

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Física

Aplicaciones de nanopartículas de magnetita de origen bacteriano

Autor
Ander García Díez
Directora
Maria Luisa Fernández-Gubieda

Leioa, 18 de Junio de 2014

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	2
<i>1.1. Características generales y aplicaciones</i>	2
<i>1.2. Aspectos básicos de la hipertermia</i>	2
<i>1.3. Bases físicas de la hipertermia</i>	4
<i>1.3.1. Pérdidas por características ferrimagnéticas</i>	6
<i>1.3.2. Pérdidas por características de relajación</i>	6
2. Métodos experimentales	9
<i>2.1. Extracción y preparación de los magnetosomas</i>	9
<i>2.2. Caracterización magnética de las muestras</i>	11
<i>2.3. Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	13
<i>2.4. Espectro de absorción infrarroja</i>	15
<i>2.5. Medidas de hipertermia</i>	18
3. Resultados y discusión	19
<i>3.1. Imágenes TEM</i>	19
<i>3.2. Espectro infrarrojo</i>	21
<i>3.3. Caracterización magnética</i>	23
<i>3.4. Medidas de hipertermia</i>	28
4. Conclusiones	34

Aplicaciones de nanopartículas de magnetita de origen bacteriano

Ander García Díez

Resumen

En este trabajo se ha estudiado la aplicación de partículas de magnetita obtenidas de bacterias magnetotácticas a la hipertermia magnética, en particular se trata de lograr una optimización del *Specific Absorption Rate* (SAR). Se han analizado tres muestras de nanopartículas, que se han limpiado del tejido bacteriano que las rodeaba mediante tres técnicas que aumentaban progresivamente su grado de limpieza. Una de las muestras se ha limpiado mediante el uso de Rack magnético (muestra 1), a la segunda se le ha tratado también con el compuesto benzonasa (muestra 2), y la tercera ha sido filtrada finalmente mediante una columna magnética (muestra 3). Para las medidas del SAR se ha trabajado con los magnetosomas en solución acuosa con una concentración de 0.2 mg/mL, así como con las partículas fijadas en agar, con una concentración de 0.2875 mg/mL. Se han obtenido imágenes TEM de los magnetosomas en solución acuosa, imágenes que muestran que el diámetro medio de los mismos se sitúa en torno a los 40-45 nm, con una desviación estándar cercana a los 7nm. Mediante técnicas de espectroscopía de infrarrojos, en particular *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), se ha podido seguir el grado de limpieza de las muestras dependiendo de los procesos de filtrado. Los resultados muestran que el filtrado elimina principalmente los restos lípidos de las bacterias. Se ha realizado una caracterización magnética de las muestras, mediante el uso de un *Magnetómetro de Muestra Vibrante* (VSM). Este conjunto de medidas ha permitido encontrar características magnéticas como la imanación de saturación y la coercitividad, además de los ciclos de histéresis de los magnetosomas. Se ha comprobado que el proceso de imanación se da por rotación, tal y como describe el modelo de Stoner-Wohlfarth, si bien los valores del campo coercitivo calculados teóricamente mediante este modelo y los obtenidos experimentalmente difieren de manera importante. La causa de esto podría ser el movimiento Browniano de las partículas, no contemplado en el modelo. Finalmente, se han realizado medidas de los ciclos de histéresis en cuatro frecuencias distintas (75, 149, 302 y 532 kHz) y para distintos valores del campo máximo aplicado, y se ha determinado a partir de ellos los valores del SAR en función del campo y de la frecuencia. Estas medidas se han realizado para los magnetosomas en la solución acuosa así como en agar. Los resultados para los magnetosomas libres muestran que mayores grados de limpieza no aumentan los valores del SAR. Por ejemplo, para una frecuencia de 532 kHz y un campo de magnitud 3×10^4 A/m, el SAR de la muestra 1 es 2300 W/g, mientras que la muestra 3 da un valor de 1600 W/g. Se ha comprobado que en la zona de bajos campos, hasta aproximadamente 6 kA/m, la forma de los ciclos de histéresis se corresponde a las *lancetas de Rayleigh*, lo cual provoca que el SAR para estas regiones tenga una relación lineal con H^3 . Sin embargo, el ajuste del exponente no es perfecto. Para las partículas en agar, se ha obtenido que la contribución del movimiento Browniano es muy pequeña en todos los casos, lo cual quedaría explicado por el tamaño de los magnetosomas.

1.Introducción

1.1 Características generales y aplicaciones

Las bacterias magnetotácticas son un grupo de bacterias acuáticas que tienen la habilidad de biomineralizar el hierro de su entorno y formar partículas de tamaño nanométrico, que son ferrimagnéticas y de mono-dominio magnético. Generalmente, estas nanopartículas son cristales del compuesto conocido como magnetita (Fe_3O_4) y/o greigita de hierro sulfato (FeS_4). En el interior de las bacterias, las partículas se agregan mediante filamentos proteicos en forma de cadenas. Las cadenas de magnetita permiten a las bacterias magnetotácticas alinearse con el campo magnético terrestre y así poder orientarse y desplazarse hacia zonas más favorables para su supervivencia. Este tipo de comportamiento se suele denominar *magnetotaxis*[1]. Este comportamiento fue primeramente observado por Blakemore (1975). En este trabajo en particular, las partículas de magnetita se han obtenido de la bacteria magnetotáctica *Magnetospirillum gryphiswaldense*. Esta bacteria sintetiza nanopartículas de magnetita, de diámetro medio en torno a los 45 nm y de forma cubo-octaédrica. Además, las nanopartículas están rodeadas de una membrana lipídica, de manera que a la estructura de nanopartícula más membrana se le conoce con el nombre de magnetosoma.

El hecho de que las nanopartículas tengan un rango de tamaños comparable al de una célula, un virus o una proteína, hace que tengan importantes aplicaciones en biomedicina. Además, al estar rodeadas de una membrana lipídica son a priori altamente biocompatibles y fáciles de funcionalizar. Dado que también tienen propiedades magnéticas, pueden ser manipuladas mediante campos magnéticos externos. Esto, unido a la capacidad intrínseca de los campos magnéticos de penetrar a través de la piel humana, ha dado lugar a que estas nanopartículas se usen para muchos procesos que involucran transporte de fármacos a través del torrente sanguíneo, de manera que puedan llegar de manera más precisa y local a las zonas deseadas de aplicación, para contraste en imagen magnética y también para hipertermia, aplicación en la cual nos centraremos en este trabajo[2].

1.2 Aspectos básicos de la hipertermia

El tamaño de las nanopartículas de magnetita tiene una importancia crucial que se refleja en sus propiedades magnéticas. Dado que prácticamente todos los cristales de magnetita se encuentran en el rango de 35-120 nm, pertenecen al rango de mono-dominio magnético y son ferrimagnéticos. Por ello, tienen una imanación permanente a temperatura ambiente, están uniformemente imanados y su momento dipolar magnético por unidad de volumen es máximo[3]. Cuando los cristales se someten a un campo que varía con el tiempo, se produce una transferencia de energía entre el campo aplicado y la nanopartícula. Esto da lugar a que la partícula se caliente progresivamente, lo cual es la base de los tratamientos de hipertermia. En la aplicación de la hipertermia, se pretende usar las partículas de magnetita para destruir posibles organismos dañinos, como células cancerosas, mediante un aumento local de la temperatura, lo cual produciría la destrucción de estas células (termoablación). La hipertermia se ha usado ya como tratamiento antitumoral, así como complemento de otros tratamientos, a saber, radioterapia y quimioterapia[4,5].

Aunque en éste área se han realizado importantes avances, surgen ciertos problemas a la hora de llevar a cabo estos tratamientos. En primer lugar, se ha de tener presente la toxicidad que se

puede generar debido a la presencia de partículas en el cuerpo humano. Aunque la presencia de una membrana formada principalmente por fosfolípidos facilita la compatibilidad de las partículas con el organismo, es necesario ser cuidadoso a la hora de la extracción de las mismas. La presencia de restos bacterianos podría acarrear un grado de toxicidad importante, por lo que lo óptimo sería conseguir los efectos deseados en cuanto a generación de calor, con el menor número posible de partículas. Para ello, es necesario que éstas tengan un *Specific Absorption Rate* (SAR) de valor suficientemente alto[6].

Otros dos aspectos importantes a destacar de la hipertermia son el *límite terapéutico* (rango de temperatura necesario para un tratamiento efectivo) y el *límite de seguridad* del cuerpo humano. En lo que respecta al límite terapéutico, se trata de una estimación del intervalo de temperaturas para las cuales los tejidos perjudiciales son más susceptibles que el tejido sano. Este rango se ha valorado entre 40 y 44 °C, aunque depende de la parte del cuerpo afectada. Obviamente es muy importante, por la seguridad del paciente, tener en cuenta cuál es la temperatura que se debe aplicar para que el tratamiento sea efectivo y no destruya también tejido no dañino[7].

Por otra parte está el límite de seguridad y la tolerancia del paciente. Dado que se trabaja con campos magnéticos que dependen del tiempo, debe de haber un límite de seguridad para los parámetros que determinan el campo (esto es, la frecuencia f y la amplitud H) con objeto de evitar calentamiento indeseado, generado principalmente por las corrientes de inducción que se producen por la existencia de un campo alterno, tal y como predice la ley de Faraday-Lenz. Tradicionalmente, los desarrolladores de procesos de tratamiento por hipertermia mantienen un rango de frecuencias de $f=0.05-1.2$ MHz, mientras que la intensidad del campo se ha mantenido en $H=0-15$ kA/m. La cuestión de los límites de seguridad ha sido tema de debate, ya que parece que los rangos antes presentados han sido fundamentalmente auto-impuestos[7].

El único experimento que consideraba explícitamente las pérdidas por corrientes inducidas fue llevado a cabo en 1984 por Atkinson, el cual estimó que para un objeto cilíndrico de radio r , con una conductividad eléctrica σ , situado en un solenoide que produce un campo de amplitud H y frecuencia f , la potencia disipada por las corrientes de inducción es[8]

$$P=\sigma(\pi\mu_0)^2H^2f^2r^2 \quad (1)$$

Es destacable de la fórmula anterior que, debido a la presencia del término en r^2 , la cantidad de calor generada depende de la parte del cuerpo considerada. Por ejemplo, estimando el radio de un brazo humano en $r=5$ cm y el del torso en $r=20$ cm, entonces la potencia disipada es 16 veces superior para el torso. Atkinson realizó pruebas clínicas de tolerancia con voluntarios, determinando finalmente que intensidades de 35.8 A/m a frecuencias de 13.56 MHz podían ser soportadas por largos periodos de tiempo[7].

Sin embargo, no se han publicado otras experiencias de pruebas clínicas por lo que, en base a los resultados de Atkinson, se ha propuesto un límite de seguridad que se suele referir como *Criterio de Brezovich*, y especifica que para mantenerse dentro de los límites de seguridad, la cantidad $C=Hf$ no debe exceder el valor de 4.85×10^8 A m⁻¹ s⁻¹ (6×10^6 Oe s⁻¹)[9]. Otros autores[10] han propuesto un límite menos rígido de 5×10^9 A m⁻¹ s⁻¹ (6.25×10^7 Oe s⁻¹). A pesar de la diversidad de criterios, todo depende de las condiciones finales del tratamiento terapéutico.

En las medidas de ciclos de histéresis (en definitiva, del SAR) en este trabajo no se ha hecho hincapié en entrar dentro de los parámetros de tolerancia marcados por los anteriores criterios, dado que el objetivo era establecer una relación entre el grado de limpieza de los magnetosomas y los valores del SAR. Por ello, se han realizado medidas a cuatro frecuencias distintas (75 kHz,

149 kHz, 302 kHz y 532 kHz) y hasta intensidades máximas del campo de 30 kA m⁻¹. El objetivo era tener un número de puntos suficientemente representativo y que expusiera claramente el comportamiento del SAR, por lo que hay valores de la constante de seguridad *C*, que no entran dentro de los límites de seguridad.

1.3 Bases físicas de la hipertermia

Es bien conocido que si un material magnético es introducido en el seno de un campo magnético **H**, entonces los momentos magnéticos individuales del material responden a este campo, produciendo una inducción magnética, **B**, cuyo valor es

$$\mathbf{B} = \mu_0(\mathbf{H} + \mathbf{M}) \quad (2)$$

siendo μ_0 la permeabilidad del vacío ($\mu_0 = 4\pi \times 10^{-7}$ T m/A), y $\mathbf{M} = \mathbf{m}/V$ es la imanación, es decir, el momento magnético por unidad de volumen. Todos los materiales responden en mayor o menor medida a la aplicación del campo magnético, y se puede escribir que la imanación inducida es proporcional al campo aplicado mediante la relación

$$\mathbf{M} = \chi \mathbf{H} \quad (3)$$

χ es lo que se denomina susceptibilidad magnética (volumétrica), que es una constante adimensional en el SI. De esta forma, los materiales pueden clasificarse en *paramagnéticos* o *diamagnéticos*. Para los primeros, la imanación inducida tiene el sentido del campo, y su susceptibilidad es del orden de 10^{-6} a 10^{-1} , en tanto que los segundos tienen una imanación opuesta al campo, y por tanto su susceptibilidad cambia de signo, variando entre -10^{-6} y -10^{-3} . Existen sin embargo otro tipo de materiales, llamados materiales de dominio magnético, y que exhiben estados de imanación incluso sin campo aplicado. Se pueden clasificar en tres grupos: *ferromagnéticos*, *antiferromagnéticos* y *ferrimagnéticos*.

En los materiales ferromagnéticos, a $T=0K$ y en ausencia de campo externo, los momentos magnéticos individuales están alineados paralelamente, de tal manera que la imanación resultante es distinta de cero. Por otro lado, en los materiales antiferromagnéticos, la distribución de los momentos magnéticos es antiparalela, de manera que las contribuciones se cancelan y, a $T=0K$ y campo nulo, la imanación es nula. Por último, los ferrimagnéticos (como es el caso de los magnetosomas) bajo las mismas condiciones tienen una distribución de los momentos que corresponde al orden antiferromagnético, pero tienen dos momentos de distinto valor, lo cual da lugar finalmente a una imanación total no nula. La Figura 1 muestra un esquema de los tres tipos descritos de orden magnético

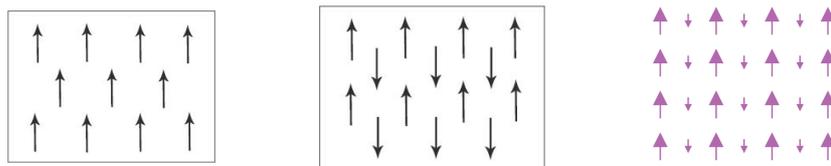


Figura 1: Distribución de los momentos magnéticos en un material ferromagnético (izquierda), antiferromagnético (centro) y ferrimagnético (derecha).

Resulta que en los materiales de orden magnético, la respuesta frente a un campo aplicado es unas 10^6 veces mayor que en un material paramagnético. La primera teoría de los materiales ferromagnéticos fue propuesta en 1907 por Pierre Weiss, que postuló la existencia de un campo efectivo intrínseco del material y de origen microscópico que denominó *Campo Molecular*. Posteriormente, las ideas de Weiss se han ido refinando mediante el desarrollo de teorías y correcciones más precisas basadas fundamentalmente en la mecánica cuántica.

Se observa también que en los materiales magnéticamente ordenados, la susceptibilidad depende del campo aplicado \mathbf{H} , $\mathbf{M}(\mathbf{H})$. Esto da lugar a las características curvas M-H que se llaman *ciclos de histéresis*. En estas gráficas, se puede observar como la imanación tiende a un valor máximo, M_s , llamado *imanación de saturación* y que es una característica de cada material. Además, se puede apreciar que una vez el material ha sido sometido a un campo magnético de determinada intensidad, si este campo se disminuye de nuevo hasta un valor nulo, existe una imanación no nula que se denomina *imanación remanente*. Finalmente, el último parámetro que determina un ciclo de histéresis es el *campo coercitivo* o *coercitividad*, que se define como el campo que es necesario aplicar para eliminar la imanación remanente. En la Figura 2 se pueden ver las características descritas del ciclo de histéresis.

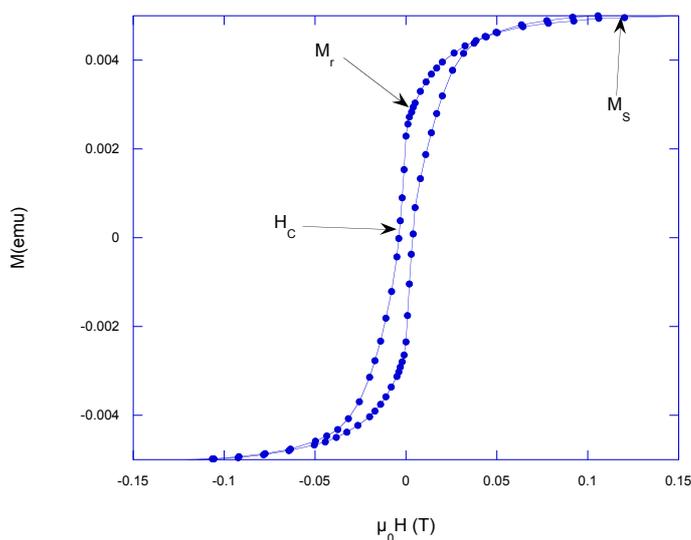


Figura 2: Esquema de un ciclo de histéresis típico, indicando la imanación de saturación (M_s), la remanencia (M_r) y la coercitividad (H_c)

Como se explicará más adelante, el valor de SAR que interesa maximizar para aplicaciones de hipertermia está directamente relacionado con el área del ciclo de histéresis. Por tanto, resulta necesario que el ciclo sea lo más ancho posible para que los resultados sean óptimos. En concreto, las partículas que son de mono-dominio magnético, como los magnetosomas, tienen un área del ciclo de histéresis que es superior al de cualquier otro material, lo cual las hace ideales para este tipo de aplicaciones.

En este trabajo, los valores de la densidad de potencia volúmica y del SAR se han determinado mediante un programa automatizado, de manera que se realizaban numéricamente las integrales[12], calculado así el área del ciclo.

$$P_{vd} = f \oint_T \mathbf{M}_t \cdot d\mathbf{H}_t \quad (4)$$

$$SAR = \frac{f}{c} \oint_T \mathbf{M}_t \cdot d\mathbf{H}_t \quad (5)$$

En estas expresiones, c es la concentración de magnetita en el medio, medida en kg m^{-3} , mientras que \mathbf{M}_t y \mathbf{H}_t son los valores en el instante t de la imanación y del campo magnético. Por tanto, el método de medida utilizado no hace distinciones entre las dos contribuciones a las pérdidas, que se explican a continuación.

1.3.1 Pérdidas por características ferrimagnéticas

El ciclo de histéresis se relaciona directamente con el método más directo de pérdidas de potencia en materiales ferrimagnéticos. Si tenemos cierto material ferrimagnético expuesto a un campo magnético que varía con el tiempo, de frecuencia f , entonces la potencia disipada por ciclo se puede expresar como[2]:

$$P_{FM} = \mu_0 f \oint H dM \quad (6)$$

Esta ecuación no da cuenta de otros posibles mecanismos de calentamiento, como las corrientes de inducción generadas magnéticamente. Sin embargo, se puede suponer que generalmente éstas son irrelevantes en el contexto de las nanopartículas, dado que estas son demasiado pequeñas, y las frecuencias usadas en hipertermia demasiado bajas como para que se genere una corriente sustancial. Por otra parte, la contribución que pudiera deberse a efectos de resonancia ferromagnética sólo es significativa para valores de la frecuencia que son mucho mayores de los recomendables en aplicaciones médicas.

De la ecuación (4), el valor del SAR se puede estimar como

$$SAR = \rho P_{FM} \quad (7)$$

Siendo ρ la densidad de partículas por unidad de volumen. Generalmente, se suele expresar el SAR en su valor normalizado, y por tanto tiene unidades de W/g. Se sigue, tal y como se ha mencionado anteriormente, que el valor del SAR es esencialmente el área del ciclo de histéresis.

1.3.2 Pérdidas por características de relajación

El segundo mecanismo de pérdidas en un campo variable se produce cuando el material analizado tiene una relajación intrínseca. Cuando una nanopartícula se sitúa en un campo magnético, la ecuación de movimiento para su imanación, de acuerdo con el modelo de Debye (o modelo del tiempo de relajación) es[9]

$$\frac{d\mathbf{M}}{dt} = \boldsymbol{\Omega} \times \mathbf{M} - \frac{1}{\tau}(\mathbf{M} - \mathbf{M}_0\hat{\mathbf{H}}) \quad (8)$$

En esta ecuación, $\boldsymbol{\Omega}$ designa la velocidad angular de la partícula, \mathbf{M}_0 es la imanación de equilibrio, $\hat{\mathbf{H}}$ es un vector unitario en la dirección del campo magnético y τ es un parámetro conocido como *tiempo de relajación*. Como se puede apreciar, el modelo de Debye predice que la variación de la imanación en el tiempo depende de lo distante que está de su valor de equilibrio, como se deduce del segundo término en el lado derecho de la ecuación (8). En esta fórmula, es clave el parámetro τ . Este tiempo de relajación es una característica de cada tipo de partícula, pero de manera general, incluye dos contribuciones. La primera de estas contribuciones se debe a la relajación de la propia imanación, y se conoce como *tiempo de relajación de Néel* (τ_N). Si la anisotropía magnética es uniaxial, entonces la imanación de una partícula tiene normalmente sólo una dirección estable (conocida como *eje fácil*), con dos sentidos antiparalelos. El paso de una orientación a otra está regulado por una barrera de energía, KV , que tiene que ver con la anisotropía. Para cierta temperatura, hay una probabilidad de que la imanación gire y pase de una de las orientaciones a la otra. El paso está regulado por el tiempo de Néel, y se escribe

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{KV}{K_B T}} \quad (9)$$

En esta definición se puede observar que la dependencia con la energía que separa las orientaciones de la imanación está incluida en el numerador de la exponencial. La constante K se llama *constante de anisotropía* y es una característica de cada material. Por otro lado, el parámetro τ_0 se conoce con el nombre de *tiempo de relajación intrínseco* y se asume que es constante y su valor está en el rango de 10^{-9} s a 10^{-6} s.

La segunda contribución proviene del movimiento Browniano, es decir, el movimiento aleatorio de la partícula en el medio fluido que la rodea, debido al choque que sufre con las moléculas del fluido, excitadas térmicamente. Este movimiento queda también caracterizado por un tiempo de relajación, τ_B , y que está dado por la siguiente ecuación

$$\tau_B = \frac{3\eta V_h}{K_B T} \quad (10)$$

Este tiempo depende como se puede observar de la viscosidad del fluido η y del volumen hidrodinámico, V_h , que se puede estimar como tres veces el volumen de la nanopartícula.

Es decir, en el movimiento Browniano, la contribución a la generación de calor viene de la rotación de la propia partícula, estando la imanación fija.

Finalmente, el tiempo de relajación que aparece en la ecuación (8) se relaciona con los otros dos mediante

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (11)$$

Sin embargo, la relajación de tipo Néel sólo es relevante en partículas lo suficientemente pequeñas como para exhibir comportamiento superparamagnético (SPM). Los magnetosomas,

con un tamaño medio de alrededor de 50 nm de diámetro, son demasiado grandes como para poder observar SPM en ellos, y por tanto la contribución de la parte de relajación de Néel es despreciable. Esto se expresa matemáticamente viendo que el tiempo de relajación de Néel es tan grande comparado con el Browniano, que el primer término en el lado izquierdo de la ecuación (11) se puede tomar como cero. Es posible hacer una estimación de ambos tiempos.

Tomando como valor del “tiempo de relajación intrínseco” $\tau_0 = 10^{-9}$ s, para una constante de anisotropía de $K = 1.1 \times 10^4$ J m⁻³ y suponiendo que el magnetosoma es esférico, con un diámetro de 50 nm a una temperatura de 300 K se obtiene que el valor del tiempo de Néel es

$$\tau_N = \tau_0 \exp(1.67 \times 10^3)$$

Sin embargo, a la misma temperatura, en un medio de viscosidad [11] $\eta = 1.01 \times 10^{-3}$ Kg m⁻¹ s⁻¹, usando un volumen hidrodinámico que es tres veces el volumen de la partícula, el tiempo de relajación característico del movimiento Browniano es

$$\tau_B = 1.1 \times 10^{-4} \text{ s}$$

Se comprueba por tanto, que el factor exponencial en el tiempo de Néel es lo suficientemente grande como para considerar que este tiempo tiene un valor infinito comparado con el tiempo Browniano. Es correcto inferir, por tanto, que la relajación de la imanación no influirá apreciablemente en el calentamiento de los magnetosomas, y que podemos suponer que toda la contribución proviene de su difusión en el medio en el que estén inmersos.

Cuando los magnetosomas sean sometidos al campo externo dependiente del tiempo, del tipo $H(t) = \text{Re}[H_0 e^{-i\omega t}]$ entonces su imanación en función del tiempo es

$$M(t) = \text{Re}[\chi H_0 e^{-i\omega t}] \quad (12)$$

Supongamos entonces que la imanación es también de la forma $M(t) = \text{Re}[M_0 e^{-i\omega t}]$

Llevando esto a la ecuación de Debye, (8), suponiendo que la velocidad angular de la partícula sea nula se obtiene

$$-i\omega M(t) = \frac{1}{\tau} (\chi_0 H - M(t)) \quad (13)$$

$$\frac{1}{i\omega\tau} \chi_0 H = M(t) \left(\frac{1}{i\omega\tau} - 1 \right) \quad (14)$$

como quiera que $M(t)$ cumpla la relación dada por (12), entonces debe de suceder que la susceptibilidad sea

$$\chi(\omega) = \frac{\chi_0}{1 - i\omega\tau} \quad (15)$$

es decir, que la susceptibilidad es en general una cantidad compleja y que depende de la frecuencia. En un sistema que posea comportamiento SPM además del movimiento Browniano, entonces el tiempo de relajación que aparece en la expresión (15) será el general dado por (11). Sin embargo, en el caso de los magnetosomas ha quedado comprobado que no exhiben SPM y que su tiempo de Néel puede considerarse infinito y por tanto no contribuye al tiempo de relajación total. En la expresión (15), el tiempo τ queda sustituido por τ_B . La susceptibilidad se puede separar en sus partes real e imaginaria, y se obtiene para cada una de ellas

$$\chi'(\omega) = \frac{\chi_0}{1 + \omega^2 \tau_B^2} \quad (16)$$

$$\chi''(\omega) = \frac{\omega \tau_B \chi_0}{1 + \omega^2 \tau_B^2} \quad (17)$$

De las dos, la parte compleja es la que está en desfase con el campo, y por tanto la que da cuenta de las pérdidas de potencia. Más explícitamente, la influencia de la relajación Browniana en la generación de calor se puede comprobar si tenemos en cuenta que la densidad de potencia disipada es

$$P = \mu_0 \pi \chi''(\omega) H^2 f \quad (18)$$

Conviene aquí hacer un comentario acerca de la cantidad SAR anteriormente mencionada. Aunque el SAR se ha convertido en una cantidad muy extendida en el ámbito de la hipertermia a la hora de evaluar la capacidad de calentamiento de partículas magnéticas, presenta el problema de la dependencia en las intensidades y las frecuencias de los campos utilizados. A consecuencia de esto, la comparación de datos obtenidos por distintos grupos queda dificultada. En vista de la ecuación (18), se ha propuesto un nuevo parámetro[7], denominado *Intrinsic Loss Parameter* (ILP) y que se basa en una normalización del SAR para campos y frecuencias como sigue

$$ILP = \frac{SAR}{H^2 f} \quad (19)$$

Finalmente, indicar que el objetivo de realizar un nuevo conjunto de mediciones con los magnetosomas fijos en agarosa es eliminar la contribución de la parte de rotación dada por la ecuación (18), y así comprobar qué fracción de las pérdidas son generadas por este mecanismo.

2. Métodos experimentales

2.1 Extracción y preparación de los magnetosomas

Las bacterias *Magnetospirillum* de las que se extraen los magnetosomas, se mantienen en un cultivo a una temperatura de unos 28°C, inicialmente en un medio conocido como *Low Iron Medium* (LIM), que no contiene hierro. De esta manera, en esta fase inicial del proceso las bacterias no son capaces de llevar a cabo la biomineralización, de modo que no se producen magnetosomas en su interior. Cuando la densidad celular es lo suficientemente alta

(aproximadamente 10^8 células/ml), lo cual se alcanza generalmente en un tiempo de unas 24 a 48 horas, las bacterias son transportadas a otro medio denominado *Flask Standard Medium* (FSM) cuya composición por litro de agua desionizada es: 0.1g de KH_2PO_4 , 0.15g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.38g de Hepes, 0.34g de NaNO_3 , 0.1g de extracto de levadura y 3g de peptona de soja. Además, se le añade citrato de hierro, como fuente para la creación de los magnetosomas. Se realizan comprobaciones de los niveles de magnetita alcanzados, en intervalos temporales de 30 minutos, hasta 24 horas.

Cuando el proceso de biomineralización se da por concluido, el siguiente paso es extraer los magnetosomas del interior celular. Para ello es necesario provocar la ruptura de la membrana de la bacteria, de manera que después de este proceso se puedan purificar los magnetosomas extraídos. Los magnetosomas se mantienen en una solución tampón conocida como *Tampón fosfato salino* (PBS) que por litro de agua desionizada se compone de: 8.0 g de NaCl , 0.2g de KCl , 1.44g de Na_2HPO_4 y 0.24g de KH_2PO_4 . Después, se usa una prensa especializada para lisis celular, en varios pasos, usando cada vez 5mL de muestra.

Con los magnetosomas ya extraídos, se puede comenzar el proceso de limpiado. Se han seguido tres procesos que aumentan progresivamente el grado de limpieza de las muestras. El primer paso es realizar un primer limpiado con un Rack magnético. Este sistema se muestra a continuación



Figura 3: Imagen del Rack de separación magnética

El funcionamiento de este dispositivo es simple. Los magnetosomas con restos bacterianos que se encuentran en suspensión se introducen en los eppendorf, que se sitúan en un portamuestras con una pared intermedia que contiene un imán. De esta manera, dado que los magnetosomas son ferrimagnéticos, quedan adheridos a las paredes del eppendorf. Conseguido esto, se realizan varias limpiezas haciendo circular agua por el eppendorf, de manera que ésta arrastra consigo los restos bacterianos, mientras que los magnetosomas se mantienen en adhesión. Se realizan varios ciclos de este tipo. En este punto, se concluye la limpieza de una de las muestras, referida aquí como Muestra 1. Para hacer una limpieza más exhaustiva, una vez se ha concluido el primer ciclo de purificación usando agua, se pueden realizar nuevos ciclos, empleando esta vez un compuesto conocido como *benzonasa*. La benzonasa es una enzima que cumple la función de romper el ADN de las células, que puede haber quedado en los restos después de la extracción, y así ayuda a la eliminación de todos los restos bacterianos en el rack. La segunda muestra que se ha utilizado en este trabajo, Muestra 2, concluye su proceso de limpieza una vez se ha usado la benzonasa y se ha limpiado con el rack. Finalmente, una tercera muestra (Muestra 3), se limpia una última ocasión con una columna magnética. El funcionamiento de este sistema es muy similar al del Rack, empleando sin embargo imanes más potentes y realizando un mayor número

de ciclos de limpieza. Con esto, concluye el proceso de limpieza de las muestras, que se mantienen en suspensión en un medio de PBS, y que pueden ser utilizadas para las siguientes partes experimentales.

Por último, queda mencionar el proceso de fijación en agarosa, que se ha realizado a fin de eliminar la contribución rotacional de las partículas en las medidas de hipertermia. La agarosa se disuelve en agua al 4% (4g de agarosa en 10g de agua). Esta disolución debe unirse con la proporción adecuada de magnetosomas, de manera que la concentración final sea del 2%. Sin embargo, la disolución de agarosa presenta un problema, que es su altísima viscosidad. No es posible realizar la disolución conjunta con las muestras de magnetosomas, si el proceso se realiza a temperatura ambiente. Por ello, la disolución de agarosa se introduce en un baño de agua que incluye un proceso de calentamiento, hasta unos 100°C. Cuando se alcanza esta temperatura, la agarosa se encuentra en un estado de fluidez suficiente como para poder realizar la unión con los magnetosomas. Éstos se extraen directamente con una pipeta, y se introducen en el eppendorf que contiene la agarosa. Este proceso debe realizarse con gran rapidez, dado que la agarosa pasa muy rápidamente a un estado semi-sólido que impide el proceso de mezcla. Se ha podido comprobar que este método de preparación es suficientemente bueno, y que los magnetosomas quedan uniformemente distribuidos en el gel, haciendo posible su uso en el equipo de hipertermia.

2.2 Caracterización magnética de las muestras

Para determinar la concentración de magnetosomas en cada una de las tres muestras, se ha realizado un análisis de las mismas usando un *Magnetómetro de Muestra Vibrante* (VSM). En la Figura 4 se puede ver un esquema de la disposición de los elementos en el VSM utilizado.

El modo de funcionamiento de este aparato está basado en la Ley de inducción de Faraday. La muestra que se quiere analizar se introduce en un eppendorf (u otro contenedor equivalente), y se coloca en el centro de sendos electroimanes que generan un campo magnético uniforme. Si la muestra tiene propiedades magnéticas, este campo creará en ella una imanación determinada.

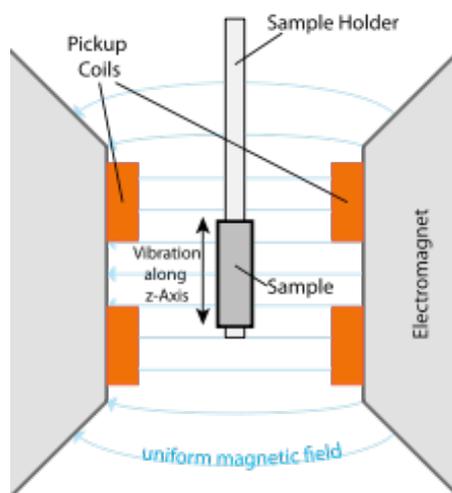


Figura 4: Esquema de disposición de la muestra en un VSM

La muestra se hace entonces vibrar en un eje perpendicular al campo magnético aplicado, generalmente de manera sinusoidal a una frecuencia determinada. De esta manera, a medida que la muestra se mueve verticalmente, la imanación que ha generado el campo en ella altera el flujo magnético (ϕ) que atraviesa los detectores (*bobinas de detección*, en la imagen *pickup coils*). Este cambio en el flujo magnético, según la ley de Faraday, provoca a su vez un voltaje (V), que es lo que se puede detectar. Mediante el uso de un programa informático debidamente calibrado, se puede traducir el voltaje detectado y obtener una medida de la imanación de la muestra, que es proporcional a dicho voltaje. Suponiendo que sea Z el eje a lo largo del cual vibra la muestra, entonces el voltaje medido en los sensores es

$$V = 2\pi f C M A \sin(2\pi ft) \quad (20)$$

siendo M la imanación de la muestra, A la amplitud de vibración, f su frecuencia y C una constante de acoplo

Y, para la muestra vibrando de manera sinusoidal en el eje Z, este voltaje se ajusta a una fórmula del tipo

$$V = \frac{d\Phi}{dt} = \left(\frac{d\Phi}{dz} \right) \left(\frac{dz}{dt} \right) \quad (21)$$

Se sigue entonces que una medida de este voltaje permite obtener la imanación correspondiente. Generalmente, esta señal es amplificada y medida por un voltímetro lock-in, de manera que a la hora de su detección se realiza un promedio entre las partes en fase y en cuadratura del voltaje medido. Con el equipo se pueden realizar medidas de la imanación en función del campo aplicado, hasta valores de 1.8T. De esta manera, se obtiene el ciclo de histéresis de las muestras. Es necesario también usar dos bobinas de compensación, situadas en serie oposición, de manera que se tenga certeza que el voltaje detectado es el debido a la imanación de la muestra. Asimismo, la imanación mínima que detecta el VSM utilizado es 2.5×10^{-5} emu. Además, dado que las muestras están contenidos en un medio (PBS), que tiene una respuesta diamagnética, a la hora de obtener los ciclos de histéresis es necesario hacer correcciones en los datos obtenidos para sustraer la contribución diamagnética. Finalmente, con el ciclo de histéresis corregido, se obtiene el valor de la imanación de saturación de la muestra y, mediante una comparación de esta con la imanación bulk de la magnetita (92 emu/g a 300K) se puede hacer una estimación de la concentración de magnetosomas presentes en la suspensión.

El equipo dispone de una fuente de alimentación que suministra un voltaje a los electroimanes así como al portamuestras que realiza el movimiento oscilatorio. Para compensar el posible calentamiento de los electroimanes por las corrientes de inducción, se usa un circuito refrigerador que está alimentado por agua. Una imagen del equipo utilizado se encuentra en la Figura 5.

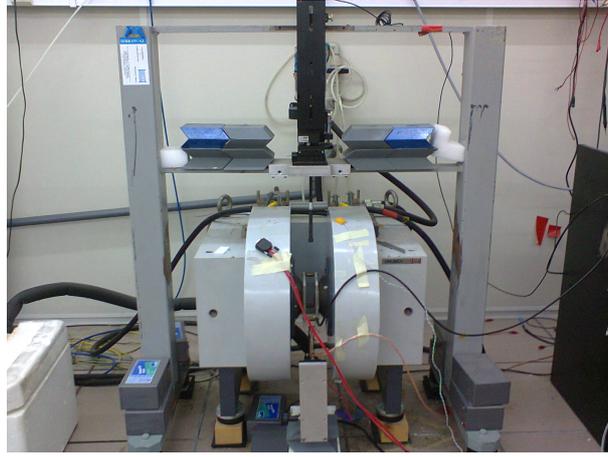


Figura 5: *Imagen del VSM utilizado*

2.3 Imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión

Para determinar la distribución de tamaños de los magnetosomas, se han tomado diversas imágenes usando Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). La base de un microscopio es la misma que la de un microscopio óptico pero usando electrones en lugar de fotones. En un microscopio óptico, la resolución posible está limitada a la longitud de onda de la luz utilizada. En un microscopio electrónico, en cambio, es posible acelerar los electrones usando altos potenciales de manera que su longitud de onda sea mucho más corta, con lo que se obtiene una resolución mucho mayor. La longitud de onda de los electrones emitidos puede calcularse usando la relación de de Broglie, incluyendo ciertas correcciones relativistas debidas a que los electrones tienen velocidades lo suficientemente próximas a la de la luz. La expresión de la longitud de onda se puede escribir

$$\lambda = \frac{hc}{\sqrt{E^2 - m_0^2 c^4}} \quad (22)$$

siendo m_0 la masa en reposo de los electrones, y E la energía de aceleración de los mismos. Los electrones se generan por efecto termoiónico a partir de un filamento generalmente de tungsteno. La emisión requiere el calentamiento del filamento, y la densidad de corriente producida viene dada por la ley de Richardson

$$j = AT^2 \exp\left(-\frac{W}{k_B T}\right) \quad (23)$$

donde A es una constante y W es la función trabajo del metal. Los electrones emitidos son acelerados con una diferencia de potencial de 120 kV, lo cual da una longitud de onda de aproximadamente 1Å. Los electrones acelerados se hacen converger mediante el uso de lentes electromagnéticas. La mayor parte del error en la resolución de los equipos proviene de las

posibles aberraciones de estas lentes (principalmente astigmatismo y aberraciones cromáticas). El haz de electrones se hace entonces incidir sobre la muestra, que se coloca en un portador preparado a tal efecto en el interior del microscopio. El sistema se mantiene además a bajas presiones de manera que el recorrido libre medio de los electrones sea lo más grande posible, y el mayor número posible de ellos impacte sobre la muestra. Es necesario también mantener la zona de impacto refrigerada debido a la gran energía de los electrones. Un esquema general de un microscopio electrónico se puede encontrar en la Figura 6.

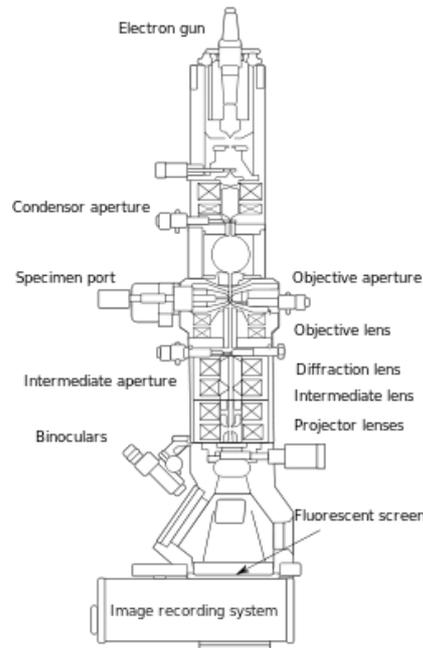


Figura 6: Imagen con los componentes de un microscopio TEM

Una vez que el haz de electrones ha impactado sobre la muestra, otra serie de lentes permiten cambiar la amplificación de la imagen regulando el flujo de electrones que pasa a través de ellas. Finalmente hay otro conjunto de lentes, las *proyectoras*, que tienen la función de expandir el haz resultante. Para poder visualizar correctamente la imagen se usa un proyector sobre una objetivo, que lo proyecta en un monitor. Para ajustar de manera completa la imagen que se obtiene, es posible desplazar la muestra en el plano horizontal, así como la posición vertical y la inclinación de la misma. Los paneles de control que permiten regular la intensidad del haz, así como el aumento de tamaño de la imagen se muestran en la Figura 7

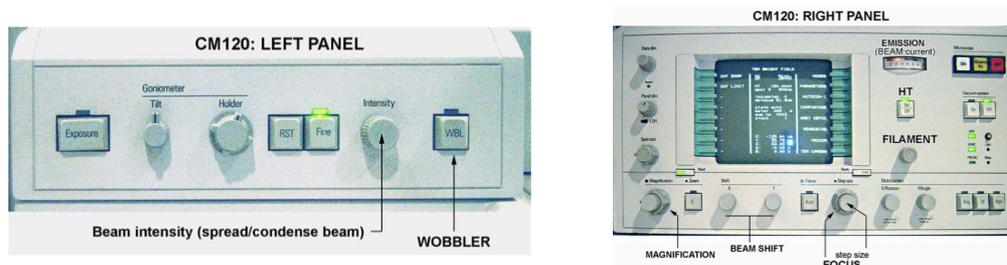


Figura 7: Paneles de control del microscopio TEM

Por otro lado, el portador de muestras presenta el siguiente aspecto



Figura 8: *Portador de muestras del microscopio*

La preparación de la muestra para su visualización es un proceso bastante delicado. Se han usado 10 μL de muestra, que se sitúan en una rejilla bidimensional de 3mm de diámetro. Esta rejilla tiene un soporte de carbono que es lo que se colocará en el portamuestras. En el caso de las muestras de magnetosomas, presentan el principal problema de ser líquidas. Por este motivo, es necesario hidrofilar la película de carbono, de manera que los magnetosomas y el medio en el que están contenidos permanezcan adheridos a la rejilla. Para hacer esto, se usa una descarga de plasma, usando un potencial de 800 mV durante 20 minutos. Este proceso se conoce con el nombre de *Glow Discharge*. A diferencia de los tejidos biológicos, en los magnetosomas no es necesario usar tinción para una correcta observación de las muestras. Una vez que se ha realizado este proceso se pueden comenzar las medidas. Gracias al sistema de grabación del microscopio, se han tomado imágenes de todas las muestras, en sectores del enrejado con suficiente concentración de magnetosomas como para poder hacer un muestreo eficaz.

A partir de estas imágenes, se puede realizar fácilmente un histograma de tamaños de las nanopartículas. Para ello, se ha usado el programa de libre distribución ImageJ, que permite analizar las imágenes y determinar el diámetro de los magnetosomas. Para cada una de las tres muestras, se han contado manualmente alrededor de 200 magnetosomas, de manera que haya una población significativa con la que realizar el histograma de diámetros.

2.4 Espectro de absorción infrarroja

Con el fin de detectar los posibles restos biológicos en las muestras después de los procesos de limpieza, se ha realizado un experimento de absorción de radiación mediante un equipo de *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. El funcionamiento de esta técnica está basado en las frecuencias propias de vibración de las moléculas que constituyen la muestra que se desea analizar. La muestra de magnetosomas (unos 10 μL) se colocan en una placa que es necesario secar a una temperatura de unos 60°C para poder realizar el análisis y, una vez seca, se coloca en

un compartimento destinado a tal efecto. La radiación se emite a partir de una fuente, que dispone también de un control de apertura de manera que se pueda regular la intensidad que la atraviesa y que por lo tanto llega a la muestra. Esta radiación es policromática y puede ser aproximada a la radiación de un cuerpo negro. Esta radiación pasa por un colimador, y se lleva a un interferómetro tipo Michelson especialmente diseñado. Éste produce un patrón típico de interferencia producido por la diferencia de caminos ópticos entre los dos haces dispersados (ver Figura 9).

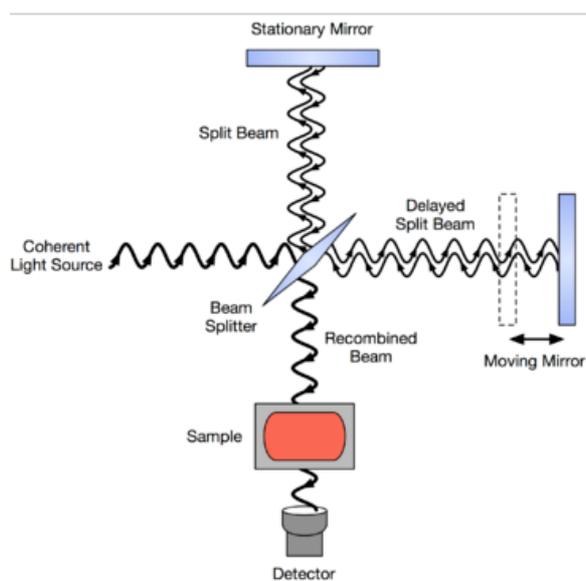


Figura 9: Interferómetro Michelson preparado para un equipo de FTIR

El haz recombinado pasa entonces por la muestra, de manera que una parte de la radiación atraviesa la muestra. Sin embargo, aquellas frecuencias que correspondan justamente a modos normales de vibración de las moléculas serán absorbidos, y por tanto se observarán como picos de absorción en el posterior diagrama. El haz resultante después de atravesar la muestra finaliza en un detector. El patrón obtenido corresponde no obstante al dominio temporal, pues depende de las fases de interferencia constructiva y destructiva que se producen en el Michelson. Por tanto, para su correcta interpretación, es necesario recurrir a la técnica de la transformada de Fourier. Según esto, una función en el dominio temporal, $f(t)$, se puede transformar en otra dependiente de la frecuencia mediante el cálculo

$$F(\omega) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(t)e^{-i\omega t} dt \quad (23)$$

de manera que esta función en el dominio de las frecuencias puede ser rápidamente transformada en un espectro de absorción en función de la longitud de onda. Un ordenador se encarga de realizar automáticamente la transformación anterior, así como el paso a longitudes de onda, obteniéndose finalmente el espectro de absorción.

Antes de comenzar las medidas, para obtener un diagrama más preciso, es necesario hacer una medida del espectro sin muestra. Debido a características propias de los materiales que forman el equipo, cuando no se coloca muestra alguna aparecerá también un espectro característico. Es necesario por tanto eliminar esta contribución para que así el diagrama refleje únicamente la absorción debida a la muestra. De la misma manera, al estar los magnetosomas en una disolución con PBS, se ha realizado una espectrometría del mismo, sin la presencia de los magnetosomas, y se ha eliminado también del espectro final obtenido. Un esquema del equipo utilizado se presenta en la Figura 10, y una foto en la Figura 11

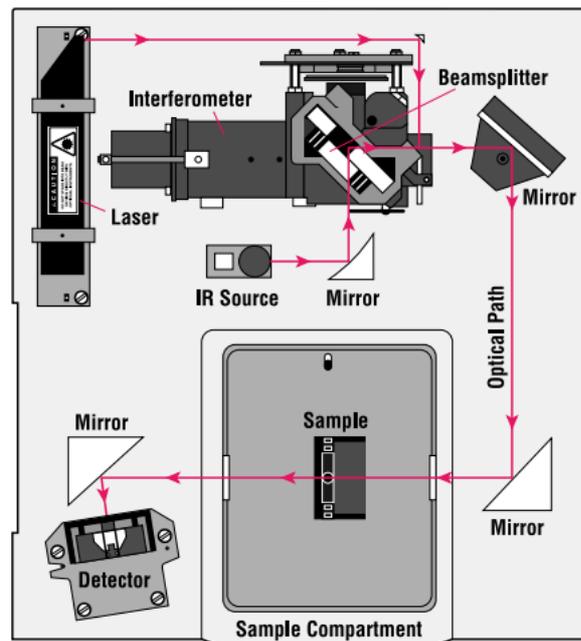


Figura 10: Fases en un equipo de FTIR

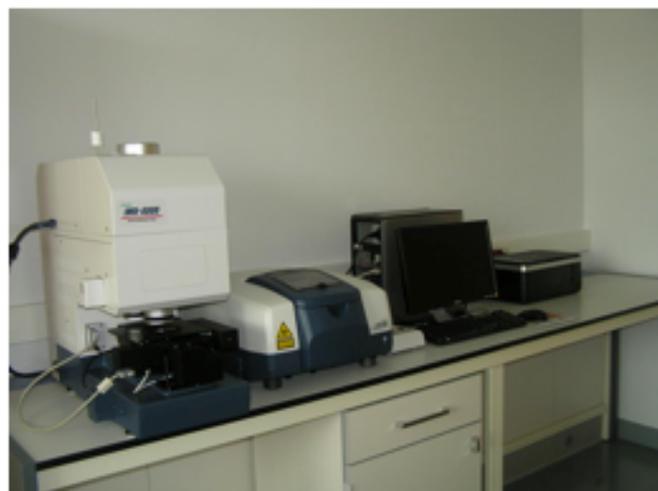


Figura 11: Imagen del equipo utilizado

2.5 Medidas de hipertermia

Por último, se han realizado las medidas destinadas a la aplicación para hipertermia de los magnetosomas. Para ello, se ha utilizado un magnetómetro AC de amplia frecuencia diseñado especialmente para estas medidas (más detalles en la referencia [12]). El aparato consiste en unas bobinas que generan un campo magnético de frecuencia variable, y que están alimentadas por un circuito. La corriente generada tiene una intensidad máxima de 6A. El sistema que mide la imanación M de la muestra en función del tiempo consta de 3 bobinas de medición

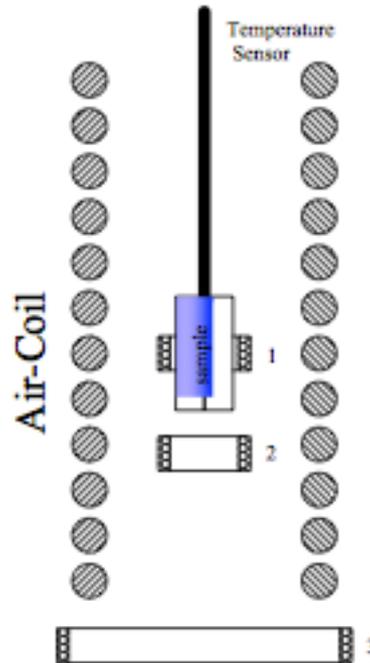


Figura 12: *Dispositivo experimental para las medidas de hipertermia*

Las bobinas 1 y 2 de la figura se colocan paralelamente a la bobina que genera el campo (marcada como “Air-Coil”). La muestra se coloca en el centro de la bobina 1, mientras que la bobina 2 cumple la función de hacer que, en ausencia de muestra, el voltaje detectado sea mínimo (por este motivo se le dice a esta bobina *bobina de compensación*). La última de las bobinas (3, en la figura), se coloca fuera de la bobina que crea el campo, y tiene como objetivo medir la intensidad y la fase del mismo. El voltaje en función del tiempo que detectan las bobinas se puede relacionar con la imanación de la muestra mediante la ecuación

$$V(t) = \xi f M(t) \quad (24)$$

siendo ξ un factor calculado numéricamente a partir de la geometría del sistema. Los autores han comprobado que la bobina 3 detecta una señal que está correctamente en fase con la del campo magnético a todas las frecuencias[12]. La señal del voltaje es detectada y llevada a un ordenador, que se encarga, mediante el uso del programa Lab View, de realizar el cálculo necesario para obtener la imanación. Antes de realizar las medidas, debido a la presencia de un voltaje no nulo en ausencia de muestra, es necesario realizar una primera medida sin muestra para poder compensar este efecto. El mismo programa permite fijar la frecuencia del campo, y se encarga

después de ir variando la intensidad del mismo para obtener así los ciclos de histéresis característicos. Se pueden alcanzar unas intensidades máximas de unos 30 kA/m.

También cabe destacar que, a partir de una frecuencia de 250 kHz, contribuyen a la medida señales armónicas que provienen del circuito que alimenta el sistema. Estos armónicos tienden a distorsionar los ciclos de histéresis. Para librarse de esta contribución, se realiza un análisis Fourier de la señal en ausencia de muestra, y así medir la distribución de estos armónicos y poder eliminarla. El tiempo estimado para realizar cada ciclo es de alrededor de 15 segundos. Finalmente, el programa realiza también un cálculo numérico del SAR y de la potencia disipada por la muestra a partir de los ciclos, que como se indicó previamente, vienen dados por las integrales (4) y (5).

Finalmente, indicar que la muestra se encuentra en un recipiente cilíndrico de 1.5 mL de capacidad, que además dispone de un sensor de temperatura, que permitiría realizar un cálculo del SAR por el método calorimétrico, aunque en este trabajo no se ha realizado dicho procedimiento.

3. Resultados y discusión

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada una de las medidas realizadas en las siguientes muestras: muestra 1 (limpiada con Rack magnético), muestra 2 (Rack con uso de benzonasa) y muestra 3 (Rack, benzonasa, y limpieza posterior en columna magnética). Primero se presentarán las imágenes TEM de las muestras, así como los histogramas de tamaño. Después, los espectros infrarrojos de cada muestra, obtenidos mediante FTIR. Finalmente, el conjunto de medidas magnéticas, que incluye la caracterización usando un VSM y las medidas de hipertermia (ciclos de histéresis y valores del SAR).

3.1 Imágenes TEM

Lo primero que se ha realizado ha sido la toma de imágenes por microscopía electrónica de transmisión de las muestras. A partir de estas imágenes, usando el programa ImageJ, se ha hecho un conteo de los tamaños de los magnetosomas en cada una de las muestras, para obtener un histograma de la distribución de tamaños. Se ha considerado que las nanopartículas tienen forma esférica, lo cual se aproxima bastante a la realidad. Las imágenes tomadas y los histogramas obtenidos a partir de ellas se muestran en la Figura 13.

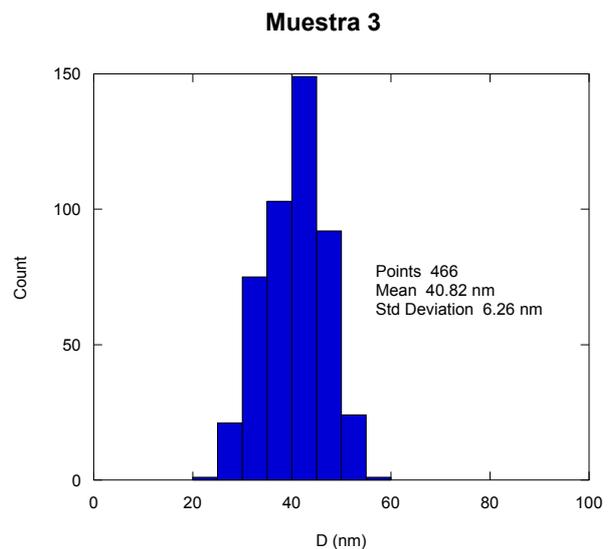
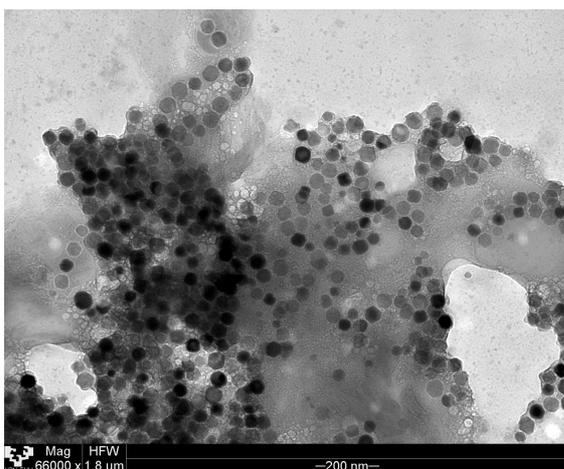
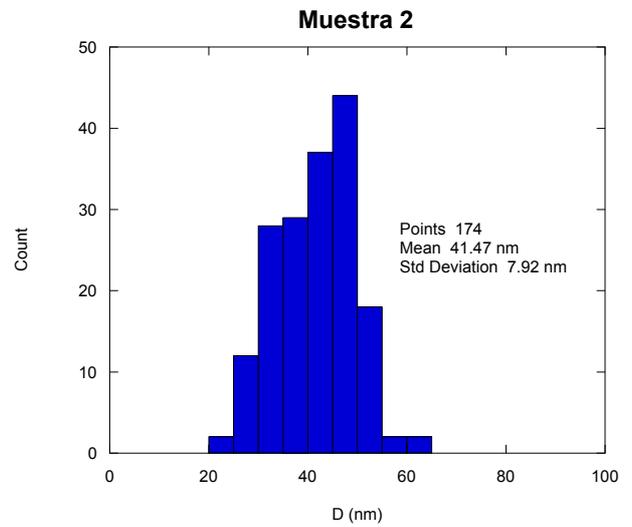
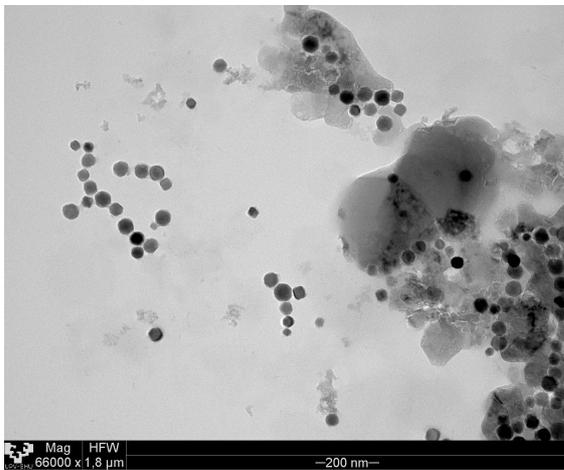
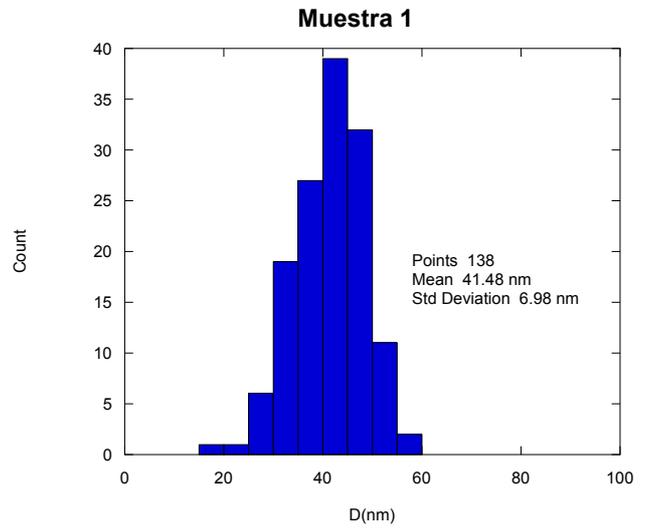
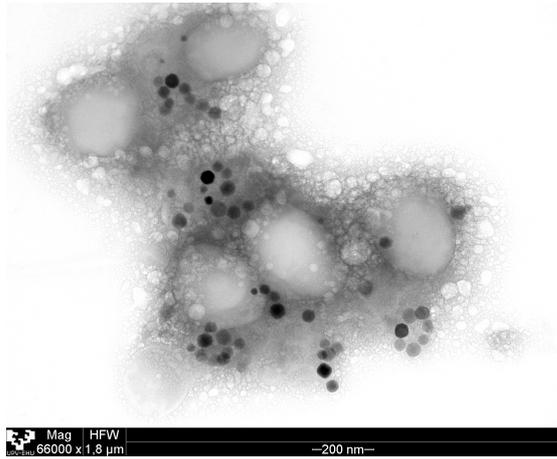


Figura 13: *Imágenes TEM e histogramas de distribución de tamaños de las muestras 1,2 y 3*

En las imágenes se observa como el proceso de limpieza contribuye a la agregación de los magnetosomas. En la muestra 1, los magnetosomas aparecen bastante desagregados, y generalmente rodeados de unos restos globulares blancos que corresponden al

polihidroxibutirato (PHB), que se trata de un polímero que los magnetosomas generan como medio de almacenamiento de energía, para ser un utilizado cuando otras fuentes más habituales no están disponibles. En la muestra 2, las partículas comienzan a estar más agregadas y el PHB ha desaparecido casi por completo. Se aprecia también una gran diferencia con la muestra 3, donde los magnetosomas aparecen mucho más agregados y el PHB ha desaparecido completamente. Esto se refleja en el espectro infrarrojo que presentan las muestras, así como en los ciclos de histéresis de las mismas, como se verá más adelante.

Los histogramas se han realizado mediante un conteo manual y evaluación de los diámetros de las nanopartículas. Se considera que alrededor de 200 nanopartículas es una población suficiente como para que la desviación estándar sea aceptable. En el caso de la muestra 1 en particular, ha sido difícil encontrar los magnetosomas, pues estos se encontraban bastante dispersos y la población era relativamente baja comparada con la de las otras dos muestras. Debido a esto, se han contado tan sólo 138 nanopartículas. Como se puede ver, todas las muestras presentan una media de tamaños en torno a los 41 nm, con una desviación estándar que no supera los 8 nm. Estos resultados nos indican que el proceso de biomineralización ya había terminado y obtenemos los magnetosomas completamente formados.

3.2 Espectro infrarrojo

Se ha realizado una medida del espectro de absorción de las muestras, con objeto de determinar qué componentes se van eliminando en los distintos procesos de limpieza. Primero se ha realizado una medida del espectro del PBS puesto que, aunque las muestras se secan antes de realizar las medidas, siempre permanecen algunos restos de este medio que son indeseadas.

El espectro que se ha encontrado para el PBS es el siguiente

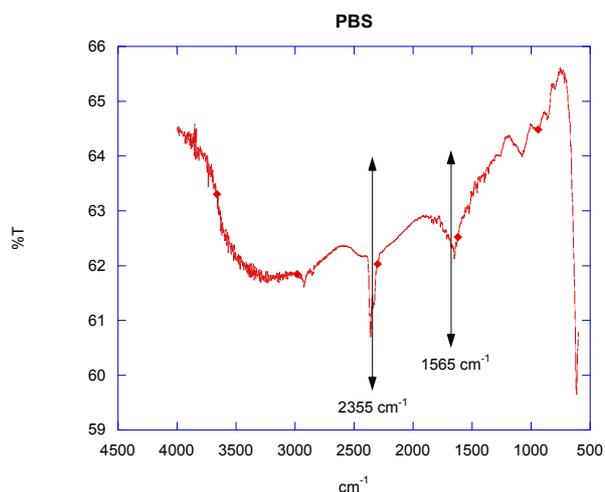


Figura 14: *Espectro infrarrojo del PBS*

Como se puede apreciar, la contribución principal del PBS es un pico de absorción apreciable, situado en torno a los 2355 cm⁻¹, y otro algo menor en aproximadamente 1565 cm⁻¹.

Por otro lado, para las muestras se ha hallado el siguiente espectro, Figura 15

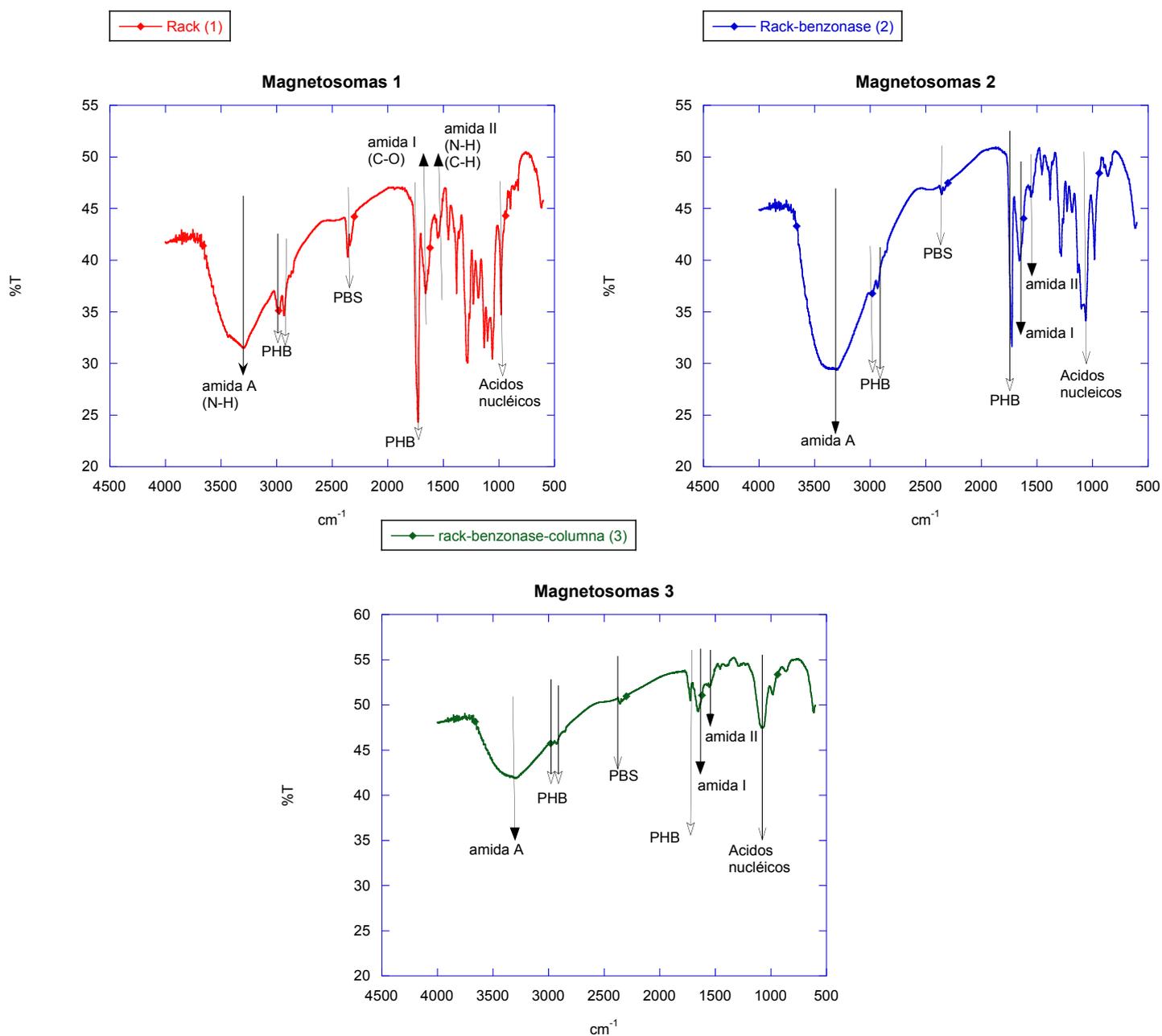


Figura 15: Espectro infrarrojo de las muestras 1,2 y 3

En la Figura 15, se puede ver que en cada una de las tres gráficas aparecen ocho picos que se pueden diferenciar claramente. El primero de ellos, situado en 3377 cm^{-1} , corresponde a un modo de vibración del enlace N-H, llamado amida A. Se encuentran después, alrededor de los 2930 cm^{-1} , sendos picos que corresponden al compuesto denominado *Polihidroxibutirato* (PHB). El PHB produce además otro pico, que es el que se encuentra a 1755 cm^{-1} . A 2355 cm^{-1} se localiza el pico que previamente se había medido, y que corresponde al PBS. En 1655 cm^{-1} y 1533 cm^{-1} se han localizado otros dos picos correspondientes a modos normales de vibración, esta vez de los enlaces C-O (amida I), N-H y C-N (amida II). Finalmente, el octavo pico aparece muy cerca de 1000 cm^{-1} , y se corresponde con los ácidos nucleicos de la bacteria.

Aunque las intensidades absolutas de los picos no ofrecen demasiada información, lo que se debe resaltar en el espectro infrarrojo de las muestras es la diferencia en la intensidad relativa entre los picos del PHB a 1755 cm^{-1} y los de las amidas I y II en 1655 cm^{-1} y 1533 cm^{-1} . Como se puede apreciar claramente, en las Muestras 1 y 2, el pico correspondiente al PHB es claramente mayor que los que corresponden a las amidas I y II. Sin embargo, en la Muestra 3 se puede observar que esto cambia totalmente, y en esta ocasión los picos de las amidas son mayores que el del PHB. De esto se puede concluir por tanto que cuando los magnetosomas han sido sometidos a más procesos de limpieza (y en particular el proceso de columna magnética), lo que se ha conseguido ha sido eliminar los componentes de tipo lipídico en mucha mayor medida que las proteínas.

3.3 Caracterización magnética

Para la caracterización magnética se ha usado un VSM, que ha permitido obtener los ciclos de histéresis de cada una de las muestras. Las medidas se han realizado con las muestras en suspensión en PBS, en un eppendorf de $100\ \mu\text{L}$ de capacidad. También se han usado estas medidas para determinar la concentración de las muestras.

Dado que el PBS es diamagnético, es necesario hacer una medida previa de éste, para después poder sustraer su contribución a los ciclos de las muestras, ver Figura 16

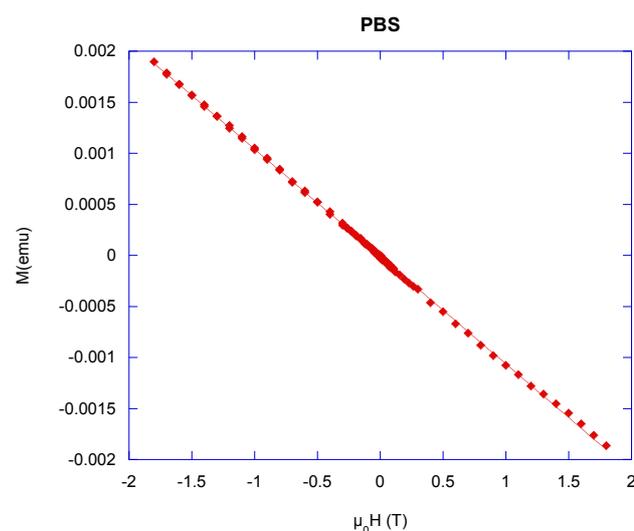


Figura 16: *Comportamiento magnético del PBS*

Como se puede apreciar, efectivamente el PBS es un medio diamagnético. Mediante una regresión lineal se ha determinado la pendiente de la recta que describe la imanación frente al campo, y estos datos se han sustraído de los ciclos para cada una de las muestras. Así pues, los ciclos corregidos quedan como se muestra en la Figura 17

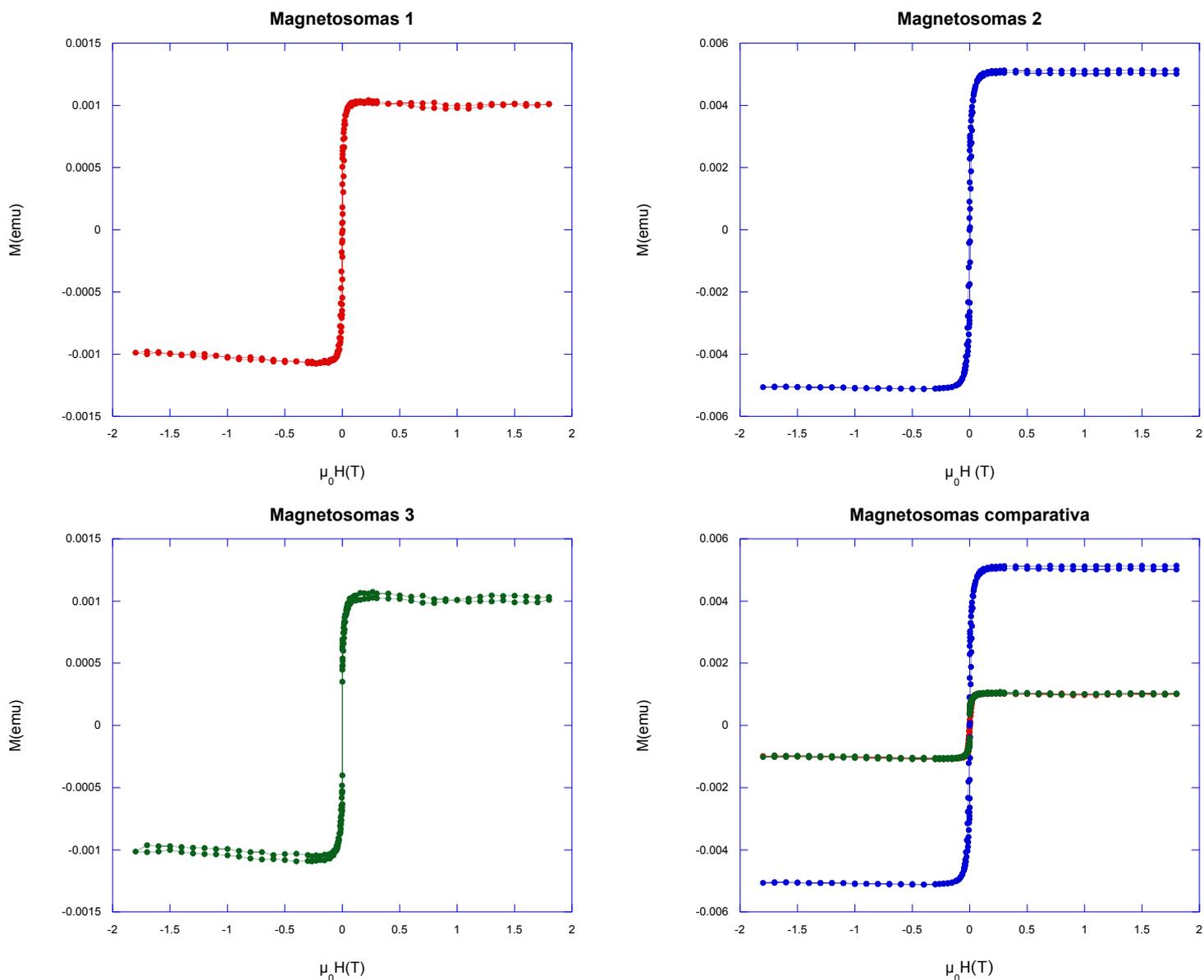


Figura 17: Ciclos de histéresis individuales de las muestras, y comparativa entre los tres (con la contribución diamagnética del PBS eliminada)

Como se puede ver en la Figura 17, las muestras 1 y 3 presentan ciclos con una imanación de saturación muy similar. Esto queda reflejado, como se verá posteriormente, en la concentración de cada muestra. Conviene hacer una análisis más detallado de la forma de los ciclos en zonas de campo más bajas y así poder estimar también la coercitividad de cada una de las muestras. Esto también se ha hecho para la muestra 2 en agar, obteniéndose los resultados que siguen

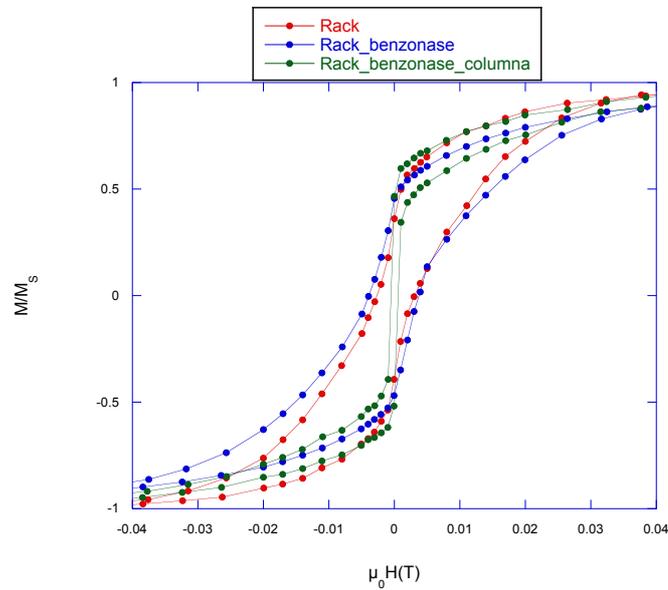


Figura 18: Detalle de los ciclos de histéresis de las muestras

De la Figura 18 se destaca que el valor de la coercitividad es mucho más bajo para la muestra 3 que para las otras dos. Como se pudo ver en las imágenes TEM, los magnetosomas están mucho más agregados en esta muestra que en las otras dos. Esto provoca que las nanopartículas se muevan cooperativamente y resulta en una disminución del campo coercitivo. Por otra parte la imanación normalizada sigue un comportamiento análogo para las tres muestras.

Muestra	Preparación	H _C (A/m)	M _r /M _s
1	Rack	4933.80	0.3530
2	Rack+benzonasa	6366.20	0.4640
3	Rack+benzonasa+columna	318.31	0.4110
2B	Rack+benzonasa (en agar)	7900.00	0.3002

Tabla 1: Valores del campo coercitivo y de la remanencia para las muestras

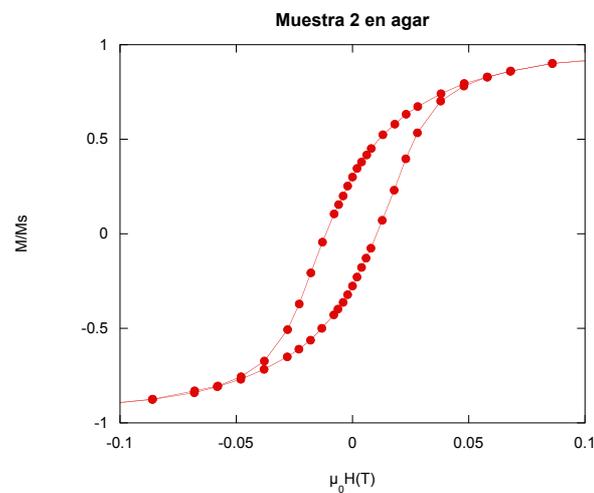


Figura19: Ciclo de histéresis de la muestra 2, con los magnetosomas fijados en agar

Los valores del campo coercitivo se pueden comparar con los calculados teóricamente mediante el modelo de *Stoner-Wohlfarth*. Este modelo, también llamado de imanación por rotación, sirve para describir el proceso de imanación de los magnetosomas, al menos en una primera aproximación. Los errores más importantes en las predicciones del modelo para nuestro sistema, provienen de que en la teoría básica no se consideran interacciones entre las partículas, así como que el sistema es más complicado, con las partículas orientadas de manera aleatoria

Las nanopartículas, al tener un único dominio magnético, poseen una dirección privilegiada a lo largo de la cual la imanación estará situada en caso de ausencia de campos magnéticos aplicados. Esto se conoce como el eje de anisotropía y viene determinado por distintas características del sistema. En general, cuando se aplique un campo magnético H , que formará un ángulo arbitrario α con el eje fácil de la partícula, la imanación M_S tenderá a rotar hacia la dirección del campo magnético externo.

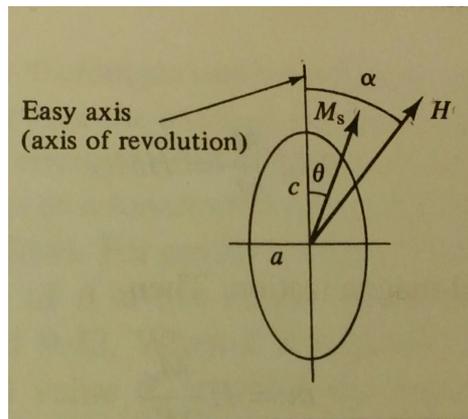


Figura 20: Modelo de Stoner-Wohlfarth para una partícula con forma de elipsoide prolato, indicando la dirección del campo magnético, la imanación y el eje fácil.

La suposición, como en la Figura 20, de que la partícula tiene forma elipsoidal no afecta a los cálculos. La imanación gira para alinearse con el campo magnético, con el objetivo de minimizar la energía potencial de interacción que es

$$E_P = -\mu_0 \vec{H} \cdot \vec{M}_S = -\mu_0 H M_S \cos(\alpha - \theta) \quad (25)$$

para hacerlo, sin embargo, debe de oponerse a la energía de anisotropía magnética, que tiende a restaurar la imanación a su posición original. La anisotropía puede ser en general debido a la forma, la tensión o de tipo cristalino. La energía de anisotropía de tipo uniáxico, es decir, considerando un único eje de fácil imanación viene dada por la expresión

$$E_A = K \sin^2 \theta \quad (26)$$

siendo K la constante de anisotropía. Al final, la suma de ambas energías nos da

$$E = E_A + E_P = K \sin^2 \theta - \mu_0 H M_S \cos(\alpha - \theta) \quad (27)$$

La posición de equilibrio se calcula entonces fácilmente igualando a cero la primera derivada con respecto a θ de la ecuación (27)

$$\frac{dE}{d\theta} = 2K \sin\theta \cos\theta - \mu_0 H M_S \sin(\alpha - \theta) \quad (28)$$

y en todo momento, la componente de la imanación a lo largo de la dirección del campo es

$$M = M_S \cos(\alpha - \theta) \quad (29)$$

Las ecuaciones (28) y (29) también se pueden escribir en función de las cantidades de *campo normalizado*

$$h = \frac{H}{H_K} = \frac{\mu_0 H M_S}{2K} \quad (30)$$

(donde $H_K = 2K/\mu_0 M_S$ es lo que se denomina *campo de anisotropía*, y es el necesario para saturar la imanación) e *imanación normalizada*

$$m = \frac{M}{M_S} \quad (31)$$

ahora, (28) y (29) se pueden escribir como

$$\sin\theta \cos\theta - h \sin(\alpha - \theta) = 0 \quad (32)$$

$$m = \cos(\alpha - \theta) \quad (33)$$

La imanación gira entonces hacia la dirección del campo, en un proceso reversible, hasta que llega el punto en el que se sitúa completamente en la dirección de éste, llegando a la saturación. Ahora, si el campo es llevado a cero y situado en el sentido justamente opuesto al inicial, la imanación comenzará de nuevo a rotar. No obstante, la ecuación (32) no confirma que el ángulo θ para el cual se cumple sea un mínimo, simplemente afirma que es extremal. Por tanto, puede tratarse de un mínimo estable, o de un máximo inestable. El punto de inflexión entre los dos se dará cuando la segunda derivada de la energía, esto es, la derivada de la ecuación (32) se anule. Esto sucederá cuando

$$\cos^2\theta - \sin^2\theta + h \cos(\alpha - \theta) = 0 \quad (34)$$

lo cual define un campo crítico h_C y un ángulo crítico θ_C para los cuales ocurre el cambio irreversible. Estos valores son

$$\tan^3\theta_C = -\tan\alpha \quad (35)$$

$$h_C^2 = 1 - \frac{3}{4} \sin^2\theta_C \quad (36)$$

Si el campo vuelve de nuevo al sentido inicial, entonces la imanación realiza el mismo recorrido, con un nuevo salto en el valor $-\theta_C$. Así, se completa un ciclo que es el *ciclo de histéresis*.

El campo coercitivo, por otro lado, es el valor del campo magnético para imanación nula. Dependiendo del valor particular de α , el campo coercitivo varía de manera continua, de tal forma que su valor máximo es

$$H_{Coer} = \frac{2K}{\mu_0 M_S} \quad (37)$$

(correspondiente a $\alpha=0^\circ$) y su valor mínimo la mitad del anterior (para $\alpha=45^\circ$). Haciendo estos cálculos para $K=1.1 \times 10^4 \text{ J m}^{-3}$ y una imanación de saturación de $M=1.714 \text{ MA/m}$ (correspondiente a la magnetita), se obtiene un valor de la coercitividad máxima de

$$H_{Coer}=10241.14 \text{ A/m}$$

Por tanto, el valor del campo coercitivo varía teóricamente entre 10241.14 A/m y la mitad de éste, es decir 5120.57 A/m. Como vemos, las predicciones teóricas del modelo encajan bien con los valores obtenidos de la coercitividad, tanto para los magnetosomas libres como fijados en agar, y por tanto podemos decir que el modelo de Stoner-Wohlfarth describe bien cómo es el proceso de imanación de los magnetosomas, aunque en nuestro caso no hayamos tenido en cuenta que el sistema que tratamos es un conjunto de partículas orientadas al azar.

Finalmente, mediante los ciclos de histéresis se ha podido determinar la concentración de magnetita en cada muestra. Esto tiene gran importancia, puesto que las medidas de hipertermia se querían hacer con una concentración determinada, en particular 0.2 mg/mL.

Para obtener las concentraciones, se ha obtenido el valor de la imanación de saturación para cada una de las muestras, a partir de los datos del VSM. Con ello, se ha estimado la masa de magnetita presente en cada muestra, comparando el valor de la imanación de saturación de las mismas con la de la magnetita bulk (92 emu/g). Teniendo en cuenta que el volumen en el que se encontraban las muestras era de 100 μL , es inmediato calcular cuál es la concentración. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2

Muestra	Preparación	$M_S(\text{emu})$	Concentración(mg/mL)
1	Rack	0.001017	0.1163
2	Rack+benzonasa	0.005010	0.5450
3	Rack+benzonasa+columna	0.001022	0.1110

Tabla 2: Valores de la imanación de saturación y la concentración de las muestras 1,2 y 3

3.4 Medidas de hipertermia

Usando el dispositivo experimental detallado en [12], se ha realizado un último conjunto de medidas específicas para la aplicación de hipertermia. Este proceso ha sido realizado dos veces, una para los magnetosomas en suspensión en PBS y otra fijados en agar. En ambos casos, para utilizar el equipo se han introducido las muestras en eppendorfs de 1.5 mL de capacidad. El dispositivo experimental ha permitido medir los ciclos de histéresis a distintas frecuencias (75,149,302 y 532 kHz) y para distintos valores del campo máximo alcanzado. A partir de los

ciclos, un programa se encarga de estimar el valor del SAR mediante la aplicación de la fórmula (5), que se reproduce aquí

$$SAR = \frac{f}{c} \oint_T \mathbf{M}_t \cdot d\mathbf{H}_t \quad (38)$$

siendo f la frecuencia del campo, c la concentración de la muestra y M_t la imanación en cada instante de tiempo.

En la Figura 21 se muestra el conjunto de ciclos obtenido para la muestra 1 en suspensión a una frecuencia de 302 kHz. Para todas las medidas de los magnetosomas en suspensión se ha utilizado una concentración de 0.2 mg/mL

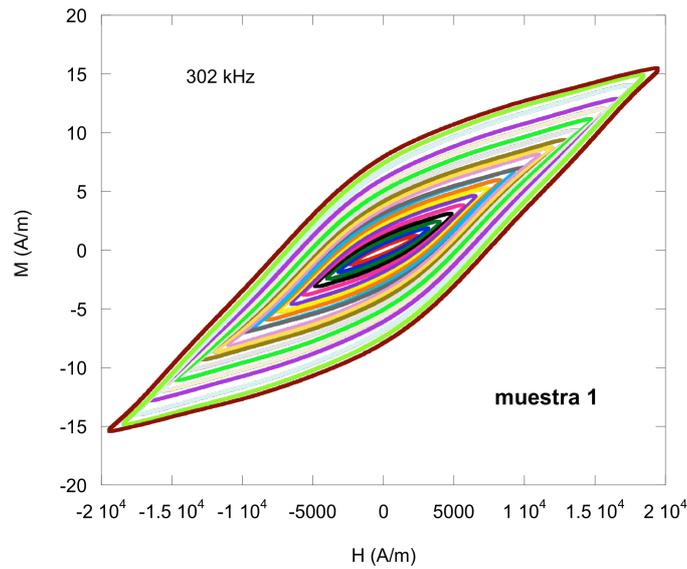


Figura 21: Ciclo de histéresis de la muestra 1 a 302 kHz

Para el resto de muestras y las demás frecuencias los resultados son similares a los de la Figura 21. Lo que se observa en todas las muestras, es que para la zona de campos bajos (hasta unos 5kA/m), los ciclos presentan la forma característica de *lancetas de Rayleigh*. Este aspecto característico fue descubierto por Lord Rayleigh hacia 1887, quien encontró que para valores del campo bajos, la permeabilidad magnética μ dependía de manera lineal con el campo, de tal forma que su expresión es

$$\mu = \mu_i + \eta H \quad (39)$$

donde la constante η se conoce con el nombre de *constante de Rayleigh*. La expresión equivalente en términos de la imanación es[15]

$$M = \chi_i H + \frac{\eta}{\mu_0} H^2 \quad (40)$$

expresión en la cual χ_i es la susceptibilidad magnética al comienzo del ciclo de histéresis. Y de aquí se obtiene, que como las pérdidas por histéresis son el área de la curva $M(H)$, tienen la expresión

$$P_{hist} = \frac{4}{3} H_m^3 \frac{J}{m^3} \quad (41)$$

siendo H_m el campo máximo aplicado. Esto queda confirmado por la evolución del SAR en función del campo, como veremos a continuación.

Las gráficas del SAR en función del campo y de la frecuencia para las distintas muestras se presentan en la Figura 22

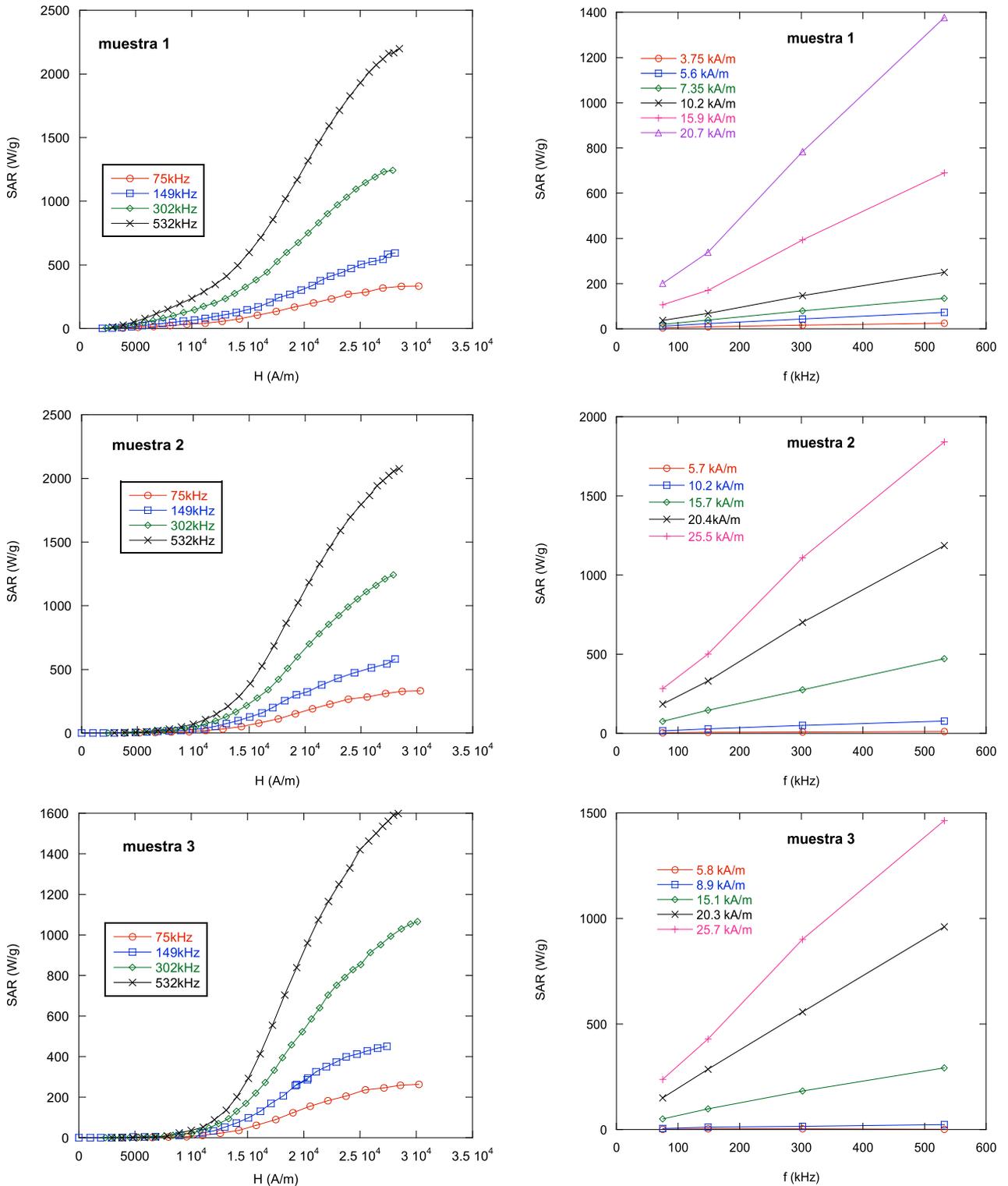


Figura 22: Gráficas del SAR en función del campo y de la frecuencia para las tres muestras

Como se puede ver en las gráficas anteriores, el crecimiento del SAR en función del campo es bastante suave hasta un valor aproximado de 15 kA/m, y después crece bruscamente. Existen sin embargo diferencias entre la muestra 1 y las otras dos, pues para la primera este crecimiento inicial a bajos campos es más pronunciado que para las muestras 2 y 3. Esto se nota especialmente a bajas frecuencias. Para un valor del campo fijo, el SAR aumenta linealmente con la frecuencia, como se sigue de la ecuación (38). También, para una frecuencia fija el valor del SAR crece con el campo, como era de esperar. En cuanto a los valores máximos alcanzados, estos siempre se producen a 532 kHz y al valor máximo del campo, que es 2.8×10^4 A/m. Para la muestra 1 este valor es de 2197.6 W/g, muy similar al valor de 2076.4 W/g que se obtiene para la muestra 2. Para la última muestra, en cambio, el valor es menor, 1600 W/g. Esto indica que una mayor limpieza en las muestras no se traduce en una mejora del valor del SAR.

La explicación de la evolución mayor del SAR de la muestra 1 con respecto a las otras dos, en la zona de bajos campos, se puede explicar observando las diferencias que existen en los ciclos de histéresis para esta zona. Por ejemplo, comparando la muestra 1 y la 2

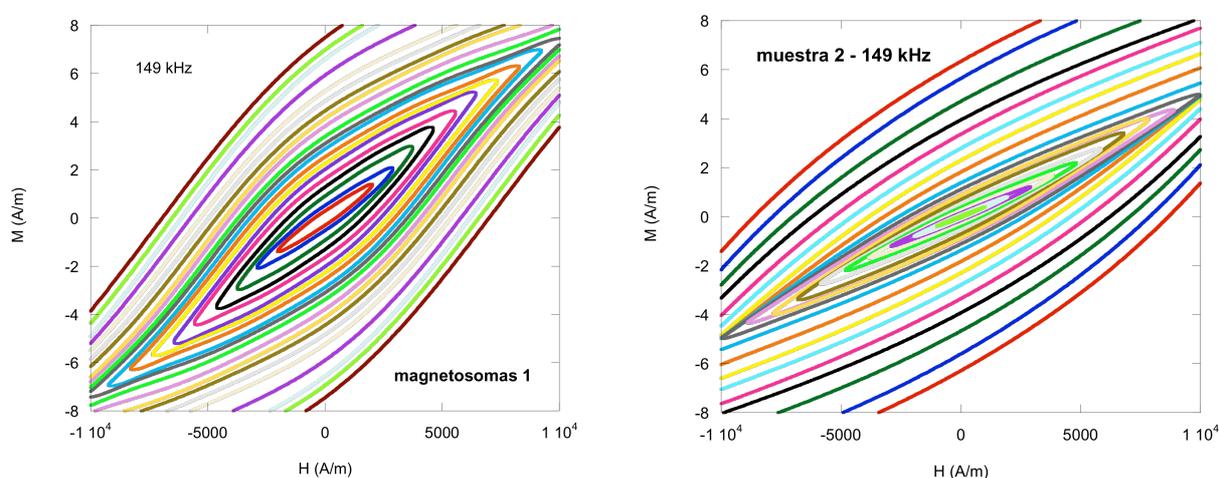


Figura 23: Comparativa de los ciclos de histéresis a bajos campos para las muestras 1 y 2

A pesar de que ambas mantienen la forma de lancetas, en la zona de bajos campos, y especialmente notable hasta los 5 kA/m, se ve como los ciclos de la muestra 1 son ligeramente más anchos, lo cual explicaría la evolución más rápida del SAR de la muestra 1 en esta región.

Se puede ver también como para valores pequeños del campo se cumple la predicción de Rayleigh de que el SAR tiene una forma lineal si se representa frente a H^3 . Esto se ve con claridad en la muestra 2, especialmente a la frecuencia de 532 kHz (Figura 24, página siguiente). En este caso, el ajuste de un exponente 2.8, que es una predicción cercana al 3 de la zona de Rayleigh.

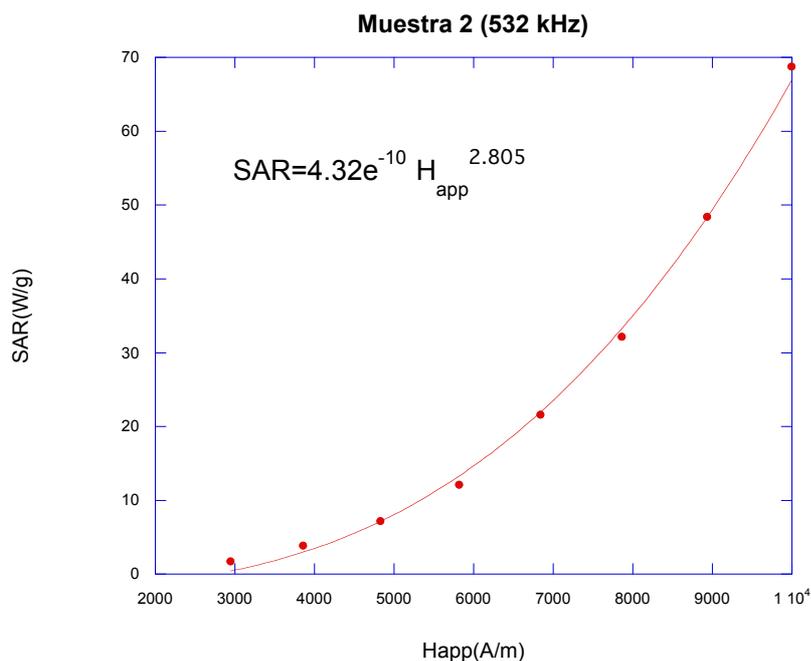


Figura 24: Comportamiento del SAR en la zona de lancetas de Rayleigh

La discrepancia entre el exponente encontrado y la predicción de la teoría de Rayleigh podría deberse a que el movimiento Browniano también está contribuyendo en este caso, y dicha contribución no está contemplada dentro de los parámetros de la teoría

Para acabar quedan por exponer los resultados de hipertermia con las muestras en agar. Para este procedimiento, se ha usado solamente la muestra 2, tomando dos concentraciones distintas. La primera de ellas era de 0.2 mg/mL, y en el segundo caso ligeramente mayor, 0.557 mg/mL. En ambos casos se han tomado 750 μ L de la muestra. Se ha preparado asimismo una disolución de agarosa con una concentración del 4%, de la que también se han tomado 750 μ L. De esta manera se han preparado finalmente dos ejemplares, uno con concentración de 2.0 μ g/ μ L (muestra 2A) y otra con 2.875 μ g/ μ L (muestra 2B). Aunque se han realizado de nuevo las medidas de hipertermia con ambas muestras, se ha usado la muestra 2B para comparar con los resultados de los magnetosomas libres.

A la hora de hacer las comparaciones, las medidas en agar se han realizado para valores del campo magnético distintos que en caso libre. Por ello, para hacer la sustracción y poder encontrar los valores de la contribución de rotación, ha sido necesario realizar una interpolación de los datos. Para ello, se ha utilizado un programa de interpolación por splines, escrito en Fortran. El programa ha tenido como base el módulo de interpolación proporcionado en la asignatura “Métodos Computacionales”, del 3^{er} curso de Grado.

Para cada una de las cuatro frecuencias, se han representado los valores del SAR para los magnetosomas libres, los valores cuando han sido fijados en agar y la resta de ambos

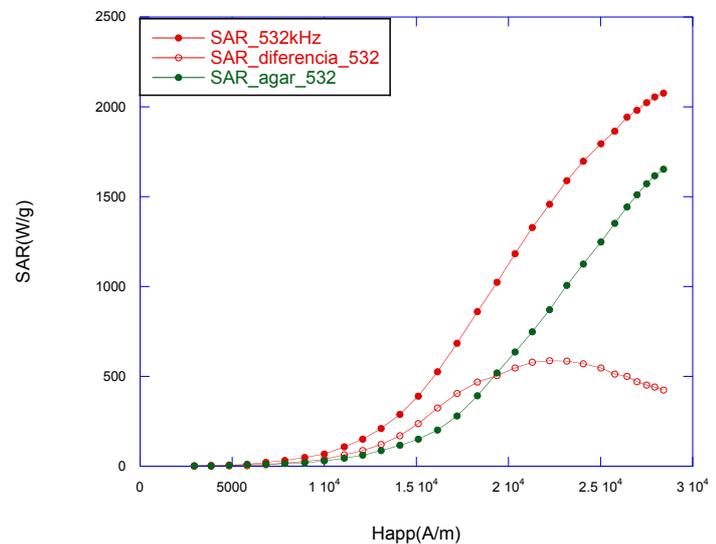
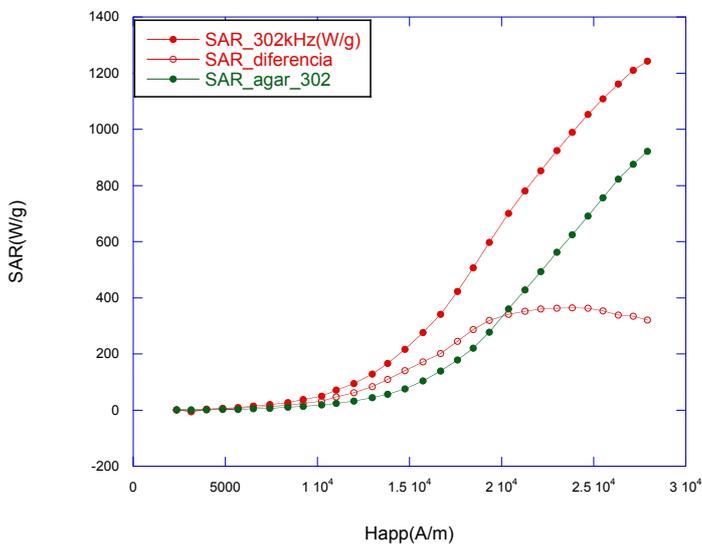
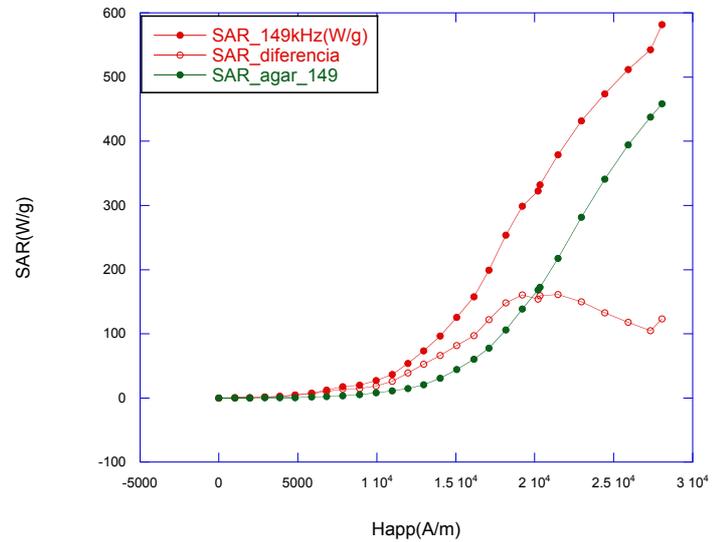
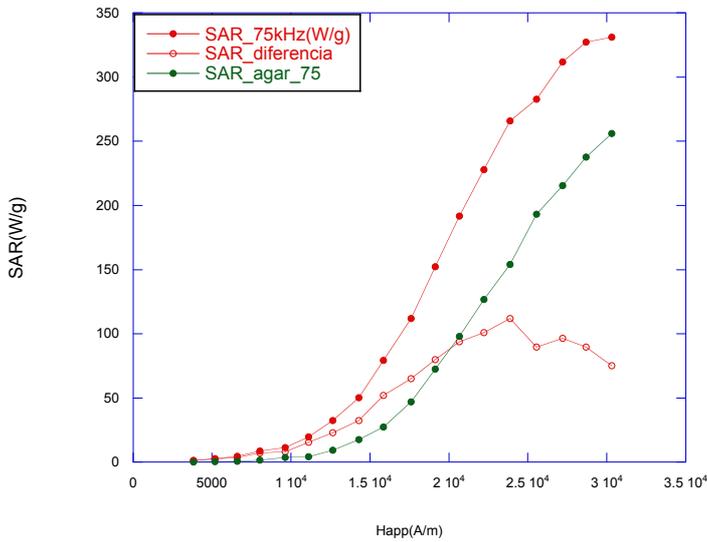


Figura 25: Comparativa de los valores del SAR para las distintas frecuencias

Lo que cabe resaltar de las gráficas anteriores es que para todas las frecuencias los valores del SAR diferencia son muy pequeños comparados con los otros dos. Esto es a causa del tamaño de las nanopartículas. En la sección 1.3.2. se calculó que para partículas del tamaño de los magnetosomas el tiempo de relajación característico del movimiento Browniano era de $\tau_B=1.1 \times 10^{-4}$ s. Por tanto, al estar trabajando en frecuencias del orden de 10^5 s^{-1} (en el caso más bajo) es de esperar que el movimiento de las partículas en el fluido no tenga un efecto demasiado grande en las pérdidas, dado que la frecuencia de los campos aplicados es al menos un orden de magnitud mayor que la frecuencia propia del movimiento Browniano. Por tanto, podemos concluir que prácticamente la totalidad del calor que está siendo generado se debe a las características de los magnetosomas debido a que son ferrimagnéticas, esto es, la contribución de Néel.

Finalmente, se puede ver que existe una zona, para campos hasta aproximadamente 20 kA/m, en la que la contribución de rotación sí que es superior a la contribución puramente magnética. Sin embargo, esta última crece muy rápidamente a partir de estos valores del campo. Esta zona en la que el SAR por la rotación es ligeramente superior se da para campos relativamente bajos y, por

tanto, se puede deducir que en esta región el área de los ciclos de histéresis no es lo suficientemente alta como para que las pérdidas así generadas superen a las propias del movimiento.

4. Conclusiones

Con este trabajo, se ha pretendido seguir el proceso de obtención de los magnetosomas a partir de las bacterias magnetotácticas *Magnetospirillum gryphiswaldense* y su utilización para hipertermia magnética. Se ha querido hacer una estimación de si los grados de limpieza de estos magnetosomas afectaban significativamente a los valores del SAR obtenido. En los experimentos de FTIR se ha mostrado que los procesos de limpieza eliminan fundamentalmente los lípidos que quedan en las nanopartículas, teniendo menos efectos sobre las proteínas. Los análisis hechos sobre las medidas específicas de hipertemia llevan a la conclusión de que la limpieza no tiene una importancia grande a la hora de maximizar los valores del SAR. Finalmente, se ha concluido que el tamaño de los magnetosomas provoca que las contribuciones al calor generado debido a la rotación Browniana de éstos no son importantes en comparación con el calor generado por pérdidas debidas únicamente a la histéresis magnética.

Bibliografía

1. Jens Baumgartner & Damien Faivre : *Magnetite Biomineralization in Bacteria* (2011) 3-22
2. Q.A.Pankhurst, J.Connolly, S.K.Jones & J.Dobson : *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36** (2003) R167-R181
3. C.T. Lefèvre, F. Abreu, U. Lins & D.A. Bazylinski: *A Bacterial Backbone : Magnetosomes in Magnetotactic Bacteria* (2011) 75-94
4. J. van der Zee: *Ann. Oncol.* **13**(2002) 1173-1184
5. R.D. Issels: *Eur. J. Cancer* **44** (2008) 2546-2554
6. E. Alphandéry, S. Faure, L. Raison, E. Duguet, P.A. Howse & D.A. Bazylinski : *J. Phys. Chem. C* **115** (2011) 18-22
7. D. Ortega & Q.A. Pankhurst: *Magnetic hypertermia*, in *Nanosciencie: Volume I: Nanostructures through Chemistry* (2013) 60-88
8. W.J. Atkinson, I.A. Brezovich & D.P. Chakraborty: *IEEE Trans. Biomed. Eng.* (1984) 70-75
9. Eiji Kita et. al: *J. Phys. D: Appl. Phys* **43** (2010) 474011
10. R. Hergt & S. Dutz: *J. Magn. Magn. Materials* **311** (2007) 187
11. R.Hergt: *J. Magn. Magn. Materials* **270** (2004) 358-368
12. E. Garaio, J.M. Collantes, J.A. García, F. Plazaola, S. Mornet, F. Couillaud, O. Sandre: aparecerá en *J. Magn. Magn. Materials* (aceptado Nov. 2013)
13. E. Alphandéry, F. Guyot, I. Chebbi: *Int. Journal of Pharmaceutics* **434** (2012) 444-452
14. A. Barth: *Biochimica et Biophysica Acta* **1767** (2007) 1073-1101
15. B.D. Cullity, C.D. Graham: *Intro. to Magnetic Materials (Capítulo 9, 314-323)* ISBN 978-0-471-47741-9