



Universidad
Zaragoza



Trabajo de Fin de Grado

Hipertermia magnética local intracelular para
terapia del cáncer

Autor

Nicolás Aranda Escribano

Directores

Ángel Millán Escolano
Guillaume Maurin Pasturel

Facultad de Ciencias
Curso 2019/2020

Índice

1. Introducción	1
2. Preludio teórico	2
3. Objetivos	7
4. Plan de trabajo	8
5. Experimental	
5.1 Métodos	10
5.2 Equipo	11
6. Análisis de resultados	
6.1 GAMMA20	13
6.2 GAMMA30	14
6.3 GAMMA30 (bis)	16
6.4 EPSILON-Ga	19
7. Discusión y conclusiones	21
8. Epílogo	23
9. Bibliografía	24
10. Anexos	
10.1 Manual de medidas	26
10.2 Medidas completas para CSIC 2b	31

1. Introducción

La oncología es un área de investigación a la orden del día, ya que hace frente a un mismo problema de salud pública, de enormes dimensiones: citando a la Organización Mundial de la Salud, “el cáncer es la segunda causa global de mortalidad” [1]. La organización Worldwide Cancer Research es todavía más tajante al afirmar “una de cada dos personas recibirá un diagnóstico de cáncer a lo largo de su vida. Una persona muere en el planeta de cáncer cada cuatro segundos” [2]. Una de las líneas de investigación más prometedoras por ser poco invasiva y con pocos efectos secundarios es la hipertermia magnética, siendo una terapia no quirúrgica que suele combinarse con otras técnicas como son la radioterapia o quimioterapia para tratar de erradicar un tumor en el seno de un sistema biológico complejo como es el cuerpo humano.

La hipertermia magnética consiste básicamente en provocar un aumento de temperatura en el área tumoral que a su vez ocasione la destrucción de las células cancerígenas. Se suele emplear como terapia complementaria a la radioterapia pues muestra efectos sinérgicos [3]. Respecto a la toxicidad de las nanopartículas (NPs) magnéticas a emplear, las de óxido de hierro (III), son las únicas autorizadas por la Agencia de Medicamentos y Alimentación (la estadounidense FDA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y que son ya usadas en clínica [4]. No obstante, debemos medir el comportamiento de éstas en función de los distintos parámetros que podemos modificar, relacionados evidentemente con la propiedad más interesante que presentan: la reacción a un campo magnético alterno (AC) externo. Justamente, la mayoría de NPs que cuentan con las propiedades magnéticas óptimas suelen presentar características tóxicas no biocompatibles, y por tanto no sirven para una aplicación clínica.

La terapia mediante hipertermia magnética se aplica ya en el tratamiento del glioblastoma en varias clínicas europeas. Pero, en su versión actual, las NPs se inyectan directamente en el tumor, y por tanto no es una técnica totalmente no-invasiva. La cantidad de NPs inyectada es además muy alta con lo cual no se eliminan del todo los efectos secundarios, y se genera un calentamiento global muy alto en el tumor con lo cual existe el riesgo de dañar el tejido sano circundante. Para eliminar estos inconvenientes se propone provocar la muerte celular mediante un calentamiento muy reducido, que se limite a pequeñas zonas concretas en el interior de la célula. Tanto para la técnica actual de calentamiento global como sobre todo para la técnica que se pretende desarrollar de calentamiento local intracelular, es crucial disponer de NPs con una elevada potencia de calentamiento.

Esta técnica de hipertermia local se estudia y desarrolla en el grupo del ICMA (Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón) en el que se enmarca este trabajo, en asociación con distintos centros de investigación y bajo la cobertura de dos proyectos europeos y varios proyectos nacionales y autonómicos. La magnitud de las tareas del proyecto global es enorme y, como cabe esperar, de carácter multidisciplinar, abarcando desde los campos más evidentes como son la medicina, química o física, llegando hasta veterinaria y biotecnología.

2. Preludio teórico

Trataremos en un primer bloque los aspectos teóricos en los que nos basamos y que permiten una explicación y justificación tanto del empleo de NPs para la hipertermia como de la técnica en sí. Detallaremos también las condiciones de medida en las que ha de realizarse el estudio de la viabilidad.

A las NPs originales de una muestra hay que añadirles ciertos polímeros (que denominamos *coating*) ya que tienden a reagruparse. Podemos así garantizar una mayor estabilidad, es decir, que no precipiten o que lo haga más lentamente. Aunque las muestras utilizadas en ensayos biológicos tienen una estructura compleja de núcleo magnético, el recubrimiento polimérico ya citado y diversos compuestos funcionales como sondas termométricas a base de iones lantánidos (que permiten medir temperatura a la escala en la que estamos trabajando [3]), en este trabajo nos concentraremos en las propiedades de las NPs magnéticas utilizadas en el núcleo.

Comencemos por entender qué ocurre en la muestra cuando aplicamos el campo magnético AC, fijando además su frecuencia y su intensidad. Como queremos que la muestra se caliente, tenemos que entender el mecanismo que permite la hipertermia, evidentemente relacionado con las NPs. Se define una NP como aquella partícula cuyo tamaño en los distintos ejes no excede los 100 nm. La clave de su uso reside en las dimensiones de estas, puesto que podemos encontrar un cambio de propiedades si verificamos la condición anterior: supone la diferencia entre un dominio magnético único o la existencia de varios. Sabemos que en los materiales tenemos una distribución de dipolos magnéticos que forman los nombrados dominios, y que en ausencia de campo externo pueden apuntar en distintas direcciones. La transición entre dominios no es brusca, sino que tiene lugar debido a tenues variaciones que conforman la transición entre la orientación y que denominamos paredes de Bloch. Al emplear una NP de escala lo suficientemente pequeña, las paredes de Bloch serían de una dimensión demasiado grande como para que se pueda producir la transición, de modo que implicaría un monodomio magnético en la NP (esto se produce para un diámetro inferior a la horquilla 3-50 nm, dependiendo del tipo de material) [5].

De las distintas clases de NPs con las que podríamos trabajar, aquellas que exhiben un comportamiento particular son las que nos resultan interesantes. Buscamos un cambio de estado magnético lo más rápido posible por la influencia de un campo magnético externo y una menor remanencia de campo a temperatura ambiente, sobre la cual incidiremos un poco más adelante. Como este comportamiento implica una susceptibilidad mayor que la de un paramagneto convencional, lo denominaremos superparamagnetismo [6]. Para nuestras NPs, su tamaño va a ser un parámetro clave en la observación de dicho fenómeno: la medida de su diámetro varía entre los 20 y los 30 nm y veremos que se pueden observar comportamientos diferentes en función de este.

Al aplicar el campo magnético alterno sobre la suspensión de NPs en agua, su dominio magnético único trata de acoplarse a la oscilación magnética externa (no obstante, existe una frecuencia de corte a partir de la cual el estímulo es demasiado “rápido” para provocar dicha reacción). Al ser el campo, justamente, alterno, barajamos dos tipos de fenómenos detrás del aumento de la temperatura, que llamaremos relajación de Néel o relajación de Brown. El mecanismo de Néel consiste en una rotación del momento magnético del monodominio como lo haría la aguja dentro de una brújula, mientras que la simple rotación física de la NP para alinear el momento magnético con la dirección del campo externo es llamada mecanismo de Brown [7]. Podemos deducir que las pérdidas de Néel producen un aumento de temperatura por un fenómeno de fricción magnética mientras que las de Brown generan una fricción mecánica con el fluido que rodea la NP. Un esquema simplificado de ambos puede verse en la Fig. 1.

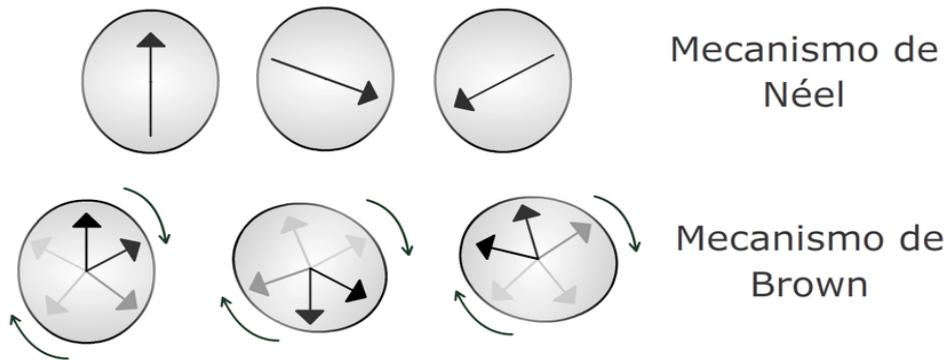


Fig. 1: Esquema de los mecanismos que se producen al exponer las NPs a un campo magnético alterno. Si ambas se pueden producir, la relajación de Brown predomina para frecuencias bajas, mientras que la de Néel para frecuencias altas. Esto es debido a los tiempos de relajación de cada mecanismo (mayor en el de Brown que en el de Néel), es decir, el intervalo de tiempo que debe transcurrir para poder re-excitarse la NP. [8]

Una vez conocidos los fenómenos tras este aumento de temperatura inducido, debemos asociarlos con la parte experimental que nos ataña. El resultado tras exponer las muestras a un protocolo experimental como el descrito en el anexo 10.1 es que efectivamente nuestras muestras responden de manera distinta a diferentes frecuencias, si bien no somos capaces de saber de antemano qué franja nos interesa para provocar una hipertermia óptima.

Resulta crucial entender la relación entre tamaño de las NPs y sus distintos comportamientos. Para ello, introducimos el conocido ciclo de histéresis en la figura siguiente.

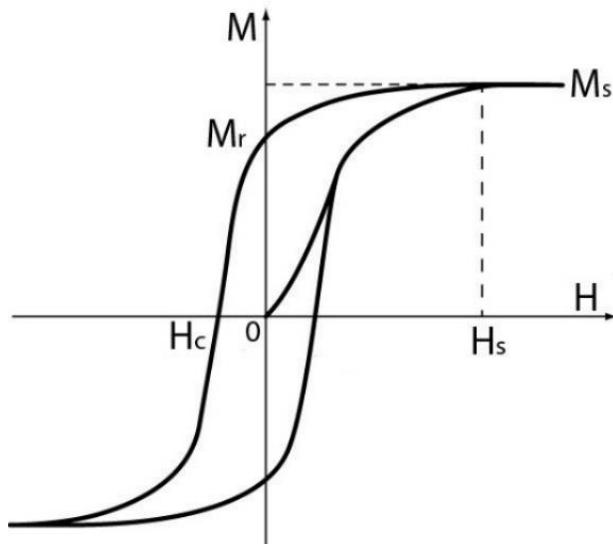


Fig. 2: Ciclo de histéresis genérico. [9]

Se obtiene un valor de la magnetización M en función del campo magnético externo aplicado H , y podemos destacar ciertos valores que dependen del material sometido a estudio. M_s es la magnetización de saturación, valor máximo que podemos obtener al alinear todos los dominios de un material en una misma dirección debido a la aplicación de un campo magnético H_s . M_r es la magnetización remanente cuando el campo externo vuelve a ser nulo. H_c es el campo coercitivo que debe ser aplicado para provocar un valor nulo de la magnetización. Este último valor resulta de interés, debido a que según el tamaño de la NP veremos un ancho de coercitividad distinto en nuestro ciclo. Además, por debajo de un cierto valor de H_c , no se produce reversión de la magnetización y no podemos inducir pérdidas [3]. Todo esto puede apreciarse en la Fig. 3, donde relacionamos el tamaño de una NP con su comportamiento, así como el hecho de poseer un único dominio magnético o varios como ya hemos explicado con anterioridad.

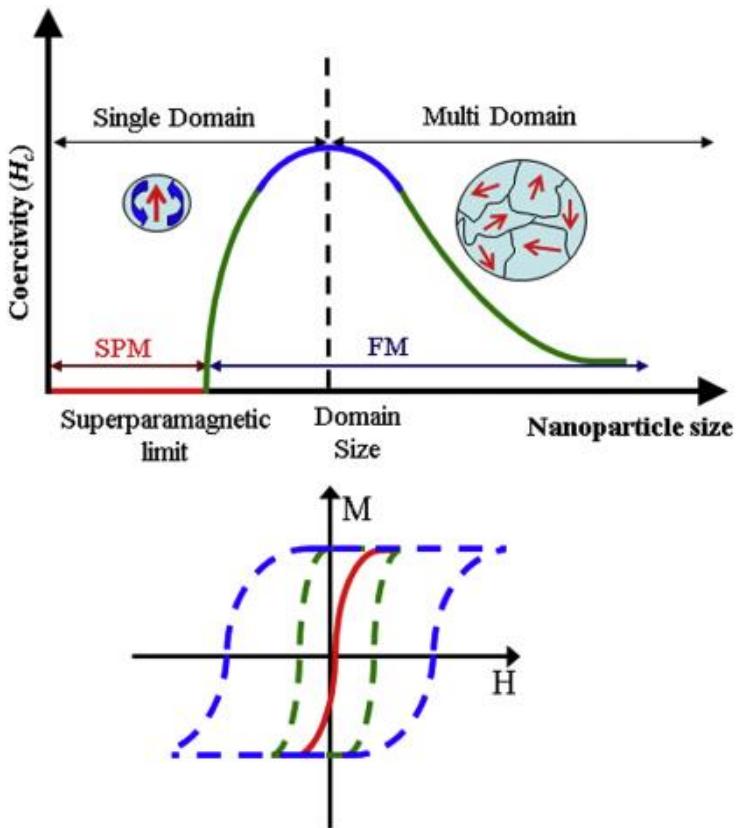


Fig. 3: Comportamiento (SPM es abreviatura de superparamagnetic y FM de ferromagnetic) y características de una NP en función de su tamaño. Puede observarse también la variación del ancho de coercitividad que se produce. [10]

Por lo tanto, dependiendo del tamaño de las NPs podremos esperar un comportamiento u otro. En el caso del superparamagnetismo, la coercitividad es nula; pero va creciendo al aumentar las dimensiones de la NP (mientras sigamos teniendo un monodominio). El ciclo de histéresis resulta de interés pues el área que describe es el trabajo que se produce, ligado por lo tanto a las pérdidas de Néel o de Brown que se pueden a su vez producir. Deducimos que tanto la anchura del ciclo (coercitividad) como su altura (magnetización de saturación) influirán en lo eficiente que sea el fenómeno de hipertermia, siendo cada ciclo distinto dependiendo de las NPs que usemos.

Experimentalmente veremos más adelante que, en general, a menor tamaño podemos inducir un menor aumento de temperatura. Entre otras, tendremos las NP GAMMA30 CSIC (γ - Fe_3O_4) de gran tamaño dinámico (cercano a los 30 nm), lo cual implicará una fuerte reacción al campo externo pero una estabilidad mucho menor; al contrario que las maghemitas GAMMA20 (cuyo tamaño promedio es ligeramente superior a los 20 nm), de las cuales podemos esperar que sean estables durante largos períodos de tiempo y que no permitan obtener un aumento de temperatura tan elevado como las anteriores. La explicación teórica ligada a este comportamiento está relacionada con la energía de anisotropía, dependiente del volumen, y por tanto de las dimensiones de las NPs, implicando una variación en la potencia de calentamiento.

Hemos introducido previamente los límites con los que se podría realizar un uso en humanos, de modo que podamos descartar ciertos valores para nuestros parámetros. Citando de nuevo a la OMS [1], nos hallaríamos ante campos magnéticos de frecuencia intermedia (trabajamos con campos del orden de 100 kHz), delimitados entre 300 Hz y 10 MHz. En este caso y para miembros del público, se establece un límite recomendado de la intensidad de campo magnético de 40 mT que sube hasta 200 mT para personal expuesto, y siendo 2 T el valor máximo a no exceder en ningún caso (la experimentación se lleva a cabo con valores de hasta 100 mT en laboratorio).

Al tener que valorar la efectividad de las distintas muestras, todo este procedimiento ha de ser cuantificado en algún parámetro que podamos obtener empíricamente, de manera que puedan ser catalogadas según su comportamiento al variar los parámetros sobre los que tenemos control (recordemos, concentración, frecuencia e intensidad del campo) dentro de los límites fisiológicos. El parámetro será el Specific Absorption Rate o SAR (tasa de absorción específica en castellano), medido en vatios por gramo de NPs magnéticas ($\text{W/g}_{\text{part.}}$) y que definimos tal que:

$$SAR = \frac{C_p(H_2o) \ m_{\text{total}}}{m_{\text{nanopartículas}}} \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Donde a su vez definimos $C_p(H_2o)$ como el calor específico del agua (en este caso es el disolvente), $m_{\text{nanopartículas}}$ la masa de las NPs magnéticas presentes en la solución, m_{total} la masa de la muestra que estamos evaluando y por último el cociente $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ como la variación temporal de la diferencia de temperatura que existe entre nuestra muestra y un mismo volumen de agua que usaremos como testigo con respecto del tiempo que mantenemos aplicado el campo magnético externo. Además, podemos simplificar el cálculo gracias a una aproximación de la concentración de nuestras NPs:

$$\begin{aligned} \frac{m_{\text{nanopartículas}}}{m_{\text{total}}} &\sim C_{\text{nanopartículas}} (\text{g/mL}) \\ \Rightarrow SAR &= \frac{C_p(H_2o)}{C_{\text{nanopartículas}}} \frac{\Delta T}{\Delta t} \end{aligned}$$

Todo lo descrito anteriormente conforma el encuadre teórico de la primera fase de la investigación. Como bien hemos precisado con anterioridad, resulta vital simplificar la complejidad del problema para abordarlo convenientemente, por lo que a lo largo del curso se ha trabajado en este marco. Si bien queda aún un largo camino por recorrer para llegar a un resultado final, hasta aquí llega mi ayuda en el desarrollo del proyecto.

3. Objetivos

El objetivo general de este proyecto es el desarrollo de una nueva técnica de hipertermia magnética local intracelular, es decir la destrucción de células tumorales de un paciente mediante una actuación local en partes concretas del interior de la célula. Dicha destrucción se pretende que ocurra por apoptosis ocasionada por la falta de respiración mitocondrial, que será la parte que tratamos de anular mediante el ya citado aumento de temperatura. Como hemos apuntado arriba la viabilidad de esta técnica pasa por encontrar NPs de óxido de hierro (III) con una alta potencia de calentamiento.

Consecuentemente, el objetivo concreto de este TFG es la optimización de las condiciones y parámetros del campo magnético para lograr el mayor calentamiento posible gracias a las NPs. Para ello se utilizarán diversas muestras de NPs de óxido de hierro, propias o elaboradas por otros laboratorios o centros de investigación con los que existe una colaboración.

4. Plan de trabajo

Para situar este trabajo en el contexto del proyecto global, sería conveniente destacar algunos aspectos importantes a tener en cuenta. Al tratarse de una terapia a nivel local, que se basa en la consecución de gradientes temperatura localizados en el interior de la célula, resulta imprescindible realizar un mapeo de la temperatura celular, para poder determinar dicho gradiente. En nuestro caso, el mapeo se realiza mediante una tecnología de nanotermometría fluorescente que utiliza elementos lantánidos luminiscentes (europio Eu y samario Sm), cuya intensidad de emisión varía con la temperatura, como sondas termométricas [11]. Estos elementos se introducen por pares en las NPs durante el procedimiento de síntesis. Su emisión se activa mediante excitación con radiación ultravioleta/visible y presenta una dependencia con la temperatura diferente para cada lantánido. En el caso del par Eu/Sm, el espectro de emisión presenta picos con máximos a 610 nm y 645 nm respectivamente cuya intensidad varía en diferente grado con la temperatura, de forma que el cociente de estas intensidades, Δ , está directamente relacionado con la temperatura absoluta mediante una curva de calibrado de Δ sobre T. El mapeo de la temperatura en células en las que previamente se han internalizado las NPs luminiscentes se realiza mediante un sencillo montaje de microscopio de fluorescencia equipado con un divisor de haz que capta en una cámara las imágenes equivalentes de emisión de cada lantánido y las transforma en imágenes de temperatura una vez aplicada la ecuación de calibrado píxel a píxel.

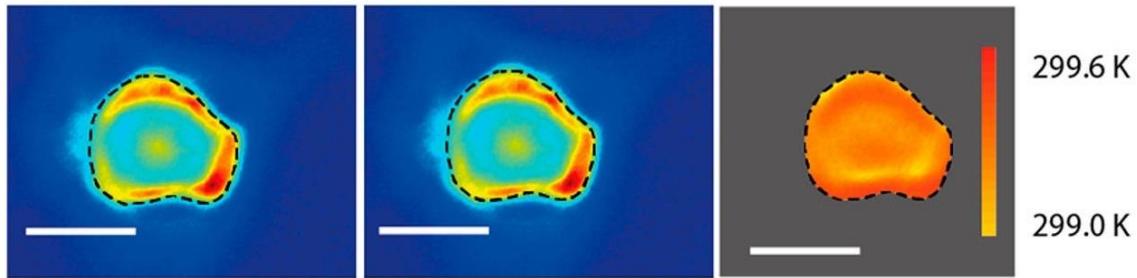


Fig. 4: Gradiente de temperatura medido en una célula mediante termometría fluorescente [11].

La muestra inicial de NPs requiere de manipulación, elaborando así otra muestra a partir de ella con una determinada concentración (que es uno de nuestros parámetros). A raíz de ahí, debemos estudiar su respuesta a campos magnéticos oscilantes, con una determinada frecuencia e intensidad que son parámetros que debemos ir variando. Con ello podremos ver cuan efectivas son a la hora de calentar un volumen de agua. No obstante, debemos considerar que esta es una etapa preliminar y que un sistema biológico es más complicado y requiere un salto de complejidad no trivial. En efecto, el uso clínico implica ciertos límites físicos (frecuencias, concentraciones y campos magnéticos no dañinos para el cuerpo humano), pero también consideraciones fisiológicas durante la eliminación del tumor mediante hipertermia, como prevenir el sobrecaleamiento de los tejidos circundantes causando daños en las partes sanas.

Nuestro trabajo en el laboratorio se concentra en la búsqueda de los parámetros idóneos en la muestra que maximicen el gradiente de temperatura que podemos inducir, los cuales dependen de la naturaleza de las NPs, pero sin comprometer su estabilidad en el medio biológico. Una vez conseguido todo ello, el siguiente escalón sería medir la temperatura a la que necesitamos llegar para atacar las mitocondrias y provocar así la apoptosis de las células tumorales. El siguiente paso sería la realización de ensayos *in vivo* en animales y, finalmente los ensayos clínicos con pacientes, algo que requiere de mucho tiempo.

El proceso de investigación es largo, por lo que desde el principio he sido consciente de incorporarme a una tarea de investigación ya iniciada, y que continuará después de la fecha de publicación de esta memoria.

5. Experimental

5.1 Métodos

Debemos primero precisar que los procesos detallados a lo largo de todo este bloque se repiten para cada una de las distintas muestras, por lo que se trata de un método de clasificación a seguir y reiniciar cada vez que descartamos una de ellas. Esta evaluación de su eficiencia es meramente técnica, en cuanto a la aplicación biomédica quedan tareas a resolver como es la selección de células cuya muerte queremos provocar [12].

En este trabajo se han utilizado tres muestras de óxido de hierro con características diferentes: 1) La muestra GAMMA20 consiste en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con un tamaño medio de unos 20 nm, que tienen una coercitividad muy baja; 2) la muestra GAMMA30 consiste en nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con un tamaño medio de unos 30 nm, con una coercitividad algo mayor que las anteriores; 3) la muestra EPSILON-Ga consiste en nanopartículas de $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con un tamaño medio de unos 25 nm y una coercitividad gigante. La notación corresponde a las diferentes combinaciones posibles Fe_xO_y del óxido de hierro, siendo la maghemita denotada por γ y caracterizada por poseer una estructura cúbica; así como la ϵ por ser ortorrómbica [13]. En cuanto a la magnetización de saturación, es mayor para las GAMMA que para las EPSILON. Los métodos de obtención de las muestras se describen brevemente a continuación:

- GAMMA20. Esta muestra se preparó siguiendo un método que consiste, brevemente, en la precipitación de una mezcla de cloruros de hierro (II) y hierro (III) en proporción 1:2, seguida de un proceso de “Oswald ripening” mediante tratamiento hidrotermal a 120°C durante 24h. El precipitado es tratado posteriormente con una disolución de HNO_3 2M durante 2h para conseguir aumentar las cargas superficiales, y finalmente se redispersa en agua [14].

- GAMMA30. Esta muestra se prepara mediante el procedimiento denominado de precipitación oxidativa. Resumidamente, una disolución de FeSO_4 se añade con rapidez a una disolución mezcla de agua y etanol (8:10) de NaOH 0.125M que contiene 0.06 mol/L de KNO_3 , en atmósfera de nitrógeno. Los lodos se colocan en un baño a 90°C y después de agitar durante 15 min, se mantienen durante 24h más. Finalmente, las nanopartículas se filtran y se tratan con una disolución de HNO_3 2M durante 2h, se filtran y se redispersan en agua [15].

- EPSILON-Ga. Estas nanopartículas se prepararon por un procedimiento de sol-gel. Brevemente, una disolución acuosa de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0.38M y $\text{Ga}(\text{NO}_3)_3$ 0.12M se mezcla con una disolución de amoniaco 5M seguida por la adición de tetraetoxisilano para alcanzar una proporción final de $\text{Si}/(\text{Fe}+\text{Ga})$ de 1.5:1, y se agita magnéticamente durante 15min. El precipitado se calienta al aire a 1100°C durante 4h y posteriormente se disuelve la capa de sílice que rodea las nanopartículas mediante tratamiento con NaOH a 60°C durante 24h. Las nanopartículas resultantes se redispersan en agua y se estabilizan mediante adición de hidróxido de tetrametilamonio para obtener una suspensión estable [16].

Para un análisis exhaustivo de cómo medimos el cociente la variación de la diferencia de temperatura entre muestra y testigo puede consultarse el anexo 10.1, siendo éste un manual de medidas realizado con el único propósito de facilitar la manipulación del montaje a alguien ajeno al proyecto (del mismo modo que se me enseñó a mí en un principio).

Una parte de las medidas realizadas no se han incluido entre los resultados al carecer de relevancia. Este es el caso, por ejemplo, del CSIC 2b, con una concentración de 1 mg/mL y testeado con un campo magnético de intensidad variable (de 11 a 71 mT en saltos de 10) con una frecuencia de 42 kHz. Dicha muestra presentaba por un lado valores del SAR para nada elevados y por otra parte precipitaba en escasos minutos, no suponiendo ningún avance.

5.2 Equipo

Para llevar a cabo la recogida de datos y posterior cálculo del SAR, contamos con un montaje que nos permite por un lado modificar parámetros de entrada que afectarán al campo magnético que estamos empleando para generar las pérdidas en la solución de agua con NPs en suspensión; pero también recoger la variación de temperatura que se obtiene.

Un esquema del instrumento para la aplicación de campos magnéticos alternos a suspensiones acuosas de nanopartículas se presenta en la Fig. 5.

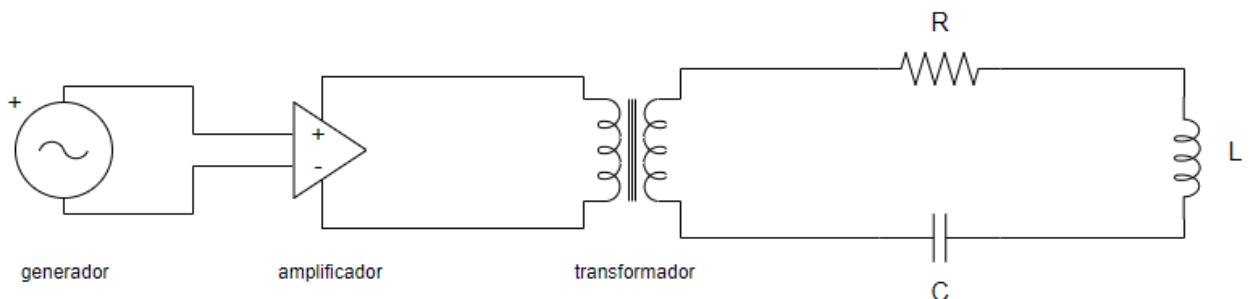


Fig. 5: Diagrama electrónico del circuito empleado.

Al tratarse de un campo magnético AC, los principales parámetros que querremos modificar serán su intensidad y su frecuencia. Para ello, contamos inicialmente con un generador de onda unido a un amplificador. La onda generada y amplificada puede verse en la pantalla de un osciloscopio, que tendrá más elementos de entrada que detallaremos más adelante. Dicha onda, señal con el voltaje deseado y la máxima intensidad posible, es conducida hasta un transformador conectado al circuito RLC que consiste en un bobinado de cables de baja inductancia en torno a bloques de ferrita (Fig. 6) y un sistema de condensadores en serie de modo que podemos modificar el valor de la capacidad. Entre los bloques de ferrita debe existir un pequeño hueco (aproximadamente 1 cm) de modo que podamos colocar dos pequeñas

cubetas: una con nuestra muestra a medir y otra como testigo. Con el fin de minimizar los efectos de transmisión térmica que falsearían los resultados, y puesto que solo queremos inducción, empleamos cinta aislante térmica en las zonas de contacto.

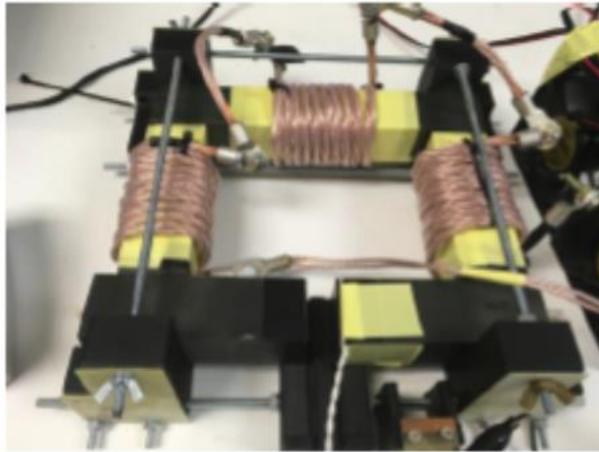


Fig. 6: Imán del sistema que permite la aplicación del campo magnético AC.

La onda inicialmente generada nos permite obtener el campo magnético deseado y cuya intensidad podemos modificar. El hecho de poder modificar también la capacidad del sistema RLC nos permite a su vez una variación de su frecuencia, apreciable en el osciloscopio. Para conocer con precisión la intensidad de campo magnético, conectamos un medidor de campo magnético a este último y al imán. Como además se producen cambios de temperatura del orden de la decena de grados Celsius, resulta vital volver a un valor “ambiente”: dispondremos también de un sistema de ventilación que permita disminuir la temperatura tanto del imán como de las cubetas entre dos medidas.

El último bloque es el correspondiente a la obtención de la temperatura en función del tiempo de exposición al campo magnético. Emplearemos un sistema consistente en delgadas fibras ópticas conductoras con un cabezal sensor semiconductor que mide diferencias de potencial en el interior del fluido en el que se sumerge (en este caso las dos cubetas). La fibra está unida a un medidor que, a valores de potencial determinados, asocia una temperatura de la muestra con una precisión de una décima de grado Celsius. Todo esto ha de ser conectado a un ordenador, en el cual tenemos un software que muestra por pantalla la evolución de la temperatura tanto de la muestra como del testigo, y que nos permite almacenar en un fichero toda esta información.

6. Análisis de resultados

Disponemos a continuación de un compendio de ciertas muestras que resultan significativas de los problemas o aciertos que podemos tener a lo largo de la investigación. Al tratarse de una serie muy extensa de datos, resultaría contraproducente y carente de sentido el incluir todos los resultados en tablas: a efectos prácticos nos interesa el ya nombrado SAR para clasificar la eficiencia de cada una de las muestras. Información más detallada sobre los resultados experimentales se incluye en el anexo 10.2.

Un parámetro relevante de una muestra sintetizada es también su estabilidad, es decir, su capacidad para no precipitar. Dicho parámetro puede ser evaluado al medir el tamaño dinámico de las NPs (es decir, la suma de su tamaño y el de su capa de difusión) en la muestra varias veces: cuanto menor sea la variación a lo largo del tiempo en la medida más estabilidad se asegura. Será un proceso llevado a cabo antes de las medidas que detallamos a continuación, clasificadas de menor a mayor coercitividad.

6.1 GAMMA20

La muestra GAMMA20 es relativamente antigua, y, aun habiendo sido elaborada hace meses, se mantiene muy estable en el tiempo debido a un tamaño de las NPs cercano a los 20 nm, siendo poco interactuantes entre sí. La coercitividad está entre los 50 y los 100 Oe, la magnetización de saturación alcanza los 76 emu/g(Fe₂O₃). Podemos por tanto seguir trabajando con muestras obtenidas a partir de ella, aunque todavía no se han conseguido unos parámetros que lleven a una eficiencia alta. El término *uncoated* es empleado para denotar un procedimiento similar al del modo de abordar el CSIC 2b GMP169, es decir, sin añadir capa externa y trabajando con una dilución de la muestra directamente, de modo que podemos analizar si las condiciones son las adecuadas o por lo contrario debemos seguir jugando con los parámetros fijados que clasificamos (y clasificaremos de ahora en adelante) en la tabla siguiente:

Nombre	Concentración	Frecuencia
GAMMA uncoated 008	7 mg/mL	42 kHz

Los valores del SAR vienen clasificados en la Fig. 7 en función de la intensidad de campo magnético aplicada.

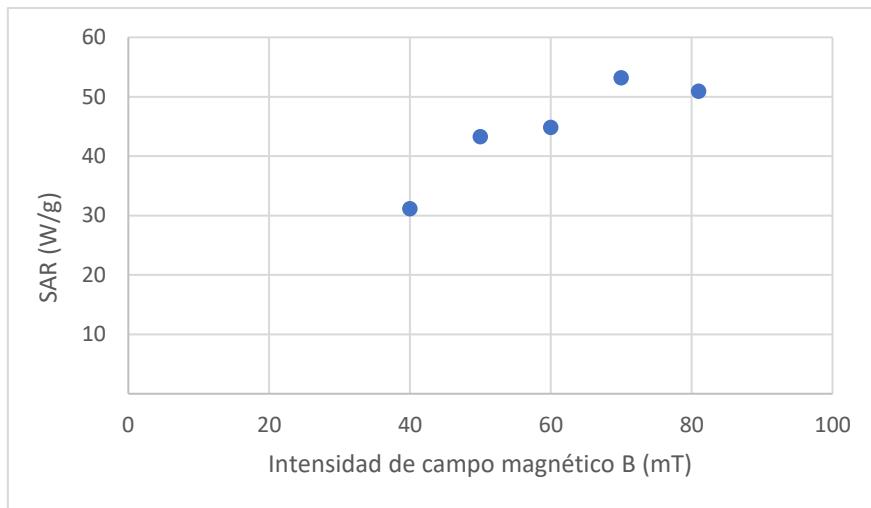


Fig. 7: SAR en función del campo magnético para gamma uncoated, a 7 mg/mL y 42 kHz.

El comportamiento aquí parece privilegiar unas ciertas intensidades, mostrando lo que tal vez podría ser una variación del mecanismo de hipertermia (recordemos, de Néel o de Brown), aunque no podemos afirmarlo rotundamente puesto que hay otros parámetros en juego. Siendo críticos, la concentración es alta y los saltos de temperatura (y por tanto el SAR) no lo suficientemente grandes como para mostrar un avance significativo. Topamos con el dilema que surge del equilibrio estabilidad-eficiencia a la hora de realizar las muestras y por tanto podemos seguir trabajando con esta muestra a la espera de alguna novedad. Es un claro ejemplo de una muestra que no pone problemas en cuanto a estabilidad se refiere, pero de eficacia no lo suficientemente alta como para que pueda resultar interesante.

6.2 GAMMA30

Se trata de la primera muestra a partir de la cual medí en laboratorio de manera autónoma ya que con objeto de poner a punto el equipo, se utilizaron muestras ya caracterizadas anteriormente. Corresponde a una segunda generación de NPs de gran tamaño (cercanas a los 30 nm), cuya estabilidad se ha ido mejorando con respecto a la muestra inicial CSIC a. Los valores de coercitividad y magnetización de saturación son similares a los de GAMMA20. Además, es la medida detallada del anexo 10.2 en el cual mostramos todas las gráficas que se llevan a cabo para la obtención del SAR.

Tras la elaboración de una primera muestra detallada en el bloque experimental, los siguientes parámetros quedaban fijados:

Nombre	Concentración	Frecuencia
CSIC 2b	6.9 mg/mL	100 kHz

Las medidas se toman entre 20 y 58 mT en saltos de aproximadamente 10, siendo que en ocasiones no podemos pasar un cierto valor de la intensidad por los límites del propio montaje. Las medidas del SAR que se obtienen quedan representadas en el siguiente gráfico:

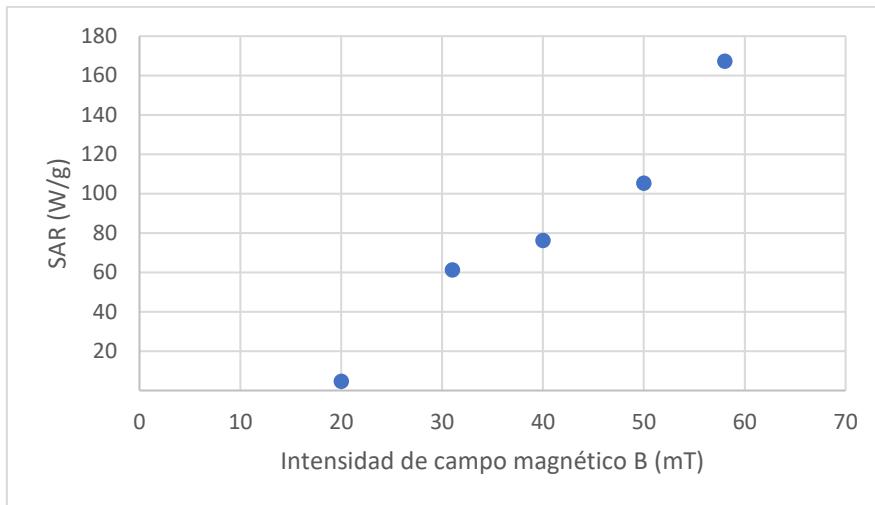


Fig. 8: SAR en función del campo magnético para CSIC 2b, a 6.9 mg/mL y 100 kHz.

Podemos observar una tendencia similar a partir de los 30 mT, que además verifica el patrón general de comportamiento esperado en forma parabólica. Dicha tendencia viene acompañada por la no respuesta aparente a menor intensidad de campo magnético, algo habitual también en el resto de las medidas que haremos. Se podrían realizar otra clase de medidas variando la frecuencia para campos magnéticos fijos de modo que se pueda privilegiar un mecanismo de Néel o de Brown y que nos permita caracterizar de manera más precisa la muestra.

Pese a mostrar una tasa de absorción específica muy alta probablemente debido a su relativamente alta concentración, descartaremos la muestra pues esto implica a su vez una alta facilidad de precipitación. Una falta de estabilidad afecta a la reproducibilidad del experimento, y en este caso requiere de agitación ocasionalmente antes de pasar al siguiente valor de la intensidad del campo magnético. Más tarde comprobaríamos que es la propia muestra la que tiende a precipitar en cortos períodos de tiempo, por lo que aquellas muestras derivadas de ésta carecerán de interés.

Otra síntesis será realizada unas semanas más tarde mediante otro proceso, los parámetros son los siguientes:

Nombre	Concentración	Frecuencia
CSIC 2b GMP169	4 mg/mL	73 kHz

Para los cuales la gráfica resultante es tal que:

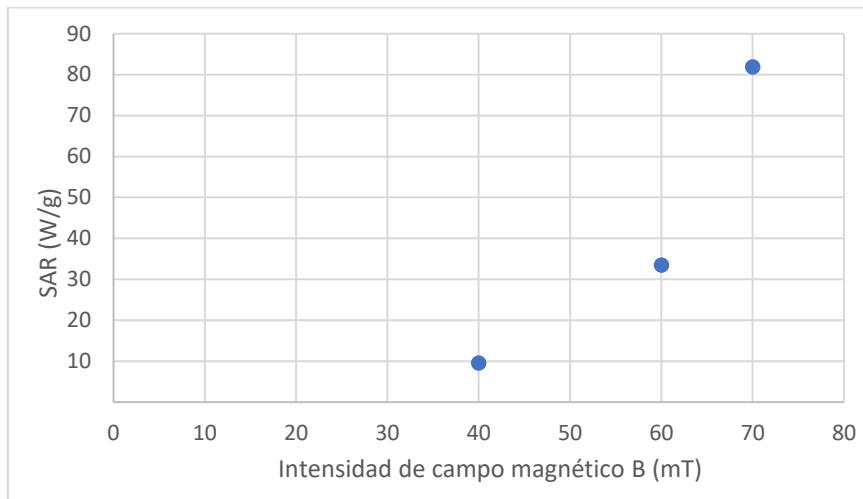


Fig. 9: SAR en función del campo magnético para CSIC 2b GMP169, a 4 mg/mL y 73 kHz.

De nuevo podemos destacar la evolución similar de la influencia del campo magnético aplicado y la necesidad de elevar la intensidad de éste pues parece haber un cierto umbral para cada muestra. Cabe destacar que el procedimiento empleado en este caso a partir de la muestra original es dilución en agua y sin añadir ni polímeros ni lantánidos para evaluar su respuesta y poder ser críticos con su eficiencia. Nótese también que el valor máximo del SAR es pequeño con respecto a los resultados en el procedimiento anterior, esperable al bajar la concentración, si bien hemos tocado otros parámetros como la frecuencia a la cual medimos. Su inestabilidad terminará por conducirnos a descartarla, siendo este un ejemplo de muestra no interesante a la hora de trabajar con ella.

6.3 GAMMA30 (bis)

De mismo origen y nombre similar que la del primer apartado, pero con una estabilidad mayor, tenemos la tercera y mejorada versión de las NPs del CSIC. Al tratarse de una novedad, haremos un estudio completo de ella: obtendremos una muestra con una cierta concentración inicial (relativamente alta) y procederemos de manera habitual: ver cómo evoluciona el SAR en función de la intensidad de campo magnético externo aplicada. Trabajaremos a continuación a la inversa, es decir, fijando la ya nombrada intensidad de campo magnético y obtener el SAR haciendo variar la frecuencia. Una vez los resultados obtenidos, se pretende ir bajando la concentración de la muestra de modo que podamos tener un conocimiento general sobre nuestra solución de óxido de hierro.

En el primero de los casos, los parámetros que fijamos son los siguientes:

Nombre	Concentración	Frecuencia
CSIC 2c	10 mg/mL	100 kHz

Y el SAR evoluciona de la siguiente manera:

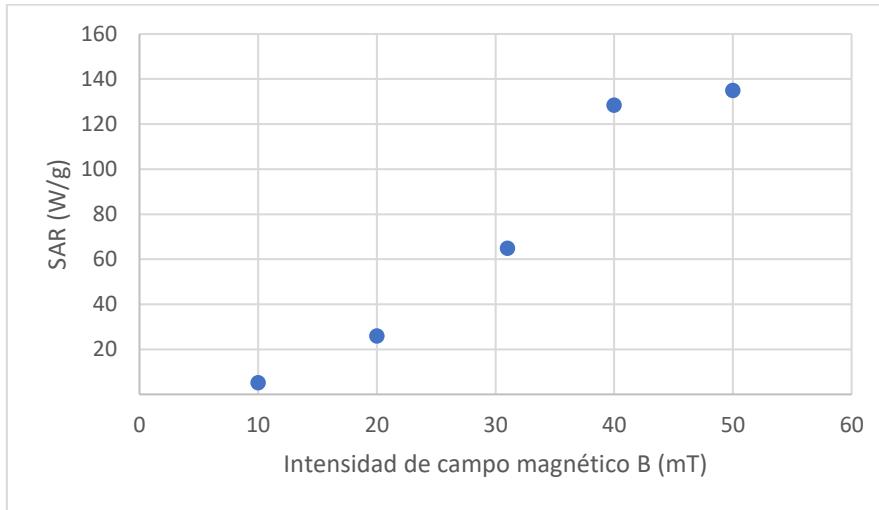


Fig. 10: SAR en función del campo magnético para CSIC 2c, a 10 mg/mL y 100 kHz.

La respuesta es, sin lugar a duda, buena, lo más destacable es la diferencia de temperatura que generamos entre la muestra y el testigo, puesto que es tan elevada que en ocasiones tenemos que parar las medidas antes de su duración habitual. Generalmente se recopilan datos de temperatura durante uno o dos minutos, pero en este caso cortamos a los 30 segundos e incluso menos, ya que un calentamiento demasiado elevado puede conllevar peligroso para el material de laboratorio. Un ejemplo del enorme salto que estamos produciendo puede verse en la siguiente gráfica:

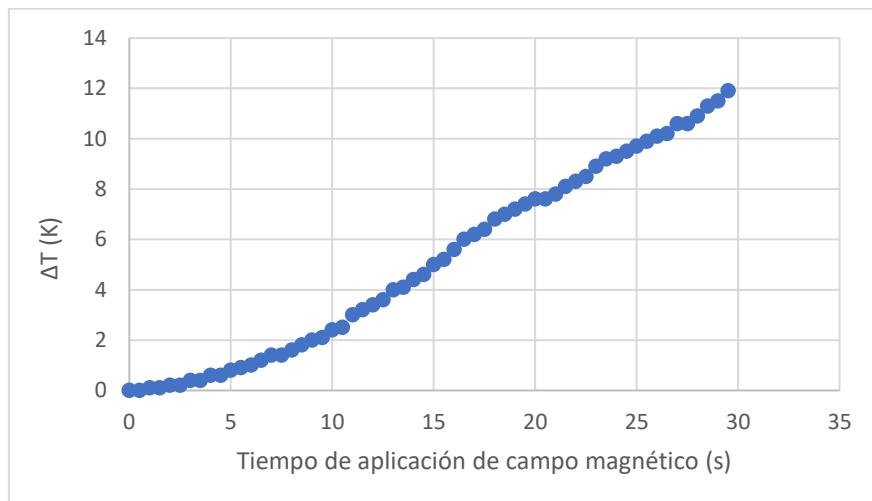


Fig. 11: Evolución temporal de la diferencia de temperatura entre muestra y testigo correspondiente a CSIC 2c, de concentración 10 mg/mL y a 100 kHz y 40 mT.

Los resultados dan pie a seguir con trabajando con esta muestra pues presenta unas características mejores que todas las medidas precedentemente, no obstante, no se puede obviar que la concentración es muy alta y deberemos evaluar el comportamiento cuando ésta disminuya.

Fijamos los parámetros de nuevo, esta vez variando la frecuencia para ver la respuesta de nuestra prometedora muestra:

Nombre	Concentración	Intensidad de campo magnético
CSIC 2c	10 mg/mL	40 mT

En esta ocasión, los SAR vendrán dados en función de la frecuencia a la que vayamos midiéndolos, por lo que la gráfica no queda como las obtenidas hasta ahora:

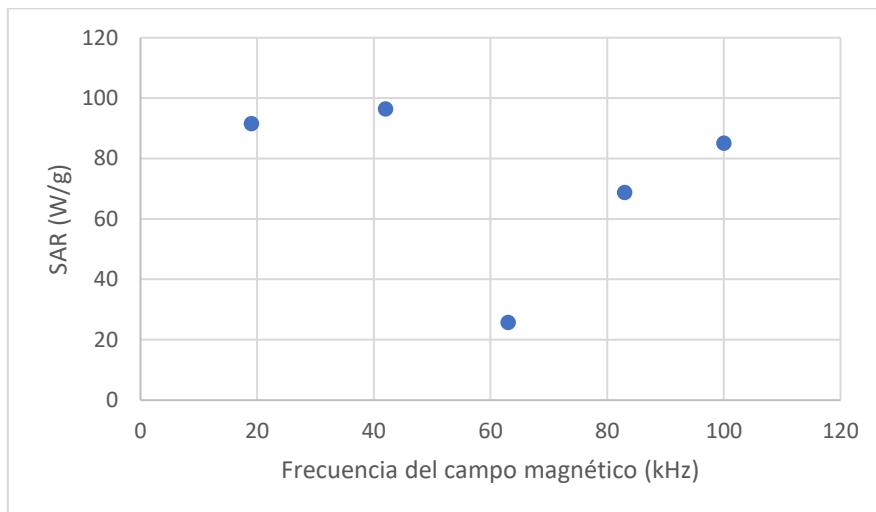


Fig. 12: SAR en función del campo magnético para CSIC 2c, a 10 mg/mL y 40 mT.

Al tratarse de un estudio de condiciones óptimas para el posterior trabajo con una muestra, podemos destacar los 19 y 42 kHz, puesto que deducimos que funcionarán incluso de manera más eficaz que a 100 kHz, frecuencia a la cual recordemos que teníamos un aumento muy brusco de temperatura. Aun así, debemos insistir en realizar medidas con una concentración inferior para realmente demostrar que nos hallamos ante una muestra que permita dar un paso más en el desarrollo de una terapia oncológica.

No obstante, podemos ver ese altibajo del SAR como una anomalía experimental que debemos tratar de explicar. Clasificando las diferencias de temperatura medidas obtenemos la gráfica comparativa de la figura siguiente.

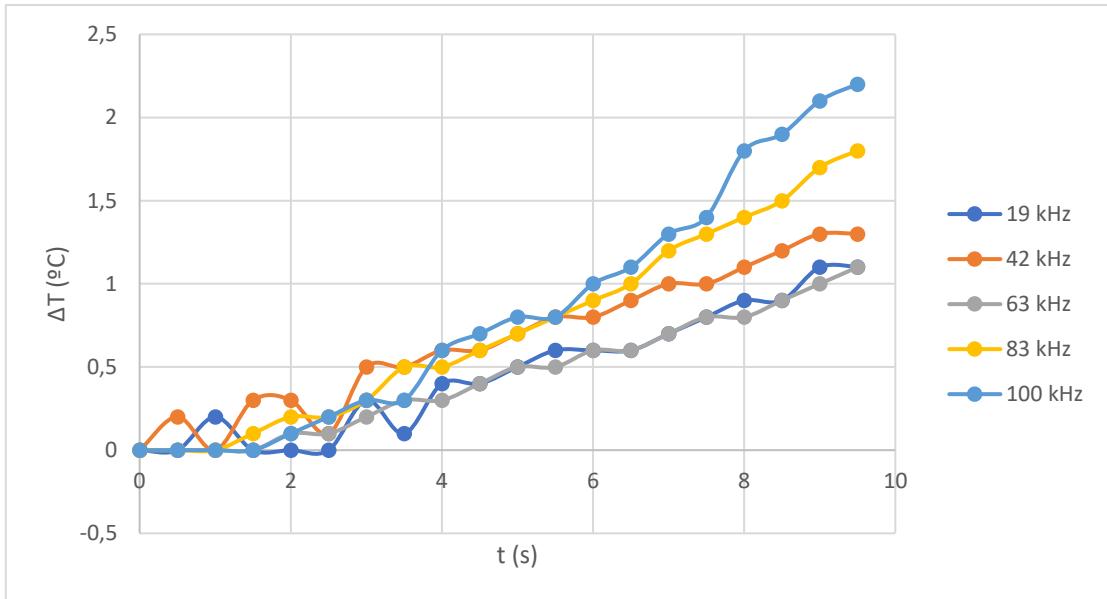


Fig. 13: Comparativa de la evolución de la diferencia de temperatura de la muestra CSIC 2b a 10 mg/mL y 40 mT. Nótese que se han recortado las medidas pues para medir el SAR basta con la pendiente en el origen.

Podemos identificar la raíz del problema: pequeñas variaciones (ruido) del orden de 0,2°C en los primeros segundos desembocan en la obtención de una descripción del comportamiento (bajo forma del SAR) equivocada. Analizando los cambios de manera global vemos que, de forma general, se cumple que un aumento de frecuencia provoca un mayor aumento de temperatura (con la excepción de 63 kHz que parece ser una frecuencia que no debería interesarnos).

6.4 EPSILON-Ga

Se trata de una muestra de color anaranjado, color que contrasta con el marrón o negro habitual, y cuya composición de las NPs (de tamaño en torno a los 25 nm) viene dada en el nombre: óxido de hierro dopado con galio. La muestra es, además, muy estable en el tiempo. La diferencia con las NPs GAMMA radica en una coercitividad enorme de más de 10 kOe, pero con una magnetización de saturación menor, de 28 emu/g(Ga_{0.40}Fe_{1.53}O₃). Procedemos al igual que en anteriores ocasiones, denotado por el término *uncoated* de nuevo. Los parámetros que fijamos son los descritos en la siguiente tabla:

Nombre	Concentración	Frecuencia
GaFeO uncoated	3.3 mg/mL	19 kHz

Dejando así una evolución del SAR tal que:

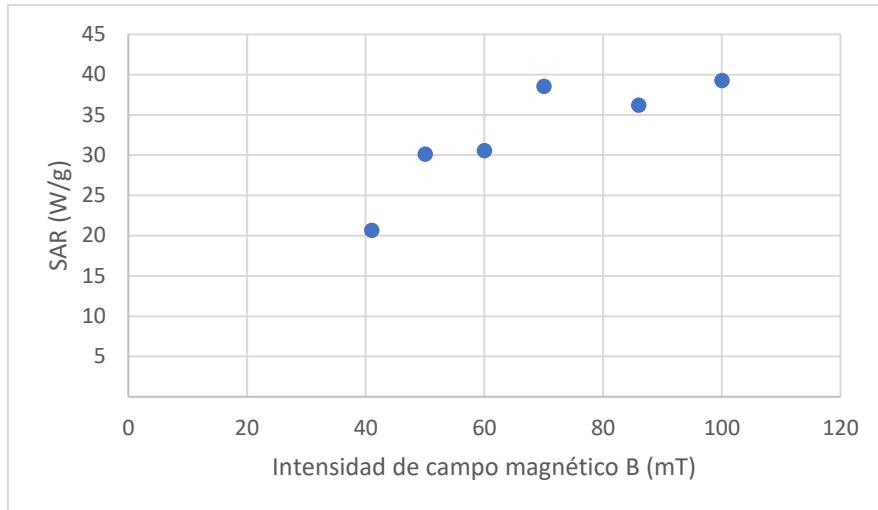


Fig. 14: SAR en función del campo magnético para GaFeO uncoated, a 3.3 mg/mL y 19 kHz.

Por lo que se aprecia un comportamiento similar al obtenido en apartados anteriores: una respuesta no lo suficientemente elevada para resultar interesante, por lo que nos lleva a pensar que no son las condiciones óptimas de medida. No obstante, se podría ir variando la frecuencia de medida (y el campo magnético para cada una de las escogidas) para tratar de encontrar una reacción de mayor calibre. Al medir repetidas veces con muestras sintetizadas a partir de la misma que teníamos inicialmente vemos que la estabilidad seguirá sin ser un problema, pero la excitación magnética inducida es demasiado leve con los parámetros que han sido elegidos.

Como ya anticipamos al principio, el proceso de investigación es lento, y a pesar de encontrarnos ante resultados prometedores, todavía queda mucho por delante. No obstante, y por motivos de salud pública (algo ajeno, evidentemente) a la Universidad de Zaragoza, mi contribución este curso acaba aquí, por lo que sólo queda hacer una valoración global del proyecto y sus resultados.

7. Discusión y conclusiones

Podemos abordar por último las conclusiones que extraemos de las medidas presentadas anteriormente, y resulta conveniente proceder separadamente.

Por un lado, en cuanto a las NPs GAMMA20, tenemos una evidencia de lo descrito en el preludio teórico: una baja coercitividad debida a un tamaño pequeño que se aproxima al comportamiento superparamagnético implica unas bajas pérdidas y consecuentemente un bajo calentamiento. Los valores del SAR no son lo suficientemente elevados para resultar de interés, si bien existirán unos ciertos parámetros que potenciarán al máximo su efectividad. La prioridad es la viabilidad del fenómeno de hipertermia por lo que estudiar otro tipo de NPs resulta más conveniente.

Reforzando la idea que a mayor tamaño podemos producir un mayor calentamiento tenemos las GAMMA30, con valores del SAR elevados en comparación con las anteriores. No obstante, su alta eficacia a la hora de provocar la hipertermia se ve eclipsada por las eventuales interacciones entre NPs, lo cual provoca reagrupamientos de estas y posteriores precipitados de la muestra. Como tenemos coexistencia de los mecanismos de Néel y de Brown, debemos considerar la tendencia general: tenemos SAR más elevados a medida que aumentamos la frecuencia, y al aumentar la frecuencia se producen más pérdidas de Néel, por lo que en este caso este fenómeno se muestra más eficiente. Se tratan sin duda de prometedores resultados puestos en jaque por este problema de estabilidad. No obstante, se efectúan progresos en los procesos de síntesis que podrían conducir a muestras de mayor eficacia con el paso del tiempo. La reacción a la modificación de parámetros (frecuencia e intensidad de campo magnético) no ha sido completamente catalogada por falta de tiempo, pero parece indicar que se está logrando una mejoría de las condiciones. Con las pocas medidas que tenemos, la muestra CSIC 2c resulta, al menos, digna de continuar siendo estudiada en búsqueda de una combinación de parámetros óptima.

Como bien hemos precisado precedentemente, el dopaje en las NPs EPSILON-Ga implica una alta (e inesperada para un óxido de hierro) coercitividad a temperatura ambiente, y deberíamos hallar grandes saltos de temperatura gracias a ellas. No obstante, un valor tan elevado solamente permite pérdidas de Brown mediante rotación de las NPs, puesto que no disponemos de un campo magnético aplicado lo suficientemente elevado como para poder producir una rotación del momento magnético. Deberíamos por lo tanto emplear frecuencias más bajas, adecuadas a un tiempo de relajación de Brown (mayor que el de Néel). Los datos que se obtienen muestran una frecuencia que arroja resultados pobres en cuanto a hipertermia, lo cual nos conduce a descartar ciertos rangos poco efectivos. De nuevo, más medidas resultan necesarias para unas condiciones adecuadas en las cuales se pueda manifestar su teóricamente alta capacidad de calentamiento.

En línea general, la variación de parámetros ofrece tal amplitud de posibilidades que se necesita de más tiempo para poder realizar una clasificación de la reacción de nuestras NPs. Se han realizado, no obstante, descartes a lo largo del año tanto de muestras como de rangos de frecuencias para algunas muestras, condiciones en las cuales la posibilidad de producir hipertermia queda en entredicho.

Finalmente, el contraste entre la enormemente superior coercitividad y menor magnetización de saturación de las EPSILON-Ga en comparación con las GAMMA nos obliga a plantear cual de los caminos resulta más interesante para seguir con la investigación. El ciclo de histéresis será de mayor área para las primeras NPs, pero con nuestro equipo de laboratorio resulta difícil de explotar, aunque el hecho que solamente se produzca un mecanismo de calentamiento puede aprovecharse para una selección intencionada en un futuro. No obstante, en términos de hipertermia, las GAMMA30 resultan más eficientes con los resultados obtenidos hasta ahora, y aún deben ser estudiadas con mayor profundidad.

8. Epílogo

A lo largo de mi estancia, se ha continuado con las medidas en el primer escalón de todo un desarrollo que está por venir. Precedentemente se había conseguido evidenciar el efecto de termometría fluorescente y ahora se trata de inducir un salto de temperatura, tarea que parece estar cerca de su finalización.

Se trata sin lugar a duda de un proyecto innovador que propone una solución a un problema actual a través del método científico. La tarea que queda por delante es enorme, pero se puede apreciar una evolución positiva que culmina el curso con ciertos indicios de estar en el buen camino, si bien hay que ser consciente de los saltos de complejidad que quedan por abordar. La última muestra con la que hemos trabajado es, a falta de mucho testeo por realizar, prometedora; y parece indicar que podría ser el inicio de otra etapa de la investigación. Hallando una concentración baja a la cual siguiese mostrándose eficiente tendríamos el primer paso dado y podríamos trabajar en la calibración de dicha muestra, de modo que tendríamos nuestro termómetro a escala celular. Podría pasarse entonces a una investigación más intensiva cambiando el agua por un cultivo biológico en el que trataríamos de ver cómo de elevado tiene que ser el gradiente de temperatura para poder destruir la mitocondria de una célula tumoral, y por tanto conseguir la apoptosis de dicha célula. Podemos intuir que las complicaciones serían diversas y relacionadas con el comportamiento mucho más imprevisible del sistema biológico con respecto a una simple solución en agua.

A pesar de dar cierta sensación de falta de conclusión, se trata de una aplicación del método científico que me ha permitido trabajar a un mayor grado de complejidad que al que he estado sometido previamente, puesto que los posibles caminos de investigación son muy amplios y existen multitud de parámetros y fuentes de error que controlar. Además, dicha falta de conclusión tiene su origen justamente en la complejidad de la tarea sobre la cual se está investigando, puesto que como ya podíamos anticipar, esto no concluye simultáneamente con el final del curso académico.

9. Bibliografía

- [1] https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1
- [2] <https://www.worldwidecancerresearch.org/what-we-do/>
- [3] Silvio Dutz y Rudolf Hergt. "Magnetic particle hyperthermia - a promising tumour therapy?" Publicado el 22 de octubre de 2014 en IOPScience.
- [4] Anselmo, A.C. y Mitragotri, S. (2016). "Nanoparticles in the clinic." Bioengineering & Translational Medicine, 1: 10-29. doi:10.1002/btm2.10003
- [5] David Chang, May Lim, Jeroen A. C. M. Goos, Ruirui Qiao, Yun Yee Ng, Friederike M. Mansfeld, Michael Jackson, Thomas P. Davis y Maria Kavallaris. "Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations." Publicado el 2 de agosto de 2018 en Frontiers of pharmacology, <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00831>
- [6] Vanessa Fernandes Cardoso, António Francesko, Cláisse Ribeiro, Manuel Bañobre-López, Pedro Martins y Senentxu Lanceros-Mendez. "Advances in Magnetic Nanoparticles for Biomedical Applications." Publicado el 27 de diciembre de 2017, 10.1002/adhm.201700845
- [7] A.E. Deatsch, B.A. Evans. "Journal of Magnetism and Magnetic Materials nº354" (2014) pp. 163–172.
- [8] Research Gate (https://www.researchgate.net/figure/Figura-23-Representacion-esquematica-de-los-mecanismos-de-relajacion-de-Neel-y-de-Brown_fig4_45529487)
- [9] Research Gate (https://www.researchgate.net/figure/Schematic-showing-magnetic-hysteresis-loop-of-a-ferromagnetic-material_fig1_330210801)
- [10] M. Mehrmohammadi, K. Y. Yoon, M. Qu, K. P. Johnston, S. Y. Emelianov. "Enhanced pulsed magneto-motive ultrasound imaging using superparamagnetic nanoclusters." Publicado el 15 de diciembre de 2010 en Nanotechnology, vol. 22, nº 4.
- [11] Rafael Piñol, Carlos D. S. Brites, Rodney Bustamante, Abelardo Martínez, Nuno J. O. Silva, José L. Murillo, Rafael Cases, Julian Carrey, Carlos Estepa, Cecilia Sosa, Fernando Palacio, Luís D.

Carlos y Ángel Millán. “*Joining Time-Resolved Thermometry and Magnetic-Induced Heating in a Single Nanoparticle Unveils Intriguing Thermal Properties*”. Publicado el 18 de febrero de 2015, 10.1021/acsnano.5b00059

[12] Jeun M., Kim Y.J., Park K.H., Paek S.H. y Bae S. “*Physical contribution of Néel and Brown relaxation to interpreting intracellular hyperthermia characteristics using superparamagnetic nanofluids.*” Journal of nanoscience and nanotechnologies, 2013 Aug 13, 5719-25.

[13] Jiří Tuček, Radek Zbořil, Asuka Namai y Shin-ichi Ohkoshi. “ *ε -Fe₂O₃: An Advanced Nanomaterial Exhibiting Giant Coercive Field, Millimeter-Wave Ferromagnetic Resonance, and Magnetolectric Coupling.*” Chemistry of Materials 2010 22 (24), 6483-6505 DOI: 10.1021/cm101967h

[14] Bonvin 2016 D. Bonvin, H. Hofmann y M. M. Ebersold. “*Optimisation of aqueous synthesis of iron oxide nanoparticles for biomedical applications.*” J. Nanopart. Res., 2016, 18, 376

[15] T. Asimakidou, A. Makridis, S. Veintemillas-Verdaguer, M.P. Morales, I. Kellartzis, M. Mitrakas, G. Vourlias, M. Angelakeris, K. Simeonidis. “*Continuous production of magnetic iron oxide nanocrystals by oxidative precipitation.*” Chem. Eng. J. 393, 124593, 2020

[16] S. Ohkoshi, S. Kuroki, S. Sakurai, K. Matsumoto, K. Sato y S. Sasaki. “*A Millimeter-Wave Absorber Based on Gallium-Substituted Epsilon-Iron Oxide Nanomagnets.*” Angew. Chemie Int. Ed. 46, 8392–8395, 2007

10. Anexos

10.1 Manual de medidas

MEDIDA DE LA REACCIÓN DE UNA MUESTRA A LA APLICACIÓN DE CAMPO MAGNÉTICO EXTERNO

Por Nicolás Aranda

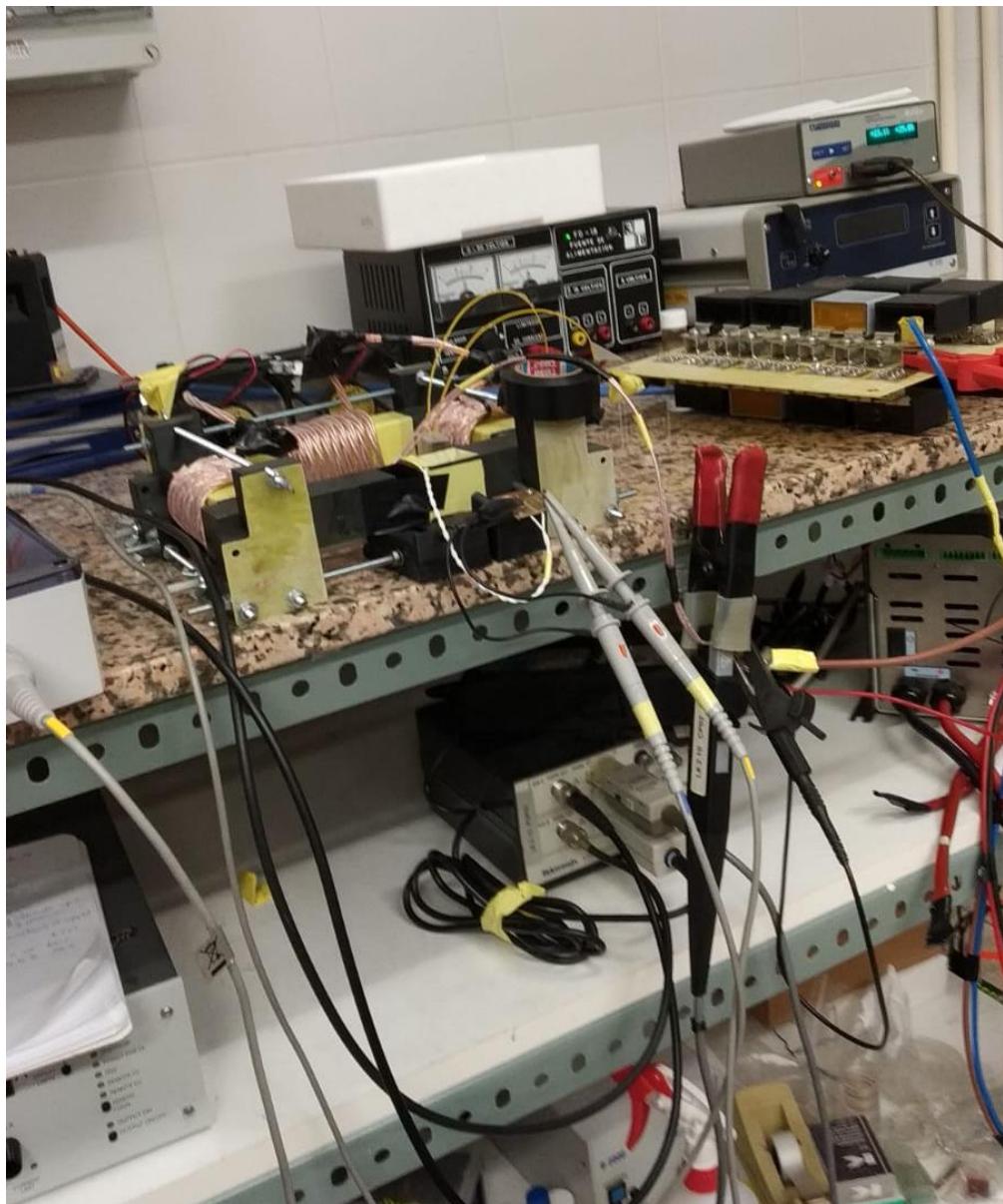


Fig 10.1.1: Vista general del montaje.

PREPARACIÓN Y ENCENDIDO

Lo primero es encender todo el equipo: conectar a las tomas de corriente, encender el osciloscopio, el medidor de campo magnético, la fuente de alimentación y comprobar que el amplificador está correctamente conectado y que el ventilador puede encenderse y apagarse. Además, dejamos la fuente de alimentación apagada ya que querremos aplicar campo magnético solo en unos determinados instantes de tiempo.

En dos cubetas pondremos un mismo volumen de la muestra a testear y de agua destilada (que jugará el papel de testigo). Colocamos además los termómetros ópticos en ambas e iniciamos el programa que nos permite tomar los datos de la temperatura a lo largo del tiempo (OptiLink Pro).

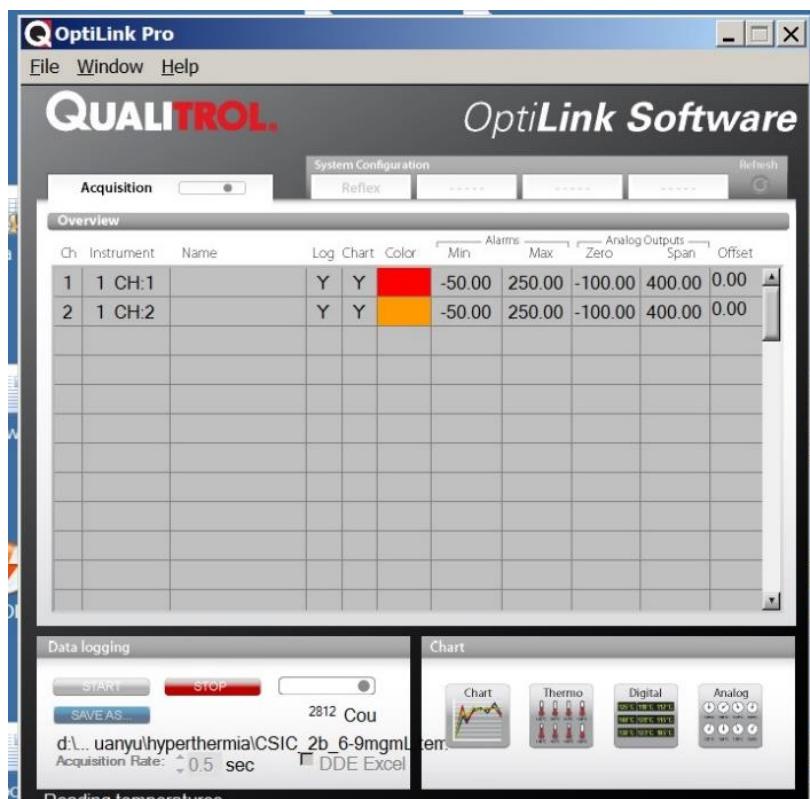


Fig 10.1.2: Panel principal del programa de medida.

Es necesario pulsar en “Save as...” y darle un nombre al archivo en el cual vamos a guardar los datos. Además, podemos hacer aparecer los valores de la temperatura en grande gracias a los botones “Chart” y “Digital”, abriendose una ventana como la siguiente tras pulsar en “Start”:

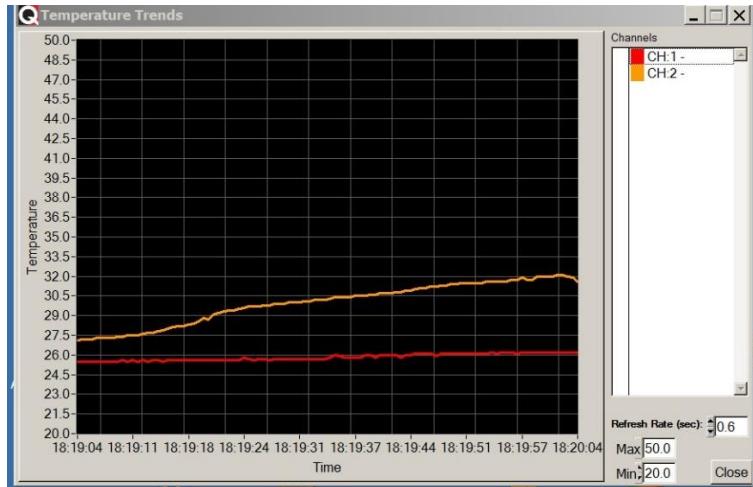


Fig 10.1.3: Evolución de la temperatura.

Por último, solemos medir a una frecuencia fija para distintos valores del campo magnético, por tanto, debemos fijar dicha frecuencia. Esto se consigue con el sistema de condensadores que tenemos junto al circuito de inducción. Primero debemos seleccionar un condensador al cual fijar la pinza y el cable (con un destornillador) que dan al campo magnético y al amplificador respectivamente. Una vez dicha posición escogida, necesitaremos ajustar dicha frecuencia como la frecuencia de resonancia del circuito: en el amplificador subiremos el valor del campo magnético a un valor arbitrario, pero suficientemente elevado, y mirando el osciloscopio a la vez que modificando la frecuencia de operación del amplificador, conseguir el máximo en el canal azul, pero además, que el periodo de esta onda representada sea el mismo que el de la onda del canal rojo (correspondiente a la fuente de alimentación), de no ser así se ve claramente que no trabajamos con una frecuencia estable.

El último paso será seleccionar el campo magnético con el que deseemos tomar la primera medida gracias al amplificador. Nótese que en el medidor de campo magnético aparece un valor atenuado de B en un factor 10, es decir, si tenemos 1.5 mT en la lectura, estamos aplicando 15 mT en realidad.

Colocando las dos cubetas en el hueco del circuito estaremos listos para medir.

MEDICIÓN

Comenzaremos por esperar a que la temperatura se estabilice viendo en la gráfica de la fig. 3 dos líneas aproximadamente constantes. Es notable que requiere de encender el ventilador y luego apagarlo esperando llegar a un cierto equilibrio, además, repetiremos este proceso después de cada medición puesto que, a pesar de las capas de cinta aislante, sigue habiendo calentamiento y conducción térmica en el circuito y entre las muestras.

Las medidas se toman de la manera siguiente:

v (kHz)	B (mT)	t
100	20	16:31-16:33
100	30	16:39-16:41
...

Fig 10.1.4: Tabla para anotar medidas

Es decir, entendemos que estamos midiendo a 100kHz como resultado del ajuste de los condensadores, y que nuestra primera medición se ha realizado encendiendo la fuente de alimentación a las 16:31:01 y apagado a las 16:33:00 (que con un valor de la temperatura cada 0.5 segundos nos dará 240 puntos). El tiempo de medida es variable, y elegido a nuestro juicio según cómo de rápido se esté calentando la muestra. Es recomendable usar el reloj de Windows situado en la esquina inferior derecha porque simplifica el proceso de selección de datos posterior.

Una vez la medida realizada, quitamos la muestra y el agua del circuito, conectamos el ventilador, subimos el campo magnético al siguiente valor deseado, que anotamos en la tabla, y esperamos a que el circuito y las cubetas se enfríen. Después, repetimos.

Al terminar, bastará con pulsar el botón “Stop” en la ventana principal (Fig. 10.1.2) y recoger los datos.

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos se guardan en un fichero de texto, basta con pasarlo a cualquier programa de tratamiento de datos (técnicamente Excel nos puede valer, aunque se recomienda Origin o MatLab).

Lo primero que queremos obtener es la diferencia de temperatura entre las muestras en función del tiempo. Buscamos en nuestra tabla los valores correspondientes a los tiempos en los que hemos encendido la fuente de alimentación (de ahí que los hayamos apuntado previamente). Se puede calcular con la fórmula siguiente:

$$\Delta T = T_{sintesis}(t) - T_{sintesis}(t = 0) - (T_{agua}(t) - T_{agua}(t = 0))$$

Donde hemos considerado la temperatura de la muestra y del agua como variable en el tiempo, y tomando como referencia t=0 el momento en el que se enciende la fuente (distinto por tanto para cada valor del campo magnético). Debería quedar algo así:

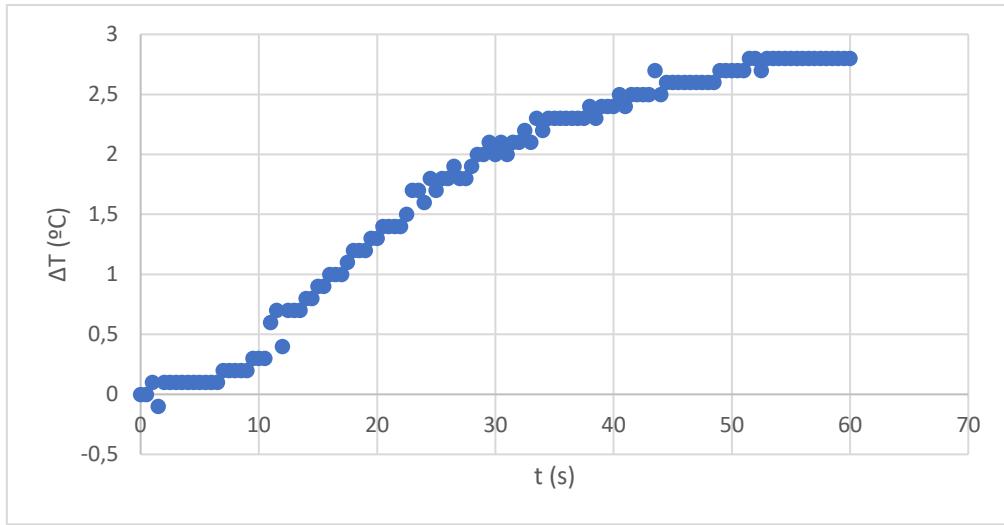


Fig. 10.1.5: Evolución de la diferencia de temperatura correspondiente a la muestra CSIC 2b, a 6.9 mg/mL, 100 kHz y 31 mT.

Por último, queremos calcular el SAR (Specific Absorption Rate), de modo que tenemos:

$$SAR = \left(\frac{C_p(H_2O) * m_{total}}{m_{Fe_2O_3}} \right) \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \approx \frac{C_p(H_2O)}{C_{Fe_2O_3}} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right); \text{ en } W/g(Fe_3O_2)$$

Donde C_p es el calor específico del agua y $C_{Fe_2O_3}$ la concentración en partículas magnéticas, dicho valor es aproximadamente el cociente entre masa de dichas partículas y masa del volumen de la muestra.

Para obtenerlo, utilizamos el código siguiente:

```
[FileName,PathName] = uigetfile('.xlsx','Select the excel file');
Exprofile = xlsread([PathName '\' FileName]);

t=Exprofile(:,1); T=Exprofile(:,2);
plot(t, T, 'o')
ylabel('Temperature difference, C');
xlabel('time, s');
b = polyfit(t, T, 2)
k=b(1,2)
hold on
y=b(1,1)*t.^2+k*t + b(1, 3);
plot(t, y, 'g', 'LineWidth',3)
C_H2O = 4.18; % the specific capacity of water, J/(g*C)
c_Fe2O3 = 14E-3; % the concentration of the sample (g/ml)
SAR = C_H2O*k/c_Fe2O3
```

Fig. 10.1.6: Código para calcular el SAR en MatLab.

Introduciéndolo en MatLab, nos permite aproximar la curva que describe la Fig. 10.1.5 a un polinomio de grado 2 que emplearemos para aproximar el cociente $(\frac{\Delta T}{\Delta t})$. Nótese que hay que cambiar el valor de la variable c_{Fe2O3} según la concentración de la muestra.

9.2 Medidas completas para CSIC 2b

Como bien hemos visto anteriormente, los parámetros fijados eran los siguientes:

Nombre	Concentración	Frecuencia
CSIC 2b	6.9 mg/mL	100 kHz

La evolución con respecto del campo magnético que aplicamos podrá verse en la gráfica de evoluciones de la diferencia de temperatura que tenemos a continuación:

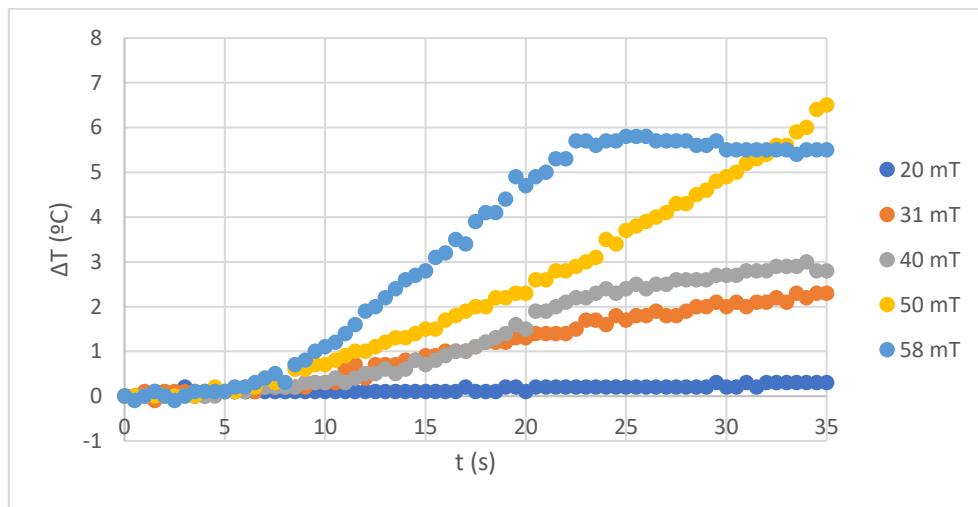


Fig. 10.2.1: Comparativa de la evolución de la diferencia de temperatura de la muestra CSIC 2b a 6.9 mg/mL y 100 kHz. Nótese que se han recortado las medidas pues para medir el SAR basta con la pendiente en el origen.

En este caso, podemos observar cómo inicialmente el calentamiento es más rápido según aumentamos la intensidad del campo magnético externo. No obstante, también se debe apreciar un comportamiento extraño de la muestra al frenarse la curva de evolución de la temperatura para valores altos de B . Tras evaluar la aproximación del crecimiento a una parábola para calcular el SAR mediante MatLab (consultar anexo 10.1), tenemos los valores siguientes:

C (mg/mL)	v (kHz)	B (mT)	SAR (W/g)
6,9	100	20	4,8
6,9	100	31	61,2
6,9	100	40	76,3
6,9	100	50	105,3
6,9	100	58	167,2

Fig. 10.2.2: Medidas experimentales del SAR de la muestra CSIC 2b a 6.9 mg/mL y 100 kHz.

Clasificados gráficamente obtenemos el resultado final presentado tanto en el apartado 6.2 como a continuación:

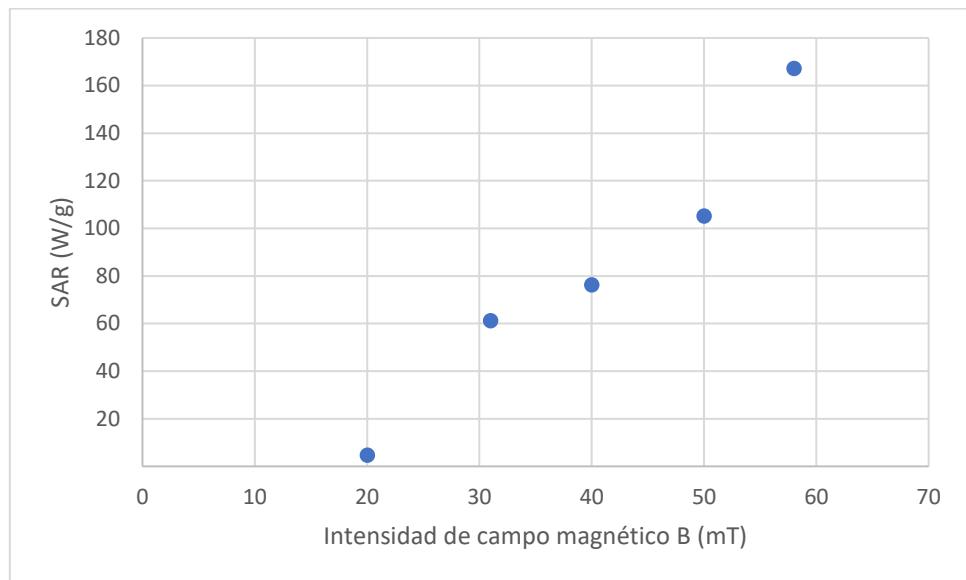


Fig. 10.2.3: SAR en función del campo magnético para CSIC 2b, a 6.9 mg/mL y 100 kHz.

De este modo concluyen las medidas correspondientes a dicha muestra, proceso a repetir por tanto en cada ocasión.