

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIA
Departamento de Física



**Síntesis y caracterización de nanoestructuras de magnetita
funcionalizadas para el tratamiento del cáncer in-vitro mediante
disrupción magneto-mecánica.**

Lucía Ayelen Morillo Victorero

Profesor Guía:

Juliano Casagrande Denardin

**Tesis para optar al Título de Nanociencia
y Nanotecnología de la Universidad
Autónoma de Barcelona.**

Santiago – Chile

2019

© Lucía Morillo Victorero, 2019

Algunos derechos reservados. Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas Chile 3.0. Sus condiciones de uso pueden ser revisadas en: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

Síntesis y caracterización de nanoestructuras de magnetita funcionalizadas para el tratamiento del cáncer in-vitro mediante disrupción magneto-mecánica

Lucía Ayelen Morillo Victorero

Este trabajo de titulación fue preparado bajo la supervisión de los profesores guía Dr. Juliano Casagrande Denardin y Dr. Rafael M. Freire del Departamento de Física y ha sido aprobado por los siguientes miembros de la comisión calificadora de la candidata:

.....

Dr.

.....

Dr.

.....

Dr.

.....

Dr. Roberto Bernal
Director Departamento de Física
Facultad de Ciencia

Resumen

En este estudio se desarrolló un sistema para disrupción magneto-mecánica bajo campo magnético alterno desde la base, empezando por la síntesis y caracterización de nanoestructuras de magnetita (MNPs-Ø) para su posterior funcionalización con dopamina (MNPs-DOP). Las MNPs fueron sintetizadas por coprecipitación y por reacción solvotermal bajo distintas condiciones. Su caracterización reveló tamaños y morfologías diferentes determinadas mediante microscopía de transmisión de electrones (TEM), la cristalinidad y fases de la magnetita fueron determinadas por difracción de rayos X (XRD) y las propiedades magnéticas fueron estudiadas con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM). Se determinó la citotoxicidad de las MNPs bajo diferentes concentraciones. Se diseñó y ensambló un sistema de bobinas para aplicar el campo magnético alterno *in-vitro*, al que posteriormente se le optimizaron la intensidad y frecuencia de campo aplicada, concentración de nanopartículas, tiempo de exposición al AMF y tiempo de incubación tras el tratamiento. Finalmente se realizaron los estudios de viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico con MTT.

Las MNPs sintetizadas por coprecipitación (MNPs-CP) presentaron tamaños de 10.07 ± 4.29 nm y morfología esférica, mientras las sintetizadas por reacción solvotermal (MNPs-RS) resultaron entre los 24.75 ± 3.99 nm con morfologías poliédricas. En ser funcionalizadas con dopamina para mejorar la captación celular electrostáticamente se observó la disminución de la aglomeración. Por sus propiedades fisicoquímicas se prosiguió el estudio con las MNPs-RS-DOP poliédricas. La oscilación de las MNPs cargadas en células humanas con cáncer cérvico-uterino (HeLa), así como las condiciones en las que se realizó el proyecto, disminuyeron la viabilidad celular en un $22.42 \pm 4.32\%$. Dicho porcentaje se obtuvo para una concentración de 100 ng/ml incubada durante 24h, bajo un AMF de 0.23 mT y frecuencia 25 Hz durante 15 minutos.

Se concluye que mediante la aplicación de un AMF de bajo campo y frecuencia las MNPs-RS-DOP poseen efectividad para el tratamiento de disrupción magneto-mecánica de células cancerígenas *in-vitro*.

Palabras clave: nanoestructuras magnéticas, magnetita, tratamiento oncológico, disrupción magneto-mecánica, campo magnético AC.

Abstract

In this study, a system for magneto-mechanical disruption of cancer cells under an alternating rotating magnetic field (AMF) is developed using magnetite nanoparticles (MNPs-Ø) functionalized with dopamine (MNPs-DOP). Two different morphologies are achieved: spherical when performing the synthesis by co-precipitation (MNPs-CP) and polyhedral by solvothermal reaction (MNPs-RS). The design and construction of a coil system for generating the AMF is presented. In-vitro studies to compare the efficiency of different shaped nanoparticles are performed, as well as optimization of specific parameters as magnetic field intensity and frequency, MNPs concentration and time of exposure to the AC field applied to the cell culture. Size and morphology are characterized by transmission electron microscopy (TEM). The crystallinity and phases of magnetite MNPs are determined by X-ray diffraction (XRD). Magnetic properties are studied by vibrating sample magnetometry (VSM).

MNPs-CP showed sizes of 10.07 ± 4.29 nm and MNPs-RS of 24.75 ± 3.99 nm. When functionalized with dopamine for improving the cellular uptake, the agglomeration decreased. Due to the more proper physicochemical properties of the MNPs-RS-DOP, the research focused on its effect under the AMF.

The oscillation of MNPs-RS-DOP loaded in human cancerous cervical tumor cells (HeLa) via low-frequency AMF decreased the viability to a maximum of $22.42 \pm 4.32\%$, with a concentration of 100 ng/ml under an applied field of 0.23 mT, frequency of 25 Hz, and time of exposure of 15 minutes. No deleterious effects founded in controls by the effect of MNPs concentration, but for the AMF system. The XRD revealed the oxidation of magnetite in MNPs, explaining its lower magnetic saturation. Further improvements for the protocol employed are suggested.

It is concluded that MNPs-RS-DOP are effective for the in-vitro magneto-mechanical cancer treatment at low fields and frequencies.

Keywords: magnetic nanoparticles, magnetite, cancer treatment, magneto-mechanical damage, AC field.

A la familia Condell

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a mi familia y amigos el constante apoyo durante mi carrera, así como la libertad otorgada para perseguir mis ambiciones.

Agradecer al Dr. Juan Luis Palma por permitirme participar en este asombroso proyecto, así como a Rafael Freire y Juliano Denardin por su tutelaje y aliento a lo largo de todo el proceso.

Por su instrucción y apoyo, agradecer a:

Patricia Díaz, por introducirme a lo largo de todo el proceso biológico del proyecto y concederme largas jornadas de trabajo en su laboratorio.

Renato Galleguillos, por el trabajo en el diseño y fabricación del dispositivo para aplicar campo.

A José Briones y Gonzalo Bustos, por su desinteresada ayuda e instrucción en el diseño y estructura del proyecto.

Agradecer la financiación concedida por la beca Iberoamérica de Santander España y por Fondecyt en Chile.

Por último, agradecer a todo el equipo del área de relaciones internacionales de la Universidad Autónoma de Barcelona y la Universidad de Santiago de Chile por hacer posible este intercambio.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN	1
1. PRINCIPIOS	4
1.1. CÁNCER & NANOTECNOLOGÍA	4
1.2. CRISTALOGRAFÍA, NANOMAGNETISMO Y TORQUE	6
1.3. NUCLEACIÓN Y CRECIMIENTO	13
1.3.1. <i>Crecimiento en presencia de campo magnético</i>	14
1.4. SÍNTESIS SOLVOTERMAL	14
1.5. ANISOTROPÍA MAGNÉTICA	15
1.6. PAREDES DE DOMINIO	16
1.7. HISTÉRESIS	18
1.8. CAPTACIÓN CELULAR, FUNCIONALIZACIÓN Y ESTERILIZACIÓN	20
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. MATERIALES	22
2.2. MÉTODOS	22
2.2.1. <i>Síntesis de MNPs</i>	22
2.2.1.1. <i>Síntesis por coprecipitación</i>	22
2.2.1.2. <i>Síntesis por coprecipitación en presencia de campo magnético</i>	22
2.2.1.3. <i>Síntesis por reacción solvotermal</i>	23
2.2.2. <i>Funcionalización de la superficie</i>	24
2.2.3. <i>Esterilización</i>	24
2.2.4. <i>Cultivo celular</i>	24
2.2.4.1. <i>Cultivo celular para ensayo de viabilidad</i>	25
2.2.4.2. <i>Cultivo celular para AMF</i>	25
2.2.5. <i>Dispositivo generador de AMF</i>	26
2.2.6. <i>Caracterización</i>	28
2.2.6.1. <i>TEM</i>	28
2.2.6.2. <i>VSM</i>	29
2.2.6.3. <i>XRD</i>	29
2.2.7. <i>Ensayo estadístico</i>	29
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE MAGNETITA	30
3.1.1. <i>TEM</i>	30
3.1.2. <i>VSM</i>	35
3.1.3. <i>XRD</i>	38
3.1.4. <i>Citotoxicidad</i>	40
3.2. CARACTERIZACIÓN DEL AMF	44

3.2.1.	<i>Evaluación del campo magnético generado</i>	44
3.2.2.	<i>Evaluación temperatura generada por el sistema</i>	44
3.3.	EFFECTO DEL AMF	45
CONCLUSIONES		51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		53
ANEXOS		59
	PLANO SISTEMA BOBINAS	60

Índice de Tablas

Tabla 3.1: Parámetros síntesis por reacción solvotermal	23
Tabla 4.1: Valores extraídos de los planos cristalográficos de las MNPS-CP-Ø.....	32
Tabla 4.2: Valores distancias interplanares para la magnetita.	33
Tabla 4.3: Valores estadísticos para las distancias interplanares MNPs-RS.	34
Tabla 4.4: Análisis resultados VSM para MNPs-CP-Ø.....	36
Tabla 4.5: Análisis resultados VSM para MNPs-RS-DOP.	37
Tabla 4.6: Análisis resultados XRD MNPs-CP.....	39
Tabla 4.7: Análisis resultados XRD MNPs-CP.....	39
Tabla 4.8: Parámetros empleados para la aplicación del AMF.....	46

Índice de Ilustraciones

Figura 2.1: Efectos de las propiedades fisicoquímicas de las MNP y su funcionalización	5
Figura 2.2: Representación de la estructura de la magnetita.	6
Figura 2.3: Estructura cristalina y momentos magnéticos de la magnetita	7
Figura 2.4: Representación de la inversión del momento magnético	8
Figura 2.5: Rotación de Néel vs. rotación de Brown.....	9
Figura 2.6: Representación de la coexistencia de ambos momentos de relajación	10
Figura 2.7: Representación de ángulos y ejes de una MNP.	11
Figura 2.8: Barrera de energía para la rotación del espín con y sin campo aplicado.....	11
Figura 2.9: Esquema de la rotación de MNPs con su eje fácil dentro o fuera del plano.	12
Figura 2.10: Efecto del campo magnético en la fase de coprecipitación.....	14
Figura 2.11: Clarificación del vector de anisotropía de forma.....	16
Figura 2.12: Curva de magnetización medida en el eje fácil y difícil.....	19
Figura 3.1: Síntesis por coprecipitación en presencia de campo magnético.	23
Figura 3.2: Coordinación entre la MNP de magnetita y la dopamina.	24
Figura 3.3: Control de citotoxicidad de las nanoestructuras poliédricas	25
Figura 3.4: Esquema placa cultivo para AMF y sus respectivos controles.....	26
Figura 3.5: Diseño inicial para aplicar campo magnético AC.	26
Figura 3.6: Diseño del sistema de bobinas previo enrollar el cable de cobre.....	27
Figura 3.7: Esquema inserción cultivo celular a dispositivo de AMF.....	27
Figura 3.8: Conteo automático diámetro de Feret, realizado con ImageJ ®.	28
Figura 3.9: Procedimiento para medir distancias interplanares con ImageJ ®.....	29
Figura 4.1: Histogramas de las nanoestructuras de magnetita..	31
Figura 4.2: Figura TEM de los planos cristalográficos de las MNPs-CP-Ø.	32
Figura 4.3: Patrón de muaré.....	33
Figura 4.4: Imágenes TEM de los planos cristalográficos de las MNPS-RS-Ø 3/2.....	33
Figura 4.5: Orientación ideal de una nanoestructura de tipo triangular.....	34
Figura 4.6: Figura TEM de la formación de cadenas en MNPs-RS-Ø.....	35
Figura 4.7: Curva de histéresis obtenida con el VSM para las MNPS-CP-Ø.....	36
Figura 4.8: Curva de histéresis obtenida con el VSM para las MNPs-RS-DOP.....	37
Figura 4.9: Comparación XRD obtenidos en las muestras.....	38
Figura 4.10: Ensayo de citotoxicidad de MNPs-CP-Ø y MNPs-CP-DOP tras 24h.....	41
Figura 4.11: Ensayo de citotoxicidad de las MNPs-DOP tras 24 y 48h de incubación	42
Figura 4.12: Curva de citotoxicidad de MNPs-RS-DOP tras 24h de incubación.....	43
Figura 4.13: Fotografías placa citotoxicidad tomadas con el microscopio óptico a 500x	43
Figura 4.14: Campo magnético generado por la corriente aplicada a la bobina.	44

Figura 4.15: Caracterización del aumento de temperatura con el tiempo sobre la bobina. ...	45
Figura 4.16: Aplicación de AMF a 0,5 mg/ml de MNPs-CP-DOP esféricas.	47
Figura 4.17: Aplicación de AMF a 500ng/ml MNPs-RS-DOP	47
Figura 4.18: Aplicación de AMF a 100 ng/ml MNPs-RS-DOP con control campo	48
Figura 4.19: Aplicación de AMF a 500 ng/ml MNPs-RS-DOP con control campo	49
Figura 4.20: Aplicación de AMF a 1 µg/ml y 1 ng/ml MNPs-RS-DOP con control campo .	50

Introducción

En las últimas décadas se ha generado gran interés en el desarrollo de materiales nanoestructurados dadas sus novedosas y excepcionales propiedades. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) poseen destacadas cualidades magnéticas, fisicoquímicas y ópticas provenientes de efectos superficiales y de cuantización. Esto es reflejado en las crecientes publicaciones sobre su síntesis, caracterización y nuevas aplicaciones en variedad de disciplinas, siendo empleadas tanto en sistemas de almacenamiento de datos de alta densidad como en tratamientos médicos (Huang *et. al.* 2009; Ha *et. al.* 2018; Mohapatra y Anand 2010; Bird *et. al.* 2015).

La necesidad de aumentar la eficacia terapéutica reduciendo los efectos adversos de fármacos usados en patologías de difícil tratamiento ha llevado a un gran desarrollo de la nanotecnología. El desarrollo de MNPs ha demostrado un gran progreso para su uso en todas las facetas del tratamiento oncológico, desde agente de contraste para imagenología de resonancia magnética (MRI), a vehículo para transporte selectivo y dirigido de agentes terapéuticos. Una perspectiva de futuro se centra en el desarrollo de MNPs con múltiples tratamientos en una única formulación que comprenda imagenología para el diagnóstico y terapia para el tratamiento (teragnóstico). En éste, el núcleo de magnetita provee el contraste para MRI y su recubrimiento biocompatible provee grupos funcionales para la conjugación de moléculas terapéuticas y marcadores tumorales (Revia y Zhang 2016; Barreto *et. al.* 2013).

El diseño y funcionalización de MNPs abarca extensas formulaciones de materiales, incluyendo núcleos de moléculas orgánicas (DNA, lípidos, virus, etc.) o inorgánicas (óxidos de hierro, oro, nanoestructuras de carbono, etc.), cada una presentando ventajas y desventajas para la aplicación considerada. Las propiedades intrínsecas de la magnetita la hacen de los materiales más prometedores por su excepcional biocompatibilidad, biodegradabilidad, dispersión, propiedades super-paramagnéticas y fácil síntesis y funcionalización; que permite moldear sus propiedades para aplicaciones específicas (Ha *et. al.* 2018; Cheng, Dengfeng *et. al.* 2014).

El comportamiento superparamagnético (SPM) adquirido al nanoestructurar el material permite un control optimizado debido a la fuerte y rápida respuesta en aplicarse un campo magnético, y de la misma manera a la rápida desaparición de la respuesta cuando se retira. Esta característica es muy importante en el ámbito médico, ya que reduce la posibilidad de agregación en retirar el campo (Chiriac *et. al.* 2018; Mansell *et. al.* 2017), señalando nuevamente a la magnetita como candidata altamente competente para MRI (Tian *et. al.* 2011), transporte y liberación de fármacos dirigido magnéticamente, tratamiento oncológico de hipertermia (Suto *et. al.* 2009), y tal como introduciremos, tratamiento magneto-mecánico en AMF para la destrucción de células cancerígenas (Theivasanthi y Alagar 2013; Suto *et. al.* 2009; Cheng, Dengfeng *et. al.* 2014). Asimismo, el comportamiento de las nanoestructuras bajo un AMF es selectivo en cuanto a la forma, y su gran área superficial posibilita la

funcionalización de agentes para tratar el cáncer o dirigir el tratamiento aumentando dramáticamente el éxito en la conducción y liberación del tratamiento (Contreras *et. al.* 2015).

Cuando estas nanoestructuras son sometidas a un AMF se producen dos efectos: el torque físico de la MNP y/o el torque del momento magnético sin desplazamiento angular de la MNP, para alinear su momento magnético en la dirección del campo. Si las nanoestructuras oscilan siguiendo el AMF dañarán interna y/o externamente los tejidos celulares. En el tratamiento de hipertermia se genera calor mediante un AMF de alta frecuencia que provoca la rotación del momento magnético y no de la partícula, el contrapunto es que el tejido adyacente podría ser dañado por el aumento de temperatura (Shen *et. al.* 2017). Usando la disrupción magneto-mecánica el campo y las frecuencias son más bajas y, por ende, el equipo es simple, económico y compacto, además de evitarse daños al tejido circuncidante de la zona tumoral. (Cheng, Dengfeng *et. al.* 2014).

Estos antecedentes indican que la magnetita posee un alto potencial encubierto para futuros tratamientos oncológicos. Es por ello por lo que se ha elegido la magnetita con el objetivo global de contribuir en el desarrollo de una terapia anticancerígena basada en nanotecnología, con menos efectos secundarios, y más eficiente y asequible. Para alcanzar esta meta, se generan objetivos específicos de destacada interdisciplinariedad. Primeramente la síntesis química, funcionalización y esterilización de las MNPs, haciendo énfasis en el intento de conseguir anisotropía de forma para realzar las propiedades magnéticas. Seguido a esto, la caracterización de las propiedades magnéticas, tamaño y cristalinidad de las MNPs mediante VSM, TEM y XRD. Por otro lado, el diseño y construcción de un sistema de bobinas para aplicar el AMF al cultivo celular a frecuencia, intensidad y tiempo modificable. Y finalmente, en el área biológica, la determinación de citotoxicidad de las MNPs y la optimización de parámetros de AMF para provocar la muerte celular mediante disrupción magneto-mecánica de manera eficiente en células HeLa.

Diversos estudios ya han probado la efectividad del tratamiento in-vivo e in-vitro (Huang *et. al.* 2010). No obstante, metodologías para una producción escalable, parámetros óptimos de campo magnético y geometrías preferentes no están aún bien establecidos. Escasos tratamientos basados en nanoestructuras de magnetita han sido aprobados por el *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en humanos, pero estos abren camino para que futuros productos agilicen su salida al mercado en vista de su no-toxicidad.

Contreras *et. al.* (2015) consiguieron una disminución de viabilidad del 39% empleando nanohilos de níquel de 4µm de largo y 35nm de diámetro incubados un corto periodo de tiempo previo al AMF (1h), suficiente para la captación celular de las MNPs. Li *et. al.* (2017) empleó MNPs de magnetita de 30 nm de diámetro recubiertas con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) con el mismo objetivo, disminuyó la viabilidad en un 25% optimizando los parámetros de AMF en 20 mT (en un rango estudiado entre 0,1 y 20mT) y 20Hz (en un rango de 2 a 20 Hz). Mansell *et. al.* (2017) y Martínez-Banderas *et. al.* (2016) indujeron la muerte celular combinando el efecto terapéutico de la doxorubicina con el tratamiento magneto-mecánico

producido por sus nanopartículas de hierro funcionalizadas con BSA. Aplicaron a una concentración de MNPs de 50 partículas por célula campos de 1mT a frecuencias inferiores a 20 Hz. Este último cálculo fue posible debido al gran tamaño de sus nanoestructuras, mayores al μm de largo. Después de aplicar el campo incubaron las células por 24h, tras la que obtuvieron una pérdida de viabilidad del 70% y 62%, respectivamente. Shen *et. al.* (2017) dopó con zinc sus MNPs de magnetita de 62nm de diámetro. También las funcionalizó con EGF para un *targeting* activo. En aplicar un campo magnético de elevada intensidad (40 mT) y baja frecuencia (15 Hz) obtuvo una disminución de viabilidad inmediata del 22%.

Teniendo en cuenta dichos antecedentes, resaltando que no se ha investigado exhaustivamente el daño celular producido por distintas geometrías bien caracterizadas y haciendo seguimiento de todo el proceso experimental, el objetivo de este trabajo es contrastar los efectos en la disminución de viabilidad celular por efecto magneto-mecánico de nanoestructuras de diferente morfología sometidas a un AMF.

1. Principios

La magnetita es un material ferrimagnético pero, como ya es conocido, se producen cambios significativos en las propiedades físicas a medida que se reducen las dimensiones de la muestra de la escala macroscópica o *bulk* (>50µm) a la nanométrica (Ionescu, Llandro y Ziebeck 2019). La síntesis y el confinamiento de las nanopartículas son responsables de diversas características que se discutirán en adelante.

Cada protocolo de síntesis y por ende composición, tamaño, morfología, carga, etc. tiene un efecto directo en trasladar el producto al área biológica, ya sea en su toxicidad, localización, captación celular, degradación, etc. A continuación se presentan algunos principios físicos y biológicos a tener en cuenta si se desea desarrollar un tratamiento de la metodología del propuesto.

1.1. Cáncer & nanotecnología

La investigación y desarrollo de nanoterapias en oncología ha experimentado un crecimiento exponencial desde los inicios del 2000. Los principales objetivos para incrementar la eficacia de los fármacos se investigan por distintas líneas: dirigir el tratamiento mediante *targeting* activo o pasivo, resultando en un tratamiento menos invasivo y de menor dosis requerida; encapsular el fármaco para aumentar su solubilidad y tiempo de vida medio en el organismo, protegiendo los principios activos de la degradación enzimática o ambiental y evitando su detección por el sistema retículo-endotelial (RES); modificar el tamaño del vehículo para conseguir traspasar barreras fisiológicas, modificar la respuesta a estímulos externos, etc. Todo esto con el objetivo de liberar los agentes terapéuticos y/o de diagnóstico de manera más segura y eficiente.

No obstante, la nanotecnología en la medicina contemporánea se enfrenta a varios retos para explotar todo su potencial, principalmente relacionados con la toxicidad y estabilidad de los fármacos, así como también en la búsqueda de métodos de producción escalables. Pocos nano-fármacos existen hoy en día en el mercado destacando el Doxil®, doxorubicina (DOX) encapsulada en liposomas para disminuir su toxicidad cardíaca, y el paclitaxel encapsulado en albúmina (nab-PTX) para aumentar la dosis tolerada. El potencial real de la nanomedicina continuará emergiendo a medida que se superen dichos obstáculos (Bertrand *et. al.* 2014).

Existen dos métodos principales para acumular las MNP en la zona tumoral: el método activo consiste en usar ligandos sobreexpresados específicamente por las células tumorales para dirigir el tratamiento a la zona (*targeting* selectivo), mientras que el *targeting* pasivo se aprovecha de la rápida formación de vasculatura en el tumor, que debido a su mal drenaje y permeabilidad retiene las nanopartículas en su interior en un efecto llamado *enhanced permeability retention* (EPR). Las MNP pueden también ser dirigidas por un campo magnético externo.

La comprensión del proceso biológico responsable de la distribución y retención de los nanomateriales es crucial para el desarrollo de nanofármacos. Examinar los parámetros fisicoquímicos de los nanomateriales nos permitirá predecir su localización, retención, unión celular, internalización, eficacia, toxicidad, comportamiento, etc.

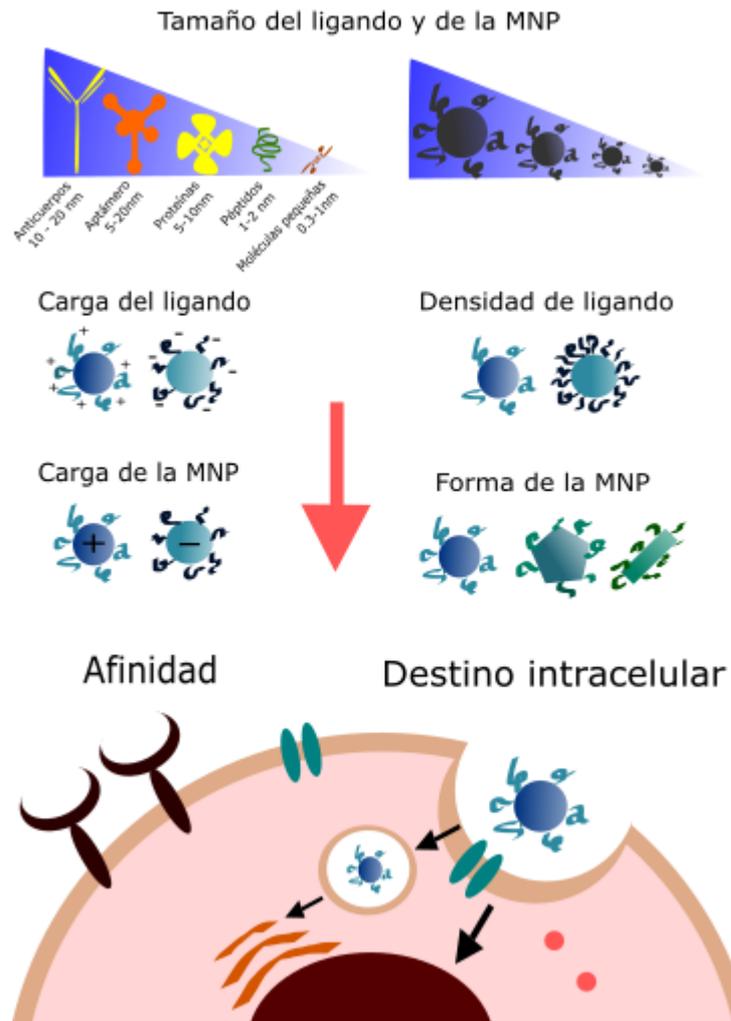


Figura 1.1: propiedades fisicoquímicas de las MNP y su funcionalización influyen en la circulación de las MNPs, su biodistribución y su internalización y destino intracelular. Elaboración propia.

Como ya sabemos, la mayoría de las células crece y se divide constantemente para reemplazar las células muertas. Cuando el material genético (DNA) de una célula resulta dañado o alterado, se producen células anormales que pueden expandirse hacia otros tejidos reproduciéndose de manera descontrolada y no pereciendo cuando deberían. Estas células cancerígenas pueden trasladarse a través del torrente sanguíneo y la linfa a otras partes del cuerpo y formar masas de tejido nombradas tumores. Los tumores pueden ser benignos, no cancerosos, o malignos. Las células en los tumores malignos son anormales y se dividen descontroladamente, provocan metástasis y destruyen el tejido de su alrededor (LIVESTRONG Foundation. 2015).

La clave para reducir la mortalidad del cáncer es su detección temprana. Para eso una imagenología sensible y un rápido tratamiento son vitales, y las MNPs se aplican para ambos.

Existen más de 100 agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer, ya sea aislados o combinados. La quimioterapia ataca a las células en distintas fases del ciclo celular pero no diferencia entre células sanas y cancerígenas, por lo que se producen severos efectos secundarios además de tener un elevado costo.

El desarrollo de un tratamiento nanotecnológico tiene el objetivo final de reducir los efectos secundarios, el costo, el tiempo de tratamiento y aumentar la eficiencia. Este trabajo se enfoca principalmente en testear el daño físico que la MNP puede causar tras producirse el *uptake* o la unión a la pared celular y aplicar un AMF, sin tener en cuenta la direccionalización ni combinación con fármacos que potencien su efectividad.

1.2. Cristalografía, nanomagnetismo y torque

Se precisa de una breve introducción a la estructura cristalográfica de la magnetita para la comprensión de su respuesta ante un campo magnético externo. Por lo tanto, se introducen a continuación algunos principios de magnetismo en escala nanométrica y las fuerzas de torque que presuntamente resultarán en el movimiento de la MNP.

La estructura de la magnetita está compuesta por hierro (II) ubicado en los espacios tetraédricos, y hierro (III) y hierro (II) distribuidos equitativamente en los espacios octaédricos, formando así una estructura de tipo espinela inversa representada en la figura 2.2.

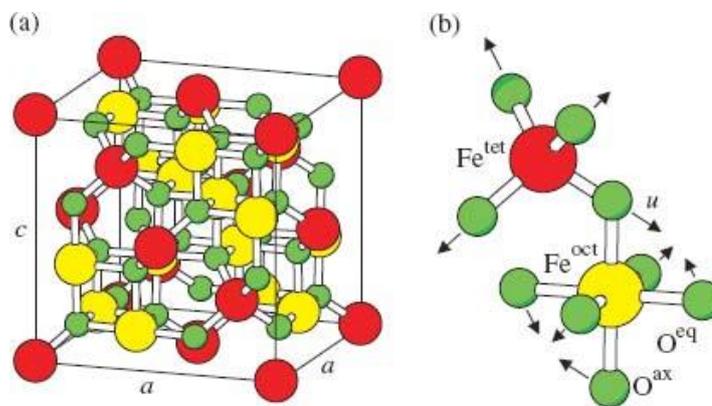


Figura 1.2: Representación de la estructura de la magnetita extraída de Fleet 1986, *Journal of Solid-State Chemistry* 62, no. 1 (March 1986): 75–82.

El factor subyacente que influencia las propiedades magnéticas intrínsecas en aplicarse un AMF es el ordenamiento de dipolos magnéticos. Los materiales se clasifican como diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, anti-ferromagnéticos y ferrimagnéticos; siendo este último el correspondiente a la magnetita. Los materiales ferrimagnéticos, del mismo modo que los ferromagnéticos, mantienen una magnetización espontánea en ausencia de campo magnético cuando están por debajo de la temperatura de Curie. La diferencia recae en el ordenamiento de dipolos, que se disponen con poblaciones de átomos con momentos opuestos reduciendo su magnetización de saturación.

Este comportamiento se debe a la población conjunta de hierro (II) y hierro (III). Los orbitales 5d del hierro no están completamente llenos y, consecuentemente, debido a las reglas de Hund los espines electrónicos desapareados generan un momento magnético dipolar en los átomos de hierro aproximadamente de $5 \mu_B$ para Fe(III) y $4 \mu_B$ para Fe(II) (Cullity, B.D. y C.D. Graham 2011). Como la electrodinámica clásica predice, se espera que dos espines cercanos se ordenen de manera antiparalela. Verdaderamente, en algunos materiales, la energía de interacción derivada del principio de exclusión de Pauli tiende a alinear los espines paralelamente, sobrepasando la interacción entre dipolos magnéticos. A bajas temperaturas esto lleva al ferromagnetismo, i.e. el material posee un momento macroscópico en ausencia de campo magnético externo.

En la magnetita la energía de intercambio lleva a los espines de la red octaédrica a alinearse paralelamente entre ellos y a los de la red tetraédrica a una orientación antiparalela a éstos. Dado que los momentos magnéticos de las subredes no son iguales, existe un momento magnético macroscópico en ausencia de campo magnético externo (Vach 2015).

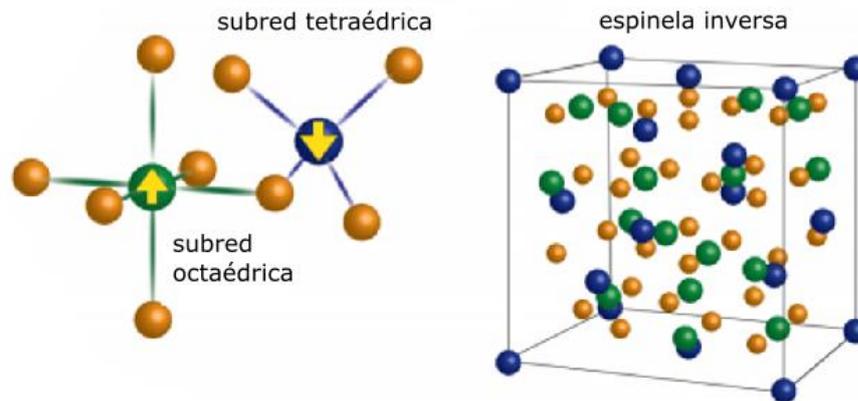


Figura 1.3: Estructura cristalina y momentos magnéticos de la magnetita. Figura modificada extraída de P. Vach, 'Solution Synthesis and Actuation of Magnetic Nanostructures', p. 159.

Se reportó que los cambios empiezan a manifestarse cuando la relación superficie-volumen de las MNPs se aproxima a 0.5. Si el tamaño de la MNP se aproxima a la longitud de onda de Broglie (relación entre la constante de Plank, h , y el momento del electrón, p) se empezarán a observar efectos cuánticos. El comportamiento ferrimagnético adoptará comportamiento tipo paramagnético, caracterizado por ausencia de momento magnético sin campo externo y un rápido aumento de este en aplicarlo, nombrado entonces superparamagnetismo. Este fenómeno se produce cuando las fluctuaciones térmicas pasan la barrera energética permitiendo el giro aleatorio del momento magnético, a partir de una dada temperatura de bloqueo (T_B). El cambio de comportamiento no dependerá solo del tamaño, sino que se verá influenciado por la forma, dimensionalidad e interacciones (Kolhatkar *et. al.* 2013; Ionescu, Llandro y Ziebeck 2019).

Cuando todos los dipolos apuntan en la dirección del campo aplicado se llega a la magnetización de saturación (M_s). Su valor puede incrementarse reduciendo la temperatura, y así, las fluctuaciones térmicas; o dopando y/o funcionalizando la MNP.

Por encima de la T_B la magnetización restante cuando se retira el campo magnético o magnetización remanente (M_r) va a cero. El campo necesario para llevar esta magnetización remanente a cero, nombrado campo coercitivo (H_c), también toma valores nulos. Ambos datos son característicos del superparamagnetismo. Podemos encontrar la temperatura de bloqueo experimentalmente realizando la curva *zero field cooling* (ZFC).

La curva de ZFC se hace enfriando la muestra a bajas temperaturas (5K aproximadamente) en ausencia de campo magnético. A continuación se aplica un campo magnético bajo y se aumenta progresivamente la temperatura midiendo la magnetización en función de la temperatura. El máximo de la curva ZFC es la T_B . También puede ser estimada considerando una muestra monodominio y conociendo su anisotropía magnética (K) (Kolhatkar *et. al.* 2013):

$$T_B = \frac{K \langle V \rangle}{25k_B} \quad (2.1)$$

La caracterización de la anisotropía magnética es de gran interés, ya que define la barrera energética para la rotación coherente de los momentos de la nanopartícula. Obteniendo T_B de la curva ZFC, la anisotropía puede estimarse empleando la ecuación 2.1. El factor 25 corresponde al $\ln(\tau_m/\tau_0)$ en magnetometría convencional, como puede deducirse a partir de la ecuación 2.4 (Yoon 2011).

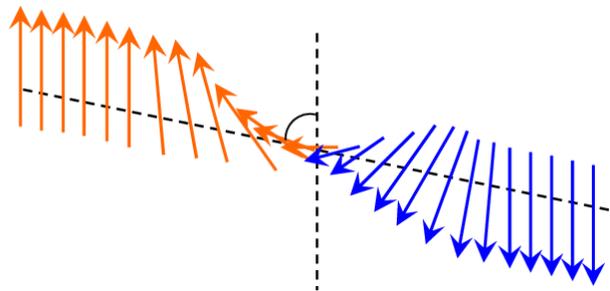


Figura 1.4: Representación de la inversión del momento magnético a lo largo de la pared de dominio.

La energía de anisotropía actúa como barrera limitante para la libre rotación de momentos magnéticos. Cuando se sobrepasa térmicamente esta barrera, el material presenta relajación superparamagnética. El tiempo de relajación para partículas no-interactuantes es descrito por la ecuación Néel-Arrhenius:

$$\tau = \tau_0 \exp\left(\frac{\Delta E_A}{k_B T}\right) = \tau_0 \exp\left(\frac{KV}{k_B T}\right) \quad (2.2)$$

La relajación magnética entre las dos posiciones de equilibrio bajo la influencia de la energía térmica puede ser también descrita usando la ley de Arrhenius:

$$M(t) = M_0 \exp(-t/\tau) \quad (2.3)$$

Donde M_0 es la magnetización inicial y τ es el tiempo característico de relajación, el cual es función de la barrera energética y de la temperatura; k_B es la constante de Boltzmann y τ_0 es inversamente proporcional a la frecuencia de intento de saltar la barrera energética entre las dos direcciones de magnetización del eje fácil. Los valores de τ_0 pueden ser determinados experimentalmente y calculados teóricamente; resultando del orden de 10^{-9} - 10^{-10} s.

El tiempo requerido para alinear el momento con el campo magnético externo es dado por los tiempos de relajación de Néel y Brown, y su extensión es responsable de la histéresis. Suponiendo que en aplicar un AMF de determinada frecuencia la relajación del momento magnético procede vía la rotación de la MNP, estaremos observando relajación de Brown. Tendremos también el proceso competitivo con la relajación de Néel, en el que la MNP permanece inmóvil pero rotan los espines de cada átomo sobrepasando la barrera energética de la anisotropía cristalina (Ver Fig. 2.5).

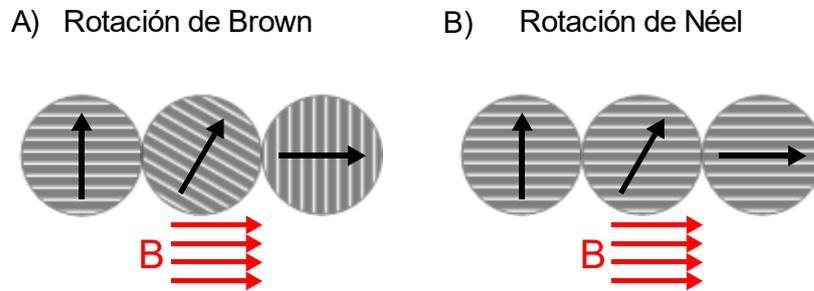


Figura 1.5: Rotación de Néel vs. rotación de Brown. (A) Relajación de Brown: el momento magnético permanece fijo, la MNP rota. (B) Relajación de Néel: los momentos magnéticos rotan manteniendo la MNP fija. Elaboración propia.

Puede calcularse en una situación sin campo siendo:

$$\tau_{Brown} = \frac{3\eta V_H}{k_B T} \quad (2.4)$$

$$\tau_{Neel} = \tau_0 \exp\left(\frac{KV_M}{k_B T}\right) \quad (2.5)$$

Siendo η la viscosidad del medio, V_H el volumen hidrodinámico de la MNP, K la constante de anisotropía magnética y V_M el volumen del núcleo de la MNP. En aplicar el AMF, rotará el momento magnético o la nanoestructura en sí. S.Ota *et. al.* revela que ambos tiempos de relajación coexisten, y que el tiempo de relajación de Brown puede suceder después de la relajación de Néel pese a tener un tiempo superior (Ota *et. al.* 2016). El tiempo de relajación efectivo se expresa como:

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

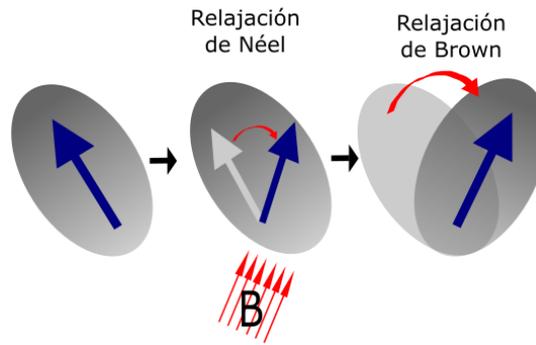


Figura 1.6: Representación de la coexistencia de ambos momentos de relajación en aplicar un campo magnético. Elaboración propia.

La frecuencia de oscilación del campo magnético óptimo para un dado tiempo de relajación τ es:

$$2\pi f\tau = 1 \quad (2.7)$$

En ausencia de campo magnético, el comportamiento de las nanoestructuras en solución es descrito por el movimiento Browniano. En aplicar el campo magnético, esperamos ver a las MNP rotar para alinear su momento magnético con la dirección del campo aplicado. La magnitud del torque magnético viene dada por la siguiente ecuación:

$$|\vec{\tau}| = |\vec{m} \times \vec{B}| = |\vec{m}||\vec{B}|\sin\varphi \quad (2.8)$$

El estrés magneto-restrictivo depende de la fuerza del campo magnético aplicado, las propiedades magnéticas del material, y del ángulo entre el campo aplicado y el eje fácil de magnetización de la nanoestructura (φ) (M. Sajjia 2015).

De acuerdo con el modelo de Stoner-Wohlfart (SW), el grado de rotación de la magnetización depende del equilibrio entre las energías de Zeeman y de anisotropía. Este modelo asume a la partícula como un monodominio, i.e. con todos los momentos dipolares alineados. Consecuentemente, el momento magnético permanece constante en magnitud y tiene anisotropía uniaxial (K_u) y la magnetización permanece restringida al plano que contiene la dirección del campo magnético y el eje fácil (van Oene *et. al.* 2015). En la figura 2.6 se representa el ángulo entre la magnetización y el campo magnético (φ), mientras α figura como el ángulo entre el campo y el eje fácil.

La ecuación de la energía puede representarse como la suma de la anisotropía magnética, describiendo el gasto energético por desalinear el momento magnético del eje fácil, y la energía de Zeeman, que describe la preferencia de alineación del momento magnético dipolar con el campo magnético aplicado (Carrey y Hallali 2016; van Oene *et. al.* 2015). La orientación

resultante del momento magnético respecto al eje fácil se determinará por la competición de ambas contribuciones.

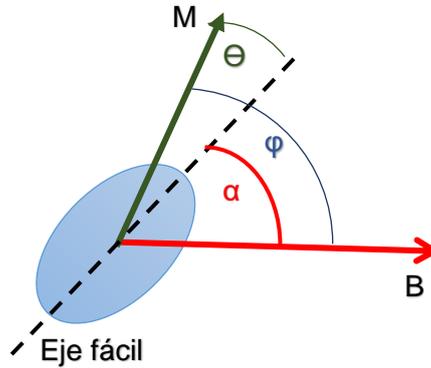


Figura 1.7: MNP y su eje fácil (línea discontinua), con un momento magnético M bajo un campo magnético B . Representación de ángulos.

$$E = KV \sin^2(\theta) - |\vec{m}| |\vec{B}| \cos(\varphi) \quad (2.10)$$

$$K = K_u = \frac{1}{2} H_k m \quad (2.11)$$

En aplicar un AMF, la energía total de la barrera energética para la rotación de spin viene dada por la ecuación 2.10. Se denota una energía menor a KV en presencia de campo (la disminución de barrera energética se representa en la figura 2.7). Considerando las MNP con anisotropía uniaxial, K es igual a K_u , siendo H_k el campo anisotrópico. El equilibrio mecánico en una dirección de magnetización se alcanza cuando las fuerzas son mínimas. De la ecuación de energía 2.10 y aplicando la definición de torque podemos conseguir una fórmula simple para obtener el torque máximo. Usualmente se emplean modelos dinámicos pero debido al gran torque producido, el efecto retardante del medio en el que se desplaza la MNP puede ser ignorado, i.e. la MNP es capaz de llegar a la mínima energía en la escala de tiempo experimental. Se obtiene un torque máximo $T_{\max} = K_u$, para campos magnéticos mayores a $H_k/\sqrt{2}$ (Mansell *et. al.* 2017).

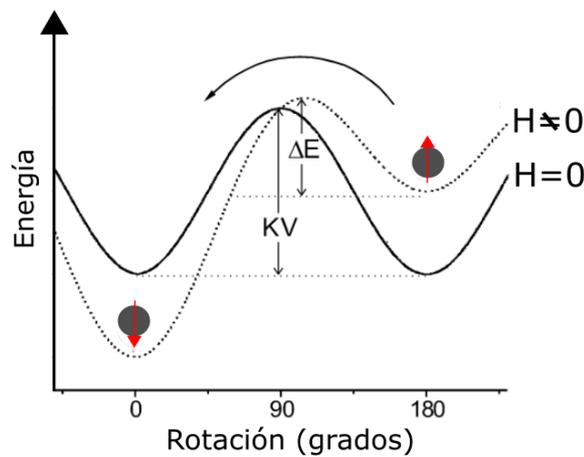


Figura 1.8: Barrera de energía para la rotación del espín con y sin campo aplicado.

En función de la intensidad del campo magnético aplicado encontramos uno o dos mínimos. Para campos altos, encontramos un mínimo a un dado φ , definiendo la orientación del momento magnético. A campos bajos encontramos un segundo mínimo, pero la orientación del momento magnético dependerá ahora del estado previo, causando la histéresis. Así, la mínima energía ocurre cuando la magnetización está alineada con el eje fácil y en la misma dirección que el campo magnético. Si encontramos la orientación del momento magnético (φ) podremos calcular el torque.

Este método se usa para nanopartículas altamente dispersas. Las diseñadas en este trabajo se dispersan en un medio líquido durante su síntesis y para su introducción in-vitro en forma de solución en medio de cultivo, pero podría optimizarse usando un ferrofluido.

La competencia entre la alineación del dipolo magnético con el eje fácil o con el campo magnético externo dependerá de los valores de anisotropía magnética, momento magnético y campo magnético. Un parámetro clave para maximizar el torque de la MNP es la anisotropía magnética. La anisotropía de forma característica de nuestra nanoestructura y una larga magnetización de saturación nos llevará a un torque optimizado con el aumento del AMF.

El reciente interés en estudiar y calcular el torque que ejerce la MNP no nace solo de la necesidad de interpretar cuantitativamente experimentos, si no de buscar parámetros para optimizar su efectividad. No existe aún ninguna teoría formalmente aceptada para predecir el torque que las MNP producen bajo un AMF, pero existen variados estudios al respecto.

Está demostrado que el torque aumenta en la dirección perpendicular al plano de rotación del AMF (Mansell *et. al.* 2017; Chiriac *et. al.* 2018; Carrey y Hallali 2016). Véase en la figura 2.8 la diferencia de comportamiento de dos partículas cuyo eje fácil está fuera del plano (a) y dentro del plano (b). El ángulo inicial entre el eje fácil y el AMF llevará a un movimiento fuera del plano de la MNP y a el torque asociado a éste. Una vez alineado el eje fácil con el plano de rotación del AMF, la magnetización rotará con el AMF siguiendo dos comportamientos remarcablemente distintos: en el caso (a) el eje fácil se alineará con el AMF produciendo un torque al rotar. El caso (b), por lo contrario, rotará sin producir ningún torque.

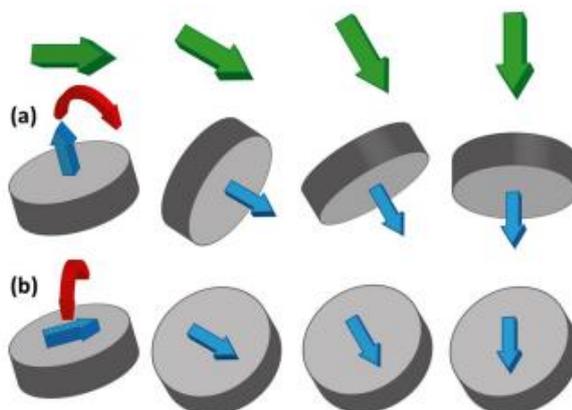


Figura 1.9: Esquema de la rotación de MNPs en forma de disco bajo un AMF con su eje fácil dentro o fuera del plano. Extraído de (Mansell *et. al.* 2017).

1.3. Nucleación y crecimiento

En este trabajo la magnetita se sintetiza a partir de la coprecipitación de dos sales de hierro en solución alcalina y por reacción solvotermal. Ambos métodos son comúnmente empleados debido a su simplicidad, escalabilidad y bajo costo; a pesar de que la reacción solvotermal tiene un bajo rendimiento y es más complejo modificar los parámetros de síntesis.

Este tipo de procedimientos químicos suelen describirse con la teoría de nucleación y crecimiento. Entender el procedimiento nos permitirá modificar adecuadamente diversos parámetros para elegir el tamaño, geometría, y así manipular las propiedades asociadas (Baumgartner *et. al.* 2013).

La nucleación se define como la formación espontánea de un material que en alcanzar un radio crítico, asociado al ratio entre la energía superficial y *bulk*, podría empezar a crecer. El ratio de nucleación puede ser descrito por la ecuación 2.12, siendo K_B la constante de Boltzmann y T la temperatura:

$$J \approx e^{-E_a/K_B T} \cdot e^{-\Delta G/K_B T} \quad (2.12)$$

El primer término de la ecuación representa la parte cinética, en la que existe una energía de activación (E_a) para la desolvatación del ion y arreglos estructurales. El segundo término es la barrera termodinámica, con la energía libre de Gibbs de la MNP en crecimiento (ΔG). Para empezar a crecer, la MNP ha de superar la barrera termodinámica.

$$\Delta G(R) = 4\pi R^2 \gamma - \frac{4}{3}\pi R^3 g_v \quad (2.13)$$

Siendo γ la energía superficial y g_v la energía libre ganada por unidad de volumen. Derivando esta ecuación respecto al radio de la MNP obtenemos el mínimo de energía, tal que:

$$R = \frac{2\gamma}{g_v} \rightarrow \text{radio mínimo para empezar el crecimiento}$$

$$\text{barrera energética termodinámica} \rightarrow \Delta G_c = \frac{16}{3}\pi \frac{\gamma^3}{g_v^2}$$

En coprecipitación las reacciones tienden a suceder muy rápido, haciendo difícil el control del proceso de cristalización. Como consecuencia, las MNP tienden a poseer poca uniformidad en tamaño y cristalinidad, limitando su uso en diversas aplicaciones tecnológicas. El proceso solvotermal es uno de los más exitosos para crecer nanopartículas con mayor cristalinidad, aunque la composición química de los compuestos organometálicos iniciales también limita diversas aplicaciones debido a su azarosa naturaleza, la compleja manipulación de químicos, el alto coste de los materiales y el bajo rendimiento del producto (Andrade *et. al.* 2012).

La nucleación empieza mediante la formación y re-dilución de pequeños núcleos de magnetita cristalina, hasta formarse pequeñas MNPs. A continuación el crecimiento del cristal es más

energéticamente favorable que la generación de nuevos núcleos. Un crecimiento lento favorecerá la cristalinidad, así que emplearemos altas temperaturas y bajas dosis. El producto puede ser manipulado mediante la elección de concentraciones apropiadas, pH, dosis, velocidad de stirring, temperatura, etc.

1.3.1. Crecimiento en presencia de campo magnético

A pesar de que no se obtuvieron los resultados esperados, se desarrolló una síntesis por coprecipitación en presencia de campo magnético con el objetivo de inducir una dirección de crecimiento preferencial en la dirección de este.

La síntesis de nanoestructuras de tipo rod es inducida en aplicar un campo magnético durante la fase de coprecipitación. El nanocrystal recién formado tenderá a ubicarse a lo largo de las líneas del campo magnético a medida que se añada la base, aumentando el pH y generando más magnetita progresivamente hasta generar el nanorod (Ficai *et. al.* (2011); Vereda, de Vicente y Hidalgo-Álvarez (2007)).

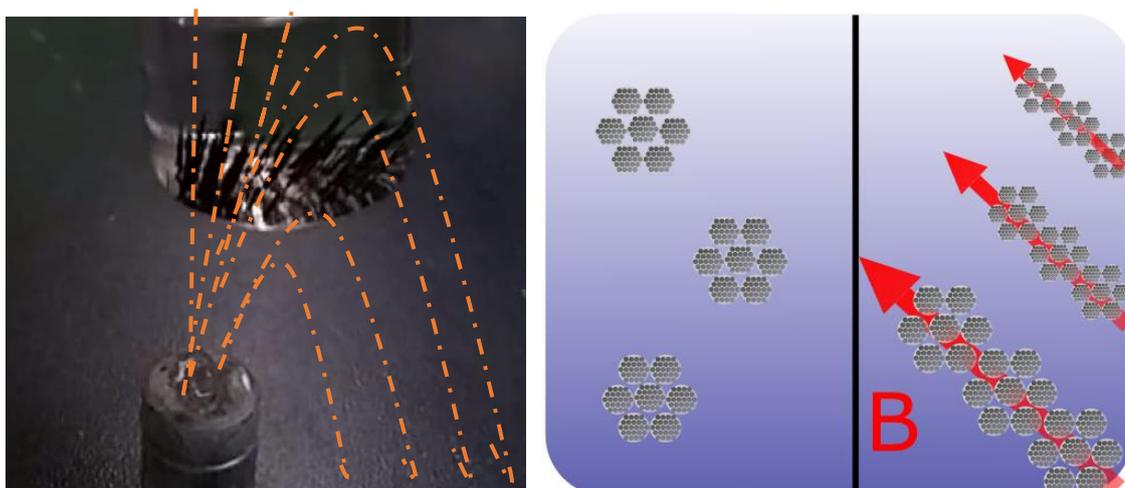


Figura 1.10: A: nanoestructuras de magnetita en presencia de campo magnético. B: efecto del campo magnético en la fase de coprecipitación. Elaboración propia.

1.4. Síntesis solvotermal

Esta síntesis se realizó para obtener distintas morfologías y estudiar así el efecto de la forma. En este tipo de reacción el solvente y el precursor se calientan en un sistema cerrado a temperaturas que superan el punto de ebullición del solvente, elevando así la presión y facilitando la interacción entre solvente y precursor. La presencia de ácido oleico y oleilamina da lugar a estructuras poliédricas que pueden ser modificadas en función de la concentración y proporción entre estas, pH, dosis, entre otros parámetros.

La nucleación comienza a partir de la reacción del acetilacetato de hierro (III) con hidróxido de amonio bajo condiciones de elevada presión y temperatura. En ese momento se generan pequeños núcleos de magnetita que tornarán en pequeñas nanopartículas. El siguiente paso,

el crecimiento, se produce a distintas velocidades a lo largo de las direcciones de crecimiento preferencial del cristal, que son proporcionales a su energía superficial (Fleischer *et. al.* 2014; Noh *et. al.* 2015).

Incidir en las superficies de la estructura atómica hace posible la comprensión de la interacción entre la magnetita y el medio que la rodea. En estructuras cúbicas centradas en las caras (FCC), la cara de mayor energía es la (110) seguida de (100), teniendo entonces la mínima energía la faceta (111). Consecuentemente, la cara (110) tiende a desaparecer durante el crecimiento del cristal, siendo idealmente la cara (111) la única faceta expuesta. Si se desea una estructura particular que presente caras de mayor energía se añaden surfactantes y adsorbatos que interactúen selectivamente con dicha faceta reduciendo su energía (Cheng, Xun-Liang *et. al.* 2014).

Chen *et. al.* 2015 estudiaron la evolución morfológica de la magnetita variando el pH, la dosis de promotor de nucleación, la concentración de precursor y la presencia o ausencia de distintos surfactantes, produciendo así estructuras planas, octaédricas, dodecaédricas y esféricas.

1.5. Anisotropía magnética

La anisotropía puede provenir de diversas fuentes. Si el eje de fácil magnetización de nuestra muestra depende de la red cristalina del sistema, estaremos hablando de anisotropía magnetocristalina. Por otro lado, si la magnetización se alinea en función de la forma del material, estaremos hablando de la anisotropía de forma.

En materiales monocristalinos, la magnetización depende de la magnitud y dirección del campo magnético externo aplicado con respecto a los ejes cristalográficos. Esto da lugar a direcciones de magnetización fáciles y difíciles, aumentando la anisotropía magnética a medida que disminuye la simetría de la MNP. El vector de momento magnético en una estructura monodominio tiende a estar alineado con el eje fácil, que contiene la menor energía magnetocristalina. Estas direcciones preferenciales nacen del acoplamiento spin-orbita, i.e. la interacción del momento magnético de espín con la red cristalina. En aplicarse un campo magnético se producirán fuerzas para alinear el momento magnético en su dirección, pero también con el eje fácil.

La anisotropía uniaxial exhibe un solo eje de simetría, el eje fácil. El interés en desarrollar nanoestructuras de distinta morfología va estrechamente ligado con generar anisotropía magnética uniaxial para aumentar la efectividad del tratamiento magneto-mecánico, i.e. el torque producido sobre la célula.

La constante de anisotropía (K) mide la preferencia de la magnetización para permanecer en una o varias direcciones dadas. Existen distintos mecanismos físicos que explican dicha preferencia, siendo los principales la anisotropía magneto-cristalina y de forma.

La constante de anisotropía magneto-cristalina se observa cuando el eje fácil está inducido por la estructura atómica del cristal, es decir, es intrínseca al material (si una partícula esférica tiene un eje fácil, dado a que su forma es isotrópica, la anisotropía observada es magneto-cristalina). Puede calcularse como el área entre $M=M_s$ y la curva de magnetización. (Bruno 1993; Ionescu, Llandro y Ziebeck 2019)

$$K_{magneto-cristalina} = \int_0^{M_s} \mathbf{H} d\mathbf{M} \quad (2.14)$$

La anisotropía de forma nace de las interacciones dipolo-dipolo y los campos demagnetizantes que generan uno o más ejes (cero para MNP esféricas). La energía del sistema dependerá de la orientación relativa entre la magnetización y los ejes del cristal. Mover el momento magnético a cualquier otra dirección va a requerir de un exceso de energía que puede ser calculado a partir de la anisotropía magnética efectiva (Mazo-Zuluaga *et. al.* 2009; Sander 2004):

$$K_{eff} = \mu_0 \int H dM \quad (2.15)$$

Nótese que en el caso de un nanorod, la cantidad de dipolos libres será mayor en la superficie que en los extremos, haciendo que la magnetización tome la dirección en el eje más largo, *in-plane*. (Thomson 2014).

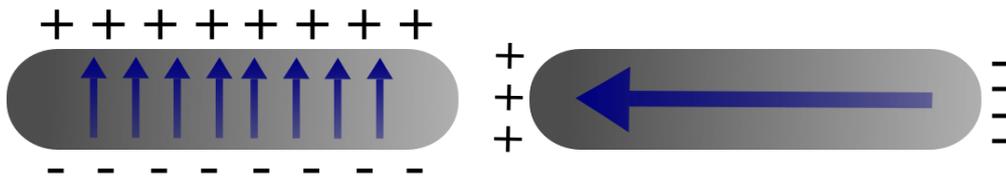


Figura 1.11: Polos superficiales libres en la superficie de nano-rods para clarificación del vector de anisotropía de forma. Elaboración propia.

Martínez-Banderas *et. al.* demostraron en su trabajo que los nanohilos magnéticos muestran resultados optimizados sobre las nanopartículas esféricas debido a su mayor relación superficie/área y mayor momento magnético originado por su fuerte anisotropía magnética. Esto aumenta su magnetización remanente permitiendo su uso en campos magnéticos más bajos donde las nanopartículas esféricas no responden.

1.6. Paredes de dominio

Se le llama pared de dominio a la región de transición entre dos zonas de magnetización uniforme (ver Fig. 2.4). La energía magnetostática se da por la interacción de los momentos magnéticos de la muestra con el campo magnetostático generado por ellos mismos, conocido como campo demagnetizante. El material forma dominios magnéticos distintos para minimizar la energía magnetostática, pese a que crear la pared suponga un aumento de la energía de intercambio.

El tamaño o radio crítico para la transición de multi-dominio a monodominio (r_c) puede ser definido como el tamaño adecuado por debajo del cual es posible existir sin una pared de dominio, pero no existe un valor discreto así que se emplea la palabra pseudo-monodominio. El grosor de este depende principalmente de la energía de intercambio (energía necesaria para mantener los espines paralelos), de la magnetización y de la anisotropía de la nanopartícula.

Existen dos radios de transición, uno para cambiar de comportamiento superparamagnético a monodominio (r_0), y el ya mencionado r_c para pasar de monodominio a multidominio (r_0). En disminuir el tamaño de la MNP, también lo hace su anisotropía magnética, hasta llegado un determinado tamaño en el que la energía térmica equipara la anisotropía magnética permitiendo la inversión aleatoria y haciendo así la MNP superparamagnética. Este tamaño puede ser estudiado con la siguiente ecuación:

$$r_0 = \left(\frac{6k_b T_B}{K} \right)^{1/3} \quad (2.16)$$

El modelo de Heisenberg se emplea para calcular la energía del sistema, considerando el momento de espín y un término adicional para la anisotropía, teniendo únicamente en cuenta la interacción con el vecino más cercano ya que la fuerza magnética dipolar entre dos espines electrónicos es mucho menor que la interacción de Coulomb.

Ciertamente, el efecto de todos los dipolos sumados puede ser sustancial y, con el objetivo de minimizar esta energía, surgen los nuevos dominios con momentos magnéticos señalando en distintas direcciones. A lo largo de las paredes de dominio el hamiltoniano no se cumple y el sistema estará pagando un costo energético para tener su energía global minimizada, asociado a fuerzas dipolares de largo alcance (Simon 2013). La geometría de los dominios depende fundamentalmente de la geometría de la muestra y del balance energético entre la energía de interacción entre vecinos y la interacción dipolar de largo alcance.

La pared costará una determinada energía por unidad de área, que balanceada con la energía dipolar de largo alcance que la indujo, a más energía cueste mayor será el dominio. Si se reduce el tamaño del cristal hasta tal punto que sea menor que el tamaño óptimo de un dominio, todos los momentos estarán alineados dando lugar a un monodominio. La energía mínima se alcanzará cuando la magnetización señale en la dirección del campo aplicado. Los momentos no podrán rotar hasta que se aplique un campo lo suficientemente grande para sobrepasar la barrera de activación, resultando en el comportamiento ideal de histéresis.

El tamaño crítico para partículas monodominio puede estimarse con la siguiente expresión:

$$\text{tamaño crítico} \rightarrow D_{crit} = \frac{9\sigma_w}{2\pi M_s^2} \quad (2.17)$$

$$\text{densidad de energía de la pared} \rightarrow \sigma_w = \left(\frac{2K_B T_C |K_1|}{a} \right)^{1/2} \quad (2.18)$$

Siendo $|K_1|$ la constante de anisotropía magneto-cristalina, T_C la temperatura de Curie, M_s la magnetización de saturación, K_B la constante de Boltzmann y a el parámetro de red. Si $D > D_{crit}$ tendremos un polidominio, $D < D_{crit}$ significa que estamos en una región monodominio, pero si la partícula monodominio decrece hasta tal punto que su energía es comparable o menor a la térmica $K_B T \geq K_{eff} V$; estaremos en régimen superparamagnético (B. Aktas, F. Mikailov 2007).

1.7. Histéresis

Podemos comprobar el efecto de la histéresis considerando un material ferromagnético monocristalino con un único dominio. Siendo Θ el ángulo entre la magnetización y el eje fácil, y α el ángulo entre el campo magnético aplicado y el eje fácil, la energía de anisotropía se describe tal que:

$$E_a = K_u \sin^2 \theta \quad (2.19)$$

En aplicar el campo magnético, aparece la energía magnetoestática o de Zeeman:

$$E_{zeeman} = H M_s \cos(\alpha - \theta) \quad (2.20)$$

Así, la energía para el monodominio será:

$$E = K_u \sin^2 \theta + H M_s \cos(\alpha - \theta) \quad (2.21)$$

Sin campo magnético, K_u será la barrera energética para rotar el momento magnético de la MNP de Θ 0 a π . Si consideramos medir individualmente a lo largo del eje difícil ($\alpha = \frac{\pi}{2}$):

$$E = K_u \sin^2 \theta + H M_s \cos\left(\frac{\pi}{2} - \theta\right) = K_u \sin^2 \theta + H M_s \sin(\theta)$$

$$\frac{dE}{d\theta} = 2K_u \sin\theta \cos\theta + H M_s \cos\theta = (2K_u \sin\theta + H M_s) \cos\theta = 0$$

$$\begin{cases} \theta = \pm \frac{\pi}{2} \pm \pi n \\ 2K_u \sin\theta = -H M_s \end{cases}$$

$$\frac{d^2 E}{d\theta^2} = 2K_u \cos^2 \theta - 2K_u \sin^2 \theta - H M_s \sin\theta > 0$$

$$\text{para } \theta = \pm \frac{\pi}{2} \rightarrow -2K_u < H M_s \rightarrow \text{condición} \rightarrow H_a = \frac{2K_u}{M_s}$$

Siendo H_a el campo en el que la magnetización alcanza la saturación. Para la componente de magnetización paralela a el campo aplicado, en el eje difícil:

$$\sin\theta = \frac{M}{M_s} \rightarrow \frac{M}{M_s} = \frac{2K_u}{H}$$

$$\boxed{M = M_s \frac{H}{H_a}} \quad (2.21)$$

Demostrando así que en el eje difícil la magnetización cambia de manera lineal con el campo aplicado hasta que alcanza la saturación.

Haciendo lo mismo para el eje fácil ($\alpha = 0$):

$$E = K_u \sin^2 \theta + HM_s \cos(0 - \theta) = K_u \sin^2 \theta + HM_s \cos(\theta)$$

$$\frac{dE}{d\theta} = 2K_u \sin\theta \cos\theta - HM_s \sin\theta = (2K_u \cos\theta + HM_s) \sin\theta = 0$$

$$\begin{cases} \theta = \pm\pi n \\ 2K_u \cos\theta = -HM_s \rightarrow \cos\theta = \pm \frac{2K_u}{H} \end{cases}$$

$$\frac{d^2E}{d\theta^2} = 2K_u \cos^2 \theta - 2K_u \sin^2 \theta + HM_s \cos\theta > 0$$

$$\text{for } \theta = 0 \rightarrow 2K_u > HM_s \rightarrow H < \frac{2K_u}{M_s}$$

$$\text{for } \theta = \pi \rightarrow 2K_u < -HM_s \rightarrow H > -\frac{2K_u}{M_s}$$

$$\boxed{H_c = \frac{2K_u}{M_s}} \quad (2.22)$$

Entonces, la energía estará minimizada para valores de campo magnético que estén entre los valores mencionados de campo, resultando en una representación rectangular ideal de un ciclo de histéresis. Véase Fig. 2.12. A partir de esta expresión nace el campo coercitivo, probando que los materiales con mayor magnetización de saturación tendrán bajos campos de coercitividad exceptuando que tengan una gran anisotropía (G. Beach 2013).

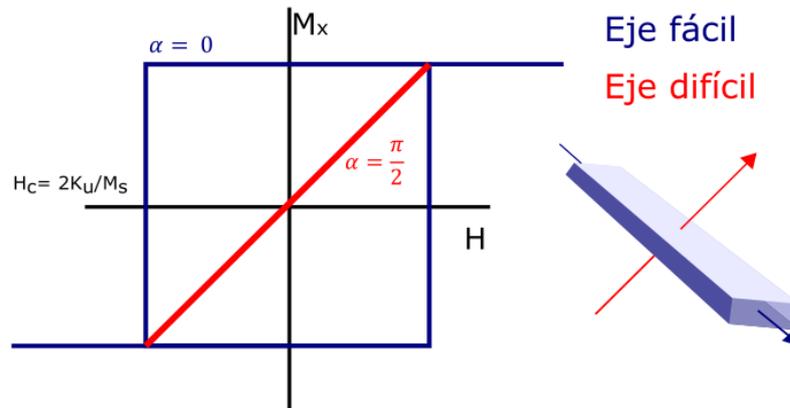


Figura 1.12: Representación de la curva de magnetización medida en el eje fácil y difícil de una nanoestructura con anisotropía uniaxial.

Cabe mencionar que la magnitud de la magnetización de saturación está estrechamente relacionada con el tamaño de la nanoestructura. La capa superficial en la que los espines se encuentran desordenados toma más relevancia a medida que aumenta la relación superficie-

volumen, disminuyendo M_s para las MNP menores. Esto puede estimarse con la siguiente ecuación (Kolhatkar *et. al.* 2013):

$$M_s = M_{sb} \left[\frac{(r - d)}{r} \right]^3 \quad (2.21)$$

Con r como radio de la MNP, d el grosor de la capa superficial desordenada y M_{sb} la magnetización de saturación del *bulk*. Esta capa superficial con momentos desalineados puede resolverse funcionalizando las MNP con el componente adecuado.

El campo coercitivo sigue un patrón similar, pero alcanza su máximo y luego decrece con el tamaño. Las medidas magnéticas tomadas con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) nos resuelve las curvas de magnetismo expuestas en adelante (Roca *et. al.* 2006).

1.8. Captación celular, funcionalización y esterilización

La alta energía superficial de las nanoestructuras se traduce en la formación de aglomeraciones, las cuales son usualmente muy grandes para poder ser captadas por las células. Para evitar la aglomeración de las MNP debido a fuerzas de Van der Waals e interacciones magnetostáticas entre partículas se acostumbra a recubrir las MNP con moléculas polares.

La comprensión de la interacción entre la MNP y la biomolécula es vital para el diseño apropiado de la nanoestructura y tratamiento, por ejemplo, en función de promover o suprimir la captación celular. Existen distintos tipos de endocitosis dependiendo del tamaño de nuestra MNP, ya que variará el método de internalización, tamaño de las vesículas, propiedades del cargo, destino, etc.

Tras tener una buena caracterización de nuestras MNPs, hay que considerar que las biomoléculas presentes en el medio biológico se adsorberán a la superficie de nuestra MNP aumentando su radio y modificando su composición y actividad. Consecuentemente, su interacción celular se verá modificada (Shang, Nienhaus y Nienhaus 2014).

El tamaño es uno de los factores con gran efecto en la eficiencia de la captación celular, así como en su cinética, el destino subcelular y su citotoxicidad. Por debajo de los 10nm se observa que las MNP tienden inicialmente a acumularse en la membrana para luego ir entrando gradualmente a la región intracelular, mientras que las MNP mayores (100nm) se internalizan directamente (Shang, Nienhaus y Nienhaus 2014). Esto se explica por la interacciones ligando-receptor, mientras las MNP pequeñas necesitan acumularse para interactuar simultáneamente y activar la invaginación de la membrana, las MNP mayores no. El ratio de captación es mayor para células positivas que negativas debido a la carga superficial de la membrana celular. Se estima por la literatura una captación óptima para tamaños sobre los 40nm de MNPs recubiertas (Huang *et. al.* 2010).

Las estrategias de funcionalización química para mejorar la solubilidad y estabilidad de las MNPs han sido sujeto de intensa investigación. El polietilenglicol (PEG) es un polímero hidrofílico que aumenta la hidratación de la MNP mejorando su solubilidad y biocompatibilidad. La superficie de las NPs recubierta con PEG minimiza la absorción proteica permitiendo evadir las células del sistema reticuloendotelial (por ejemplo los macrófagos del hígado y del bazo) y por tanto aumentando el tiempo de circulación en la sangre. Además, la funcionalización con el péptido de factor de crecimiento epidérmico (EGF) mejora la selectividad del tratamiento, dirigiéndolo más específicamente a las células cancerígenas.

Las MNPs funcionalizadas pueden añadirse al cultivo celular en suspensión o en forma de ferrofluido. Esto conlleva grandes diferencias en la captación celular y en la citotoxicidad, directamente relacionadas con el grado de aglomeración de las MNPs. En este estudio se empleó medio de cultivo para dispersar las MNPs.

La esterilización es otro punto clave para trasladar las MNPs del área de la fisicoquímica a la biología, así como para cualquier dispositivo que pretenda ser empleado para aplicaciones biomédicas. La contaminación invalidará el estudio induciendo citotoxicidad y/o enfermedades infecciosas. Las MNPs pueden ser tóxicas de manera indirecta generando especies reactivas del oxígeno (ROS) al interactuar con las células de manera externa o interna, un exceso de ROS produce daños en la membrana celular e inflamación. Entonces, las MNP precisan ser estériles, i.e. sin ningún organismo vivo, y cada método de esterilización tiene distintos efectos en las propiedades intrínsecas y en la estabilidad en función del material y recubrimiento de la MNP que deberían considerarse. Autoclave, irradiación UV, tratamientos químicos, etc. son algunas de las estrategias más empleadas.

Las nanoestructuras poliédricas fueron secadas por liofilización, ya que la humedad puede romper la esterilización, lo que puede conllevar coalescencia de nuestras MNPs funcionalizadas. Después fueron irradiadas con luz UV por un periodo de 15 minutos. El procedimiento seleccionado requerirá de mayores estudios para asegurar la esterilidad conservando la estabilidad y características fisicoquímicas, y demostrar su eficiencia en comparación a otras alternativas (França *et. al.* 2010).

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales

Los productos químicos empleados fueron comprados en Sigma-Aldrich®, J.T. Baker® y Chemix® y empleados sin previa purificación.

Sigma Aldrich®: FeCl₃ (98%, CAS 7705-08-0), FeCl₂ (97%, CAS 7758-94-3), NH₄OH (28-30% CAS 1336-21-6), C₈H₁₁NO₂·HCl (CAS 62-31-7), C₁₈H₃₇N (70%, CAS 112-80-1), C₁₈H₃₄O₂ (90%, CAS 112-80-1), C₅H₂₁FeO₆ (97%, CAS 14024-18-1)

ChemiX®: HCl (CAS 764701-0)

J.T. Baker®: C₆H₅CH₃ (99.9%, CAS 108-88-3), C₆H₁₄ (98.5%, CAS 110-54-3)

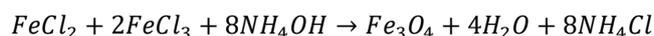
Para los cultivos celulares se obtuvo el DMEM de GIBCO™ (12100046) y el MTT de Promega Corporation.

2.2. Métodos

2.2.1. Síntesis de MNPs

2.2.1.1. Síntesis por coprecipitación

En este estudio se sintetizaron MNPs casi-esféricas por el método descrito por (Barreto *et. al.* 2013). En dicho método se emplean sales de cloruro de hierro (II) y cloruro de hierro (III) en relación molar 1:2 para obtener magnetita. Lo anterior queda descrito en la siguiente reacción:



La solución acuosa resultante, en un volumen final de 300 mL, se ultrasonizó (ELMASONIC S 30H) por 5 minutos a 30°C y se le añadieron 20 µL de HCl.

La mezcla se llevó a 80° en agitación mecánica (BIOBASE® OS20-S) a 500 rpm. Llegada esa temperatura se añade NH₄OH (hasta pH=8) para producir la nucleación. Se mantiene a 80°C y 500 rpm una hora y se deja reposar para obtener un precipitado. Debido a que la disolución se encuentra a un pH básico, por decantación magnética se lava con agua destilada repetidamente hasta que la solución se torna pH neutro. Se obtuvo un polvo de MNPs mediante un proceso de secado a 50°C durante 24h (BIOBAS PCHB-C6000).

2.2.1.2. Síntesis por coprecipitación en presencia de campo magnético

El protocolo para sintetizar rods se modificó del propuesto por (Ficai *et. al.* (2011)).

Las MNPs de tipo rod se obtuvieron reproduciendo el procedimiento anterior, pero en este procedimiento se depositó el vaso de precipitados en el centro de una bobina que produjo un campo de aproximadamente 100 Oe durante la etapa de precipitación. Esta vez el vaso no

estará directamente sobre la placa calefactora sino que en un baño de silicona, que permite conseguir la posición y temperatura necesaria para el procedimiento.

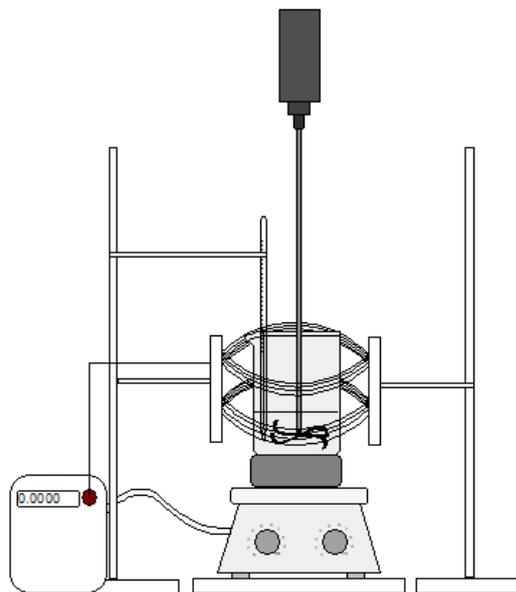


Figura 2.1: Síntesis por coprecipitación en presencia de campo magnético. Elaboración propia.

2.2.1.3. Síntesis por reacción solvotermal

Esta síntesis se realiza siguiendo el método descrito por (Zeng *et. al.* 2010)), considerando alguna modificación:

1mmol de acetilacetonato de hierro (III), $\text{Fe}(\text{acac})_3$, se mezcló con distintas proporciones de oleilamina y ácido oleico en medio orgánico (tolueno), véase tabla 3.1. Se introdujeron 12,5 mL de dicha mezcla en un autoclave de teflón con capacidad de 15mL. Se introdujo el autoclave en el horno a 200°C por 24h. Después de dejar enfriar el autoclave a temperatura ambiente durante 24h, se centrifugaron las MNPs (BIOBASE BK-TH16) en eppendorfs de 1,5 mL a 16500rpm por 30 minutos para precipitar las MNPs y se limpiaron en hexano. Este último procedimiento se repitió cuatro veces.

Debido al mayor rendimiento obtenido en la síntesis de MNP1 Ø y mayores características magnéticas observadas, en adelante la mención de MNP Ø poliédricas hará referencia a las sintetizadas con 5mL de oleilamina, en ausencia de ácido oleico.

Tabla 2.1: Parámetros síntesis por reacción solvotermal bajo un sistema de ligandos dual.

MNP 5/0 (1)	MNP 5/0 (2)	MNP 3/2	MNP 0/5
1mmol $\text{Fe}(\text{acac})_3$			
20 mL tolueno			
5ml OAm		3ml OAm	0ml OAm
0ml OAc		2ml OAc	5ml OAc
1 día 200°C	2 días 200°C	1 día 200°C	1 día 200°C

2.2.2. Funcionalización de la superficie

La funcionalización de las MNPs \emptyset se llevó a cabo por medio del protocolo extraído de Shultz *et al.* (2007), en la que se emplea una reacción magnetita/dopamina de 1:10. Para obtener la funcionalización se requiere que la dopamina esté deprotonada (ver Fig. 3.2). Las MNPs en polvo junto con la dopamina fueron disueltas en agua destilada. Se añadió hidróxido de amonio para deprotonar la quinona favoreciendo la unión ($\text{pH}=8$). Luego, la muestra se ultrasonizó durante 15 minutos y se agitó mecánicamente durante 2 horas a 800 rpm. Finalmente, las MNPs-DOP se centrifugaron en eppendorfs de 1.5mL a 16500rpm para obtener un precipitado. Posterior a ello se procedió a lavar con agua destilada y repitiendo la centrifugación repetidas veces. Del producto obtenido, se obtuvo un polvo de MNPs-DOP mediante un proceso de secado a 50°C durante 24h.

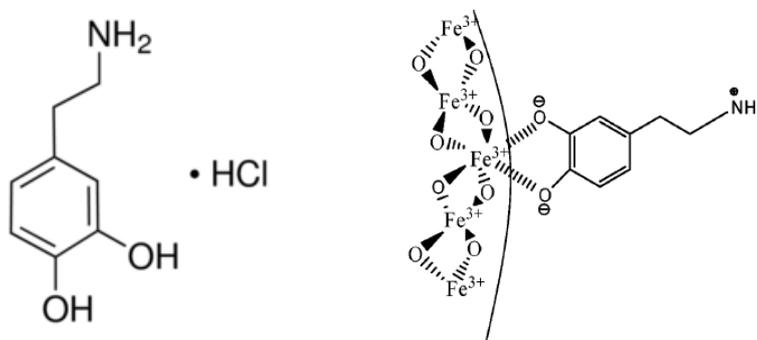


Figura 2.2: 2-(3,4-Dihidroxifenil) etilamina hidrocloreto, dopamina. Coordinación entre la MNP de magnetita y la dopamina. Extraída de Shultz *et. al.* 2007.

2.2.3. Esterilización

Las MNPs-(\emptyset y DOP) sintetizadas por coprecipitación fueron depositadas sobre un crisol y calentadas a 121°C en un horno tubular con atmósfera controlada de Ar/He por una hora (MTI, GSL-1100X). Previo a su uso en el cultivo fueron expuestas a luz UV durante 15 minutos.

Las MNPs-DOP elaboradas por reacción solvotermal se liofilizaron (LABCONCO FreeZone 2.5, Merck) y se irradiaron con luz UV durante 15 minutos.

2.2.4. Cultivo celular

Células de la línea celular HeLa (obtenida comercialmente de *American Type Culture Collection* (ATCC)) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con 100 μL de medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado con: 1mM de piruvato de sodio, 100IU/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina, y un 10% de suero fetal de bovino (BSA) y se incubaron (Autoflow Ir Direct Heat CO2 Incubator (Nuair)) a 37°C con un 95% de aire y 5% de CO₂ por 24h. Aproximadamente se cultivaron 1000 células por pocillo.

2.2.4.1. Cultivo celular para ensayo de viabilidad

Se evaluó la citotoxicidad de las MNPs por ensayo colorimétrico con el reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidido (MTT) según las condiciones del fabricante.

Se incubaron células, como se describe en el punto anterior, en 4 pocillos por columna en una placa de 8x12 pocillos. Pasado el período de incubación celular se añadieron 2 controles: en la primera columna se realizó el control negativo, con peróxido de hidrógeno al 30% (7µL para 100 µL de medio) para corroborar la muerte celular; y un control positivo, sin MNPs. A continuación se añadieron 100µL de MNPs en un total de 10 concentraciones decrecientes. Tras otro periodo de incubación de 24h se retira el medio con las MNPs y se añaden 50 µL de medio sin suplementar, para evitar su interferencia en el ensayo colorimétrico, y 10 µL de MTT. Finalmente, se incuba la placa con MTT por 2 horas más.

La concentración del MTT reducido en cada pocillo se mide a 495 nm usando un lector de absorbancia para ELISA (TECAN infinite F50 ®) a 495nm, con un valor de referencia de 620nm cuyo resultado se resta de la absorbancia total. Los valores del control se contrastan con el control negativo para determinar si ha habido citotoxicidad o efectos de campo. La viabilidad celular se calcula como el porcentaje de densidad óptica de las células tratadas en comparación al control negativo. Los datos resultantes se analizan empleando el software GraphPad Prism®.

$$viabilidad (\%) = \frac{Densidad\ óptica\ de\ las\ células\ con\ MNPs}{Densidad\ óptica\ de\ los\ controles\ negativos} \cdot 100 \quad (3.1)$$

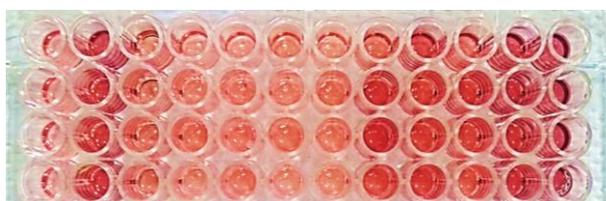
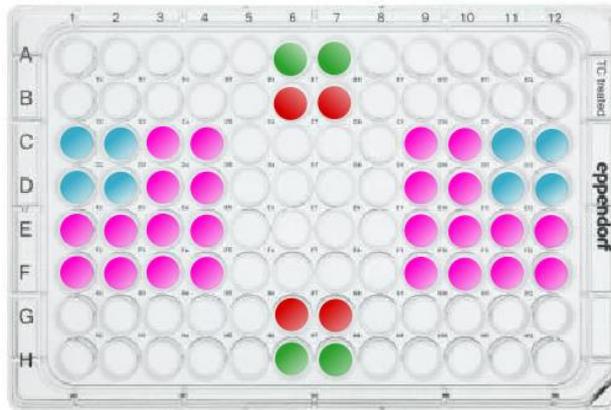


Figura 2.3: Control de citotoxicidad de las nanoestructuras poliédricas. Primera columna, control positivo. Segunda columna, control negativo. De columna 3 a 12, concentraciones de MNPs desde 10mg/ml hasta 10 pg/ml.

2.2.4.2. Cultivo celular para AMF

En cada placa se realizaron tres tipos de control. El control negativo no posee MNPs ni recibe AMF, para verificar la estabilidad de las células durante el proceso; el positivo, posee MNPs y no recibe AMF, para verificar la citotoxicidad de las MNPs; y el control de campo, en el que las células no poseen MNPs pero recibe AMF, para demostrar que el campo magnético o el calor generado por el sistema no daña las células (ver Fig. 3.4).



Control negativo
Control positivo
Control campo

Figura 2.4: Esquema placa cultivo para AMF y sus respectivos controles. Elaboración propia.

2.2.5. Dispositivo generador de AMF

El AMF se aplica mediante un sistema de bobinas diseñado específicamente para este ensayo in-vitro.

El diseño se imprime en polímero PLA, de 1,75mm de diámetro con boquilla de 0,3mm (3D printer ANYCUBIC). Ver planos en anexo 1. Ambas bobinas están hechas con filamento de cobre de 0,76mm de diámetro (American wire gauge 21) dando 11 vueltas por capa, en un total de 5 capas. La corriente alterna que alimenta las bobinas se produce con un generador de funciones (GW INSTEK AFG-2225) y un amplificador (PHONIC XP 2000), controlando los parámetros aplicados a la bobina con un osciloscopio (GW INSTEK GDS-1072B).

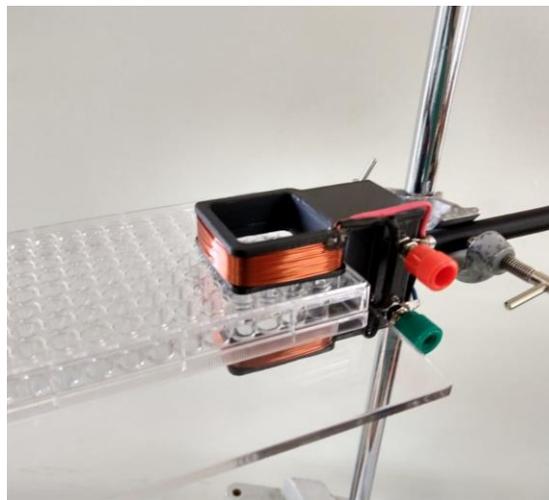


Figura 2.5: Diseño inicial para aplicar campo magnético AC.

El sistema se diseñó inicialmente con una bobina, véase figura 3.5, y, tras unos experimentos, se rediseñó con dos bobinas paralelas, véase figura 3.6. Estas se adaptan a la placa de 96 pocillos cubriendo dos secciones de 4x4 simultáneamente, evitando así la variación de tiempo

fuera de la incubadora antes de recibir el tratamiento o, en su defecto, el uso de una placa por cada experimento.

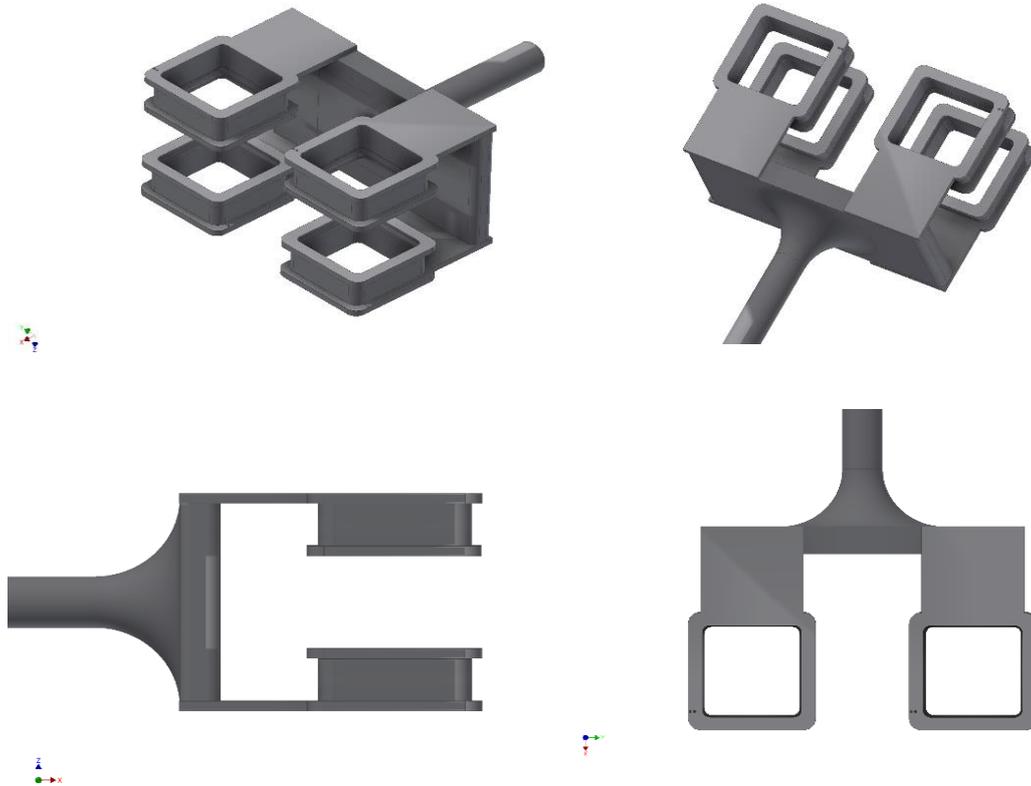


Figura 2.6: Diseño del sistema de bobinas previo enrollar el cable de cobre.



Figura 2.7: esquema inserción cultivo celular a dispositivo de AMF.

Para evitar el calentamiento heterogéneo en la placa, que podría derivar en falsos resultados en función de la proximidad a la bobina, se colocó un material aislante por encima y por debajo de esta. A su vez, se colocó un ventilador calefactor cerca de la bobina para evitar la muerte celular por la brusca disminución de temperatura. Hay que tener en cuenta que las condiciones en las que se realizan los experimentos fluctúan, y que la manera óptima sería

tratarlo en una atmósfera bien controlada (especialmente temperatura, porcentaje de oxígeno, CO₂ y humedad).

Después de aplicar el campo magnético se siguieron dos procedimientos: realizar el ensayo MTT directamente o volver a introducir la placa en la incubadora para estabilizar las células antes de estudiar su viabilidad, dando tiempo a que se produzca la muerte celular en caso de no ser inmediata. El ensayo MTT se realiza siguiendo el protocolo descrito al final de la sección 3.2.5.1.

2.2.6. Caracterización

2.2.6.1. TEM

El tamaño y la forma de las nanoestructuras se determinó por microscopía de transmisión de electrones (modelo TEM HT7700 Hitachi High-Technologies Corporation, voltaje de aceleración 120 kV, emisión 10 μ A).

El tamaño medio de las partículas esféricas y su distribución se evaluó midiendo ≥ 200 partículas con el software ImageJ®. Los datos se distribuyeron en una curva log-normal y se obtuvo la desviación estándar para todas las muestras.

El tamaño y distribución de las nanoestructuras obtenidas por reacción solvotermal se pudo evaluar automáticamente dado que estaban más dispersas que las nanopartículas esféricas. Se obtuvo el diámetro de Feret y su error para ≥ 350 partículas, véase figura. 3.8.

También se observaron los planos cristalográficos de la muestra, los cuales se estudiaron realizando la transformada de Fourier (FFT) para corregir la resolución, y realizando la transformada inversa para medir la distancia interplanar resultante (ver Fig. 3.9).

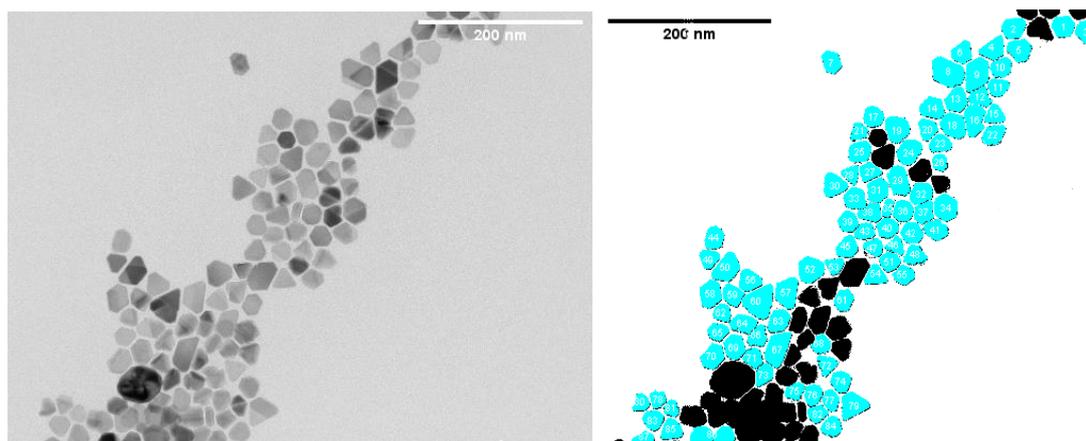


Figura 2.8: Conteo automático diámetro de Feret, realizado con ImageJ®.

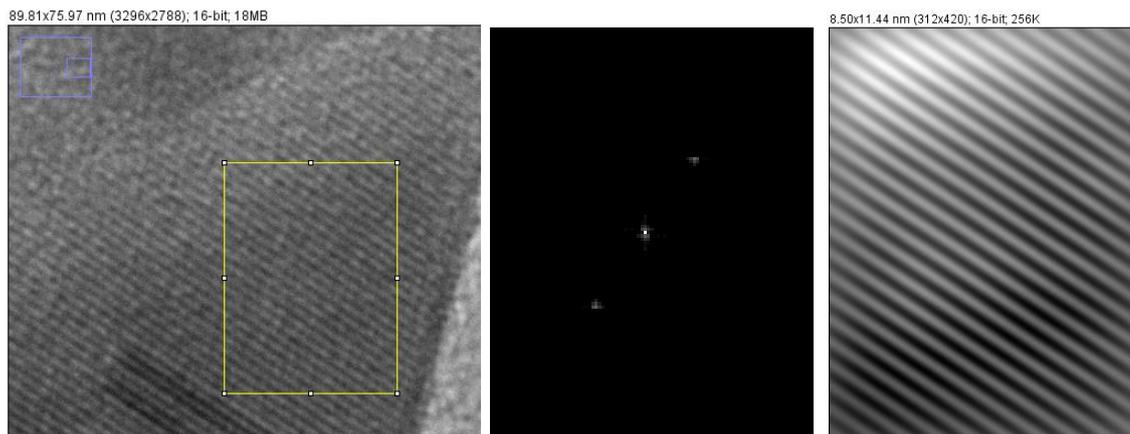


Figura 2.9: Izquierda: selección de una sección de Figura TEM para realizar la transformada de Fourier. Centro: modificación de Figura de la FFT para realizar la transformada inversa de Fourier (derecha).

2.2.6.2. VSM

Los ciclos de histéresis fueron medidos a temperaturas crecientes con el magnetómetro de muestra vibrante (VSM Cryogenic®).

Para medir las propiedades magnéticas de 5 a 300K se introdujeron en una cápsula cantidades conocidas de MNPS-CP-Ø y MNPs-RS-DOP. Estas se fijaron con algodón para evitar el movimiento de las MNPs en ser agitadas. La magnetización vs. campo magnético se obtuvo en el rango de ± 4 y ± 2 T a una velocidad de 0,4 T/min, respectivamente.

2.2.6.3. XRD

La composición de las MNPs se estudió mediante difracción de rayos X (XRD). Las medidas se tomaron en un rango 2θ entre $10-90^\circ$ usando un tubo de cobalto con radiación $K\alpha$ ($\lambda=1.79026\text{\AA}$) (Bruker D2 phaser).

Se analizaron los resultados con el software X'Pert High Score Plus®, cuya base de datos permite asociar los picos de difracción a materiales cristalinos.

2.2.7. Ensayo estadístico

Los valores numéricos se reportaron como promedio \pm error estándar de medida (SEM). Todos los ensayos estadísticos presentados para citotoxicidad y muerte celular por aplicación del AMF se obtuvieron empleando el test ANOVA o la t de Student (GraphPad Software Inc., San Diego CA). La cantidad de muestras para cada grupo de AMF era ≥ 12 y para controles ≥ 4 . Los valores de p se consideraron estadísticamente significativos a $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de las nanoestructuras de magnetita

3.1.1. TEM

Para determinar el tamaño y desviación estándar de las MNPs se tomaron a partir de 200 medidas extraídas de imágenes TEM, éstas y sus histogramas se presentan en la imagen 4.1. Debido a las distintas morfologías de las MNPs-RS se empleó el diámetro de Feret para presentar sus resultados.

Las imágenes 4.2 y 4.4 muestran los planos cristalográficos de las nanoestructuras. Sus orientaciones se obtienen mediante la medida de la distancia interplanar manual y por FFT. Sus valores y estadísticas se presentan en la tabla 4.1 y 4.3.

Como puede observarse en las dos imágenes superiores de la figura 4.1, no se observa una diferencia significativa en la morfología de las MNPs-CP realizadas en presencia de campo magnético, pese a que se observó alguna nanoestructura alargada. Entre ambas muestras existe una diferencia de tamaño de 1.95 ± 5.17 nm. Dada la similitud entre ambas, se procederá a caracterizar y estudiar los efectos de las MNPs-CP empleando únicamente la muestra de mayor tamaño, i.e. la producida sin campo, debido a su teórica menor reactividad superficial, resultando en una menor aglomeración. Ficai *et. al.* consiguió la morfología rod aplicando un campo de 0.5 mT, para el cual sus MNPs se dispusieron a lo largo de las líneas de campo magnético. En aumentar el pH para la fase de crecimiento aumentó la cantidad de magnetita y crecieron las nanoestructuras. El campo magnético que aplicamos, 10mT, pudo haberse visto afectado por la presencia de materiales magnéticos del entorno de la bobina; o se basificó el medio muy rápidamente, lo que no permitió el ordenamiento en la dirección de campo esperado.

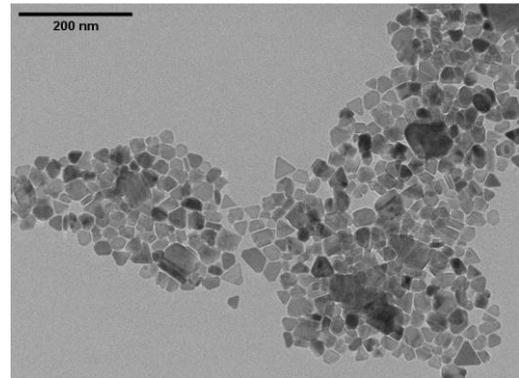
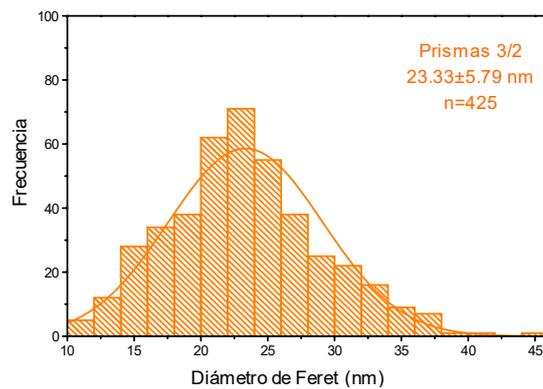
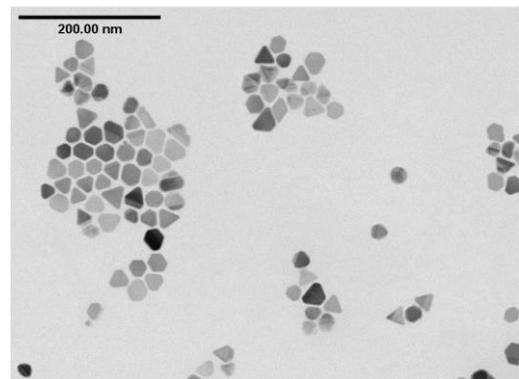
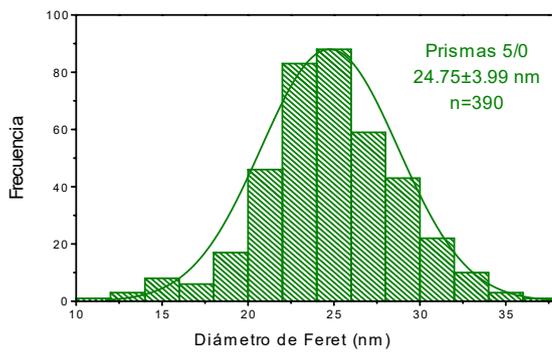
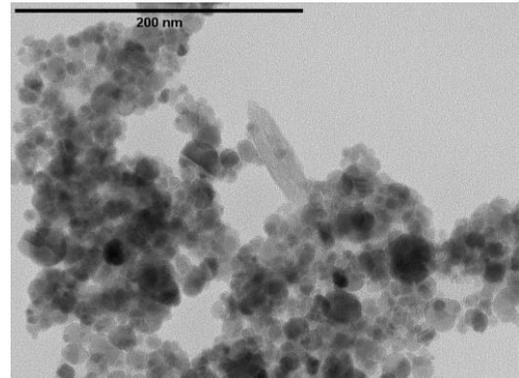
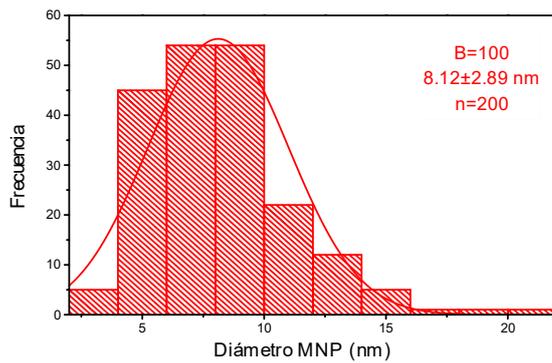
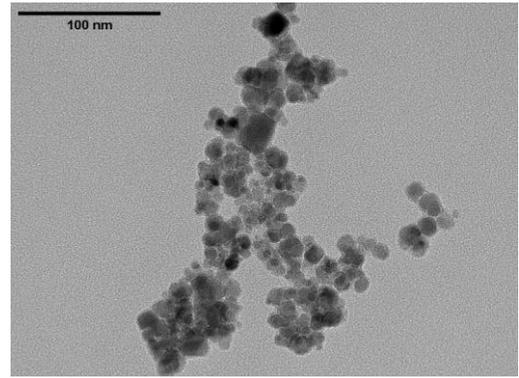
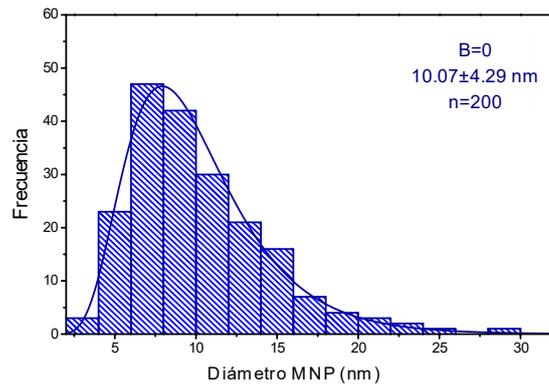


Figura 3.1: Histogramas de las nanoestructuras de magnetita. MNPs-CP sintetizadas sin campo (azul), y con campo (rojo). Figuras inferiores MNPs poliédricas, a distintas proporciones de oleilamina y ácido oleico, 5/0 (verde) y 3/5 (naranja). Presentado como promedio \pm desviación estándar. A su derecha imagen TEM correspondiente.

Las nanoestructuras de magnetita sintetizadas por reacción solvotermal presentaron una anisotropía de forma mucho más remarcada (Obsérvese figuras inferiores de la imagen 4.1). En cuanto a las MNPs-RS sintetizadas con una proporción 5/0 de oleilamina y ácido oleico, no se observó diferencia significativa en morfología ni tamaño entre las que permanecieron 24h y 48h en el horno, por lo que se escogieron las de 24h por su menor costo de producción. Para la proporción 3/2 se observó una disminución de tamaño y variación de morfología no significativa, pero mayor aglomeración y menor rendimiento. Las MNPs sintetizadas a proporción 0/5 fueron descartadas del estudio por un rendimiento extremadamente bajo. En función de estos resultados se prosiguieron las caracterizaciones y estudios de campo con las MNPs-RS 5/0.

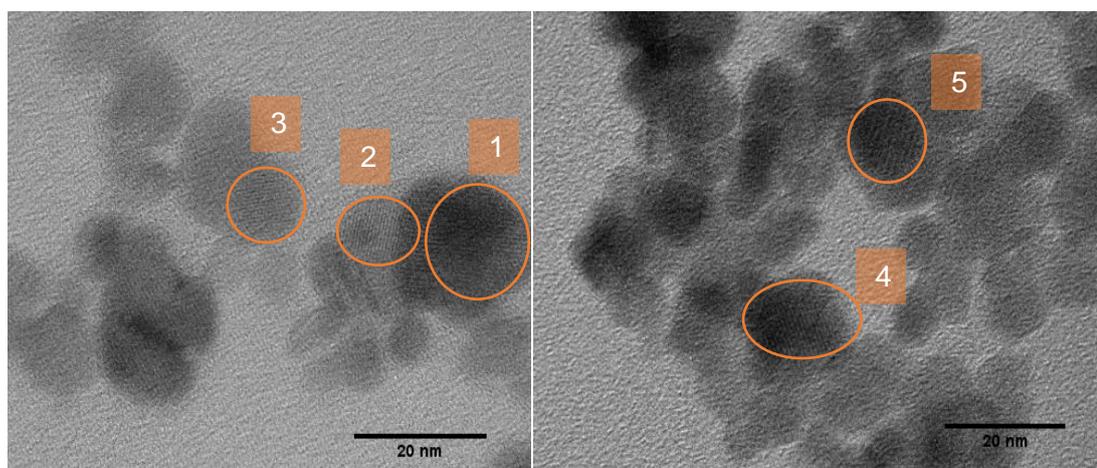


Figura 3.2: Figura TEM de los planos cristalográficos de las MNPs-CP-Ø de magnetita.

En la figura 4.2 se presentan las imágenes de planos cristalográficos de MNPs-CP. Asociarles un plano será complejo ya que no tienen una morfología homogénea. Como ya introducimos, el plano con menor energía en un cristal FCC en condiciones normales es el (111), seguido del (100) y (110); así, la termodinámica promoverá una estructura octaédrica o tetraédrica exponiendo únicamente planos (111), pero ya que no son octaedros ideales se presentarán diversos planos. Se presentan los valores de distancia interplanar marcados en la figura 4.2 en la tabla 4.1, así como su plano asociado.

Tabla 3.1: Valores extraídos de los planos cristalográficos de las MNPS-CP-Ø. $\pm SD$: desviación estándar. *El patrón observado no corresponde a un plano cristalográfico: efecto Muaré.

Planos	d_1 (Å)	d_2 (Å)	d_3 (Å)	d_4 (Å)	d_5 (Å)
Promedio	5.48	5.24	4.64	5.06	9.18
$\pm SD$	0.21	0.19	0.17	0.19	0.26
FFT	6.20	4.91	4.90	6.83	10.41
Plano	(110)	(111)	(111)	(110)	*Muaré

La asociación al plano expuesto se obtuvo a partir de la ficha de parámetros cristalográficos de la magnetita (JCPDS 01-086-1352) presentados en la tabla 4.2. Como podemos observar, para el patrón resaltado en la estructura número 5 se observa una distancia muy grande y

particularmente bien definida que asociamos a un patrón de muaré. El patrón de muaré es un patrón de interferencia que se forma cuando se superponen dos rejillas de líneas con un cierto ángulo o de tamaños diferentes (ver Fig. 4.3).

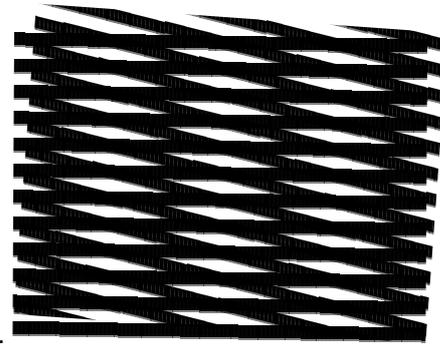


Figura 3.3: Patrón de muaré. Elaboración propia.

Tabla 3.2: Valores distancias interplanares para la magnetita. JCPDS 01-086-1354.

H	K	L	d (Å)
1	1	1	4.87595
2	2	0	2.98590
4	0	0	2.11135
1	1	0	5.97180
1	0	0	8.44540

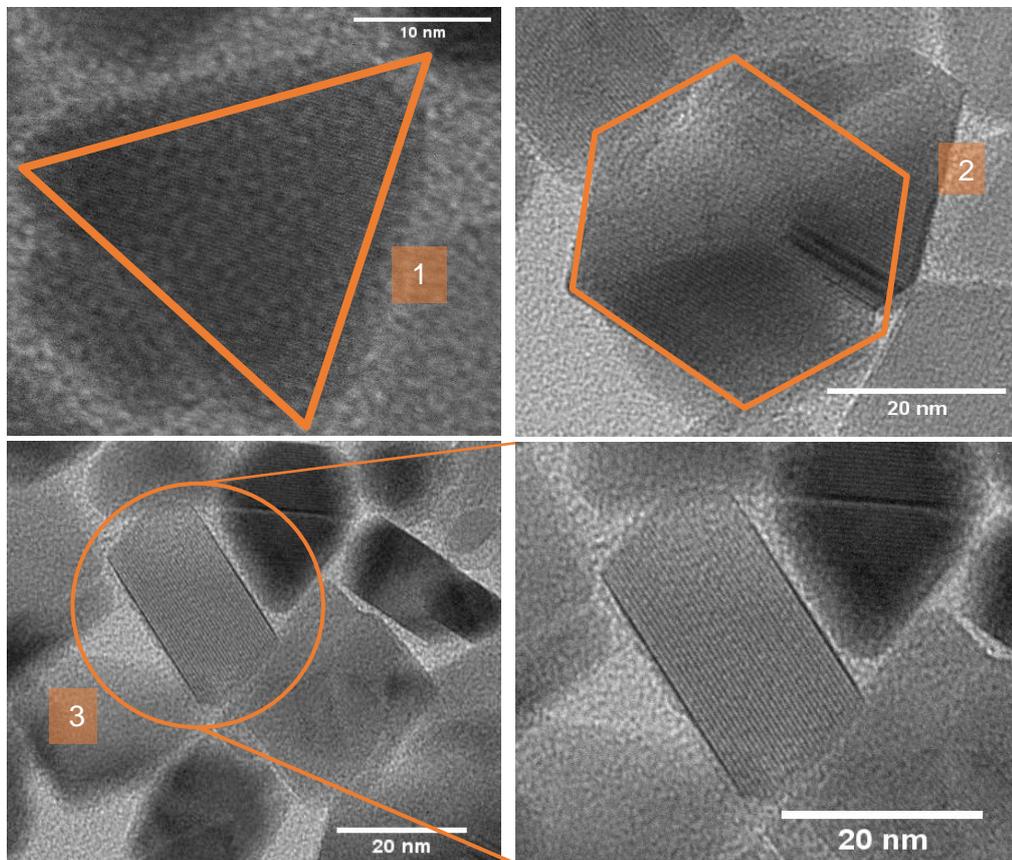


Figura 3.4: Imágenes TEM de los planos cristalográficos de las MNPS-RS-Ø 3/2 de magnetita

Tabla 3.3: Valores estadísticos para las distancias interplanares de las estructuras poliédricas.

Plano	d_1 (nm)	d_2 (nm)	d_3 (nm)
Promedio	3.26	5.14	5.10
\pm SD	0.30	0.43	0.48
FTT	3.20	5.15	5.17
Plano	(220)	(111)	(111)

El motivo por el que surgieron geometrías tan diferentes y menos aglomeradas en las MNPs-RS se atribuyó a la modificación de energía superficial de los planos producida por el ácido oleico y la oleilamina. Ambos son solventes de alto punto de ebullición, agentes reductores y estabilizantes, permitiendo el control de la cinética de la reacción. Las interacciones y coordinación de ambos ligandos con el precursor metálico dan lugar a distintas velocidades de reducción, y por tanto a distintas formas, pero el factor que controla dicha dispersión de morfologías aún se discute (Wang *et. al.* (2015), Cai y Wan (2007)).

L. Chen *et. al.* demostraron que aumentando la concentración de NaOH pasaban de tener octaedros truncados a dodecaedros, y en excederse conseguían poliedros irregulares y partículas pequeñas. Se observó un efecto similar en aumentar la concentración de Fe^{3+} . Esto se atribuye a una alta dosis de agente reductor, i.e. aumento de la velocidad de crecimiento, y al aumento del ratio de nucleación, respectivamente.

Mourdikoudis y Liz-Marzán probaron que la oleilamina estabiliza las facetas (111). Chen *et. al.* sintetizó dodecaédros que exponían facetas de alta energía (110) mediante su estabilización selectiva, demostrando que el ácido oleico deprotonado se adsorbía fuertemente a dicha la faceta.

En base a estas observaciones y los resultados se atribuye la presencia de las facetas (111) en las MNPs-RS a la menor energía superficial y a la estabilización de la oleilamina, mientras la presencia de facetas de alta energía (110) se atribuyen a la estabilización otorgada por el ácido oleico. A partir de estas observaciones y los resultados, se intuye que las superficies de la MNP triangulares como la presentada en la figura 4.5 están exponiendo los planos (110), mientras sus tres costados exponen las caras (111)

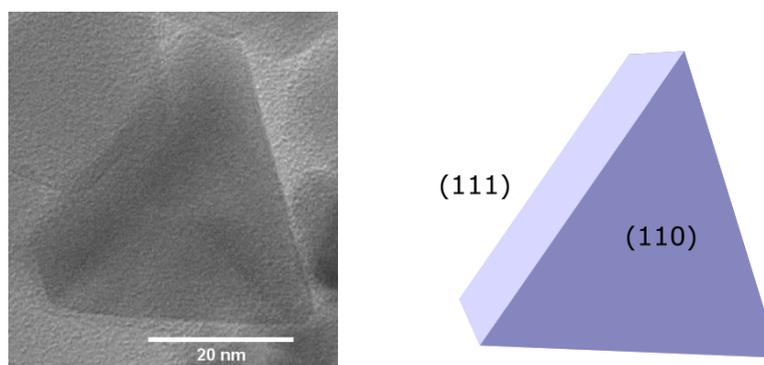


Figura 3.5: Orientación ideal de una nanoestructura de tipo triangular. Elaboración propia.

Para acabar con las observaciones de microscopía TEM, nos fijamos en un efecto de formación de cadenas. Un estudio realizado por Saville *et. al.* señala que las suspensiones de MNPs pequeñas (alrededor de los 20nm), si no se estabilizan con polímeros, pueden formar agregados lineares como el que observamos en nuestra muestra (véase Fig. 4.6). Tanto la interacción entre las MNPs como el AMF externo son responsables de la formación de estos agregados que pueden resultar en un impacto negativo en los sistemas biológicos, por ejemplo, destruyendo orgánulos intracelulares. Shen *et. al.* (2017) sintetizaron MNPs de magnetita dopada con zinc y funcionalizadas con EGF, las cuales bajo un AMF de 15Hz y 40mT formaron cadenas que produjeron cientos de pN resultado en daños drásticos en las membranas lisosomales, i.e. muerte celular y necrosis.

El torque de una cadena o agregado puede estimarse considerando el momento magnético total de una cadena y el campo magnético externo, asumiendo la magnetización transversal despreciable en comparación a la longitudinal debido a la alta anisotropía de forma. El torque será proporcional al número de MNPs en el agregado.

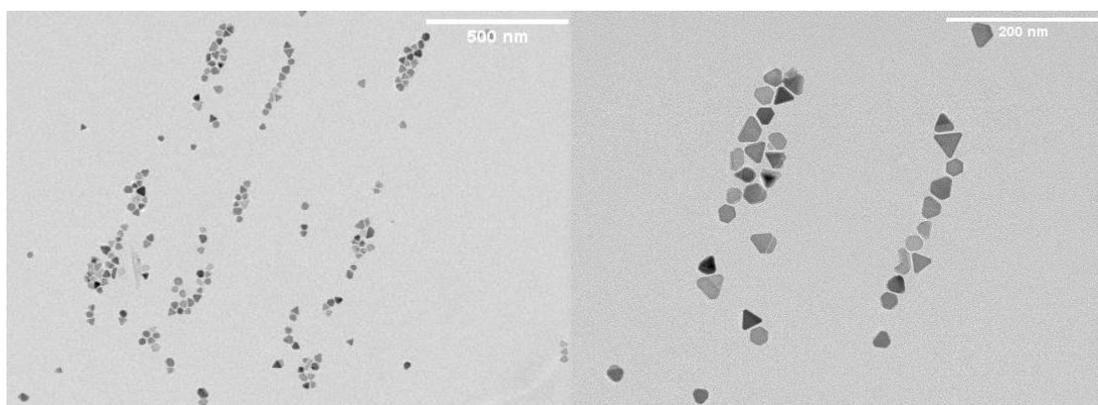


Figura 3.6:Figura TEM de la formación de cadenas en MNPs-Ø poliédricas

3.1.2. VSM

En la figura 4.7 y 4.8 se muestran las curvas de magnetización de las MNPs-CP-Ø y MNPs-RS-DOP, respectivamente.

Como puede observarse en ambas, el aumento de temperatura lleva a una leve pérdida de histéresis, i.e. disminución de campo coercitivo y magnetización remanente, relacionada con la transición de comportamiento ferrimagnético a superparamagnético (Vázquez *et. al.* 2004). Se observa más claramente dicho comportamiento en el *inset* de la curva de magnetización de las MNPs-DOP, que reduce sus valores de coercividad para cada aumento de temperatura (véase imagen 4.8).

La transición al superparamagnetismo se observa en partículas con monodominio magnético por encima de la temperatura de bloqueo, cuando la energía térmica es capaz de sobrepasar la barrera energética permitiendo el giro aleatorio del momento magnético de la MNP (Kolhatkar *et. al.* 2013). El tamaño monodominio surge por debajo de los 15nm de diámetro

para las nanopartículas de magnetita (Theivasanthi y Alagar 2013) y aunque en promedio las MNPs-CP-Ø se encuentren por debajo de este, la dispersión de tamaños obtenida es grande, desde los 3 a los 30nm aproximadamente. Esto nos concedió un momento magnético promedio casi-nulo en ausencia de campo magnético externo a temperatura ambiente, pero con una histéresis significativa.

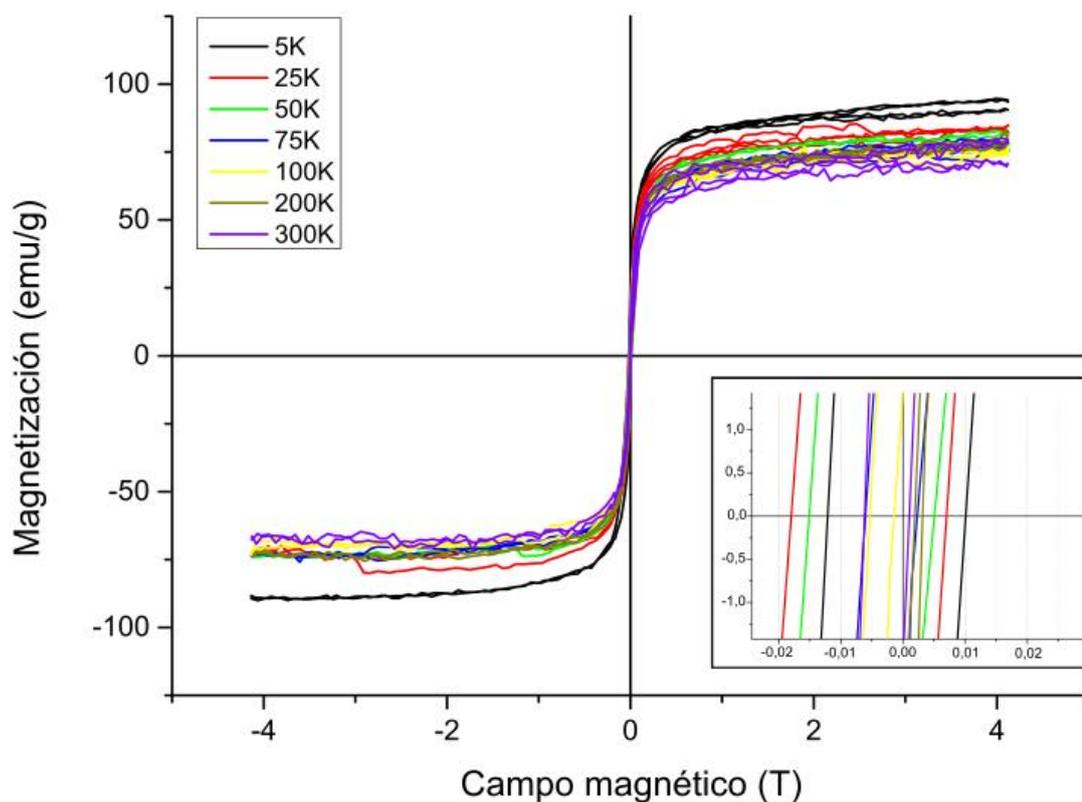


Figura 3.7: Curva de histéresis obtenida con el VSM para las MNPs-CP-Ø.

Tabla 3.4: Análisis resultados VSM para MNPs-CP-Ø.

T (K)	M_s (emu/g)	H_c (mT)	R_m (emu/g)
5	94.16	12.1	22.3
25	84.81	13.4	19.97
50	82.86	15.1	14.63
75	79.81	5.99	13.91
100	77.04	5.33	9.51
200	83.37	1.90	2.3
300	80.07	0.88	8.92

La disminución de magnetización de saturación con la temperatura se atribuye al aumento de las fluctuaciones térmicas en los momentos magnéticos de su superficie, los cuales sufren un desalineamiento respecto al *bulk* debido a su mayor inestabilidad. Este efecto se puede reducir con la funcionalización (Kolhatkar *et. al.* 2013).

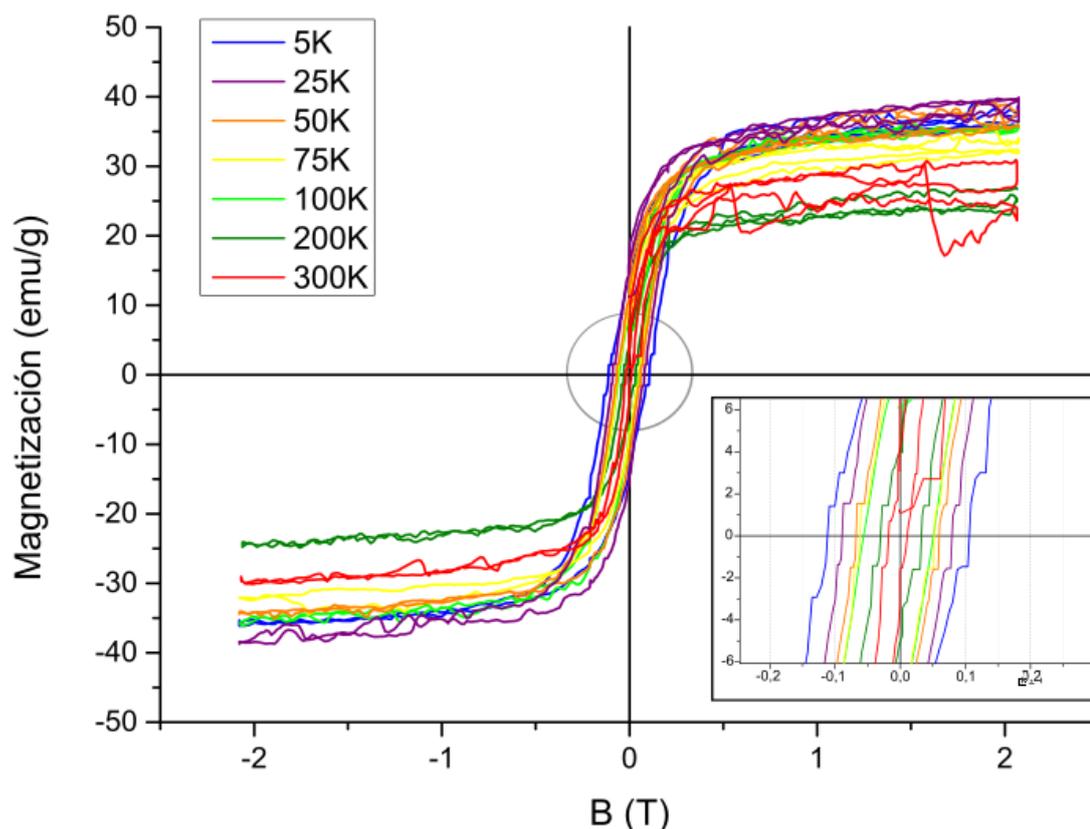


Figura 3.8: Curva de histéresis obtenida con el VSM para las MNPs-RS-DOP.

Observamos una disminución del 38% en la magnetización de saturación de las MNPs-RS-DOP respecto las MNPs-CP-Ø, pese a que la magnetización de saturación en la nanoescala aumenta con el tamaño hasta llegar a tamaños *bulk*. Las MNPs-CP-Ø tienen menos de la mitad del tamaño promedio de las MNPs-RS-DOP, pero dada su morfología exponen más superficie, por lo que su relación superficie-volumen no debería diferir tan significativamente, i.e. la proporción de momentos magnéticos desalineados no debería resultar tan significativa. Se atribuye este decaimiento a diversos factores: la unión de la oleilamina o la dopamina influyeron en sus propiedades magnéticas (Roca *et. al.* 2006), la alta dispersión de tamaños, la contaminación y/o la oxidación de la muestra.

Tabla 3.5: Análisis resultados VSM para MNPs-RS-DOP.

T (K)	M_s (emu/g)	H_c (mT)	R_m (emu/g)
5	37,62	105	13,87
25	39,185	79,6	16,09
50	37,645	60	12,095
75	34,915	52,1	9,875
100	34,145	50,3	8,475
200	25,835	32,5	4,515
300	30,445	10,9	4,705

Así mismo, la coercividad menor obtenida para las MNPs-CP-Ø se atribuyen a su menor tamaño, ya que una mayor proporción se encuentra en estado superparamagnético actuando como monodominio y siendo más afectadas por las fluctuaciones térmicas. En su mayoría las MNPs-RS se encuentran por encima de los 15 nm, presentando más de un dominio, i.e. histéresis.

Modificar y estandarizar las condiciones de la síntesis para obtener distintas morfologías, tamaños, composiciones, y diseños núcleo-superficie, nos permitiría optimizar las propiedades magnéticas como magnetización de saturación (M_s), coercividad (H_c), temperatura de bloqueo (T_B) y tiempos de relajación de Néel y Brown (t_n y t_b). La magnetización de saturación aumenta linealmente con el tamaño hasta alcanzar el valor en escala macroscópica (*bulk*), aumentando también la sensibilidad y eficiencia. La correlación con la morfología no está aún clarificada y la composición del núcleo y la superficie se ve limitada por la biocompatibilidad y la alta influencia sobre las propiedades magnéticas. (Kolhatkar *et. al.* 2013).

3.1.3. XRD

Los patrones de XRD obtenidos para las muestras MNPs-CP y MNPs-DOP se presentan en la imagen 4.9, junto a los planos de difracción de la magnetita (JCPDS 01-088-0315) y la hematita (JCPDS 01-072-0469).

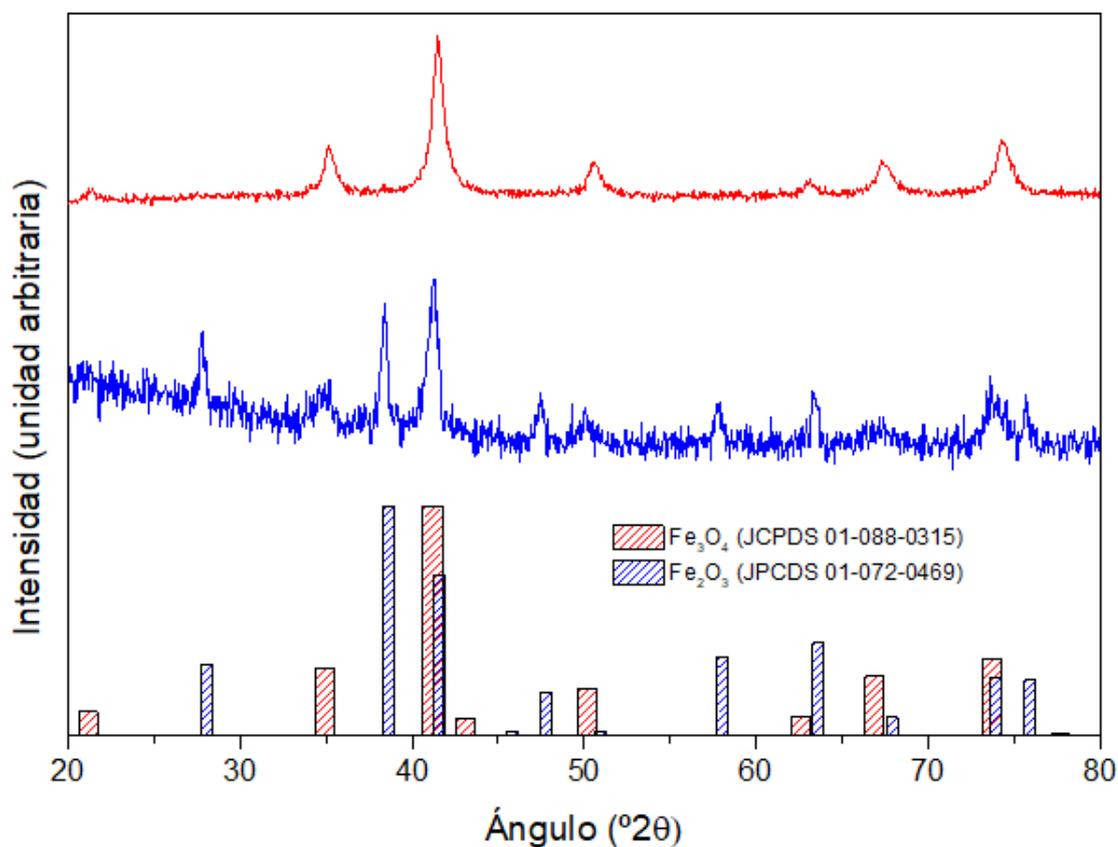


Figura 3.9: Comparación planos de difracción obtenidos en las muestras con los de la magnetita y hematita.

Se observaron los picos principales de difracción de la magnetita en las posiciones mostrados en la tabla 4.6 para las MNPs-CP. Dada la ausencia de reflexiones características de la hematita podemos descartar la oxidación de nuestra muestra en el momento previo a los experimentos. Tampoco se denota contaminación. Se observa para las MNPs-CP una mejor cristalinidad, con picos más definidos y estrechos.

En la figura 4.9 se observan las diferencias con en el patrón de difracción en el caso de las MNPs-RS. Al contrario que con las MNPs-CP, la magnetización de la muestra poliédrica se midió después de 10 días en contacto con aire. Es notorio que la magnetita se ha oxidado, por lo que tenemos una mezcla de magnetita y hematita (Fe_2O_3), véase su presencia en la tabla 4.7. La hematita es un material anti-ferromagnético, lo que explica la disminución de sus propiedades magnéticas, i.e. su menor respuesta frente a un campo magnético externo.

Tabla 3.6: Análisis resultados XRD MNPs-CP. Se muestran los valores de la magnetita JCPDs 01-088-0315

2θ	I/I_{max}	h	k	L	$D_{calc}(\text{Å})$	$2\theta_{JCPDs}$	$D_{JCPDs}(\text{Å})$
21.20	0.30	1	1	1	4.866	21.464	4.80355
35.15	0.49	2	2	0	2.964	35.407	2.94156
41.50	1	3	1	1	2.526	41.781	2.50857
50.65	0.42	4	0	0	2.093	50.942	2.08000
63.15	0.34	4	2	2	1.709	63.566	1.69831
67.35	0.43	5	1	1	1.614	67.925	1.60118
74.25	0.52	4	4	0	1.483	74.917	1.47078
85.05	0.30	6	2	0	1.324	85.682	1.31551
88.90	0.32	5	3	3	1.278	89.660	1.26879

Tabla 3.7: Análisis resultados XRD MNPs-CP. Se muestran los valores de la magnetita en rojo, y de la hematita en azul, en blanco, picos que podrían corresponder a ambas.

2θ	I/I_{max}	h	k	l	$D_{calc}(\text{Å})$	$2\theta_{JCPDs}$	$D_{JCPDs}(\text{Å})$	
27.8498	0.37		0	1	2	3.7196	28.093	3.68552
34.9350	0.21					2.9821	35.407	2.94156
38.3996	0.71		1	0	4	2.7219	38.653	2.70280
41.2400	1		1	1	0	2.5418	41.600	2.51900
47.5152	0.27		1	1	3	2.2219	47.789	2.20838
57.7369	0.24		0	2	4	1.8540	58.079	1.84276
63.4109	0.35		1	1	6	1.7032	63.637	1.69662
73.7775	0.29		2	1	4	1.4912	73.946	1.48728
75.7045	0.32		3	0	0	1.4588	75.912	1.45435

Mediante la ecuación de Scherrer (ecuación 4.2) se confirma el tamaño mayor de las MNPs-RS, pese a que son resultados de menor precisión que el TEM. También se empleó la ecuación de Bragg para asignar a cada pico su correspondiente plano de difracción, a partir de la distancia interplanar (ecuación 4.1). Siendo B la amplitud del pico de referencia a altura

media (FWHM) situado a un ángulo 2θ de $41,5^\circ$, b el error instrumental (despreciable), λ la longitud de onda del rayo X (1.79026 \AA) y K el factor de forma (para magnetita y hematita $K \approx 0.9$) (Bergmann CP 2015).

$$2d \sin \theta = n\lambda \rightarrow d = \frac{n \cdot 1.79026}{2 \cdot \sin \theta} \quad (4.1)$$

$$d_{MNP\text{s esféricas}} = \frac{K\lambda}{(B - b)\cos\theta} = \frac{0.9 \cdot 1.79026\text{\AA}}{0.8 \cos\left(\frac{41,5}{2}\right)} = 21.54 \text{ nm} \quad (4.2)$$

$$d_{MNP\text{s poliédricas}} = \frac{0.9 \cdot 1.79026\text{\AA}}{0.2952 \cos\left(\frac{41,2}{2}\right)} = 58.29 \text{ nm}$$

3.1.4. Citotoxicidad

Se realizaron distintos ensayos de citotoxicidad para estudiar el efecto de las MNPs sobre la viabilidad celular. A partir de sus resultados se seleccionó la concentración que se aplicará a los cultivos celulares para la aplicación del AMF. Analizando los gráficos expuestos en este capítulo emerge la necesidad de optimizar el protocolo por diversos motivos.

En los resultados obtenidos para MNPs-CP- \emptyset expuestos en la figura 4.10 vemos que la citotoxicidad se manifiesta a los 50 mg/ml. Conociendo la baja dimensionalidad de las MNPs, 50 mg/ml resultará citotóxico para el cultivo celular en una dispersión apropiada (Patil *et. al.* 2018). El hecho de no visualizar la muerte celular a las concentraciones pertinentes se debe fundamentalmente a la fuerte aglomeración. Las MNPs precipitaron rápidamente en ser añadidas al medio de cultivo afectando a la homogeneidad de la solución y consecuentemente a la concentración real añadida. A su vez, los agregados no son captados por la célula por lo que no resultan tan citotóxicos como las MNPs dispersas, pero no producirán tampoco el efecto esperado bajo el AMF. En estudiar la citotoxicidad de las MNPs-DOP esféricas se redujo la concentración citotóxica a 10 mg/ml, mostrando la disminución de la aglomeración pese a seguir siendo aún una concentración excesiva, comparada con estudios extensos realizados por Patil *et. al.*

Esta disminución de la aglomeración de MNPs-DOP se produjo debido a la coordinación de la dopamina en la superficie de la MNP como resultado de la optimización de la interacción entre orbitales, formando un anillo de 5 átomos y reduciendo el ambiente estérico del complejo metálico (Shultz *et. al.* 2007). Además de reducir la aglomeración, esta funcionalización se empleó para optimizar la captación celular electroestáticamente dada la carga positiva de la dopamina y la carga negativa de la pared celular.

Debido al *targeting* inespecífico entre la dopamina y las células cancerígenas, pese a que el quelato estable pueda ser funcionalizado mediante enlaces amida con moléculas de interés, y teniendo en cuenta los efectos secundarios de la dopamina, en un futuro debería emplearse una funcionalización más selectiva e inocua.

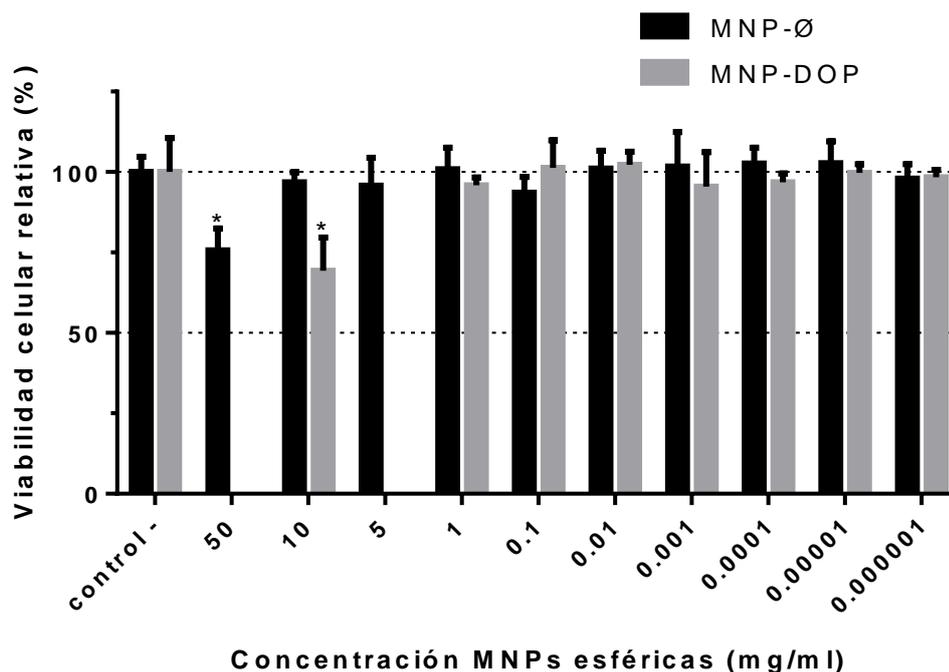


Figura 3.10: Ensayo de citotoxicidad de MNPs-CP-Ø y MNPs-DOP tras 24h de incubación (n=5). Los datos se muestran con el error estándar de medida (SEM).

En cambiar a las MNPs-DOP poliédricas se incrementó la concentración citotóxica en 2 órdenes de magnitud, véase Fig. 4.11.

Debido al sistema dual de ligandos con los que se consiguió la anisotropía de forma y al efecto de la dopamina, las MNPs están significativamente más dispersas en el medio de cultivo previa la adición a las células. Se realizaron estudios a las 24 y 48h para dejar un margen de tiempo al procedimiento de apoptosis celular. Esto se hace ya que el ensayo MTT mide cuantitativamente la reducción de un compuesto amarillo a uno de color violeta, realizada por enzimas mitocondriales presentes en células activas (Contreras *et. al.* 2015). En aplicarse inmediatamente después del tratamiento de AMF, algunas células podrían haber iniciado su proceso de muerte celular pero tener aún activas dichas enzimas mitocondriales, dando lugar a falsos negativos.

En este análisis se obtienen resultados de alta variabilidad, en el que no se observan efectos de toxicidad en las MNPs-DOP poliédricas a las 24h, y se observa una concentración citotóxica de 100 µg/ml a las 48h de incubación (véase Fig. 4.11).

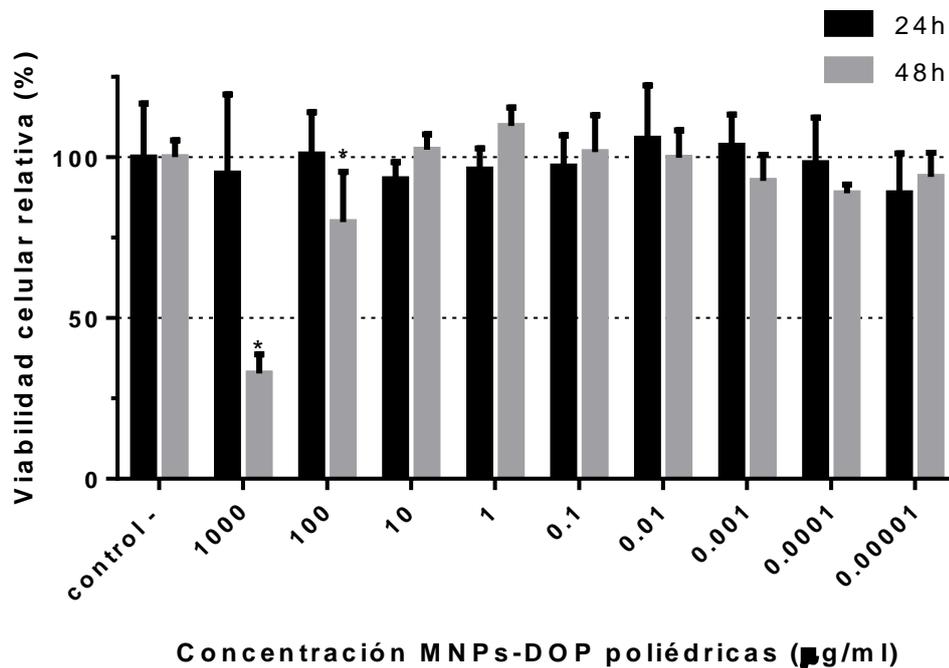


Figura 3.11: Ensayo de citotoxicidad de las MNPs-DOP poliédricas con dopamina tras 24 y 48h de incubación (n=4).

En consecuencia a la ausencia de resultados a las 24h, se realizó otro ensayo individual en el que se encontró una concentración citotóxica del orden de 1 µg/ml, véase Fig. 4.12. Debido a que en éste se observan concentraciones no citotóxicas y altamente citotóxicas se puede producir una curva de viabilidad y obtener el valor de la concentración de MNPs necesaria para reducir *in-vitro* el crecimiento poblacional de un organismo en un 50%; o *half maximal inhibitory concentration* (IC50). De este protocolo observamos una citotoxicidad significativa a concentraciones dos órdenes de magnitud inferiores a las obtenidas en la figura anterior para las 48h, por lo que emplearemos concentraciones iguales o inferiores a esta en los estudios con AMF, remarcando que en cada uno de ellos podremos comprobar nuevamente la citotoxicidad observando el control positivo de cada placa.

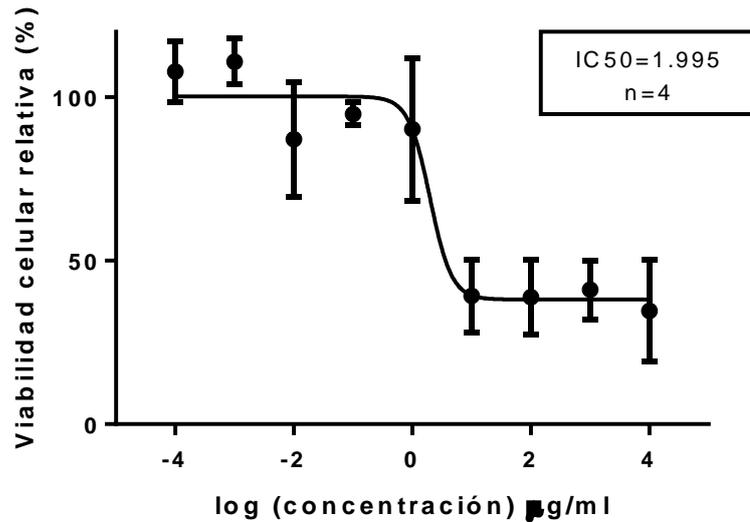


Figura 3.12: Curva de citotoxicidad de MNPs-DOP poliédricas tras 24h de incubación.

En distintas etapas del procedimiento, se observó con el microscopio óptico invertido (OLYMPUS CK2) el estado de las células para descartar la contaminación o daño por fallos en el protocolo. Se presenta a continuación imágenes de la placa de citotoxicidad de MNPs-DOP poliédricas tras 48h de incubación.

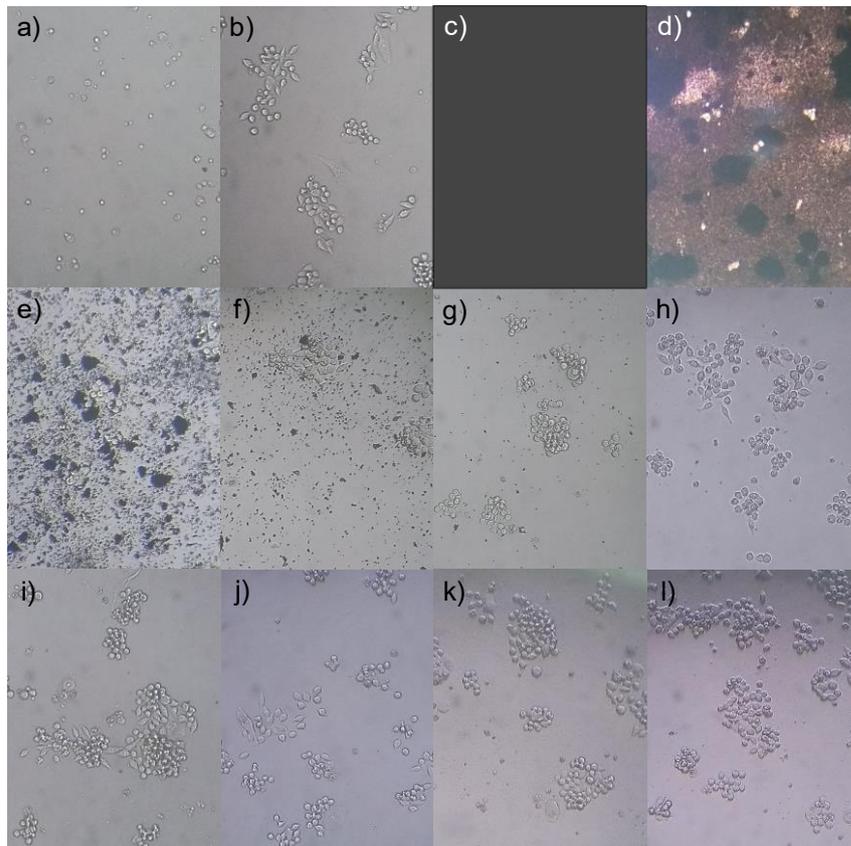


Figura 3.13: Fotografías tomadas con el microscopio óptico a 500x de la placa de citotoxicidad de MNPs-DOP poliédricas después de 48h de cultivo, del pocillo 1 al 12. Obsérvese que la figura c) no ha podido ser tomada ni evaluada su citotoxicidad por completa opacidad (10 mg/ml).

3.2. Caracterización del AMF

3.2.1. Evaluación del campo magnético generado

Para evaluar el campo generado por las bobinas se emplea un gausímetro (modelo 5080, Sypris Test & Measurement®) y su linealidad fue testada para distintas frecuencias como muestra el siguiente gráfico.

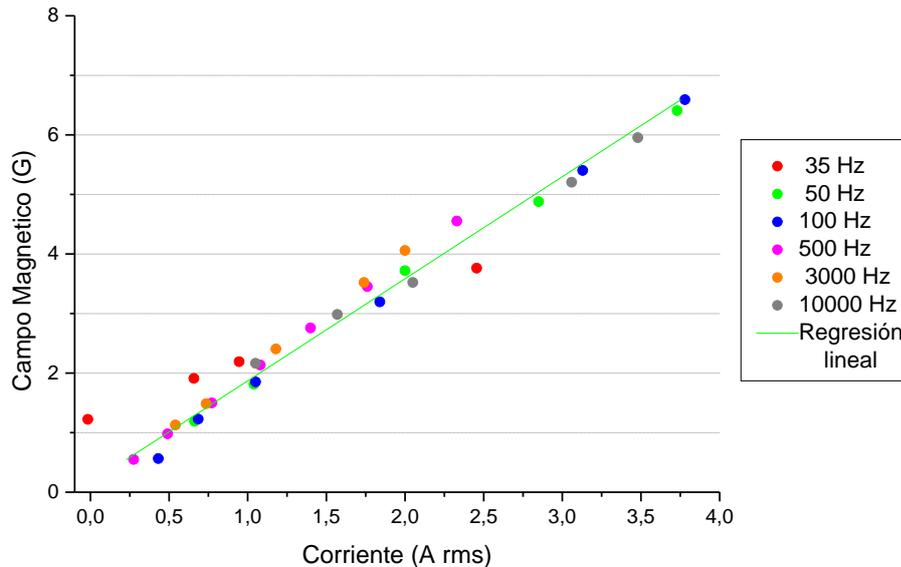


Figura 3.14: Campo magnético generado por la corriente aplicada a la bobina.

$$B (G) = (0.58334 \pm 0.01148)I(A) + (-0.09082 \pm 0.04051) \quad (4.3)$$

A partir de esta información se extrae la ecuación 4.3 que nos permite relacionar el campo magnético generado en el centro de la bobina con la corriente aplicada a ésta.

3.2.2. Evaluación temperatura generada por el sistema

Cabe mencionar que este sistema se intenta llevar al límite trabajando con el mayor campo aplicado y menor frecuencia posible. Aumentar mucho la intensidad en la bobina genera muchas pérdidas por efecto Joule, lo que no sólo peligró la integridad del dispositivo, si no que influye en la viabilidad celular. En disminuir mucho la frecuencia la corriente se dispara, por lo que cabe controlar con el osciloscopio que no sature la frecuencia para evitar dañar el amplificador y con una cámara térmica (FLIR Systems OÜ, Estonia) la temperatura de la placa. Esto resultó en la limitación de campo máximo y frecuencia mínima de 0,29 mT y 25Hz.

Se hipotetizó que las pérdidas de viabilidad observadas inicialmente podían deberse al aumento de calor producido en la bobina, el cual no es tan intenso sobre los controles positivo y negativo. Por esto, se añadieron a las placas 8 pocillos de control de campo para comprobar

que no se atribuía al aumento de temperatura o al campo generado. Se observó una pérdida de viabilidad significativa en las celdas de control de campo, por lo que se caracterizó el aumento de temperatura, véase Fig. 4.15.

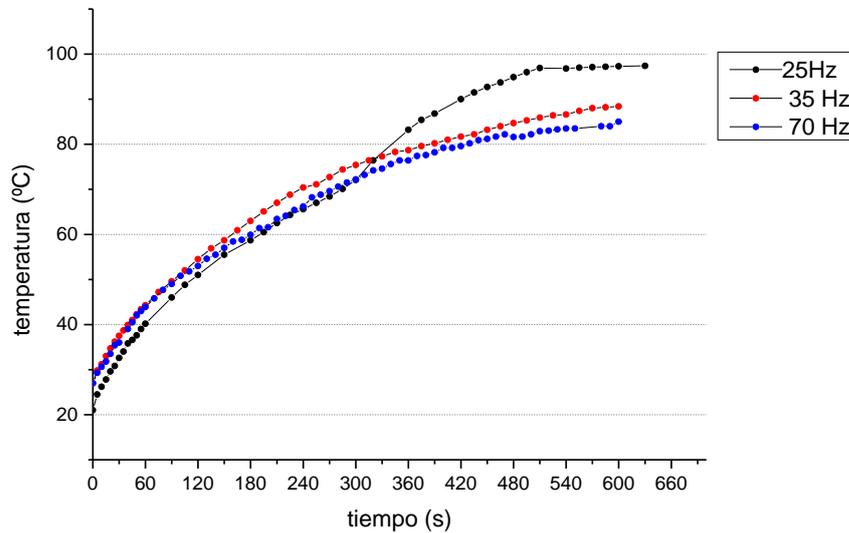


Figura 3.15: Caracterización del aumento de temperatura con el tiempo sobre la bobina.

En base a estos resultados, se decidió modificar el procedimiento aplicando el campo en modo *on-off* en etapas de 1 minuto de duración, haciendo que la bobina llegue a temperaturas de aproximadamente 40°C (temperatura óptima del cultivo celular de 37°C) y se enfríe para evitar el sobrecalentamiento de la placa.

3.3. Efecto del AMF

En base a los anteriores resultados se define la mayor intensidad de campo como 0,29 mT para evitar el calentamiento extremo. La frecuencia más baja aplicada es de 25Hz, por las limitaciones del equipo. La concentración se definió mediante pruebas de citotoxicidad. El tiempo de exposición al AMF se testea teniendo en cuenta que la zona de trabajo mantiene al cultivo celular fuera de sus condiciones óptimas, por lo que finalmente se han realizado tratamientos de manera interrumpida para estabilizar la placa en la incubadora antes de proseguir, y con el método *on-off* para no sobrecalentarla.

El AMF se aplicó en los parámetros representados en la tabla 4.8.

Tabla 3.8: Parámetros empleados para la aplicación del AMF, tras 24h de incubación de las células y 24h de incubación con las nanoestructuras funcionalizadas. *Hipótesis rechazada por falta de control de campo. **Aplicado en 3 etapas de 10' interrumpidas para reestablecer las condiciones de temperatura óptimas del cultivo. ***AMF aplicado en modo on-off y ensayo MTT realizado tras las 24h de su aplicación

	MNP	Concentración (ng/ml)	B (mT)	f (Hz)	Tiempo de exposición (min)	Disminución significativa de viabilidad?
1	CP-DOP	500.000	0.1	50	10	X
2				50	20	X
3				35	10	X
4				35	20	X
5	RS-DOP	500	0.23	25	15	X
6				25	30	X
7				35	15	X
8				70	15	X
9	RS-DOP	100	0.23	35	15	✓*
10				25	15	✓
11				70	15	✓
12				25	30**	X
13				25	15***	X
14			0.29	25	15	X
15		1000	0.23	25	15***	X

Los ensayos bajo campo magnético alterno se realizaron variando los siguientes parámetros: concentración de MNPs, intensidad del campo magnético AC, frecuencia y tiempo de exposición. En todos los casos las MNPs han sido incubadas con las células durante un periodo de 24h, pero tras la aplicación del AMF se ha testeado hacer el ensayo MTT inmediatamente después, y transcurridos 30 minutos y 24 horas.

Como podemos observar en la figura 4.16, la diferencia entre el AMF a 50 y 35 Hz resultó significativa comparada con el test negativo individual de cada placa, pero dado que la diferencia del control positivo con el negativo también lo es, se atribuye la disminución de viabilidad a la citotoxicidad de las MNPs-DOP esféricas. Esto deriva en que la concentración empleada de 0,5 mg/ml resultó citotóxica, por lo que el análisis de citotoxicidad realizado no corresponde con la citotoxicidad real de las MNPs-DOP esféricas (véase Fig. 4.10). Se observó que las MNPs-DOP esféricas formaron agregados de tamaños significativos, los cuales no son capaces de entrar en la célula ni interactuar de manera previsible bajo el AMF. En seleccionar una concentración supuestamente inocua para el test de AMF, se ultrasonificó

por un tiempo prolongado previo a añadirla al cultivo, reduciendo el agregado y revelando la citotoxicidad real de las MNPs en añadirlas al cultivo.

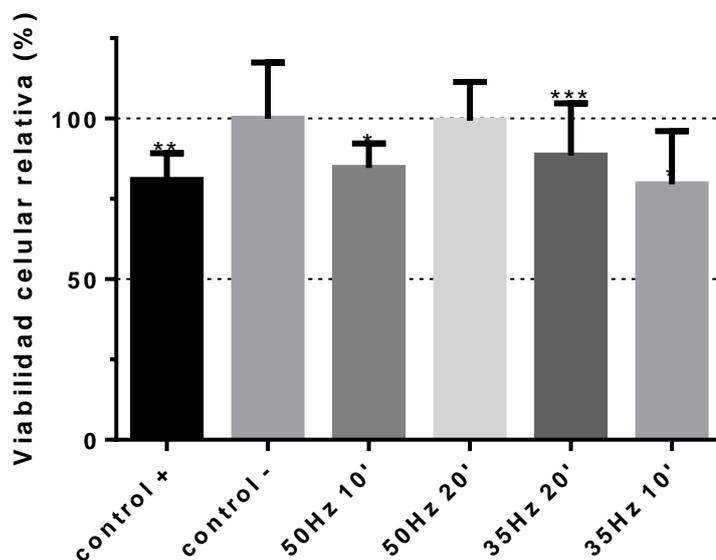


Figura 3.16: Viabilidad celular relativa inmediatamente después de la aplicación de un AMF de 0,23mT para una dosis de 0,5 mg/ml de MNPs-CP-DOP, para distintas frecuencias y tiempos de exposición (control + y - n= 4, AMF n=32).

En realizar el test de campo sobre concentraciones no-tóxicas de MNPs-DOP poliédricas, se obtuvieron resultados positivos para una concentración de 500 ng/ml sometidas a un AMF de 0,23 mT a una frecuencia de 25 Hz durante 30 minutos (Ver Fig. 4.17):

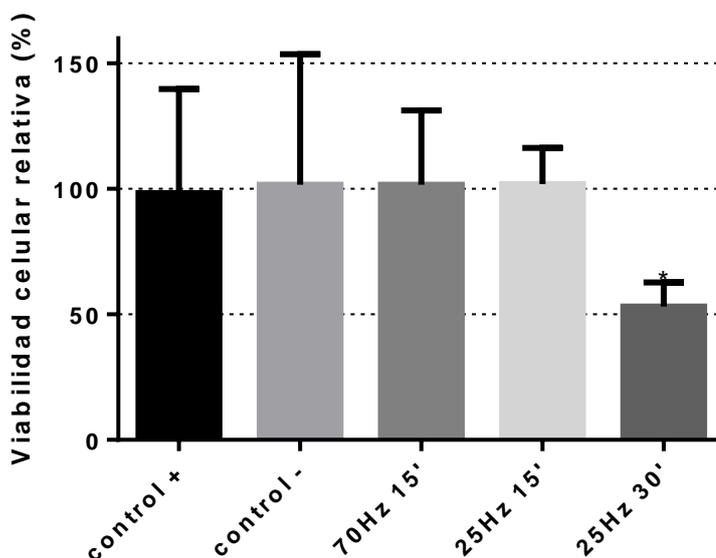


Figura 3.17: Viabilidad celular relativa inmediatamente después de la aplicación de un AMF de 0,23mT para una dosis de 500ng/ml de MNPs-RS-DOP para distintas frecuencias y tiempos de exposición (control + y - n= 4, AMF n=32).

Después de los resultados expuestos en la figura 4.17 se hipotetizó que la disminución de viabilidad observada a 500 ng/ml 25 Hz 30' podía atribuirse a efectos de temperatura. Para testear esto se añadieron los controles de campo representados en la figura 3.4, obsérvese la diferencia entre los controles positivo y negativo con el control de campo en la figura 4.18, el cual reduce un 14.84 ± 3.71 % su viabilidad. Por otro lado se consigue observar por primera vez una disminución de viabilidad significativa debido al AMF, del $22,42 \pm 4.32$ % para una frecuencia de 70Hz y de $20,71 \pm 4.56$ % para una frecuencia de 25Hz.

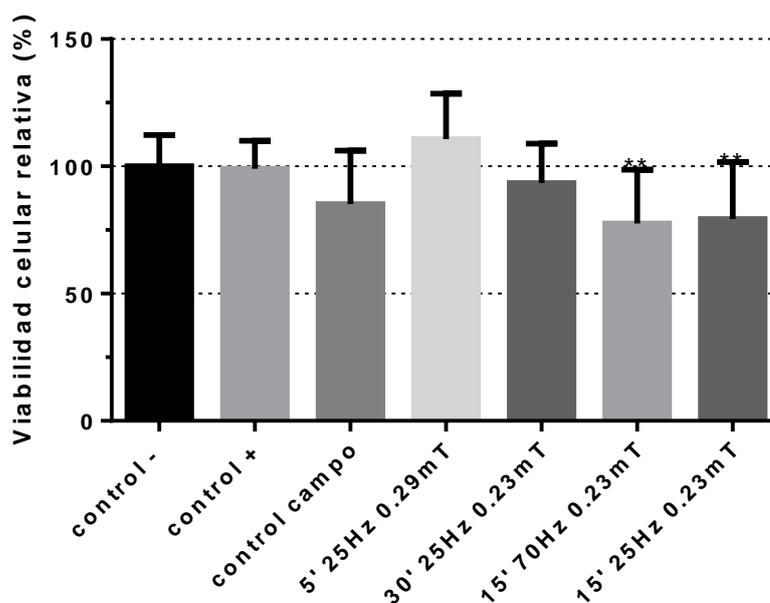


Figura 3.18: Viabilidad celular relativa inmediatamente después de la aplicación del AMF para una dosis de 100ng/ml de MNPs-RS-DOP para distintas frecuencias, campos y tiempos de exposición (Control - y + n=16, control campo n=8, AMF n= 24).

Esto nos indica la necesidad de resolver el problema de la generación de calor, pero a su vez demuestra una posible efectividad del tratamiento, que podría estar siendo enmascarada por las condiciones ambientales. No se observó citotoxicidad a 100 ng/ml.

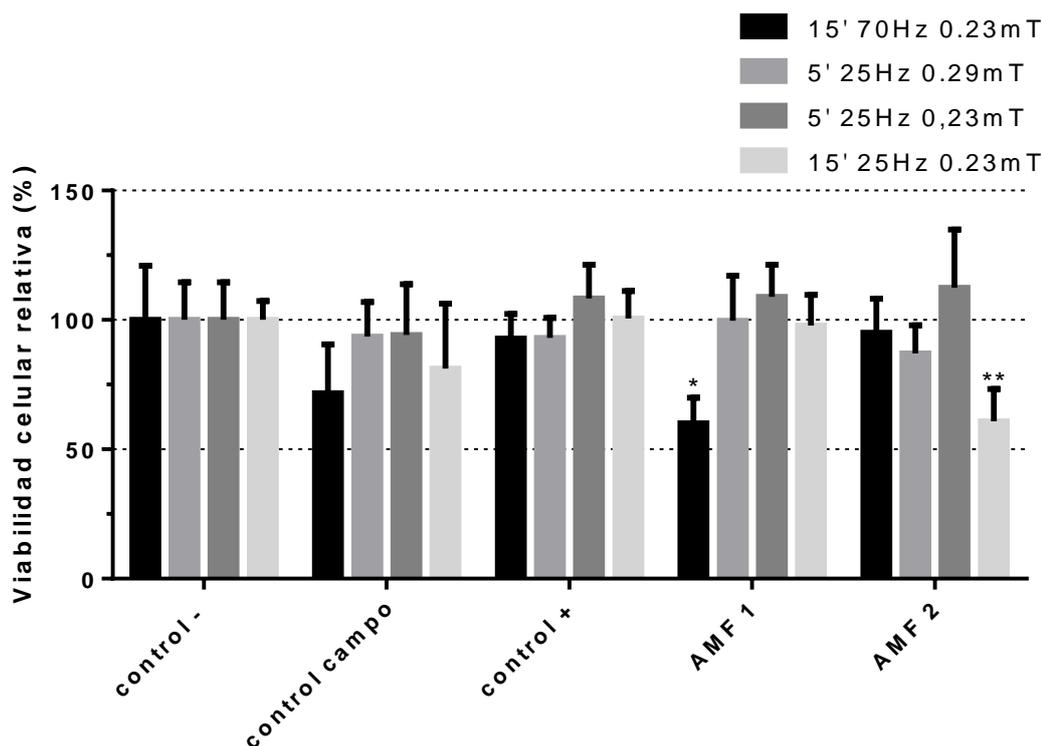


Figura 3.19: Viabilidad celular relativa inmediatamente después de la aplicación del AMF para una dosis de 500ng/ml de MNPs-RS-DOP para distintas frecuencias, campos y tiempos de exposición. Se observa diferencias significativas entre ambas bobinas (Control - y + n=16, control campo n=8, AMF n= 24).

Como se intuye a partir de los gráficos representados en la figura 4.19, en el momento de observar los resultados para la concentración de 500 ng/ml, el sistema de AMF ha sufrido un deterioro que produce diferencias significativas entre ambas bobinas (AMF 1 y 2). Esto nos indicó que el sistema sufrió una deformación, fácilmente resuelta moldeando el sistema tras calentarlo. También se observa baja diferencia significativa entre las células sin y con MNPs bajo el efecto del AMF, y además de la disminución de viabilidad en los controles de campo nuevamente. En base a esto se desarrolla otro protocolo:

La apoptosis celular puede producirse por daño físico directo a la membrana o mediante la activación de vías de muerte celular: apertura de canales iónicos, daños físicos a orgánulos internos, etc. (Chiriac *et. al.* 2018)(Mansell *et. al.* 2017). En hacer el ensayo de MTT inmediatamente después de aplicar el AMF sólo teníamos en consideración el primer caso. Verdaderamente, la célula podría estar dañada internamente pero poseer actividad suficiente para metabolizar el MTT. Por esto, se realizó otro bloque de investigación en el que se incubaron las células después del AMF durante 24h más esperando revelar efectividades del tratamiento mayores debido a la activación de la muerte celular de manera no inmediata después del tratamiento magneto-mecánico. Cabe mencionar que este tiempo extra aumenta las posibilidades de las MNPs para interactuar con el medio y poder generar ROS y citotoxicidad, motivo por el que previamente se estudió la citotoxicidad de las MNPs tras 48h.

Las causas de la muerte celular podrían contrastarse con controles y con estudios empleando distintos marcadores que permitan determinar si se ha roto la pared celular, los lisosomas (cambio de pH celular), si se han abierto los canales para iniciar la apoptosis (aumenta concentración de iones calcio), etc. (Contreras *et. al.* 2015).

Además de dejar 24h de incubación post-tratamiento para observar los posibles efectos del AMF a largo plazo, se empleó un sistema para aplicar el AMF de manera intermitente (*on-off*) y así evitar el calentamiento excesivo de la placa. Los resultados se exponen a continuación:

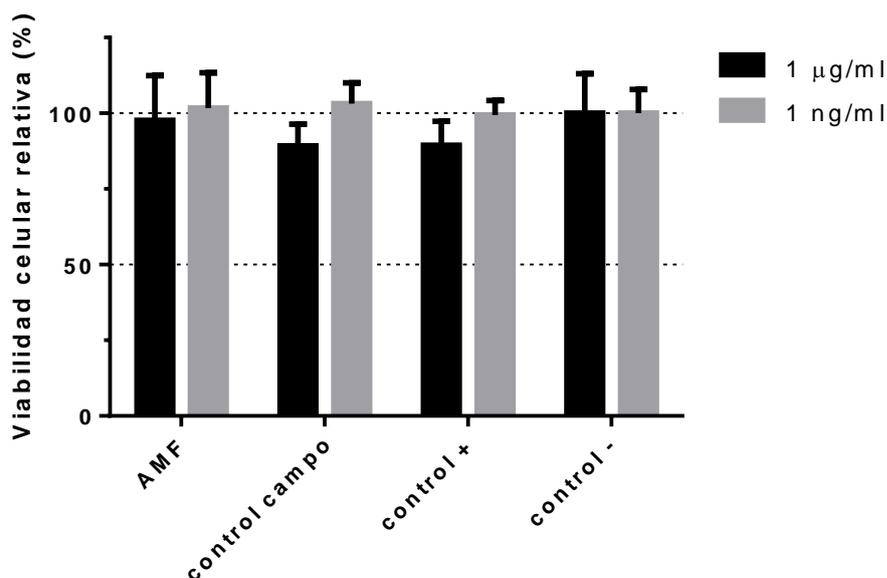


Figura 3.20: Viabilidad celular relativa 24h después de la aplicación de un AMF de 0.23 mT y frecuencia de 25 Hz con el método *on-off* durante intervalos de 1 minuto en un total de 16 minutos, para dosis de 1 µg/ml y 1 ng/ml de MNPs-RS-DOP (para AMF n=24, control + y - n=4, control campo n=8).

Como podemos ver en la figura 4.20, el método *on-off* evitó el daño celular por temperatura producido en el control de campo hasta el momento. Pese a ese avance, no se observó la disminución de la viabilidad celular por la aplicación del AMF 24h después de su aplicación por lo que se considera el posible uso de un campo magnético muy bajo, sumado a la disminución de magnetización de saturación de las MNPs-RS-DOP que también nos conduce a un menor efecto. Para resolver esto se ha de reconsiderar el diseño del equipo, así como sintetizar nuevamente MNPs en un ambiente controlado que evite su oxidación.

Conclusiones

El efecto de las MNPs de Fe_3O_4 bajo un AMF de baja intensidad y frecuencia fue investigado con resultados positivos, confirmándose la efectividad de las MNPS-RS-DOP para el tratamiento magneto-mecánico de células HeLa *in-vitro*.

Se logró sintetizar, funcionalizar y caracterizar las diferentes nanoestructuras y el sistema de AMF. Mediante imágenes TEM se estudió el rol de los protocolos de síntesis sobre la morfología y tamaños resultantes, revelándose para las MNPs-RS un diámetro de Feret de 24.75 ± 3.99 nm con morfologías poliédricas exponiendo los planos más estables. Se observó como la funcionalización con dopamina disminuyó el grado de aglomeración, así como también se reveló por su patrón de difracción la presencia de hematita en las MNPs-RS-DOP. Este factor disminuyó su respuesta magnética medida con el VSM, encubriendo una posible efectividad mayor para la disrupción mecánica. Controles de citotoxicidad mostraron concentraciones citotóxicas de 50 y 10 mg/ml para MNPs-CP-Ø y MNPs-CP-DOP, respectivamente; y 1 µg/ml para MNPs-DOP poliédricas. El objetivo global se consiguió con una concentración de 100 ng/ml bajo un AMF de 0,23mT oscilando a una frecuencia de 70 Hz durante 15', resultando en una disminución de viabilidad celular máxima del $22,42 \pm 4.32$ %, asociada también a condiciones ambientales.

Los pasos propuestos a seguir para optimizar el procedimiento partirían por una síntesis de nanoestructuras con mayor anisotropía y una dispersión menor de tamaños, en una atmosfera de gas inerte para evitar su oxidación. Esto procedido por un estudio de diversas funcionalizaciones y sus respectivas caracterizaciones magnéticas, parámetros relacionados con gran influencia en la biocompatibilidad y efectividad del tratamiento, haciendo énfasis en su buena dispersión para evitar aglomeraciones. Todo esto requiere una MNP final estéril, por lo que se ha de investigar un método eficiente, con la menor repercusión posible. Seguidamente realizar los estudios pertinentes de citotoxicidad a diferentes tiempos de incubación para la tría de una concentración y tiempo de incubación apropiada, y un extenso análisis en los parámetros de AMF aplicado para buscar la máxima disminución de viabilidad celular.

Un punto principal para hacer el estudio reproducible y efectivo radica en el diseño del sistema de bobinas. Los cultivos celulares precisan de condiciones ambientales específicas que no se reprodujeron fuera de la incubadora. Diseñar un ambiente cerrado con temperatura y presión controladas es considerado uno de los pasos más relevantes para el avance del proyecto, así como diseñar un sistema que aplique un campo magnético de mayor intensidad sin producir pérdidas de calor que influyan en el cultivo.

Futuras consideraciones se enfocarían en emplear un *targeting* activo específico y cargo de fármacos quimioterapéuticos para elevar la efectividad del tratamiento.

Bajo este propuesto, se deberían realizar estudios de torque en MNPs bien caracterizadas y comparar los resultados con simulaciones numéricas. El torque producido por aglomeraciones y formaciones de cadenas precisa de mayor investigación.

Referencias bibliográficas

- ANDRADE, Â.L., VALENTE, M.A., FERREIRA, J.M.F. y FABRIS, J.D., 2012. Preparation of size-controlled nanoparticles of magnetite. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 324, no. 10, pp. 1753-1757. ISSN 03048853. DOI 10.1016/j.jmmm.2011.12.033.
- B. AKTAS, F. MIKAILOV, 2007. *Advances in Nanoscale Magnetism: Proceedings of the International Conference on Nanoscale Magnetism ICNM-2007*. S.I.: Springer.
- BARRETO, A., SANTIAGO, V., FREIRE, R., MAZZETTO, S., DENARDIN, J., MELE, G., CAVALCANTE, I., RIBEIRO, M., RICARDO, N., GONÇALVES, T., CARBONE, L., LEMOS, T., PESSOA, O. y FECHINE, P., 2013. Magnetic Nanosystem for Cancer Therapy Using Oncocalyxone A, an Antitumour Secondary Metabolite Isolated from a Brazilian Plant. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 9, pp. 18269-18283. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms140918269.
- BAUMGARTNER, J., DEY, A., BOMANS, P.H.H., LE COADOU, C., FRATZL, P., SOMMERDIJK, N.A.J.M. y FAIVRE, D., 2013. Nucleation and growth of magnetite from solution. *Nature Materials*, vol. 12, no. 4, pp. 310-314. ISSN 1476-1122, 1476-4660. DOI 10.1038/nmat3558.
- BERGMANN CP, P.P., 2015. Raman Spectroscopy of Iron Oxide of Nanoparticles (Fe₃O₄). *Journal of Material Science & Engineering* [en línea], vol. 05, no. 01. [Consulta: 8 abril 2019]. ISSN 21690022. DOI 10.4172/2169-0022.1000217. Disponible en: <http://www.omicsgroup.org/journals/raman-spectroscopy-of-iron-oxide-of-nanoparticles-fe3o4-2169-0022-1000217.php?aid=64916>.
- BERTRAND, N., WU, J., XU, X., KAMALY, N. y FAROKHZAD, O.C., 2014. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 66, pp. 2-25. ISSN 0169409X. DOI 10.1016/j.addr.2013.11.009.
- BIRD, S.M., GALLOWAY, J.M., RAWLINGS, A.E., BRAMBLE, J.P. y STANILAND, S.S., 2015. Taking a hard line with biotemplating: cobalt-doped magnetite magnetic nanoparticle arrays. *Nanoscale*, vol. 7, no. 16, pp. 7340-7351. ISSN 2040-3364, 2040-3372. DOI 10.1039/C5NR00651A.
- BRUNO, P., 1993. Physical origins and theoretical models of magnetic anisotropy. , pp. 29.
- CAI, W. y WAN, J., 2007. Facile synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles in liquid polyols. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 305, no. 2, pp. 366-370. ISSN 00219797. DOI 10.1016/j.jcis.2006.10.023.
- CARREY, J. y HALLALI, N., 2016. Torque undergone by assemblies of single-domain magnetic nanoparticles submitted to a rotating magnetic field. *Physical Review B*, vol. 94, no. 18, pp. 184420. ISSN 2469-9950, 2469-9969. DOI 10.1103/PhysRevB.94.184420.
- CHEN, L., ZHOU, Q., XIONG, Q., LI, W., LIU, J. y YANG, X., 2015. Shape-Evolution and Growth Mechanism of Fe₃O₄ Polyhedrons. *Advances in Materials*

Science and Engineering, vol. 2015, pp. 1-7. ISSN 1687-8434, 1687-8442. DOI 10.1155/2015/763124.

CHENG, Dengfeng, LI, X., ZHANG, G. y SHI, H., 2014. Morphological effect of oscillating magnetic nanoparticles in killing tumor cells. *Nanoscale Research Letters*, vol. 9, no. 1, pp. 195. ISSN 1556-276X. DOI 10.1186/1556-276X-9-195.

CHENG, Xun-Liang, JIANG, J.-S., JIANG, D.-M. y ZHAO, Z.-J., 2014. Synthesis of Rhombic Dodecahedral Fe₃O₄ Nanocrystals with Exposed High-Energy {110} Facets and Their Peroxidase-like Activity and Lithium Storage Properties. *The Journal of Physical Chemistry C*, vol. 118, no. 24, pp. 12588-12598. ISSN 1932-7447, 1932-7455. DOI 10.1021/jp412661e.

CHIRIAC, H., RADU, E., ŢIBU, M., STOIAN, G., ABABEI, G., LĂBUŞCĂ, L., HEREA, D.-D. y LUPU, N., 2018. Fe-Cr-Nb-B ferromagnetic particles with shape anisotropy for cancer cell destruction by magneto-mechanical actuation. *Scientific Reports* [en línea], vol. 8, no. 1. [Consulta: 3 abril 2019]. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-018-30034-3. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-30034-3>.

CONTRERAS, M., SOUGRAT, R., ZAHER, A., RAVASI, T. y KOSEL, J., 2015. Non-chemotoxic induction of cancer cell death using magnetic nanowires. *International Journal of Nanomedicine*, pp. 2141. ISSN 1178-2013. DOI 10.2147/IJN.S77081.

CULLITY, B.D. y C.D. GRAHAM, 2011. *Introduction to magnetic materials*. John Wiley & Sons. S.l.: John Wiley & Sons.

DEATSCH, A.E. y EVANS, B.A., 2014. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 354, pp. 163-172. ISSN 03048853. DOI 10.1016/j.jmmm.2013.11.006.

FICAI, D., FICAI, A., VASILE, B.S., FICAI, M., OPREA, O., GURAN, C. y ANDRONESCU, E., 2011. SYNTHESIS OF ROD-LIKE MAGNETITE BY USING LOW MAGNETIC FIELD. , pp. 10.

FLEET, M.E., 1986. The structure of magnetite: Symmetry of cubic spinels. *Journal of Solid State Chemistry*, vol. 62, no. 1, pp. 75-82. ISSN 00224596. DOI 10.1016/0022-4596(86)90218-5.

FLEISCHER, K., VERRE, R., MAUIT, O., SOFIN, R.G.S., FARRELL, L., BYRNE, C., SMITH, C.M., MCGILP, J.F. y SHVETS, I.V., 2014. Reflectance anisotropy spectroscopy of magnetite (110) surfaces. *Physical Review B*, vol. 89, no. 19, pp. 195118. ISSN 1098-0121, 1550-235X. DOI 10.1103/PhysRevB.89.195118.

FRANÇA, À., PELAZ, B., MOROS, M., SÁNCHEZ-ESPINEL, C., HERNÁNDEZ, A., FERNÁNDEZ-LÁPEZ, C., GRAZÁ, V., DE LA FUENTE, J.M., PASTORIZA-SANTOS, I., LIZ-MARZÁN, L.M. y GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, À., 2010. Sterilization Matters: Consequences of Different Sterilization Techniques on Gold Nanoparticles. *Small*, vol. 6, no. 1, pp. 89-95. ISSN 16136810, 16136829. DOI 10.1002/smll.200901006.

- G. BEACH, 2013. Electronic, Optical and Magnetic Properties of Materials: Hysteresis in Ferromagnetic Materials. En: MIT OPENCOURSEWARE (ed.), *MIT OpenCourseWare*,
- HA, Y., KO, S., KIM, I., HUANG, Y., MOHANTY, K., HUH, C. y MAYNARD, J.A., 2018. Recent Advances Incorporating Superparamagnetic Nanoparticles into Immunoassays. *ACS Applied Nano Materials*, vol. 1, no. 2, pp. 512-521. ISSN 2574-0970, 2574-0970. DOI 10.1021/acsanm.7b00025.
- HUANG, J., BU, L., XIE, J., CHEN, K., CHENG, Z., LI, X. y CHEN, X., 2010. Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iron Oxide Nanoparticles. *ACS Nano*, vol. 4, no. 12, pp. 7151-7160. ISSN 1936-0851, 1936-086X. DOI 10.1021/nn101643u.
- HUANG, X., ZHUANG, J., CHEN, D., LIU, H., TANG, F., YAN, X., MENG, X., ZHANG, L. y REN, J., 2009. General Strategy for Designing Functionalized Magnetic Microspheres for Different Bioapplications. *Langmuir*, vol. 25, no. 19, pp. 11657-11663. ISSN 0743-7463, 1520-5827. DOI 10.1021/la901258p.
- IONESCU, A., LLANDRO, J. y ZIEBECK, K.R.A., 2019. Magnetism, Magnetic Materials, and Nanoparticles. En: N.J. DARTON, A. IONESCU y J. LLANDRO (eds.), *Magnetic Nanoparticles in Biosensing and Medicine* [en línea]. 1. S.I.: Cambridge University Press, pp. 1-51. [Consulta: 16 julio 2019]. ISBN 978-1-139-38122-2. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/9781139381222%23CN-bp-1/type/book_part.
- KOLHATKAR, A., JAMISON, A., LITVINOV, D., WILLSON, R. y LEE, T., 2013. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 8, pp. 15977-16009. ISSN 1422-0067. DOI 10.3390/ijms140815977.
- LI, W., LIU, Y., QIAN, Z. y YANG, Y., 2017. Evaluation of Tumor Treatment of Magnetic Nanoparticles Driven by Extremely Low Frequency Magnetic Field. *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, pp. 46287. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/srep46287.
- LIVESTRONG, A REGISTERED TRADEMARK OF THE LIVESTRONG FOUNDATION., 2015. Cancer basics. [en línea]. Disponible en: <https://www.livestrong.org/we-can-help/just-diagnosed/cancer-basics>.
- M. SAJJIA, 2015. Magnetic anisotropy. *Coordination Chemistry Reviews*,
- MANSELL, R., VEMULKAR, T., PETIT, D.C.M.C., CHENG, Y., MURPHY, J., LESNIAK, M.S. y COWBURN, R.P., 2017. Magnetic particles with perpendicular anisotropy for mechanical cancer cell destruction. *Scientific Reports* [en línea], vol. 7, no. 1. [Consulta: 3 abril 2019]. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-017-04154-1. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-04154-1>.
- MARTÍNEZ-BANDERAS, A.I., AIRES, A., TERAN, F.J., PEREZ, J.E., CADENAS, J.F., ALSHARIF, N., RAVASI, T., CORTAJARENA, A.L. y KOSEL, J., 2016. Functionalized magnetic nanowires for chemical and magneto-mechanical induction of cancer cell death. *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, pp. 35786. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/srep35786.

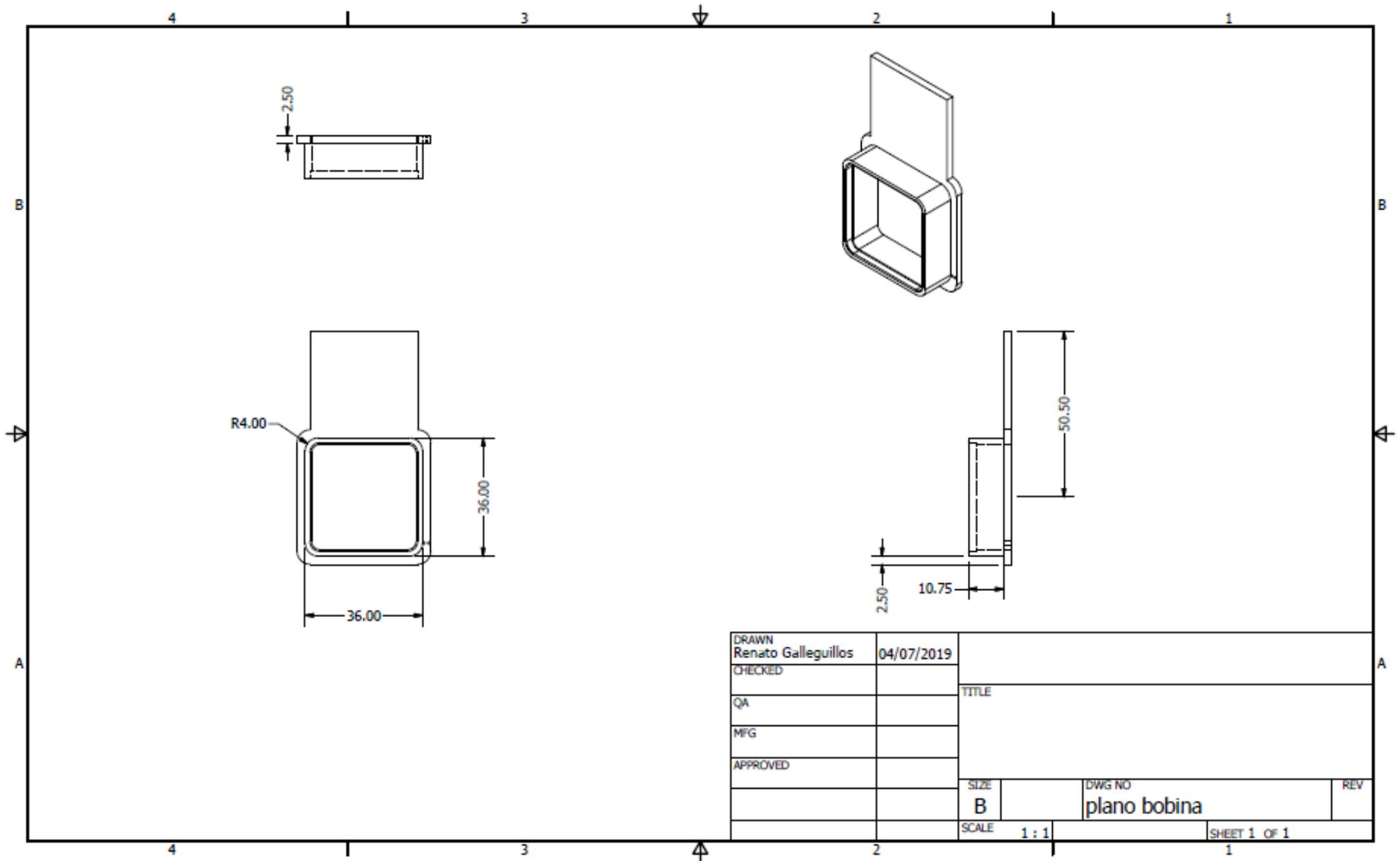
- MAZO-ZULUAGA, J., RESTREPO, J., MUÑOZ, F. y MEJÍA-LÓPEZ, J., 2009. Surface anisotropy, hysteretic, and magnetic properties of magnetite nanoparticles: A simulation study. *Journal of Applied Physics*, vol. 105, no. 12, pp. 123907. ISSN 0021-8979, 1089-7550. DOI 10.1063/1.3148865.
- MOHAPATRA, M. y ANAND, S., 2010. Synthesis and applications of nano-structured iron oxides/hydroxides – a review. , pp. 20.
- MOURDIKOU DIS, S. y LIZ-MARZÁN, L.M., 2013. Oleylamine in Nanoparticle Synthesis. *Chemistry of Materials*, vol. 25, no. 9, pp. 1465-1476. ISSN 0897-4756, 1520-5002. DOI 10.1021/cm4000476.
- NOH, J., OSMAN, O.I., AZIZ, S.G., WINGET, P. y BRÉDAS, J.-L., 2015. Magnetite Fe₃O₄ (111) Surfaces: Impact of Defects on Structure, Stability, and Electronic Properties. *Chemistry of Materials*, vol. 27, no. 17, pp. 5856-5867. ISSN 0897-4756, 1520-5002. DOI 10.1021/acs.chemmater.5b02885.
- OTA, S., KITAGUCHI, R., TAKEDA, R., YAMADA, T. y TAKEMURA, Y., 2016. Rotation of Magnetization Derived from Brownian Relaxation in Magnetic Fluids of Different Viscosity Evaluated by Dynamic Hysteresis Measurements over a Wide Frequency Range. *Nanomaterials*, vol. 6, no. 9, pp. 170. ISSN 2079-4991. DOI 10.3390/nano6090170.
- PATIL, R.M., THORAT, N.D., SHETE, P.B., BEDGE, P.A., GAVDE, S., JOSHI, M.G., TOFAIL, S.A.M. y BOHARA, R.A., 2018. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biochemistry and Biophysics Reports*, vol. 13, pp. 63-72. ISSN 24055808. DOI 10.1016/j.bbrep.2017.12.002.
- RE VIA, R.A. y ZHANG, M., 2016. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Materials Today*, vol. 19, no. 3, pp. 157-168. ISSN 13697021. DOI 10.1016/j.mattod.2015.08.022.
- ROCA, A.G., MORALES, M.P., O'GRADY, K. y SERNA, C.J., 2006. Structural and magnetic properties of uniform magnetite nanoparticles prepared by high temperature decomposition of organic precursors. *Nanotechnology*, vol. 17, no. 11, pp. 2783-2788. ISSN 0957-4484, 1361-6528. DOI 10.1088/0957-4484/17/11/010.
- SANDER, D., 2004. The magnetic anisotropy and spin reorientation of nanostructures and nanoscale films. *Journal of Physics: Condensed Matter*, vol. 16, no. 20, pp. R603-R636. ISSN 0953-8984, 1361-648X. DOI 10.1088/0953-8984/16/20/R01.
- SHANG, L., NIENHAUS, K. y NIENHAUS, G., 2014. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, vol. 12, no. 1, pp. 5. ISSN 1477-3155. DOI 10.1186/1477-3155-12-5.
- SHEN, Y., WU, C., UYEDA, T.Q.P., PLAZA, G.R., LIU, B., HAN, Y., LESNIAK, M.S. y CHENG, Y., 2017. Elongated Nanoparticle Aggregates in Cancer Cells for Mechanical Destruction with Low Frequency Rotating Magnetic Field. *Theranostics*, vol. 7, no. 6, pp. 1735-1748. ISSN 1838-7640. DOI 10.7150/thno.18352.

- SHULTZ, M.D., REVELES, J.U., KHANNA, S.N. y CARPENTER, E.E., 2007. Reactive Nature of Dopamine as a Surface Functionalization Agent in Iron Oxide Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 9, pp. 2482-2487. ISSN 0002-7863, 1520-5126. DOI 10.1021/ja0651963.
- SIMON, S.H., 2013. *The Oxford solid state basics*. First edition. Oxford: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-968076-4.
- SUTO, M., HIROTA, Y., MAMIYA, H., FUJITA, A., KASUYA, R., TOHJI, K. y JEYADEVAN, B., 2009. Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 321, no. 10, pp. 1493-1496. ISSN 03048853. DOI 10.1016/j.jmmm.2009.02.070.
- THEIVASANTHI, T. y ALAGAR, M., 2013. Innovation of Superparamagnetism in Lead Nanoparticles. *Physics and Technical Sciences*, vol. 1, no. 3, pp. 39. ISSN 2327-6517. DOI 10.12966/pts.11.01.2013.
- THOMSON, T., 2014. Magnetic properties of metallic thin films. *Metallic Films for Electronic, Optical and Magnetic Applications* [en línea]. S.I.: Elsevier, pp. 454-546. [Consulta: 18 abril 2019]. ISBN 978-0-85709-057-7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857090577500103>.
- TIAN, Y., YU, B., LI, X. y LI, K., 2011. Facile solvothermal synthesis of monodisperse Fe₃O₄ nanocrystals with precise size control of one nanometre as potential MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 8, pp. 2476. ISSN 0959-9428, 1364-5501. DOI 10.1039/c0jm02913k.
- VACH, P., 2015. Solution Synthesis and Actuation of Magnetic Nanostructures. , pp. 159.
- VAN OENE, M.M., DICKINSON, L.E., PEDACI, F., KÖBER, M., DULIN, D., LIPFERT, J. y DEKKER, N.H., 2015. Biological Magnetometry: Torque on Superparamagnetic Beads in Magnetic Fields. *Physical Review Letters*, vol. 114, no. 21, pp. 218301. ISSN 0031-9007, 1079-7114. DOI 10.1103/PhysRevLett.114.218301.
- VÁZQUEZ, M., LUNA, C., MORALES, M.P., SANZ, R., SERNA, C.J. y MIJANGOS, C., 2004. Magnetic nanoparticles: synthesis, ordering and properties. *Physica B: Condensed Matter*, vol. 354, no. 1-4, pp. 71-79. ISSN 09214526. DOI 10.1016/j.physb.2004.09.027.
- VEREDA, F., DE VICENTE, J. y HIDALGO-ÁLVAREZ, R., 2007. Influence of a Magnetic Field on the Formation of Magnetite Particles via Two Precipitation Methods. *Langmuir*, vol. 23, no. 7, pp. 3581-3589. ISSN 0743-7463, 1520-5827. DOI 10.1021/la0633583.
- WANG, H., SHRESTHA, T.B., BASEL, M.T., PYLE, M., TOLEDO, Y., KONECNY, A., THAPA, P., IKENBERRY, M., HOHN, K.L., CHIKAN, V., TROYER, D.L. y BOSSMANN, S.H., 2015. Hexagonal magnetite nanoprisms: preparation, characterization and cellular uptake. *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, no. 23, pp. 4647-4653. ISSN 2050-750X, 2050-7518. DOI 10.1039/C5TB00340G.

- YOON, S., 2011. Determination of the Temperature Dependence of the Magnetic Anisotropy Constant in Magnetite Nanoparticles. *Journal of the Korean Physical Society*, vol. 59, no. 5, pp. 3069-3073. ISSN 0374-4884. DOI 10.3938/jkps.59.3069.
- ZENG, Y., HAO, R., XING, B., HOU, Y. y XU, Z., 2010. One-pot synthesis of Fe₃O₄ nanoprisms with controlled electrochemical properties. *Chemical Communications*, vol. 46, no. 22, pp. 3920. ISSN 1359-7345, 1364-548X. DOI 10.1039/c0cc00246a.

Anexos

Plano sistema bobinas



DRAWN	Renato Galleguillos	04/07/2019		
CHECKED			TITLE	
QA				
MFG				
APPROVED				
			SIZE	DWG NO
			B	plano bobina
			SCALE	REV
			1 : 1	
			SHEET 1 OF 1	

