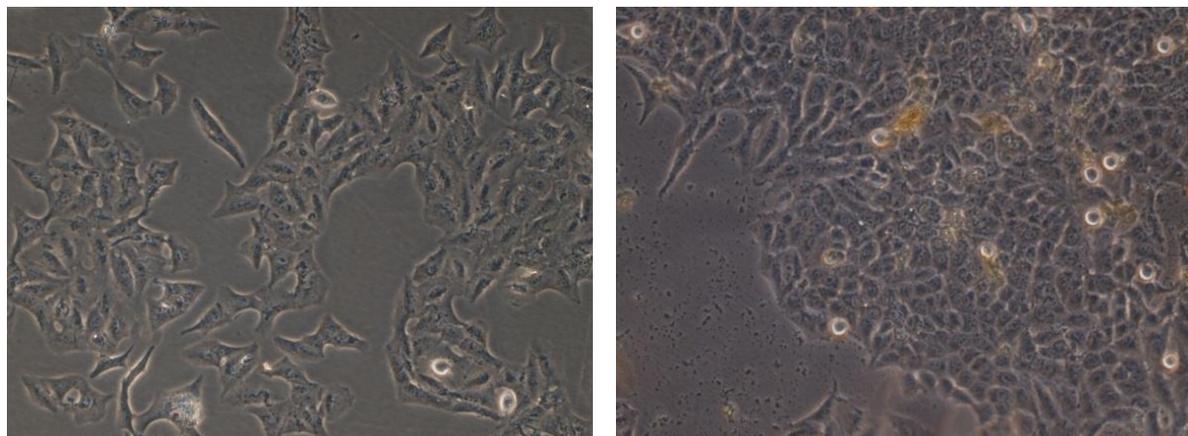
Durante todos los ensayos de cultivo e internalización de NPMs se realizó un seguimiento los cultivos con el microscopio de contraste de fase, a fin de controlar la viabilidad a partir de la visualización de la morfología de las células, confluencia y cambios relacionados al agregado de las NPMs al cultivo. En la Figura 4.6 se muestra una microfotografía de un

cultivo de células A549 antes (izquierda) y después (derecha) de ser incubadas con las NPMs. Se observa que las células mantienen su morfología, no se ve un aumento significativo en el número de células muertas y las zonas coloreadas estarían relacionadas con las NPMs. Para comprobar la internalización de las NPMs en las células A549 se realizó la observación TEM de los cultivos celulares que incorporaron NPMs de las suspensiones coloidales  $Fe_3O_4$  y  $AC-Fe_3O_4$ .

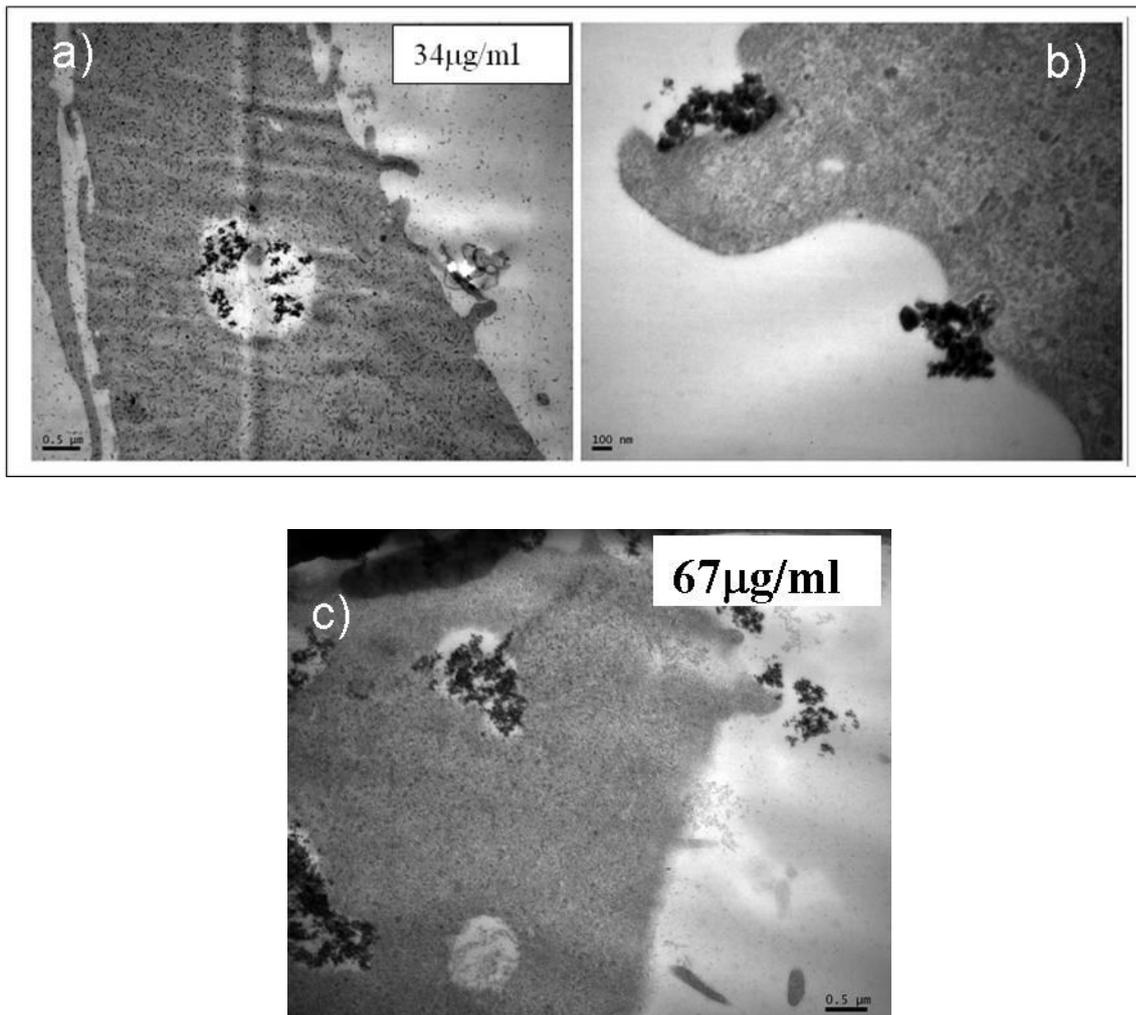
Para observación con TEM, las células a un 60 % de confluencia fueron incubadas durante 17 h a 37 °C con 34.0, 67.0 y 135  $\mu g/ml_{DMEM}$ . Una vez concluido el tiempo de internalización, se las lavo 3 veces con PBS y se las fijó según el protocolo descrito en la sección 2.5.2.

En la *Figura 4.7* se muestran imágenes a) y b) TEM de célula que fueron incubadas con 34 y c) 67  $\mu g_{Fe_3O_4}/ml_{DMEM}$ , utilizando como suspensión coloidal  $Fe_3O_4$ . En la misma se puede observar todo el proceso 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. Las imágenes a) muestra un ensoma con baja densidad de partículas, la imagen b) ejemplifica la adhesión a la membrana plasmática de las NPMs y se observan los pseudópodos abrazando un agregado de estas. Se observa que las células expuestas a mayor cantidad de NPMs presentan más cantidad de endosomas cargados de NPMs y estos se encuentran más densamente empaquetados.

En el interior de los endosomas y lisosomas, el pH es extremadamente ácido, lo cual podría degradar los recubrimientos de las NPM e inclusive generar cambios en la composición del carozo magnético de la partícula.



*Figura 4.6: Microfotografías de contraste de fase de cultivo de células A549, del lado izquierdo se muestra un cultivo antes de incubar con las NPMs y del lado derecho el cultivo luego de incubación con 34  $\mu g_{Fe_3O_4}/ml_{DMEM}$  del coloide  $Fe_3O_4$ . Objetivo 20X.*



*Figura 4.7: Imágenes TEM de una célula A549 internalizada con: a y b) 34 y c) 67µg/ml<sub>DMEN</sub>, utilizando el coloide Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.*

Las células que internalizaron NPMs recubiertas pertenecientes al coloide AC- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (6.25) se muestran en la *Figura 4.8*. En esta imagen se confirma el ingreso de las NPMs a la célula y se observa muchas prolongaciones de la membrana celular abrazando agregados de nanopartículas. Se presume que las proteínas del medio de cultivo alteran el recubrimiento con moléculas de ácido cítrico, las cuales en la suspensión coloidal acuosa a pH<sub>SUS</sub> ~7.4 poseen carga eléctrica negativa, resultado de la pérdida de los protones de los carboxilos libres, Esta alteración del recubrimiento se evidencia en la formación de agregados de nanopartículas. No se han observan partículas endocitadas en forma individual.

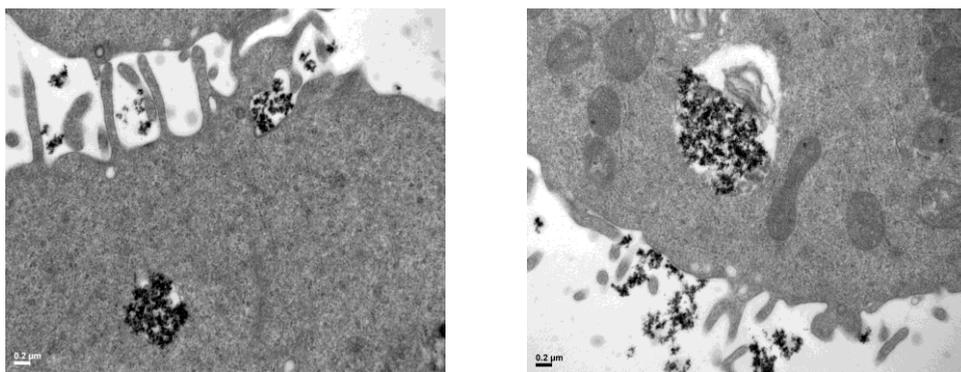


Figura 4.8: Imágenes TEM de una célula A549 que internalizó NPMs recubiertas con AC del coloide AC-  $Fe_3O_4$  a una concentración de  $135 \mu g_{Fe_3O_4}/ml_{DMEM}$ .

#### 4.4. Cuantificación de NPMs internalizadas por las células A549

Una vez verificada la captación de NPMs por la célula es de interés cuantificar su magnitud, especialmente en experiencias de hipertermia intracelular donde la concentración efectiva es de relevancia (ver ecuación (2.2)). Para este fin, se determinó la cantidad de NPMs internalizadas por las células a través de dos metodologías: Determinación de Fe en las células por un método colorimétrico y por la medida magnética de  $M(H)$  los cultivos celulares que internalizaron NPMs utilizando magnetometría dc (VSM). De ambas metodologías se deriva un valor medio.

##### Determinación de Fe por método colorimétrico

Esta técnica se fundamenta en la Ley de Lambert Beer, que establece que la Absorbancia de una solución es directamente proporcional a su concentración [x].

$$A = \varepsilon * b * [x],$$

donde, la absorbancia A es adimensional,  $\varepsilon$  es la absortividad molar, que es una constante de proporcionalidad y es específica de cada cromóforo. La longitud del camino óptico b se expresa en cm.

Este método<sup>124</sup> consiste en la digestión ácida de la célula que han internalizado NPMs, utilizando HCl (5M). Este ácido no solo digiere la membrana de la célula sino también disuelve a la magnetita que ha sido internalizada por ellas, por lo tanto el Fe queda como iones  $Fe^{+2}$  o  $Fe^{+3}$  disueltos en el medio de reacción. Luego se agrega a la mezcla digerida ferrocianuro de potasio  $K_4(Fe(CN)_6)$  al 5% el cual forma un complejo coloreado con los iones, llamado *Prussian Blue*, el cual tiene un pico de absorción a 700 nm.

Para preparar la curva de calibración se utilizó como patrón una muestra de suspensión coloidal de  $25 \mu g_{Fe}/ml$ , valorada previamente con  $K_2CrO_7$ , de la cual se tomaron diferentes alícuotas y se las colocaron directamente en las cubetas espectrofotométricas para dejar secar en estufa toda la noche junto a las muestras de células que se van a ensayar. Luego, se le agregó a cada cubeta 1ml de HCl (5M) y se dejaron en estufa a  $30^\circ C$  durante 4 hs, luego se tomaron 500  $\mu l$  de cada cubeta y se los hicieron reaccionar con 500  $\mu l$  de ferrocianuro de potasio al 5%, recién preparado. Se mantuvieron en la oscuridad durante 35 min y para luego medir la absorbancia a  $\lambda=700$  nm. La curva de calibración obtenida se muestra en la Figura 4.9.

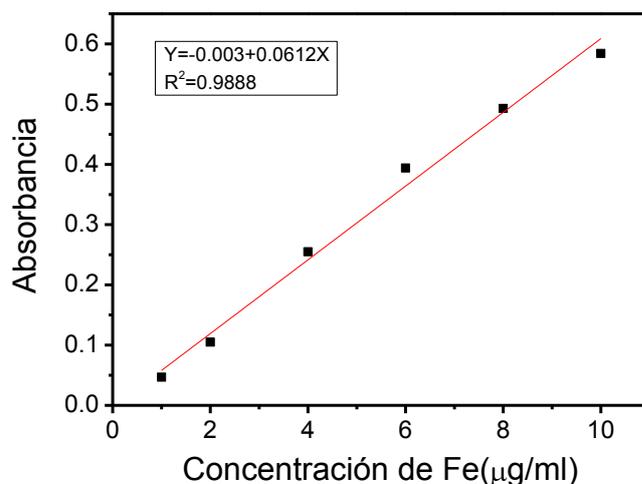


Figura 4.9: Absorbancia medida a 730 nm. Recta de calibración para determinar Fe por espectrofotometría

La cantidad de Fe presente en la muestra de células digerida se determina a partir del valor de la Absorbancia (A) de la muestra e interpolando este valor en la curva de calibración de A vs concentración de Fe ( $\mu\text{g Fe/ml}$ ). Conociendo el número total de células se determinó la masa de magnetita por célula expresada como ( $\text{pg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cél}}$ ).

La cantidad de NPM incorporada por célula en cultivos de células A549 incubadas con la suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bajo el protocolo descrita en la sección 2.3.3, utilizando una concentración de  $34 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEN}}}$  se muestra en el la Tabla 4.2 4.2. Se expresa como masa de magnetita por célula ( $\text{pg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cél}}$ ).

Suspensión coloidal	$N_{\text{cel}}$	Captación ( $\text{pg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cél}}$ )
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$1.5 \times 10^6$	37
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$15 \times 10^6$	35
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$1.6 \times 10^6$	34

Tabla 4.2: Cuantificación de NPMs por célula A549 incubadas con el coloide  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  medido a una concentración de  $34 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEN}}}$ . Se reportan también el número total de células ensayadas ( $N_{\text{cel}}$ ) y los valores medios de internalización ( $\text{pg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cél}}$ ).

Se observa un valor similar de  $\text{pg}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{cél}}$  para los 3 ensayos realizados, lo cual nos indica una buena reproducibilidad de la técnica.

#### Determinación de $m_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{célula}}$ por Magnetometría dc:

Para cuantificar la cantidad de NPMs de magnetita que ingresaron en las células se determinó la curva  $M(H)$  a temperatura ambiente de los cultivos celulares luego de ser incubados A549 con la suspensión coloidal magnética a la concentración ( $\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEN}}}$ ) que se desea determinar. Se utilizó como técnica de medida la magnetometría VSM, para lo cual se prepararon *pellet* (células centrifugadas) de un volumen pequeños de  $\sim 200 \mu\text{l}$  pero que contiene millones de células. Para lograr entrar en la sensibilidad de esta técnica es necesario cultivar en botella de cultivo de  $75 \text{ cm}^2$ , para obtener grandes cantidades  $\sim 5 \times 10^6$  células que internalizaron NPMs. Para tal fin, se internalizaron las NPMs dentro del

cultivo celular bajo el protocolo descrito en la sección 2.3.3, se levantaron las células de la botella y se las resuspendió en 15 ml de PBS, de esta suspensión celular se determinó el número de células por ml de suspensión celular utilizando la cámara de Neubauer.

Posteriormente se centrifugó la suspensión celular, se la resuspendió en 2 ml de PBS y se la transfirió a un sachet de material termocontraible como los utilizados para medir  $M(H)$  de las suspensiones coloidales con VSM. Luego se centrifugó el sachet dentro de un falcon de 15 ml y se descartó el sobrenadante y por último se dejó secar el *pellet* en estufa a 37 °C para realizar la medida de VSM. Es importante el buen sellado del sachet antes de ser medido por VSM.

A través del valor del momento de saturación del cultivo celular  $m_{cel}^s (Am^2)$  obtenido de la curva  $M(H)$ , del número total de células ( $N_{cel}$ ) determinado con cámara de Neubauer y el valor de la  $M_s (Am^2/g \text{ de magnetita})$  de la suspensión coloidal se determinó la masa de magnetita por célula y se expresó como  $pg \text{ Fe}_3O_4 / célula$ .

$$\frac{m_{cel}^s (Am^2)}{M_s (Am^2 / gFe_3O_4) * N_{cel}} = pg \text{ Fe}_3O_4 / célula$$

Se determinó la cantidad de NPM incorporada por célula en cultivos de células A549 incubadas con la suspensión coloidal  $Fe_3O_4$  bajo el protocolo descrita en la sección 2.3.3, utilizando una concentración de  $34 \mu g_{Fe_3O_4} / ml_{DMEN}$ . El VSM obtenida para esta suspensión celular se muestra en la *Figura 4.10* y la masa de magnetita por célula determinada fue de 20 pg/cél.

Se ve que este valor difiere del obtenido con espectrofotometría, puede deberse a la poca estabilidad de los complejos de hierro, cualquier cambio que deba hacerse en la dilución, todo el método debe reiniciarse ya que la estabilidad del complejo dura alrededor de 35 min. A esto debe sumarse la complejidad de este método frente al de VSM. Por lo tanto, se eligió seguir trabajando durante esta tesis con la técnica de VSM.

La cantidad de NPM incorporada en células A549(HSP70B-EGFP) internalizados con las suspensiones coloidales AC-  $Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4$  o  $SiO_x-Fe_3O_4$  se muestra en la *Tabla 4.3 4.3*. En esta se indica la suspensión coloidal utilizada, la concentración con la que se incubaron las células ( $\mu g_{Fe_3O_4} / ml_{DMEN}$ ) y la cantidad media de magnetita incorporada por célula  $pg \text{ Fe}_3O_4 / célula$  para cada ensayo.

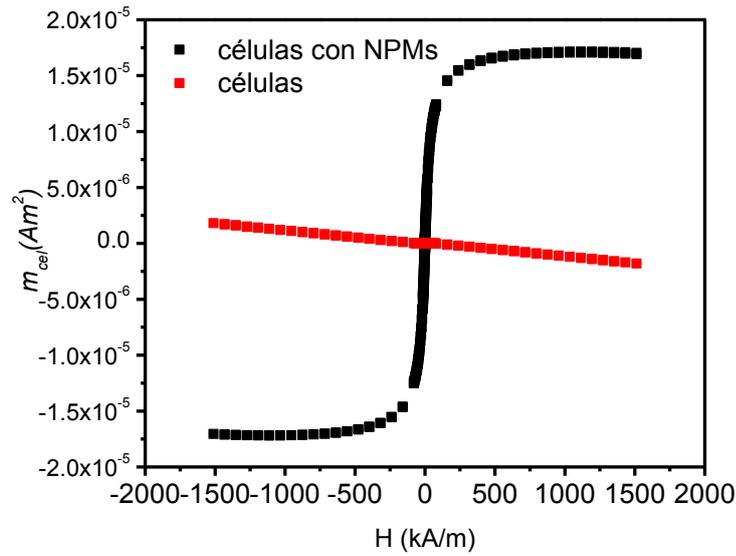


Figura 4.10: curva de VSM para determinar la captación en  $\text{pg Fe}_3\text{O}_4 / \text{célula}$ , de un cultivo celular que se incubó con  $34 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4} / \text{ml}_{\text{DMEN}}$  de la suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Suspensión coloidal	Concentración ( $\mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4} / \text{ml}_{\text{DMEN}}$ )	$\text{pg Fe}_3\text{O}_4 / \text{célula}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	29.0	20.4
AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	29.0	12.4
AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	67.0	45.0
AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	135	169
$\text{SiO}_x$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$	29.0	9.0

Tabla 4.3: Captación de magnetita por célula de cultivos celulares que se han previamente incubados con NPMs de AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{SiO}_x$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a una concentración determinada.

Las curvas  $M(H)$  de los cultivos celulares que internalizaron NPMs de las suspensión coloidales AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{SiO}_x$ - $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a una concentración de  $29 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4} / \text{ml}_{\text{DMEN}}$  se muestra en la Figura 4.11.

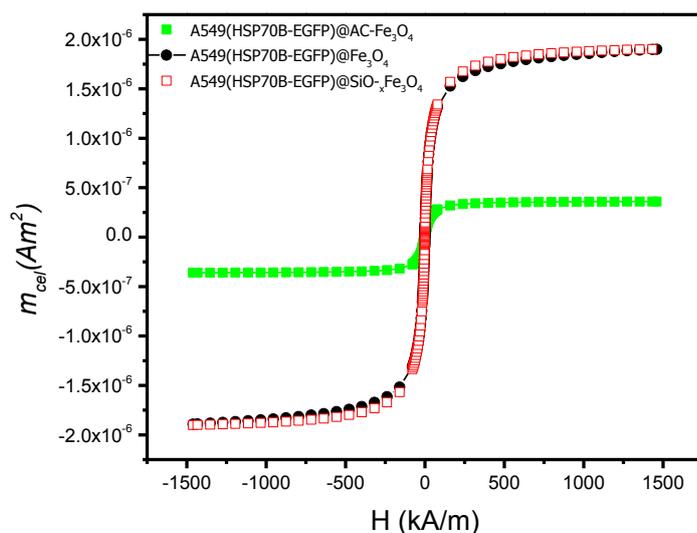


Figura 4.11: curvas de  $M(H)$  para cuantificar la captación de magnetita por célula en cultivos celulares que internalizaron NPMs de las suspensiones coloidales  $AC-Fe_3O_4$ ,  $Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$  a una concentración de  $29 \mu g_{Fe_3O_4}/ml_{DMEM}$ .

#### 4.4.1. Citotoxicidad causada por NPMs sin recubrir del tipo $Fe_3O_4$ .

Con el fin de evaluar el rango de concentración para el cual las NPMs del coloide  $Fe_3O_4$  no producen un efecto citotóxico en las células A549 se analizó utilizando doble marca fluorescente Bromuro etidio (BE) – naranja de acridina (NA) como técnica de medida del porcentaje de células viables, apoptóticas y necróticas para cultivos A549 que han sido expuestos a 10, 34 y  $67 \mu g_{Fe_3O_4}/ml_{DMEM}$

##### Protocolo Bromuro etidio (BE) – naranja de acridina (NA)

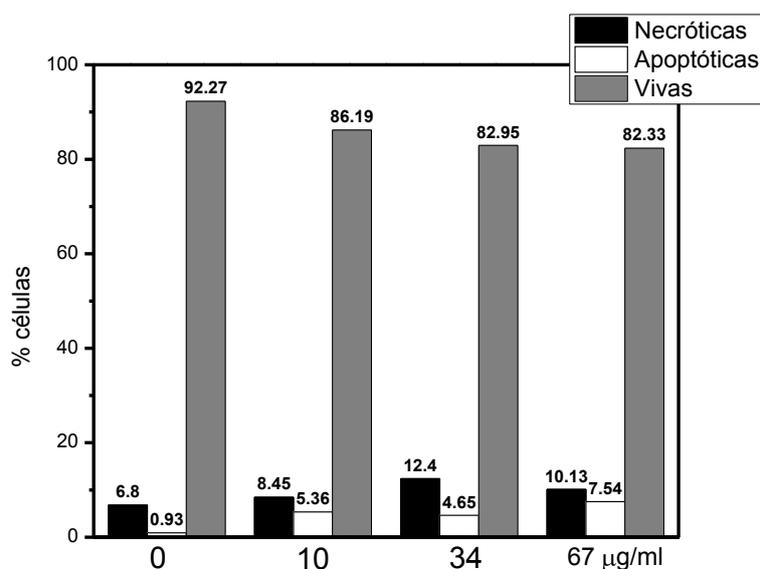
Se sembraron 45000 células por pocillos en 1 ml de DMEM en placa de cultivo de 24 pocillos. Se dejaron en estufa de cultivo a  $37^\circ C$  durante 24 h. Se internalizó con suspensiones coloidales de NPMs  $Fe_3O_4$  a una concentración de 10, 34 y  $67 \mu g$  de magnetita por ml de DMEM. Pasado el tiempo de internalización de 17 h, se retiró y se recogió en un falcón el sobrenadante y se lavó con PBS, el cual fue colectado conjuntamente con el sobrenadante. Para evaluar la viabilidad del cultivo se realizó el ensayo de doble marcación con BE y NA simultáneamente. Las concentraciones utilizadas de estos reactivos fueron de  $100 \mu g/ml$  en ambos casos, preparadas con PBS como solvente. Se agregó, por cada pocillo  $12 \mu l$  de cada uno de los reactivos, para todos los pocillos tanto tratados con nanopartículas como los cultivos control que son célula A549 que no han sido sometidas a NPMs. Pasado un tiempo de incubación de 5 min (en oscuridad) se realizó la toma de imágenes en microscopio invertido de fluorescencia, distinguiendo los estados de viabilidad en que se encuentra la célula (apoptótica, necrótica, viable).

Se centrifugó el sobrenadante de la limpieza de las células el cual había sido colectado en el falcón y se marcó con azul de tripán para determinar el número de células muertas

utilizando una cámara de neubauer. Esta medida resultó despreciable frente a la cantidad de células marcadas con NA y BE en los cultivos. Los controles positivos para apoptosis fueron realizadas con alcohol al 5%. Se tomaron del orden de 10 imágenes para cada cultivo. Los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones se presentan en la

*Figura 4.12.*

Si bien presentan mayor número de células apoptóticas y necróticas en los casos de cultivos que han sido expuestos a las diferentes concentraciones de coloide respecto del cultivo control, no se observa dependencia alguna o relación con la concentración utilizada. Para concentraciones mayores de  $10 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{ml}_{\text{DMEN}}$  se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas. Los valores de células necróticas estuvieron en un valor constante (al 2 % de variación) para las diferentes concentraciones. Se observa una disminución de las células viables con la concentración que llega al 10 % para la concentración de  $67 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{ml}_{\text{DMEN}}$ . Consideramos esta medida como suficiente para asegurar el uso de estas NPMs en los experimentos posteriores. Los ensayos de citotoxicidad posteriores se realizaron con citometria de flujo.



*Figura 4.12: Porcentaje de células (% células) vivas, apoptoóicas y necróticas luego de someter a células A549 a distintas concentraciones (0, 10, 34 y  $67 \mu\text{g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}/\text{ml}_{\text{DMEN}}$ ) de suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .*

#### 4.4.2. Citotoxicidad causada por NPMs recubiertas del tipo $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$ .

Si bien las NPMs de las suspensiones coloidales  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$  están compuestas de materiales inocuos tales como, ácido cítrico, agua y carozo de magnetita, cuya citotoxicidad fue analizada en el inciso anterior, cuando estas NPMs se mezclan con el medio de cultivo celular DMEN, pueden producir un cambio en sus propiedades químicas

y por consecuencia generar algún efecto tóxico en las células. Por lo tanto se determino la viabilidad en las células A549 utilizando Anexina-V e Ioduro de Propidio (IP). Este análisis es más representativo (en cuanto a mayor precisión y estadística) que el de NA/BE ya que se estudia una población celular mucho mayor debido a que la determinación se realiza con el citómetro de flujo.

Para realizar estos ensayos se incubaron las células con NPMs en botella mediana según el protocolo descrito en la sección 2.3.3 para 3 valores de concentración (34, 67 y 135  $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}_{\text{DMEM}}$ ). Paralelamente se prepararon los siguientes controles, control positivo de Ioduro de Propidio IP (+) y el control positivo de Anexina, A (+), que son células fijadas según el protocolo descrito en la sección 2.3.2 y teñidas con IP o Anexina, respectivamente. Se realizó un tercer control denominado control de autofluorescencia, el cual consiste en células A549 sin realizar el paso de fijación con paraformaldehído al 4%.

Antes de realizar la tinción con las dos marcas, se resuspendió a todos los cultivos en *Binding buffer*. Para la tinción se agregó 5 $\mu\text{l}$  Anexina a cada suspensión celular y se la dejó reaccionando 15 min en oscuridad a 4°C, antes de la medición en el citómetro e inmediatamente antes de realizar la medida se les agrega 5 $\mu\text{l}$  de IP.

Todas las muestras fueron medidas con el citómetro FACS calibur y analizadas con el software Win MDI (*Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry*). En la Figura 4.13 se muestra el análisis citométrico de doble marca Annexina V/IP para cultivos sometidos con 34, 67 y 135  $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}_{\text{DMEM}}$ .

En los gráficos las células quedan representada por puntos donde se representa la intensidad de fluorescencia roja del IP versus la intensidad de fluorescencia verde de la Isotiocianato de Fluoresceina (FITC) de la Anexina V. Se observa para del cultivo incubados con 135  $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}_{\text{DMEM}}$  una disminución en el porcentaje de células viables conjuntamente con un aumento en el porcentaje de células necróticas y apoptóticas con respecto a las otras concentraciones ensayadas. De este resultado se infiere que a partir de una concentración de 135  $\mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}_{\text{DMEM}}$ , la suspensión coloidal *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>* empieza a generar un efecto citotóxico.

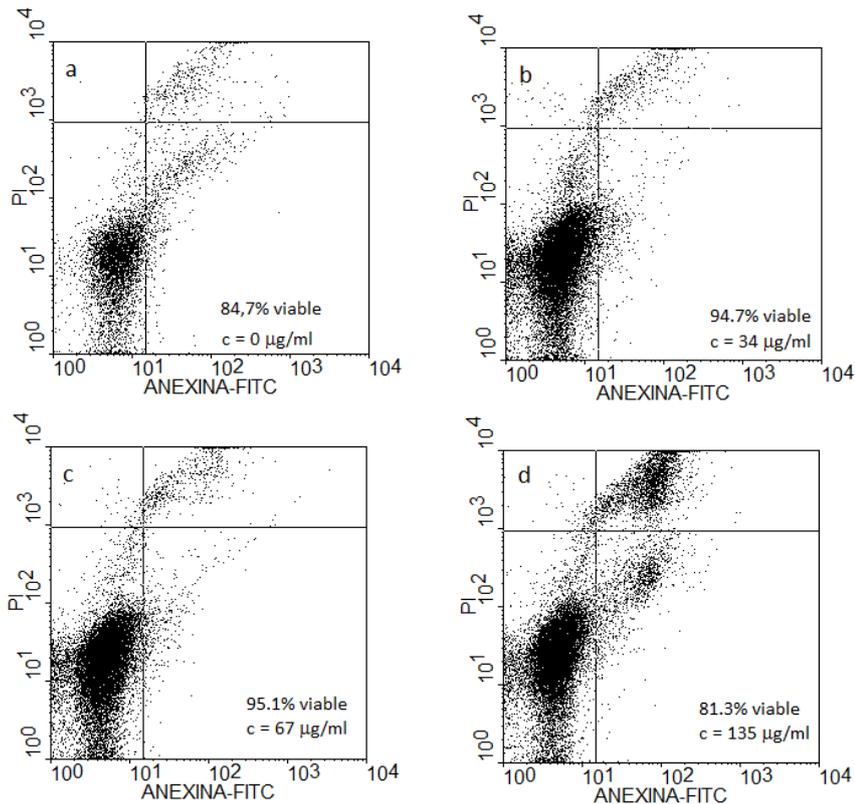
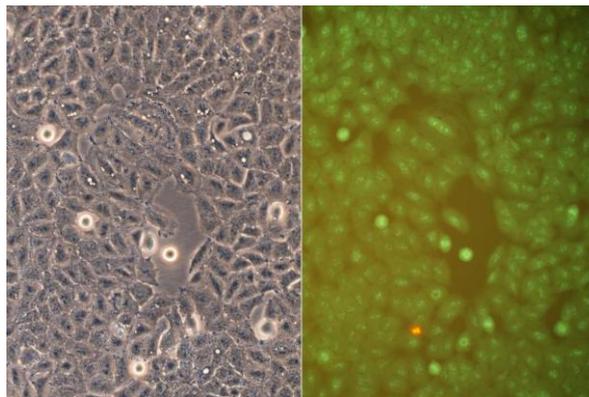


Figura 4.13: Medidas de citotoxicidad con Anexina y IP, luego de someter a las células a 34, 67 y 135  $\mu\text{g}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$ , correspondiente a la suspensión coloidal AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Los gráficos se representan en forma de puntos donde en el eje X se gráfica la intensidad de fluorescencia verde FITC de la Anexina y en el eje Y la fluorescencia roja de el IP.

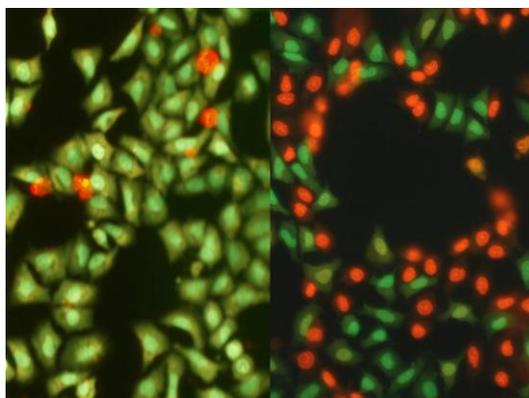
#### 4.4.3. Citotoxicidad $\text{Fe}_3\text{O}_4@A549$ por aplicación de campos de radiofrecuencia

En esta sección se muestra el resultado de la exposición a campos de radiofrecuencia de un cultivo de células A549 que internalizaron NPMs del coloide  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Para lo cual, se expuso al cultivo a  $f = 170 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 34 \text{ kA/m}$  durante 30 min. Se efectuó el registro la temperatura del cultivo durante el ensayo y no se detectó incremento de temperatura por encima del obtenido para un cultivo control (que no fue incubado con NPMs). Se cuantificó la muerte celular utilizando medidas de fluorescencia con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio en forma análoga al análisis presentado en la sección 4.4.1 para el coloide  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Para este ensayo se incubaron las células A549 con 34  $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  del coloide  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , bajo el protocolo descrito en la sección 2.3.3 d) y se las expuso al campo RF durante 30 min. Luego se determinó la viabilidad utilizando 40  $\mu\text{l}$  de la solución de marcación NA/BE, bajo el mismo protocolo descrito en la sección 4.4.1. La Figura 4.14 muestra imágenes de contraste de fase y fluorescencia para el cultivo incubado con 34  $\mu\text{g}/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  de la suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y en la Figura 4.15 se muestran dos zonas características del mismo cultivo después de ser tratado con RF.



*Figura 4.14: Medida de NA/BE de células incubadas con  $34 \mu\text{g/ml}_{DMEN}$  de suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  durante 17 h.*



*Figura 4.15: Medida de NA/BE del cultivo mostrado en la Figura 4.14 después del tratamiento con RF a  $f = 170 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 34 \text{ kA/m}$  durante 30 min.*

Los cultivo de células que han internalizado las NPMs y fueron expuestos a campos de RF presentan un aumento en la muerte celular (células apoptóticas y necróticas) del 12 % respecto de los cultivos que solo han internalizado las NPMs.

En la *Figura 4.16* se muestran imágenes TEM de un cultivo duplicado del utilizado para el ensayo de citotoxicidad por aplicación de RF.

Este experimento constata la inducción de muerte por aplicación de tratamiento de hipertermia magnética sin que se registre incremento de temperatura.

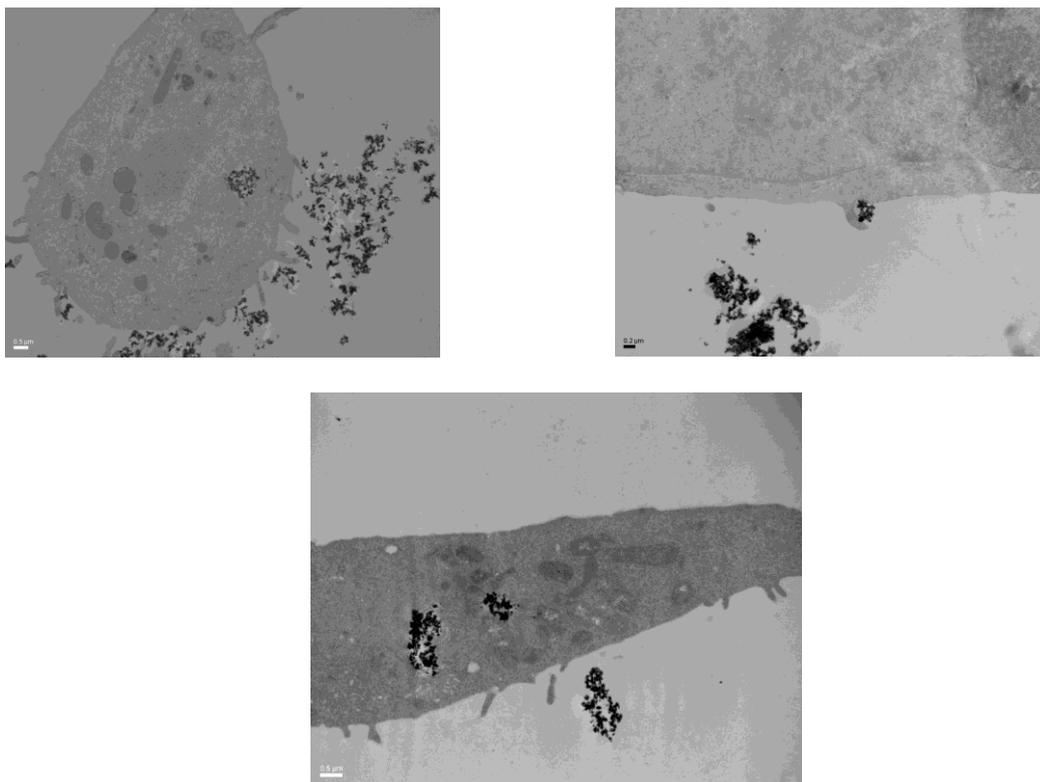


Figura 4.16: Imágenes TEM para cultivos internalizados con  $34 \mu\text{g/ml}_{\text{DMEN}}$  de suspensión coloidal  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y tratados 30 min con RF a  $f = 170 \text{ kHz}$  y un  $H = 34 \text{ kA/m}$ .

#### 4.5. Generación de las células A549 transducidas con vectores lentivirales *HSP70B-EGFP* y *CMV-EGFP*

Para la generación de los vectores lentivirales primero fue necesario amplificar los plásmidos recombinantes. Así, se realizó la transformación de bacterias competentes con los plásmidos *HSP70B-EGFP* y *CMV-EGFP*<sup>15</sup> según el protocolo descrito en la sección 2.4.1 y la minipreparación descrita en la sección 2.4.2 para producir la liberación del plásmido de las bacterias transformadas. Luego, para comprobar la identidad de esos plásmidos, el ADN plasmídico obtenido en la minipreparación fue digerida con enzimas de restricción, según el método descrito en la sección 2.4.3 y estos fragmentos se sembraron en un gel de agarosa junto a los patrones de peso molecular estandar de ADN para realizar la corrida electroforética.

En la *Figura 4.17* se muestra el patrón de bandas correspondiente a los fragmentos de los plásmidos *HSP70B/GFP* y *CMV/GFP*. Las bandas de 0.742/ 1.216 y 0.700/1.100 kpb sirvieron para identificar a los vectores lentiviral *HSP70B/EGFP* y *CMV/EGFP* respectivamente.

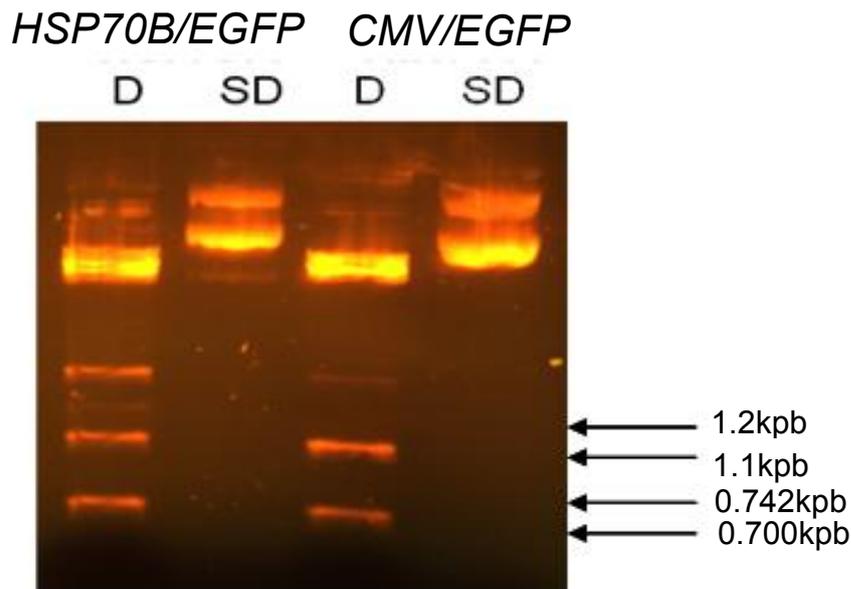


Figura 4.17: Corrida electroforética correspondiente al ADN plasmídico de *HSP70B/EGFP* y *CMV/EGFP* sin digerir (*SD*) y digeridos (*D*) con las enzimas de restricción *AgeI* y *SaiI*, en agar para identificar los plásmidos de interés.

Una vez elegida la minipreparación que contenía el plásmido de interés, se procedió a realizar una expansión a mayor escala (maxipreparación) con el fin de obtener cantidades preparativas del plásmido.

Estos vectores poseen la información genética que codifica para la expresión de la proteína verde fluorescente (*EGFP*) bajo la acción del promotor inducibles por la temperatura *HSP70B* (heat shock protein) o bajo el promotor constitutivo del citomegalovirus *CMV*, que da lugar a la expresión de *EGFP* de manera constitutiva y que sirvió como vector control. Ambos poseen la información necesaria para la resistencia a Neomicina (Neo). Se muestra de manera esquemática los 2 lentivirus en la Figura 4.18



Figura 4.18: Esquema de los dos vectores lentivirales usados en este trabajo, generados por F. Noyan y colaboradores<sup>15</sup>. Se usó el promotor (P) del citomegalovirus (*CMV*) en caso del lentiviral *CMV/GFP* o el promotor inducibles por temperatura *HSP70B* (heat shock protein) para el caso del lentivirus *HSP70B/EGFP*, ambos promotores dirigen la expresión de la proteína verde fluorescente aumentada o *EGFP* (enhanced green fluorescent protein). Estos vectores incluyen el elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (*WPRE*), el sitio de unión de primer ( $\theta$ ), el elemento de respuesta a rev (*RRE*), la secuencia central de polipurinas (*cPPT*) y una señal de empaquetamiento ( $\psi$ ). Ambos poseen la información necesaria para la resistencia a Neomicina (*Neo*) bajo la acción del promotor (*PGK*).

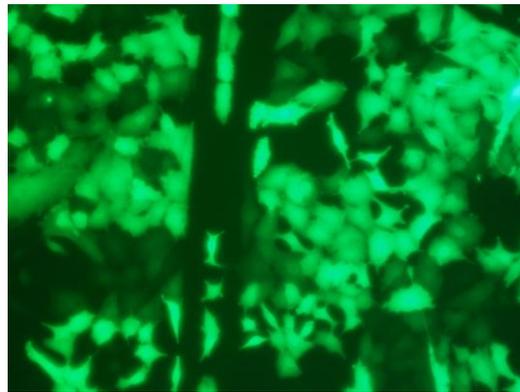
Los vectores lentivirales se generaron mediante la transfección de células 293T con los plásmido de transferencia junto con los plásmido pMDLg/pRRE, pCMV-VSVG y pRSV-REV, utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio como se describe en la

sección 2.4.6. Por último para obtener las células modificadas *A549 (con promotor constitutivo CMV-EGFP)* y *A549 (con promotor inducible HSP70b-EGFP)* se realizó la transducción de la línea celular A549 utilizando los vectores lentivirales *CMV-EGFP* y *HSP70B-EGFP*, según el protocolo descrito en la sección 2.4.8. A estas líneas celulares se las denominaron:

*A549(HSP70B-EGFP)*

*A549(CMV-EGFP)*

Ambos tipos celulares poseen además resistencia al antibiótico neomicina, esto le confiere una correcta propagación. Las células *A549 (CMV-EGFP)* poseen una expresión de EGFP de manera constitutiva. En la *Figura 4.19* se muestra una microfotografía de fluorescencia de un cultivo de células *CMV/EGFP*.

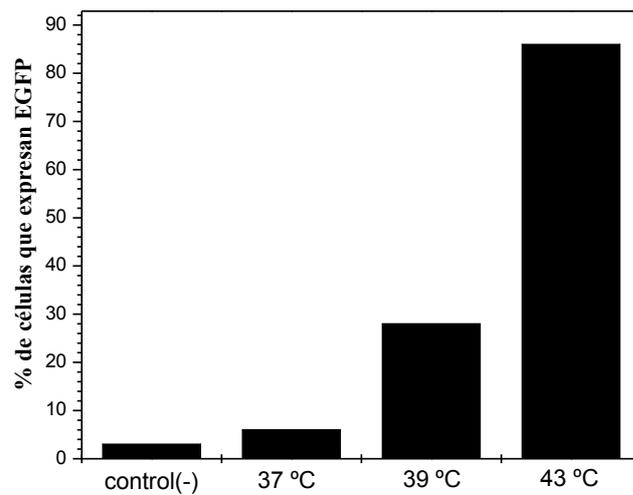


*Figura 4.19: Microfotografía de fluorescencia de un cultivo celular A549 (CMV-EGFP). Objetivo 20 X.*

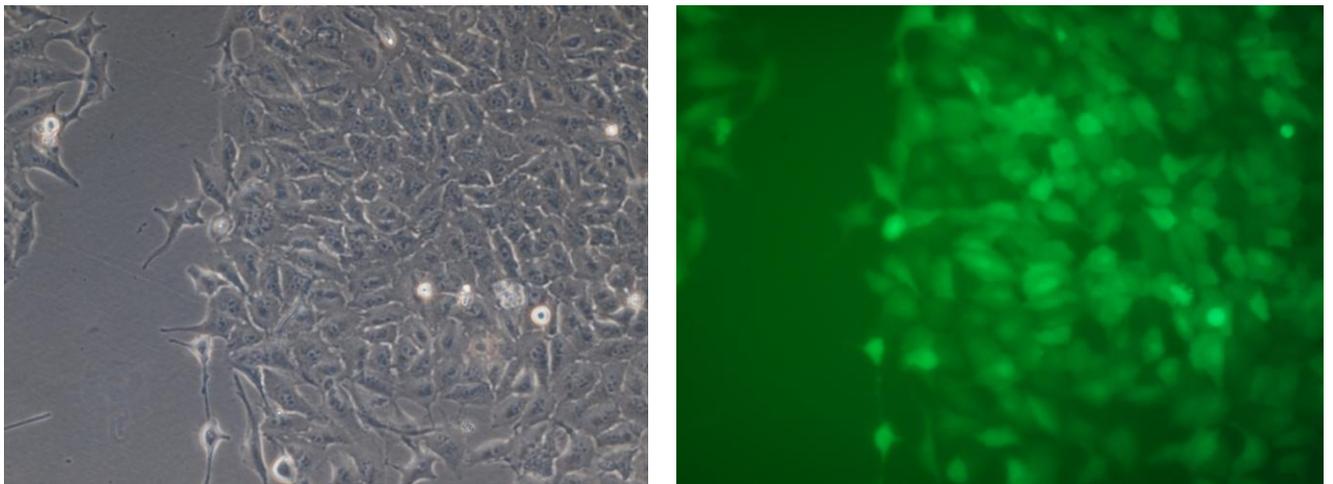
#### **4.5.1. Caracterización térmica de las células A549(HSP70B-EGFP).**

Con el objetivo de caracterizar térmicamente las líneas celulares *A549 (HSP70B-EGFP)*, se determinó que porcentaje de células expresan EGFP respecto del total de células vivas, luego de que se las mantuvo durante 60 min en baño térmico a 37, 39 o 43 °C. Para tal fin, se cultivaron las células *HSP70B-EGFP* según el protocolo de cultivo en placa de petri descrito en la sección 2.3.3. A estos cultivos se los mantuvieron a 37 °C, 39 °C o 43 °C durante 60 min y 24 h. después se determinó el porcentaje de células que expresan EGFP con el citómetro de flujo, para cada temperatura ensayada. Este resultado se muestra en la *Figura 4.20*. Se pudo observar que cuando se somete a las células a 39 °C hay un ~ 25 % de porcentaje de células que expresan EGFP por encima del **control**-, que son células que no fueron mantenidas en baño térmico y para el cultivo sometido a 43 °C este porcentaje se incremento a un 80 % aproximadamente

En la *Figura 4.21* se muestran microfotografías de contraste de fase y de fluorescencia del cultivo mantenido durante 60 min a 43 °C. Esta imagen es consistente con los resultados de FACS, ya que se ve un incremento exponencial del porcentaje de células que expresan fluorescencia verde con el incremento de temperatura.



*Figura 4.20: Porcentaje de células que expresan EGFP, para cultivos de células A549 (HSP70B-EGFP) mantenidos en baño térmico a 37 °C, 39 °C o 43 °C durante 60 min. Los porcentajes mostrados en cada gráfico se corresponden a la proporción de células que expresan EGFP respecto del total de células.*



*Figura 4.21: Microfotografías de cultivos de células HSP70B-EGFP mantenidos en baño térmico durante 60 min a 43 °C, Objetivo 20X.*

## 5. Metodología de evaluación del aumento de temperatura celular

El sensado de temperatura en cultivos en monocapa del tipo  $X@A549(HSP70B-EGFP)$  (con  $X= Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$ ) expuestos a tratamiento de HM sistemáticamente indicó que el cultivo no incrementa significativamente su temperatura, llegando a valores muy inferiores a los necesarios para inducir muerte. Este hecho se ejemplifica en la *Figura 5.1*. Este tipo de resultado había sido previamente reportado en células tumorales Hela (humanas de útero) internalizadas con óxido de perovskita<sup>13</sup> tipo  $La_{0.56}(SrCa)_{0.22}MnO_3$  y células dendríticas internalizadas con NPMs de óxido de Fe (ref. 14). Mas recientemente Di corato y col. reportaron una gran disminución en la eficiencia de calentamiento de un conjunto variado de NPMs en células de carcinoma de ovario SKOV-3. Estos autores asociaron este hecho a la inhibición del mecanismo de relajación de Brown en el entorno celular<sup>90</sup>, lo cual previamente había sido propuesto por Fortin y col<sup>106</sup>. En ninguno de estos trabajos se contempla la posibilidad de otro mecanismo ni se aborda la problemática de la determinación del incremento de temperatura local en la célula, sin incremento de temperatura global del cultivo. A fin de abordar esta hipótesis de calentamiento intracelular local, en este capítulo se discuten experiencias que involucran la evaluación de la expresión génica en cultivos del tipo  $X@A549(HSP70B-EGFP)$  (con  $X= Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$ ) luego de la exposición a campos de radiofrecuencia. El ADN de estas células está modificado de modo que expresa EGFP bajo estrés. Ha sido demostrado que el incremento de temperatura es el principal estímulo que induce estrés<sup>15</sup>. El estrés y sus aumentos relativos se determinan contando con citometría de flujo el porcentaje de células que expresan EGFP. La metodología empleada para este fin se muestra esquemáticamente en la *Figura 5.2* y se describe detalladamente en la sección 5.3. Para diferenciar el estrés inducido por aumento de temperatura del posible estrés inducido por la aplicación de campos de RF o por la incorporación de NPMs, se cuantifica la expresión de EGFP en cultivos  $A549(HSP70B-EGFP)$  después de la aplicación de campos de RF (Sección 5.1) en cultivos  $X@A549(HSP70B-EGFP)$  (Sección 5.2).

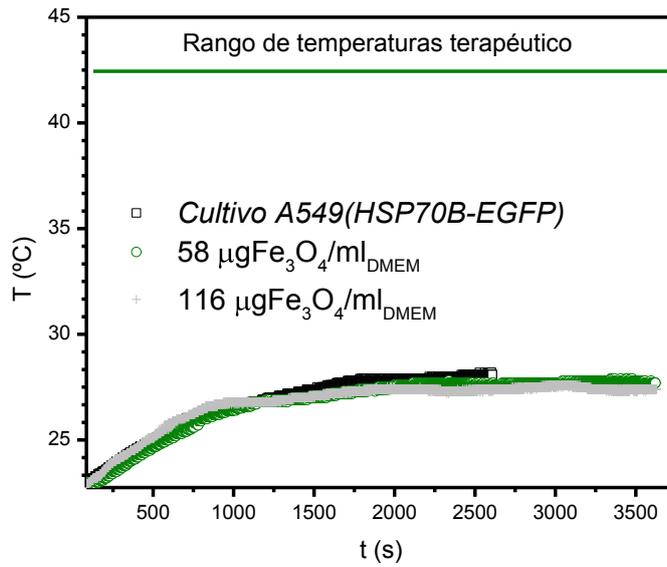


Figura 5.1: curvas de calentamiento registradas durante la aplicación de campos de RF de  $f = 170 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 34 \text{ kA/m}$  en cultivos de A549(HSP70B-EGFP) e incubados con dos concentraciones de suspensión coloidal AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en DMEM.

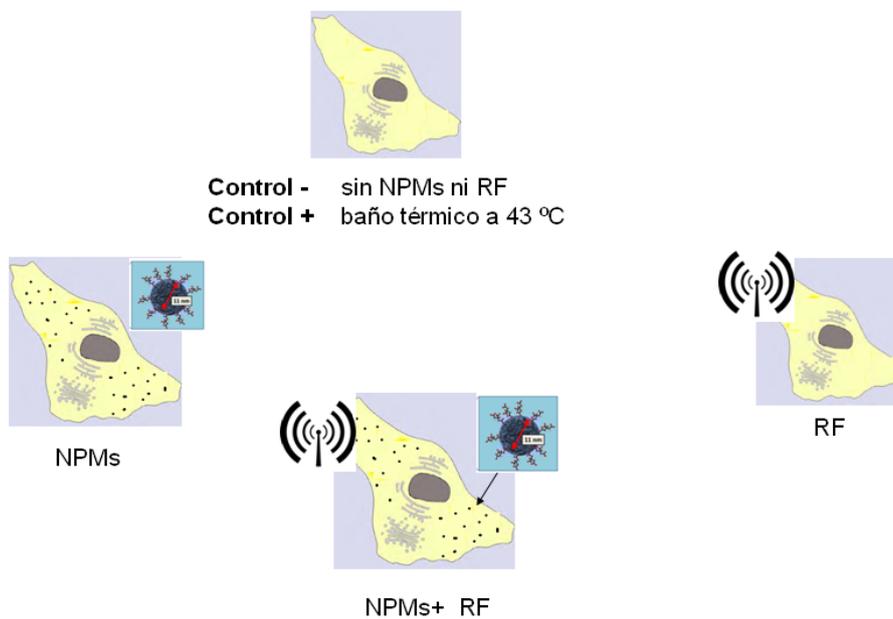
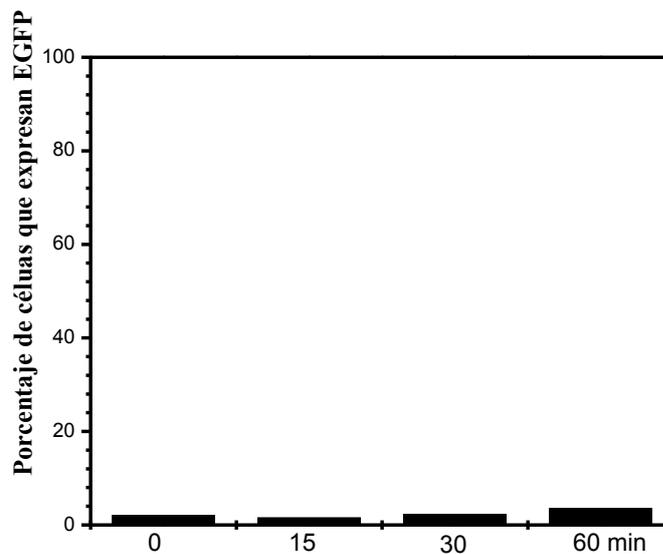


Figura 5.2: Esquema de ensayos simultáneos que componen la metodología para evaluar mediante el porcentaje de células que expresa EGFP la ocurrencia de aumento de temperatura intracelular en tratamientos de hipertermia magnética.

## 5.1. Estrés en células *A549(HSP70B-EGFP)* por aplicación de radiofrecuencia

En esta sección se determina la inducción de la expresión génica por aplicación de campos de RF en células *A549(HSP70B-EGFP)*.

Se expusieron los cultivo de células *A549(HSP70B-EGFP)* a campos RF de  $f=170$  kHz y  $H_0 = 34$  kA/m durante 0, 15, 30 y 60 min, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.4. En la *Figura 5.3* se muestran un gráfico de porcentajes de células que expresan EGFP para cada tiempo de aplicación ensayado del cual se infiere que la aplicación de radiofrecuencia para tiempos menores a 60 min, no induce un incremento en el porcentaje de células que expresan EGFP.



*Figura 5.3: Porcentajes de células que expresan EGFP en cultivos de células *A549(HSP70B-EGFP)* para los diferentes tiempos de aplicación de RF de  $f=170$  kHz y  $H_0 = 34$  kA/m.*

## 5.2. Estrés en células *X@A549(HSP70B-EGFP)*

En esta sección se analiza la expresión de EGFP originada por la internalización de NPMs. Se determinó la proporción de células que expresaron EGFP luego de ser incubadas con 58, 116 y 232  $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  de la suspensión coloidal *AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>*. Para realizar esta experiencia se siguió los protocolos de cultivo e internalización descritos en la sección 2.3.5. En la *Figura 5.4* se muestran los porcentajes de expresión para las diferentes concentraciones ensayadas. Se observa un incremento en el porcentaje de células que expresan EGFP con el aumento de la concentración de nanopartículas. Por lo tanto y para diferenciar la inducción de la expresión génica debida a la incorporación de NPMs de la inducida por el tratamiento de HM se eligieron concentraciones  $\leq 58$   $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  para los ensayos posteriores.

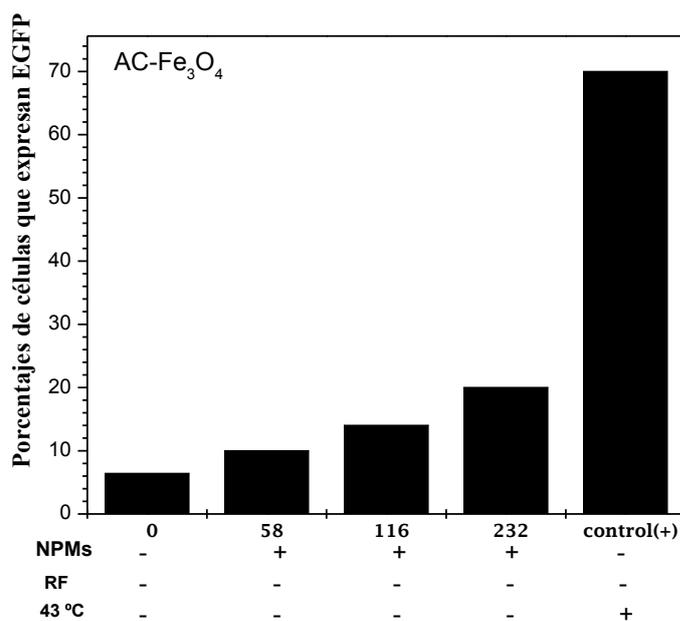


Figura 5.4: Porcentajes de células que expresan EGFP luego de incubarlas con 0, 58, 116 y 232  $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  de la suspensión coloidal AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

### 5.3. Estrés en células X@A549(HSP70B-EGFP) inducido con campos de RF

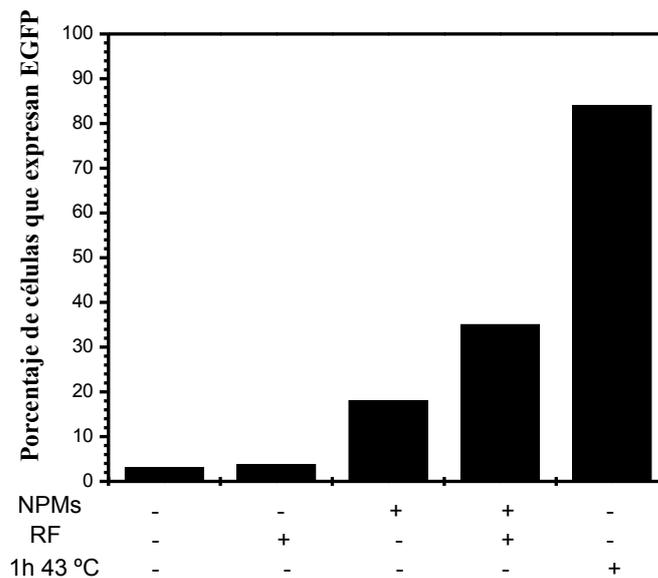
Esta metodología consiste en determinar el porcentaje de células A549(HSP70B-EGFP) que expresan EGFP, luego de ser incubadas con una dada concentración de suspensión coloidal estable ( $\mu\text{gFe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$ ) según el protocolo descrito en la sección 2.3.3d y posteriormente expuestas durante un tiempo determinado a campos de RF en *dewar* o en baño térmico a 37 °C según se describe en la sección 2.2.2. Los diferentes ensayos simultáneos que componen la metodología experimental desarrollada para evaluar si ocurre un incremento de temperatura local cuando se exponen las células X@A549(HSP70B-EGFP) a un campo de radiofrecuencia está mostrada esquemáticamente en la Figura 5.2. Esta metodología incluye varios ensayos simultáneos los cuales se describen a continuación:

- **control +**: evaluación de la expresión de EGFP en células A549(HSP70B-EGFP) incubadas durante 60 min a 43 °C en baño térmico. Se realiza este ensayo para corroborar el buen funcionamiento del promotor, es decir, que el mismo se active con el incremento de temperatura a 43 °C.
- **control -**: evaluación de la expresión de EGFP en células A549(HSP70B-EGFP) que no fueron expuestas a campos de RF ni incubadas con NPMs. Este ensayo permite controlar que las células no hayan sufrido algún otro tipo de estrés que active el promotor HSP70B durante el experimento.
- **NPMs**: evaluación de la expresión de EGFP en células X@A549(HSP70B-EGFP) con X=  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , AC- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ . Se realiza este ensayo para evaluar el efecto en la expresión génica de la incorporación de NPMs.
- **RF**: evaluación de la expresión de EGFP en células A549(HSP70B-EGFP) expuestas a campos de RF. Este ensayo se realiza para evaluar el efecto de campos de RF en la expresión de EGFP.

- **NPMs + RF:** permite evaluar el efecto de la exposición de las células  $X@A549(HSP70B-EGFP)$  a campos de RF en la expresión de EGFP.

### 5.3.1. Efecto de campos de RF en $AC-Fe_3O_4@A549(HSP70B-EGFP)$ .

El porcentaje de células  $A549(HSP70B-EGFP)$  que expresan EGFP luego de ser incubadas con  $58 \mu g Fe_3O_4 / ml_{DMEM}$  de la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4$  y expuestas durante 60 min a campos magnéticos de RF ( $f = 170 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 34 \text{ kA/m}$ ) se muestran en la *Figura 5.5*.



*Figura 5.5:* Porcentaje de células que expresan EGFP luego de ser incubadas con  $58 \mu g Fe_3O_4/ml_{DMEM}$  de coloide  $AC-Fe_3O_4$  y expuestas durante 60 min a campos de RF de  $f = 170 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 34.4 \text{ kA/m}$ .

Se observa solo un 16 % de incremento en el porcentaje de células  $AC-Fe_3O_4@A549(HSP70B-EGFP)$  que expresan EGFP por efecto del campos de RF respecto a estas mismas células sin exposición al campo. Con el propósito de optimizar la expresión de EGFP se modificaron de a una por vez las siguientes condiciones:

- confluencia celular al inicio de la incubación con la suspensión coloidal,
- concentración de la suspensión coloidal magnética  $AC-Fe_3O_4$  ( $\mu g Fe_3O_4/ml_{DMEM}$ ) con la que se incuban las células,
- tiempo de incubación con la suspensión coloidal,
- tiempo de aplicación del campo de RF.

La variación de estas las condiciones experimentales no resultó en una variación de la expresión de EGFP. Estos experimentos indican que la baja expresión podría estar relacionada con la baja potencia específica disipada por las NPMs. Esta potencia fue de 15.5 w/g para las NPMs en suspensión coloidal acuosa en las mismas condiciones de excitación. La elección de la suspensión había sido realizada sobre la base de los valores de SAR obtenidos a  $f = 267 \text{ kHz}$  y  $H_0 = 41 \text{ kA/m}$  para un amplio conjunto de suspensiones

coloidales de alta estabilidad (sección 3.2.4). La suspensión coloidal elegida presentaba el mayor valor de 41.4 w/g.

### 5.3.2. Efecto de campos de RF en $X@A549(HSP70B-EGFP)$ (con $X= Fe_3O_4, AC-Fe_3O_4$ y $SiO_x-Fe_3O_4$ )

A fin de inducir una mayor expresión de EGFP luego de exponer a campos de radiofrecuencia a células  $A549(HSP70B-EGFP)$  que han internalizado NPMs, se eligió trabajar con NPMs de mayor momento magnético (es decir  $M_s$  mas cercanos al valor de *bulk*) y mayor SAR en el estado de suspensión coloidal acuosa  $SiO_x-Fe_3O_4$  y  $Fe_3O_4$  cuyas caracterizaciones fueron mostradas en la sección 4.2. Estas NPMs serían más apropiadas para generar un calentamiento intracelular que las del coloide  $AC-Fe_3O_4$  debido a que presentan mayor  $M_s$  y mayor SAR en el estado de suspensión acuosa. Adicionalmente, se varió la temperatura del entorno de los cultivos durante la exposición a campos RF, de ambiente a un valor fisiológico de 37 °C. El baño térmico utilizado fue mostrado en la *Figura 2.2*. El uso de este baño térmico limita el rango de frecuencias según se explicó en la sección 4.2 y este rango no incluye las condiciones utilizadas en la sección 5.3.1.

A fin de trabajar en las mejores condiciones de excitación, se exploraron los valores de SAR bajo diferentes condiciones de  $f$  y  $H_0$  para  $SiO_x-Fe_3O_4$  según se describió en la sección 4.2. El mayor valor de SAR se obtuvo a  $f= 128$  kHz y  $H_0 = 20.3$  kA/m y fue de 67 w/g. Este valor es superior al obtenido para la suspensión coloidal  $AC-Fe_3O_4$  bajo las condiciones de medida anteriores.

El resultado del porcentaje de células que expresan EGFP, cultivadas y cargadas con NPMs según protocolos descritos en la sección 2.3.4, para diferentes tiempos de aplicación de campos de RF (135, 150 y 180 min) bajo estas nuevas condiciones de medida y en baño térmico a 37 °C se muestra en la *Figura 5.6*. Se observa un incremento en el porcentaje de células que expresan EGFP con el tiempo de exposición. Por lo tanto, se limitan los siguientes ensayos a tiempo de exposición menores de 150 min.

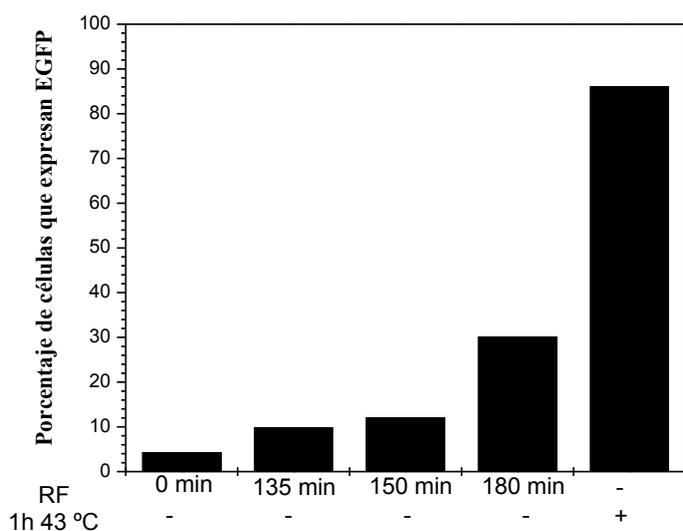


Figura 5.6: porcentaje de células que expresan EGFP para cultivos celulares expuestos a diferentes tiempos de aplicación de RF ( $f = 128$  kHz y  $H_0 = 20.3$  kA/m).

A continuación, se determinó el porcentaje de células que expresa EGFP para las concentraciones (5, 18, 29, 58 y  $116 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$ ) de las suspensión coloidales  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ , siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.3.5. En la Figura 5.7 se muestran como estos porcentajes de expresión aumentan con la concentración. Por lo tanto y para evitar la inducción de la expresión génica por incorporación de NPMs se eligieron concentraciones  $\leq 29 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$  para los ensayos posteriores.

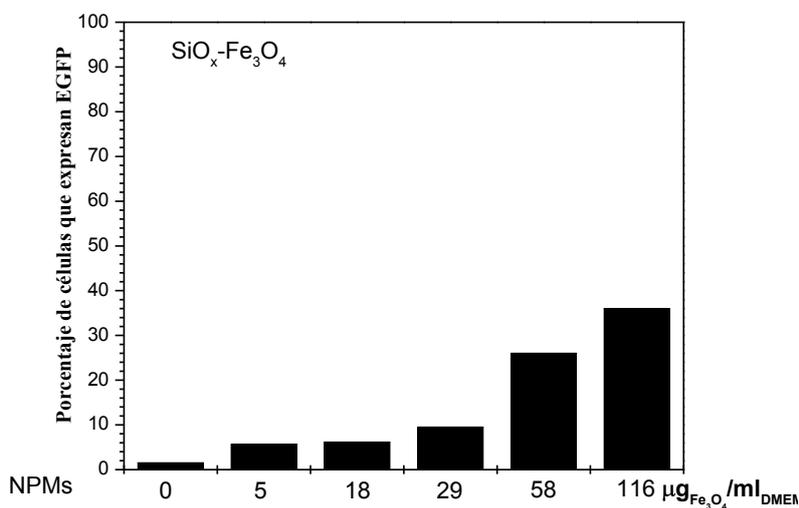
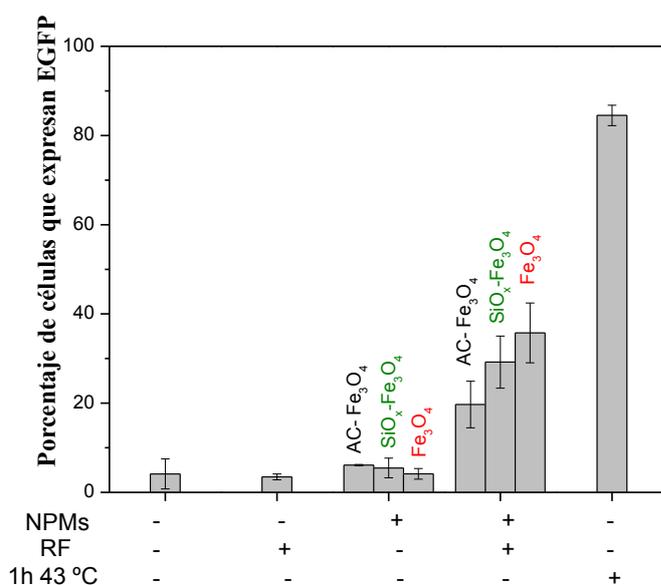


Figura 5.7: porcentajes de células que expresan EGFP en cultivos celulares incubados en contacto con distintas concentraciones de  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$  en DMEM.

Una vez definidas las condiciones experimentales óptimas de  $f = 128$  kHz y  $H_0 = 20.3$  kA/m,  $H_0$ , tiempo de aplicación de los campos de RF de 135 min y concentración de la suspensión coloidal de  $29 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}_{\text{DMEM}}$ , se comparó el efecto para los tres tipos de

NPMs seleccionadas, es decir se estudiaron células  $X@A549(HSP70B-EGFP)$  con  $X=SiO_x-Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $Fe_3O_4$ . Los resultados de estos ensayos, junto con todos sus controles descriptos en la sección 5.3, se muestran en la *Figura 5.8*. Estos ensayos fueron realizados por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante contrastes de valores medios usando el test t de Student.



*Figura 5.8: porcentajes de células A549(HSP70B-EGFP) que expresan EGFP luego de ser incubadas con  $29 \mu g Fe_3O_4/ml_{DMEM}$  de suspensión coloidal de  $SiO_x-Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $Fe_3O_4$  y expuestas durante 135 min a campos de RF de  $f = 128 \text{ kHz}$  y  $H = 20.3 \text{ kA/m}$ , y porcentaje de expresión de sus respectivos controles. Estos ensayos fueron realizados por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante contrastes de valores medios usando el test t de Student.*

Para determinar el efecto de exponer a las células a campos de RF. El análisis estadístico, contraste de valores medios entre el control – y las células que sí fueron expuestas a campos de RF, reportó que no hay diferencias significativas entre ambos cultivos ( $p = 0.75231$ ). Esto indica que la aplicación de campos de RF no ejerce efecto sobre la expresión de EGFP en las células  $A549(HSP70B-EGFP)$ . Con lo cual se verifica la situación experimental buscada en la sección 5.1.

Para estudiar el efecto de incubar las células con los coloide  $Fe_3O_4$ ,  $SiO_x-Fe_3O_4$  o  $AC-Fe_3O_4$ , se contrastaron las medias entre el control negativo (células sin internalizar) y las células incubadas con cada una de las NPMs. Los análisis estadísticos reportaron que no hay diferencias significativas entre cada par comparado ( $p = 0.99525$ ,  $p = 0.59582$  y  $p = 0.48913$  para  $Fe_3O_4$ ,  $SiO_x-Fe_3O_4$  y  $AC-Fe_3O_4$ , respectivamente). Esto indica que la internalización con estas NPMs no presenta un efecto significativo en la expresión de EGFP. Con lo cual se verifica la situación experimental buscada en la sección 5.2.

Luego, se realizaron contrastes de medias para evaluar el efecto de la exposición a campos de RF a células que han incorporado NPMs de los diferentes coloide. En este análisis estadístico se compararon las células con cada tipo de NPMs y expuestas a campos de RF

contra sus dos controles: células que solo han incorporado NPMs (denominando al estadístico p como  $p_{\text{NPM}}$ ) y células sin NPMs que han sido expuestas a campos magnéticos (denominado al estadístico p como  $p_{\text{RF}}$ ).

Se obtuvieron valores del estadísticos  $p_{\text{NPM}} = 0.02253$  y  $p_{\text{RF}} = 0.00286$  para  $X=\text{Fe}_3\text{O}_4$ ;  $p_{\text{NPM}} = 0.00275$  y  $p_{\text{RF}} = 0.00162$  para  $X=\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$  y  $p_{\text{NPM}} = 0.06674$  y  $p_{\text{RF}} = 0.0102$  para  $X=\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$ . Por lo tanto, para  $X=\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$  el aumento en el porcentaje de células que expresan EGFP en los cultivos internalizados y luego expuestos a campos de RF, respecto a sus controles, es estadísticamente significativo. Mientras que para  $X=\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$  las células que internalizaron estas NPMs y luego fueron expuestas a campos de RF no presentan diferencia significativa en el nivel de expresión de EGFP con respecto a las células que solo fueron internalizadas. Por el contrario, sí la hay en el porcentaje de células que expresan EGFP cuando se las compara con los cultivos no internalizados y expuestos a campos de RF.

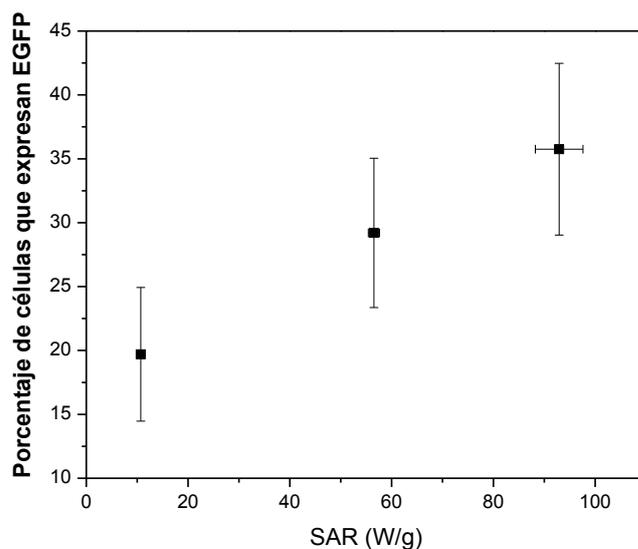
El conjunto de estos resultados indica que hay un efecto sobre el porcentaje de células que expresan EGFP en los cultivos internalizados y luego expuestos a campos de RF, siendo este efecto mayor cuando los coloides utilizados son  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ , y menor para el coloide  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$ .

No se observan diferencias significativas en el % de células que expresan EGFP al comparar ensayos de HM utilizando diferentes coloides. Los valores estadísticos obtenidos para las estas comparaciones son:  $p = 0.32746$  para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ,  $p = 0.11662$  para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$ , y  $p = 0.1625$  para  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ . En la *Tabla 5.1* se comparan los % EGFP para las células incubadas con las distintas suspensiones coloidales ensayadas (X) junto con el SAR de las suspensiones y la captación media de NPMs alcanzada por las células para incubación a  $29 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$  para cada coloide.

X	$d_{\text{XRD}}$ (nm)	Ms ( $\text{Am}^2/\text{kg}$ )	SAR (W/g)	C (pg/cel)	EGFP (%)	EGFP/C (cel/pg)	CxMs $10^{-15} \text{Am}^2/\text{cel}$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	17	60	92.9	20.4	36	1.76	1224
$\text{SiO}_x\text{Fe}_3\text{O}_4$	10	92	56.5	9.0	29	3.22	828
$\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$	18	28	10.7	12.4	17	1.37	347

*Tabla 5.1:  $d_{\text{XRD}}$  es el tamaño de la NPM determinado por XRD, Ms magnetización de saturación a temperatura ambiente de las suspensiones coloidales acuosas X y su SAR a campos de RF de  $f=128 \text{ kHz}$  y  $H_0= 20.3 \text{ kA/m}$ . C es la captación media, determinada con VSM y expresada en  $\text{pgFe}_3\text{O}_4/\text{cel}$ , alcanzado por las células A549(HSP70B-EGFP) por incubación con  $29 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4/\text{ml}$ . EGFP indica el porcentaje de células X@A549(HSP70B-EGFP) con  $X= \text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  que expresan EGFP luego de exposición durante 135 min a la condición de excitación mencionada. CxMs representa el momento magnético de saturación por célula.*

Como se mencionó y se ejemplificó en la *Figura 5.1* en ninguno de estos ensayos se registró un incremento global de temperatura en el cultivo. Por esta razón no fue posible determinar el SAR intracelular. Sin embargo se observa una correlación entre el % de expresión de EGFP y la capacidad específica de disipación de las NPMs en suspensión acuosa (ver *Figura 5.9*). A mayor SAR de las NPMs en suspensión acuosa mayor % de EGFP en el cultivo.



*Figura 5.9: porcentaje de células que expresan EGFP de los cultivos incubados con 29  $\mu\text{g/ml}$  de AC-  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiOx-Fe}_3\text{O}_4$  o  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y expuestas durante 135 min. a campos magnéticos de RF ( $f=128$  kHz y  $H_0= 20.3$  kA/m), en función del valor del SAR de cada coloide determinado bajo las mismas condiciones de  $H_0$  y  $f$ .*

Por otro lado, se debe tener en cuenta la captación, una mayor captación indica un mayor número de elementos calefactores (NPMs) en la célula. La expresión de EGFP se espera que aumente con el producto del número de partículas en la célula (relacionado con la Captación) y con la eficiencia de calentamiento de la partícula en la célula. Como ya se mencionó, esta eficiencia no se puede determinar en los cultivos y el uso del SAR determinado en la suspensión acuosa en principio no sería adecuado para el análisis porque el tiempo de relajación de Brown depende de la viscosidad del medio, por lo cual al ir de la suspensión acuosa a la célula se podría bloquear este mecanismo.

En la *tabla 5.1* se lista el cociente entre el % EGFP y la captación, a fin de definir una magnitud específica. Esta magnitud aumenta con la Ms de las NPMs como se muestra en la *Figura 5.10* siendo esta última una propiedad de las NPMs que no cambia con la internalización. Recordemos que en general el SAR depende linealmente con  $\text{Ms}^2$  independientemente del medio en la cual las NPMs se encuentren además de otros parámetros.

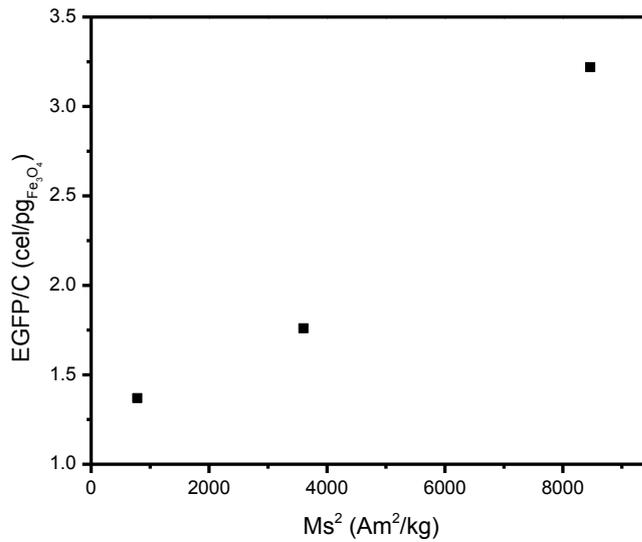


Figura 5.10: cociente entre el porcentaje de células X@A549(HSP70B-EGFP) con X= SiO<sub>x</sub>-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, AC-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (incubación con 29 µg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> /ml<sub>DMEM</sub>) que expresan EGFP después de exposición durante 135 min a campos de RF de f=128 kHz y H<sub>0</sub>= 20.3 kA/m y la captación (C) vs. la magnetización de saturación Ms de las NPMs a temperatura ambiente.

La dependencia del SAR con parámetros estructurales y magnéticos se mostró en la ecuación (1.36)) que reescribimos aquí en forma simplificada eliminando las variables que se dejan constantes en los experimentos a menos de la frecuencia  $f$

$$(5.1) SAR \propto V M_s^2 \frac{2\pi f\tau}{1 + 2\pi f\tau} = V M_s^2 ff$$

Esta expresión muestra que el SAR depende de Ms, V y un factor de frecuencia ( $ff$ ) que contiene la dependencia con el tiempo de relajación, es decir depende explícitamente del mecanismo involucrado y además depende del volumen de la partícula V (ecuaciones 1.21 y 1.22). La ecuación indica para un dado mecanismo una dependencia con el tamaño y con Ms. En el análisis de un amplio conjunto de muestras presentado en el capítulo 3, se verificó que la dependencia mas fuerte es con la Ms. Esto sugiere una relación entre el SAR intracelular y el % de expresión de EGFP.

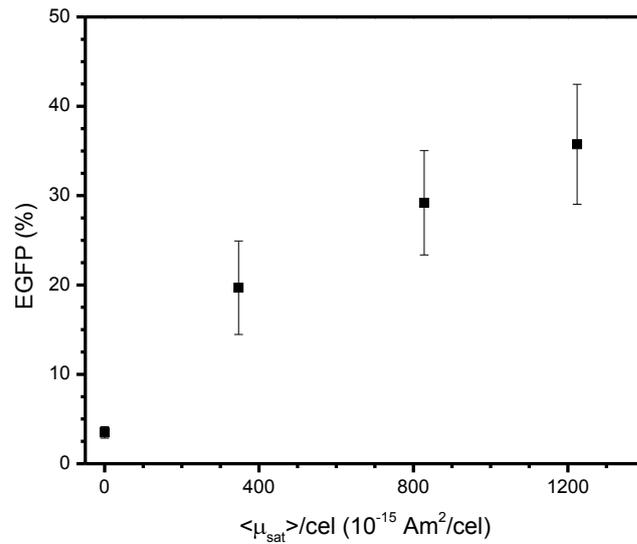


Figura 5.10: porcentajes de células X@A549(HSP70B-EGFP) con X=  $\text{SiO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{AC-Fe}_3\text{O}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (incubación con  $29 \mu\text{g Fe}_3\text{O}_4 / \text{ml}_{\text{DMEM}}$ ) que expresan EGFP después de exposición durante 135 min a campos de RF de  $f=128 \text{ kHz}$  y  $H_0= 20.3 \text{ kA/m}$  vs. el momento magnético medio de saturación por célula  $\langle \mu_{sat} \rangle$ . Se incluye el % EGFP del cultivo que no fue internalizado pero sí fue expuesto a campo magnético RF asignándole un valor de  $\langle \mu_{sat} \rangle = 0$ .

Alternativamente es posible graficar, como se muestra en la figura 5.10, el porcentaje EGFP en función de CxMs siendo esta cantidad el momento magnético medio de saturación por célula  $\langle \mu_{sat} \rangle = N_p V \rho M_s$ , donde  $N_p$  es el número medio de partículas incorporadas por célula y  $V$  es el volumen de la partícula. El % de expresión aumenta con  $\langle \mu_{sat} \rangle$  reflejando la dependencia de SAR con  $V M_s$  y como ya se mencionó el SAR es proporcional a  $V M_s^2$  reforzando la idea de una relación entre el SAR intracelular y el % de expresión de EGFP.

Finalmente, señalamos que para el caso de internalización con coloides que disipen por el mecanismo de Néel, en cuyo caso se puede descartar un cambio de mecanismo al internalizar, sería posible con esta metodología estimar la energía liberada en cada célula  $E(\mu\text{J})$ . Esta energía se obtendría como:

$$E = SAR \times C \times t_{RF}$$

donde SAR es la disipación relacionada con el mecanismo de Néel que es independiente del medio que aloja a las nanopartículas y  $t_{RF}$  es el tiempo de exposición de los cultivos al campo de RF.

En la Figura 5.11 a fin de mostrar como se aplicaría esta estimación a nuestros datos se grafica la dependencia del porcentaje de células que expresan EGFP en función de la energía liberada en cada célula  $E$ , incluyendo el % expresión EGFP del cultivo que no fue internalizado pero sí fue expuesto al campo magnético de RF, asignándole un valor de energía absorbida nulo.

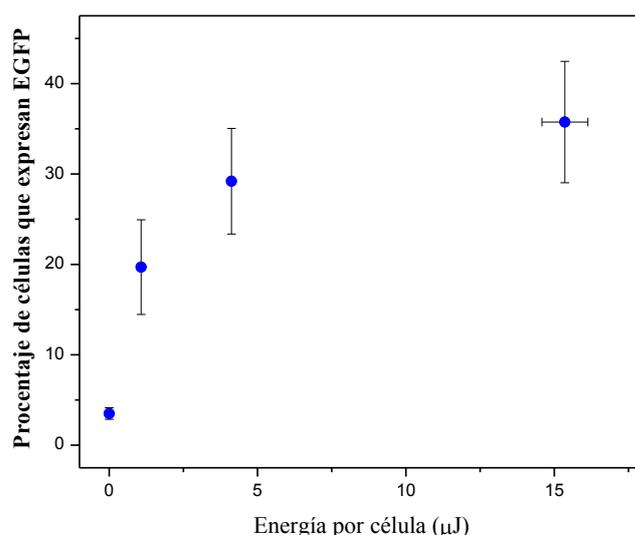


Figura 5.11 porcentaje de células que expresan EGFP en función de la energía liberada en cada célula  $E$ . Se considera también la expresión EGFP del cultivo que no fue internalizado pero sí fue expuesto a campo magnético RF asignándole un valor de energía absorbida nulo.

Este análisis sugiere que una optimización de NPMs para experiencias *invitro* debe contemplar la optimización tanto de las propiedades de las NPMs, especialmente la Ms, como la afinidad entre estas y la célula receptora a fin de incrementar la captación.

En resumen, la aplicación de campos de RF en células que han internalizado NPMs da lugar a un aumento en la proporción de células que expresan EGFP respecto de sus respectivos controles. Dado que ha sido demostrado mediante experimentos con baño térmico que el incremento de temperatura es el principal estímulo que induce estrés<sup>15</sup> en las mismas células, y a que está demostrado que la aplicación de campos de RF a NPMs en diversas matrices genera calor dando lugar a una elevación de temperatura, y a que hemos corroborado experimentalmente que las NPMs aquí utilizadas disipan en estado de suspensión, inferimos que la expresión medida está vinculada con una elevación local de temperatura en la célula.

## 6. Resumen y conclusiones

Durante este trabajo de tesis se sintetizaron suspensiones coloidales de NPMs recubiertas con ácido cítrico, estables en condiciones fisiológicas y óptimas para aplicaciones biomédicas. Estas partículas polidispersas en tamaño tienen en el rango de 11.5 a 14.5 nm, magnetización de saturación en el rango de 33.6 a 70.6 Am<sup>2</sup>/kg y son aptas para su aplicación en la terapia oncológica por hipertermia magnética por presentar valores de potencia específica disipada SAR en el rango 28.9 a 104 w/g y un bajo efecto citotóxico en la línea celular A549.

El estudio de la estabilidad, a pH fisiológico, de las NPMs sintetizadas en un amplio rango de pHs de adsorción del ácido cítrico mostró que la mayor estabilidad se obtiene cuando el ácido cítrico se une a la superficie de las NPMs a un pH de adsorción de 4.58. En estas condiciones de acidez del medio, la mayor fracción de moléculas de recubrimiento presenta un solo grupo carboxilo disociado que se adsorbe a la superficie de las NPM, dejando dos grupos carboxilos libres que al pH de resuspensión (fisiológico) se disocian estabilizando electrostáticamente las NPMs en suspensión, característica importante para las aplicaciones biomédicas. Simultáneamente, el recubrimiento incrementa el desorden de los átomos de la superficie de las NPMs, dando lugar a una capa magnéticamente frustrada de mayor tamaño lo cual disminuye la magnetización de saturación y consecuentemente el parámetro SAR de las mismas.

Por otra parte, se muestra que el efecto de las interacciones dipolares es relevante en la selección del mecanismo de relajación y en la disipación de potencia en suspensiones coloidales acuosas. Los mayores valores de SAR fueron medidos en los coloides más interactuantes y más agregados. Para un conjunto de nanopartículas interactivas el tiempo de relajación de Néel puede ser incrementado por la interacción dipolar haciéndose mayor que el de Brown, resultando en un cambio en el mecanismo de relajación magnética involucrado y por consiguiente en la eficiencia de disipación de las NPMs. Por lo tanto, para analizar el parámetro SAR obtenido experimentalmente a partir de las expresiones teóricas utilizadas habitualmente, incluimos en dichas expresiones un término de energía de interacción dipolar  $E_{int\ dip}$  a través del factor  $\sigma = \frac{K_{eff}V + E_{int\ dip}}{k_B T}$  cuyo valor en este

trabajo se determinó a partir del incremento de la temperatura de bloqueo respecto de la correspondiente a partículas aisladas. Finalmente se destaca que este estudio indica que la característica relevante de las NPMs a optimizar para incrementar el SAR de una suspensión coloidal es la magnetización de saturación.

Se realizaron experimentos magnetocalóricos en monocapa de células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 y en monocapa de células A549 modificadas (A549(HSP70B-EGFP)) que han endocitado nanopartículas magnéticas. Las células A549(HSP70B-EGFP) fueron obtenidas por la transducción con el virus que posee la información genética que codifica la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP (*Enhanced Green*

*Flourescence Protein*) bajo la acción del promotor HSP70B (*Heat Shock Protein*). En estos experimentos magnetocalóricos sistemáticamente no se sensó incremento de temperatura global de los cultivos para diversas condiciones de excitación (frecuencia y amplitud de campo). La evaluación de los efectos de la aplicación de campos de radiofrecuencia en las células que han internalizado las NPMs del tipo X@A549(HSP70B-EGFP) con  $X = Fe_3O_4$ ,  $AC-Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$  indica un aumento en el porcentaje de estas células (X@A549(HSP70B-EGFP) que expresan EGFP. Este efecto es mayor cuando los coloides utilizados son  $Fe_3O_4$  y  $SiO_x-Fe_3O_4$ , y menor para el coloide  $AC-Fe_3O_4$  encontrándose que correlaciona con la magnetización de saturación de la nanopartícula y con la eficiencia de captación. Se concluye que la expresión génica inducida por exposición a campo de radiofrecuencia en células modificadas que han incorporaron estas nanopartículas está vinculada con un aumento de temperatura local en la célula.

- 
- <sup>1</sup> R. K. Gilchrist, R. Medal, W. D. Shorey, R. C. Hanselman, J. C. Parrott, C. B. Taylor.
- <sup>2</sup> A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, B. Tesche, H. Föhling, T. Mitrovics, T. Vogl, J. Cervós-Navarro, R. Felix, *Int. J. Hyperthermia*, **12** (6), (1996), 705-722.
- <sup>3</sup> A. Jordan. MagForce Nanotechnologies A G, Berlin, Germany.  
<http://www.magforce.de/en/produkte/nanothermr-therapie.html>
- <sup>4</sup> O. S. Neilsen, M. Horsman, J. E. Overgaard. *J. Cancer*, **37**, (2001), 1587–9.
- <sup>5</sup> I. Hilger, K. Fruhauf, W. Andra, R. Hiergeist, R. Hergt, W. A. Kaiser. *Acad. Radiol.* **9**, (2002), 198–202.
- <sup>6</sup> I. Hilger, W. Andra, R. Hergt, R. Hiergeist, H. Schubert, W. A. Kaiser. *Radiology*, **218**, (2001), 570–5.
- <sup>7</sup> R. E. Rosensweig, *J. Magn. Magn. Mater.* **252**, (2002) 370–374.
- <sup>8</sup> R. E. Rosensweig, *Ferrohydrodynamics*; Cambridge University Press: Cambridge, England, (1985).
- <sup>9</sup> I. A. Brezovich, *Biological, Physical and Clinical Aspects of Hyperthermia* ed B R Paliwal et al (Medical Physics Monograph No 16) (New York: AIP) (1987) pp 82–110.
- <sup>10</sup> R. Hergt, S. Dutz. *J. Magn. Magn. Mater.*, **311**, (2007), 187.
- <sup>11</sup> P. Guardia, R. Di Coranto, L. Lartigue, C. Wilhelm, A. Espinosa, M. Garcia –Hernandez, F. Gazeau, L. Manna, T. Pellegrino. *ACS Nano*, **6**, (2012), 3080.
- <sup>12</sup> M. Johannsen, B. Thiesen, P. Wust, A. Jordan. *Int. J. Hyperthermia*, **26**, (2010), 790.
- <sup>13</sup> A. Villanueva, P. de la Presa, J. M. Alonso, T. Rueda, A. Martínez, P. Crespo, M. P. Morales, M. A. Gonzalez-Fernandez, J. Valdés, G. Rivero, *J. Phys. Chem. C*, **114**, (2010) 1976–1981.
- <sup>14</sup> I Marcos-Campos, L Asín, T E Torres, C Marquina, A Tres, M R Ibarra y G F Goya, *Nanotechnology* **22**, (2011), 205101 (13pp).
- <sup>15</sup> F Noyan, I Avedillo Díez, M Hapke, C Klein, RA Dewey. *Cancer Gene Ther.* **5**, (2012), 352-7.
- <sup>16</sup> A. Millan, A. Urtizberea, N. J. O. Silva, F. Palacio, V. S. Amaral, E. Snoeck, V. Serin, *J. Magn. Magn. Mater.* **312**, (2007), 5-9.
- <sup>17</sup> J. Jin, S. Ohkoshi, K. Hashimoto, *Adv. Mater.* **16** (1), (2004) 48-51.
- <sup>18</sup> M. Popovici, M. Gich, D. Nižňanský, A. Roig, C. Savii, Ll. Casas, E. Molins, K. Zaveta, C. Enache, J. Sort, S. de Brion, G. Chouteau, J. Nogués, *J. Chem. Mater.* **16**, (2004), 5542-5548.

- 
- <sup>19</sup> M. Gich, A. Roig, E. Taboada, E. Molins, C. Bonafos, E. Snoeck Faraday Discussions, **136**, (2007), 345-354.
- <sup>20</sup> G. Salas, C. Casado, F. J. Teran, R. Miranda, C. J. Sernab y M. Puerto Morales J. Mater. Chem, **22**, (2012), 21065.
- <sup>21</sup> D.Langevin. Annual Review of Physical Chemistry, **43**, (1992), 341-369.
- <sup>22</sup> X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, Y. D. Li. Nature, **437**, (2005), 121-124.
- <sup>23</sup> R. Massart. IEEE TRANSACTIONS ON MAGNETICS, **17**, ( 1981).
- <sup>24</sup> R. Massart, V. Cabuil. J. Chem. Phys. **84**, (1987), 967-973.
- <sup>25</sup> R. Massart C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. C, **291**, 1980, 1–3.
- <sup>26</sup> J.P. Jolivet. Metal Oxide Chemistry and Synthesis. From Solution to solid State. John Wiley & Sons LTD, 2000.
- <sup>27</sup> G. Gnanaprakash. Materials Chemistry and Physics, **103**, (2007) 168.
- <sup>28</sup> D.K. Kim. Jornal of Magnetism and Magnetic Materials, **225**, (2001) 30.
- <sup>29</sup> L.Andreade. Quimica Nova
- <sup>30</sup> Jean-Pierre, J Jin, J.; Hashimoto, K. Y Ohkoshi, S. J. Mater. Chem, **15**, (2005) 1067.
- <sup>31</sup> U. Schwertman, R. M. Cornell. VSH, Weinheim (2000),28.
- <sup>32</sup> E. Illés, E. Tombácz. Journal of Colloid and Interface Science, **295**, (2006) 115–123.
- <sup>33</sup> P.C. Hiemenz. Principles of colloid and surface chemistry Marcel Dekker, INC. Ew York (1997).
- <sup>34</sup> L. Garcell, M.P. Morales, M. Andres-Vergés, P. Tartaj and C.J. Serna J.Colloid Inter. Sci, **205**, (1998), 470475.
- <sup>35</sup> R.M. Cornell y U. Schwertmann, The Iron Oxides. Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses. VCH, Weinheim, Germany, 1996.
- <sup>36</sup> I.T.Lucas,S.Durand-Vidal,E.Dubois,J.Chevalet and P.Turq.Journal of Physical Chemistry C **111**,50(2007).
- <sup>37</sup> S. Dutz, R. Hergt. Nanotechnology, **25**, (2014), 452001 (28pp).
- <sup>38</sup> B. Derjaguin, L. Landau. Acta physicochim. URSS, **14**, (1941), 633-662.
- <sup>39</sup> F. Verwey, J. Overbeek, K. Nees. Theory of stability of liophobic colloids: the interactions of sols particles having an electric double layer,1948, New York. Elsevier.

- 
- <sup>40</sup> S. W. Charles. “Magnetic fluids( Ferrofluids)” in Studies of magnetics properties of fine particles and their relevance to materials science. J.L. Dormann and D. Fiorani. Elsevier Science Publishers B.V.(1992).
- <sup>41</sup> P.C.Scholten. “Magnetic particles in a liquid medium” in Studies of magnetic properties of fine particles and their relevance to materials science. J.L. Dormann and D. Fiorani. Elsevier Science Publishers B.V.(1992).
- <sup>42</sup> W.Weï, H. Quanguo, J. Changzhong, *Nanoscale Res. Lett.* **3**, (2008), 397–415.
- <sup>43</sup> J. L. Viota, F. J. Arroyo, A. V. Delgado, J. Horno, *J. Colloid Interface Sci.*, **344 (1)**, (2010), 144–149.
- <sup>44</sup> M. J. Kogan, M. J. I. Olmedo, L. Hosta, A. R. Guerrero, L. J. Cruz, F. Albericio. *Nanomedicine*, **2 (3)**, (2007), 287–306.
- <sup>45</sup> M. M. Yallapua, S. F Othmanb, E. T.Curtisb, B. K .Guptaa, M. Jaggia, S. C. Chauhana, *Biomaterials*, **32**, (2011), 1890–1905.
- <sup>46</sup> S. Campelj, D. Makovec, M. Drofenik. *J. Phys.: Condens. Matter*, **20**, (2008), 204101/1–204101/5.
- <sup>47</sup> M. Răcuciu. *Curr. Appl. Phys.* **9 (5)**, (2009), 1062–1066.
- <sup>48</sup> S.Nigama, K. C. Barick, D. J. Bahadur, *Magn. Magn. Mater*, **323**, (2011), 237–243.
- <sup>49</sup> *HandBook of Chemistry and Physics 61st Edition 1980-1981* crc Press, inc. Boca Raton, Florida 33431
- <sup>50</sup> Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchansky, N. Kaur, E. P. Furlani, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, **109**, (2005),3879–3885.
- <sup>51</sup> S.Nigama, K. C Barick, D. J. Bahadur. *Magn. Magn. Mater*, **323**, (2011), 237–243.
- <sup>52</sup> P. A. Philipse, M.P.B. van Bruggen y C. Pathmamanoharan. *Langmuir*, **10**, (1994), 92-99.
- <sup>53</sup> O. Mykhaylyk, Y. Sanchez- Antequera, D. Vlaskou, E. Hammerschmid, M. Anton, O. Zelphati. *Meth. Mol. Biol.* **605**, (2010), 487-525.
- <sup>54</sup> J. Wotschadlo et al. *J. Magn. Magn. Mater.* **321**, (2009), 1469–73.
- <sup>55</sup> B. C. Cullity. *Introduction to magnetic materials*. Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachussets (USA),1972.
- <sup>56</sup> F. Heider, D. J. Dunlop y N. Sugiura. *Science*, **236**, (1987), 1287–90.
- <sup>57</sup> C. Kittel, *Revs.Mod.Phys*, **21**, (1949), 541-583.
- <sup>58</sup> C. Kittel, Galt,J.K.*Solid. State.Physics*, **3**, (1956), 437.

- 
- <sup>59</sup> J.Bean , J. Appl. Phys, **27**, (1956), 1448.
- <sup>60</sup> C. P. Bean, J.D. Livingston, D.S. Rodbell - J. phys. radium, 1959.
- <sup>61</sup> F. Bodker, S. Morup, S. Linderot. Physical Review Letter, **72**, (1994),282-285.
- <sup>62</sup> E. C., Stoner, E. P. Wohlfarth. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences, (1948),599-642.
- <sup>63</sup> J. L. Dormann, D. Fiorani y E. Tronc. ADVANCES IN CHEMICAL PHYSICS. **98**
- <sup>64</sup> J. Carrey, B. Mehdaoui, and M. Respaud, Journal of Applied Physics **109**, (2011).
- <sup>65</sup> P. Dutta, A. Manivannan, and M. S. Seehra Phys. Rev. B , **70**, (2004), 174428, 1-7.
- <sup>66</sup> R. E. Rosensweig. J. Magnetism and Magnetic Materials, **252**, (2002), 370-374.
- <sup>67</sup> M. Shilomis, Sov. Phys. Uspekhi (Eng transl) **17 (2)**, (1974), 153.
- <sup>68</sup> R. T. Gordon, J.R. Hines y D. Gordon. Med.Hypotheses, **5**, (1979), 83-102.
- <sup>69</sup> D.C.F. Chan, D.B.Kirpotin, P.A. Bunn, J.Magn. Magn. Mater, **122**, (1993), 374.
- <sup>70</sup> A.Jordan, R.Scholz, P.Wust, H. Schirra, T.Schiestel, H. Schmidt, R. Felix. J. Magn.Magn.Mater, **194**, (1999), 185-196.
- <sup>71</sup> A. Jordan, et all. Int J Hyperthermia, **9**, (1993), 51-58.
- <sup>72</sup> B. Hildebrandt, P. Wust, O. Ahlers, A. Dieing, G. Sreenivasa, T. Kerner, R. Felix, H. Riess. Critical Reviews in Oncology/Hematology, **43**, (2002), 33–56.
- <sup>73</sup> C. Streffer. Recent Results Cancer Res, 1988, **107**, 7-16
- <sup>74</sup> M R.Iorimoto, , Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. Science, 1993. 259(5100): p. 1409-10.
- <sup>75</sup> S. Lindquist, The heat-shock response. Annu Rev Biochem, 1986. **55**p. 1151-91.
- <sup>76</sup> E. White, Genes Dev, **10(1)**, (1996), 1-15.
- <sup>77</sup> B.V. Harmon, et al. Int J Radiat Biol, 1990. 58(5): p. 845-58.
- <sup>78</sup> W.C. Dewey, D.E. Thrall, E.L. Gillette. Int J Radiat Oncol Biol Phys, **2(1-2)**, (1977), 99-103.
- <sup>79</sup> Hildebrandt, 43(1), (2002), 33-56.
- <sup>80</sup> S. Yan, D. Zhang, N.Gu, J.Zheng, A. Ding, Z. Wang, B. Xing, M. Ma y Y. Zang. J. Nanosci. Nanotechnol (2005), **5**, 11885-92.
- <sup>81</sup> L.H. Rerddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur. Chem Rev (2012), 112, 5818-5878.

- 
- <sup>82</sup> P. De la Presa, Y. Luengo, M. Multigner, R. Costo, M.P. Morales, G. Rivero y A. Hernando. *J. Phys. Chem. C* (2012), **116**, 25602-25610.
- <sup>83</sup> P. Gurdia, R. Di Coranto, L. Lartigue, C. Wilhelm, A. Espinosa., M. Garcia Henandez. *ACS Nano* (2012), **6**, 3080-3091.
- <sup>84</sup> C. Martinez-Boubeta, K. Simeonidis, A. Makridis, M. Angelokeris, O. Iglesia, P. Guardia. *Sci Rep* (2013), **3**, 1652.
- <sup>85</sup> S. H. Noh, W. Na, J. T. Jang, Lee J. H., E. J. Lee, Moon S. H. *Nano Lett* (2012), **12**, 3716-21.
- <sup>86</sup> A. Meffre, B. Mehdaoui, V. Kelsen, P.F. Fazzini, J. Carrey, S. Laclaise. *Nano Lett* (2012), **12**, 4722-8.
- <sup>87</sup> L. Lartigue, P. Hugoumenq, D. Alloyeau, S. P. Clarke, M. Levy, J.C. Bacri. *ACS Nano* (2012), **6**, 10935-49.
- <sup>88</sup> P. Hugoumenq, M. Levy, D. Alloyeau, L. Lartigue, E. Dubois, V. Cabuil, C. Ricolleau, S. Roux, C. Wilhelm, F. Gazeau y R. Bazzi. *J. Phys. Chem. C*, **116**, (2012), 15702-15712.
- <sup>89</sup> M. Kallumadil, M. Tada, T. Nakagawa, M. Abe, P. Southern, Q. A. Pankhurst. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **321**, (2009), 1509–1513.
- <sup>90</sup> R. Di Corato, A. Espinosa, L. Lartigue, M. Tarahud, S. Chat, T. Pellegrino, C. Menager, F. Gazeau y C. Wilhelm. *Biomaterials*, **35**, (2014), 6400-6411.
- <sup>91</sup> R. Hiergeist, W. Andra, N. Buske, R. Hergt, I. Hilger, U. Richter y W. Kaiser. *J. Magn. Magn. Mater.*, **201**, (1999), 420–422.
- <sup>92</sup> G. Salas, J. Camarero, D. Cabrera, H. Takacs, M. Varela, R. Ludwig, H. Dähring, I. Hilger, R. Miranda, M. P. Morales, and F.J. Teran. *The Journal of Physical Chemistry C*, **118** (34), (2014), 19985–94.
- <sup>93</sup> S. Dutz, M. Kettering, I. Hilger, R. Muller y M. Zeisberger. *Nanotechnology*, **22**, (2011), 265102.
- <sup>94</sup> D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks, (1973). *Journal of the National Cancer Institute*, **51**, (1973), 1417–23.
- <sup>95</sup> S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Drug, V.R. Racaniello y Skalka. 2000. *Principles of Virology. Molecular Biology Pathogenesis and Control*. Amer Society For Microbiology Press. Washington D.C.
- <sup>96</sup> M. I. Bukrinsky, S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman y M. Stevenson. *Nature* **365**, (1993), 666–669.
- <sup>97</sup> D. S. Anson. *Genetic Vaccines and Therapy*, **2**(9), 2004, 1-13.
- <sup>98</sup> X.Y. Zhang, V.F. La Russa, L. Bao. *Mol Ther.*, **5**, (2002), 555–565.

- 
- <sup>99</sup> R. Zufferey, D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naidini y D. Trono. *Nature Biotech.* **15**, (1997), 871-875.
- <sup>100</sup> L. Naldini , U. Blömer , P. Gallay , D. Ory , R. Mulligan , F.H. Gage , I.M. Verma , D. Trono . *Science.* **272(5259)**, (1996), 263-7.
- <sup>101</sup> L.J. Chang y A. K. Zaiss. 2003. Capítulo 20: Self-Inactivating Lentiviral Vectors and a Sensitive. En *Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols*. Curtis A. Machida (ed.). Humana Press Inc. New Jersey. Pág. 367-382.
- <sup>102</sup> J. Kraunus, D.H.S. Schaumann, J. Meyer, U. Modlich, B. Fehse, G. Brandenburg, D. von Laer, H. Klump, A. Schambac, J. Bohn y C Baun. *Gene Therapy* (2004), 1–11.
- <sup>103</sup> L. Lutterotti, S. Matthies and H. -R. Wenk, "MAUD (Material Analysis Using Diffraction): a user friendly Java program for Rietveld Texture Analysis and more", *Proceeding of the Twelfth International Conference on Textures of Materials (ICOTOM-12)*, **1**, (1999), 1599.
- <sup>104</sup> B.C. Dodrill, *The Performance of the Model 7400 VSM: Sensitivity*. Reporte técnico de Lake Shore Cryotronics, Inc.
- <sup>105</sup> R. C. Jaklevic, J. Lambe, A. H. Silver, and J. E. Mercereau. *Physical Reveiw Letters*, **12 (7)**, (1964), 159–160.
- <sup>106</sup> Jean-Paul Fortin et al. *Eur Biophys J* **37(2)** 223 (2008).
- <sup>107</sup> T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook. *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1982.
- <sup>108</sup> Tom Dull, Romain Zufferey, Michael Kelly, R. J. Mandell, Minh Nguyen, Didier Trono y Luigi Naldini. *J Virol*, **72(11)**, (1998), 8463–8471.
- <sup>109</sup> S. A Stewart, D. M. Dykxhoorn, D. H. Palliser, Mizuno, E. Y. Yu, D. S. An, D. M. Sabatini, I. S. Chen, W. C. Hahn, P. A. Sharp, R. A. Weinberg, C. D. Novina. *ARN* **2003**, **9(4)**, 493-501.
- <sup>110</sup> A. Schambach, J. Bohne, S. Chandra, E. Will, G.P. Margison, D. A. Williams, C. Baum *Mol Ther* **13(2)**, (2006), 391-400.
- <sup>111</sup> D. Ribble, N. B. Goldstein, A. D. Norris, Y. G. Shellman. *BMC Biotechnology*, **5**, (2005), 12.
- <sup>112</sup> M. van Engeland et al. *Cytometry* **31-9**(1998). Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis detection sistem based on phosphatidylserine exposure.
- <sup>113</sup> M. van Engeland, Luc J.W. Nieland, Frans C.S. Ramaekers, Bert Schutte, Chris P.M. Reutelingsperger. *Cytometry*, **31**, (1998), 1–9.

- 
- <sup>114</sup> F. Lei, P. Vinayak, D. Dravid, L. Johnson. *Applied Surface science*, **181**, (2001), 173-178.
- <sup>115</sup> *HandBook of Chemistry and Physics 61st Edition 1980-1981* crc Press, inc. Boca Raton, Florida 33431.
- <sup>116</sup> Fisher y Peters. *Compendio de Análisis Químico Cuantitativo*. 1971
- <sup>117</sup> D. Papias, M. Taxiarchou, I. Paspaliaris, A. Kontopoulos. *Hydrometallurgy*, **42 (2)**, (1996), 257–265.
- <sup>118</sup> S. Campelj, D. Makovec, M. Drofenik, *J. Phys. Condens. Matter*, **20**, (2008), 204101/1–204101/5.
- <sup>119</sup> S. Nigama, K. C. Barick, D. J. Bahadur, *Magn. Magn. Mater* , **323**, (2011), 237–243.
- <sup>120</sup> P. Allia, M. Coisson, P. Tiberto, F. Vinai, M. Knobel, M. A. Novak, W. C. Nunes, *Phys. Rev. B*, **64** , (2001), 1–12.
- <sup>121</sup> K. Gilmore, Y. U. Idzerda, M. T. Klem, M. Allen, T. Douglas, M. Young. *J. Appl. Phys.*, **97**, (2005), 10B301/1–10B301/3.
- <sup>122</sup> P. C. Fannin, C. N. Marin, K. Raj, C. Couper, P. Barvinschi. *J. Magn. Magn. Mater* **324**, (2012), 3443–3447.
- <sup>123</sup> J. L. Dormann, L. Bessays, D. Fiorani, *Solid State Phys. C*, **21**, (1988), 2015–2034.
- <sup>124</sup> Ali M. Rad, Branislava Janic, ASM Iskander, Hamid Soltanian-Zadeh, Ali S. Arbab. *BioTechniques*, **43**, (2007), 627-636.