Universidad de Oviedo

Programa de doctorado en Física Fundamental y Aplicada

Sensor impeditivo de nanopartículas superparamagnéticas y su aplicación a la cuantificación de PSA

David Lago Cachón

Dirigida por:
Montserrat Rivas Ardisana — José Ángel García Díaz

2016

II

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: *Sensor impeditivo de nanopartículas superparamagnéticas y su aplicación a la cuantificación de PSA*	Inglés: *Impeditive sensor of superparamagnetic nanoparticles and its application to PSA quantification*

2.- Autor	
Nombre: David Lago Cachón	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Física Fundamental y Aplicada	
Órgano responsable:	

RESUMEN (en español)

El mundo nanométrico está lleno de comportamientos anómalos que desafían nuestras ideas preestablecidas, acostumbrados como estamos a la experiencia macroscópica. El superparamagnetismo, un buen ejemplo de ello, hace de las nanopartículas magnéticas, junto a sus reducidas dimensiones comparables a las entidades biológicas de interés analítico, excelentes candidatos en aplicaciones en el campo biomédico.

Así, el descubrimiento de nuevos biomarcadores de uso diagnóstico abre el abanico de aplicaciones analíticas de las nanopartículas, que a su vez llevan aparejadas nuevos condicionantes. Así por ejemplo, para aplicaciones *point-of-care* (POC), de emergencia, en países en desarrollo o en zonas catastróficas, a las tradicionales demandas de eficacia y buena sensibilidad, hay que añadir la rapidez, facilidad de manejo, portabilidad y bajo coste.

Esta tesis trata sobre un nuevo método de detección de nanopartículas superparamagnéticas y su aplicación a la cuantificación de bioanalitos, como células o proteínas, enfocada a dar respuesta a los requisitos mencionados. La aplicación final del método desarrollado a un biosensor cuantificador de proteínas implica diversas áreas de conocimiento como la biología, la medicina, la química, la física y la ingeniería, siendo por lo tanto ésta una tesis multidisciplinar.

El tema principal de investigación ha sido el estudio y desarrollo de un método de detección (NPSensor) de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, basado en la interacción entre las mismas y la corriente de radiofrecuencia sobre circuitos sensores impresos. Los aspectos fundamentales del trabajo pueden resumirse en tres: (i) desarrollo del sensor de nanopartículas y estudio de los parámetros influyentes en la mejora de la señal, (ii) análisis del origen físico predominante de esta detección y (iii) acoplamiento y evaluación de inmunoensayos de flujo lateral para cuantificación de proteínas.

Como caso de estudio modelo de la bioaplicación se eligió el PSA (*Prostate Specific Antigen*), el biomarcador más utilizado en la actualidad para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de próstata. Para ello las nanopartículas se funcionalizaron adhiriendo a su superficie un anticuerpo específico contra esta proteína para posteriormente realizar el marcaje magnético. La separación entre nanopartículas marcadoras y libres se resolvió ventajosamente mediante la combinación del sensor con tiras de flujo lateral TFL. Esta técnica preserva las condiciones arriba mencionadas en cuanto a rapidez y sencillez. Habitualmente se realiza con etiquetas que aportan color, lo que permite realizar ensayos positivo/negativo. La sustitución de las marcas de color por nanopartículas magnéticas, en combinación con NPSensor, dota de carácter cuantitativo a la técnica.

Se comprobó efectivamente la capacidad del nuevo sistema de detección de nanopartículas magnéticas para la cuantificación de PSA. Se realizaron inmunoensayos en tiras de flujo lateral tipo sándwich, utilizando dos anticuerpos monoclonales para el marcaje y la línea de test y un anticuerpo IgG para imprimir la línea de control. Y como colofón del trabajo, la cuantificación de los inmunoensayos se probó eficaz en el rango de concentraciones de PSA de interés clínico.

RESUMEN (en Inglés)

World in the nanometric scale defies our pre-established ideas as we are used to everyday macroscopic experience. Superparamagnetism, a paradigmatic example, makes of magnetic nanoparticles, together with their reduced size comparable to those of biological entities of analytical interest, excellent candidates for applications in the biomedical field.

Thus, the discovery of new biomarkers of diagnostic interest widens the scope of analytical applications of nanoparticles, which in turn involve new requirements. For example, for point-of-care (POC) or emergency applications, in developing countries or catastrophic events, additional features as rapidity, friendly-use, portability and low cost are demanded.

This thesis deals with a new detection method of superparamagnetic nanoparticles and its application to quantification of bioanalytes, like cells or proteins, focused on the above mentioned demands.

The final application of the proposed method to a protein-quantifying biosensor involves different knowledge areas as biology, medicine, chemistry, physics and engineering. This makes this thesis a multidisciplinary work.

The main point of this research has been the study and development of a detection method (NPSensor) of iron oxide superparamagnetic nanoparticles, based on their interaction with a radiofrequency current flowing along printed sensing circuits. The basic aspects of the project can be summarized in three topics: (i) development of the NPSensor and study of the parameters which influence the signal, (ii) analysis of the main physical origin of the detection mechanism and (iii) coupling and evaluation of lateral flow immunoassays for protein quantification.

As case study of bioapplication PSA (*Prostate Specific Antigen*) was chosen. This is the nowadays most used biomarker for diagnosis and control of prostate cancer. With this aim, the nanoparticles were functionalized adhering to their surface an antibody specific against this protein to then carry out its magnetic labelling.

The separation between labelling and free nanoparticles was successfully solved by combining NPSensor to lateral flow strips. This technique preserves the above mentioned requirements of quickness and simplicity. It is usually performed with colouring labels to produce positive/negative tests. Substituting the colour markers by magnetic particles, together with NPSensor, provides quantitative character to this paper-based technique.

The ability of the new magnetic nanoparticles detection system for PSA quantification has been effectively assessed. Sandwich-type lateral flow immunoassays were performed using two monoclonal antibodies for labelling and test line, and an IgG antibody to print the control line. As culmination of the work, quantification of PSA immunoassays was proved effective in the concentration range of clinical interest.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE FÍSICA /
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN FÍSICA FUNDAMENTAL Y APLICADA

Un buen ejercicio matutino para un investigador es descartar una hipótesis cada día antes del almuerzo. Eso le mantiene joven.

Konrad Lorenz

A mi familia
por apoyarme y aguantarme

Agradecimientos

Se acaba, por fin, la tesis. Han sido muchos años, muchos laboratorios, muchas disciplinas... se ha chocado contra muchos muros, descartado muchas hipótesis, pero por encima de todo tengo la sensación de haber estado aprendiendo sin pausa día a día, gracias sobre todo a las personas que me enseñaron y acompañaron en el camino.

El haberme sumergido en tantos laboratorios distintos me ha permitido conocer un montón de personas interesantes, algunas de las cuales me alegro de poder considerar mis amigos. Hay tanta gente a la que agradecer, que sólo es posible hacerlo de manera injustamente breve.

Primero he agradecer encarecidamente a la Dra. Montserrat Rivas Ardisana y el Dr. José Ángel García sus enseñanzas, su confianza y su apoyo a lo largo de estos años. Si he acabado esta tesis, a pesar de la coyuntura y los largos periodos sin contrato, que no quepa duda que es gracias al amor por la ciencia y la investigación que Montse, persona a la que admiro y quiero, me ha transmitido y contagiado a lo largo de estos años compartiendo laboratorio. Será difícil que yo le pueda devolver todo el cariño y apoyo que me ha dado estos años.

Mención especial se merece también el Dr. José Carlos Martínez por los innumerables consejos recibidos, fueran del tema que fuera, y la paciencia mostrada durante estos años.

También he de agradecer a todos los compañeros que pasaron por el laboratorio en estos años por hacer que el ambiente del mismo fuera siempre agradable: Adrián, Benjamín, Braddy, Catalina, Cristina, María, Norberto Fleitas, Pablo, Pedro Mariño y Yuset. ¡Amanda! ¿Pero cómo pones eso en los agradecimientos del TFM? Matarte no, suicidarme tal vez ;-)

He de agradecer a Arturo López Quintela y Tatiana López por aceptarme en Nanogap SL durante mi periodo de aprendizaje, y por supuesto a Ana, Iván, Javi, Marta y las Noes por las nanorisas... o más correcto sería decir las carcajadas.

A Mar por introducirme en el fascinante mundo de los ELISAs y los ensayos inmunológicos.

También he de agradecer al Dr. Carlos López Larrea que me haya permitido realizar tareas de investigación en el departamento de inmunología del HUCA y en Healthsens. Gracias a Claudia, Gabriel, Graciela, Rober y Rubén por el compañerismo y, más importante aún, los momentos *expresso* con pastitas. Para Alba, Aroa, Jota, Rebeca y el resto de personas de inmuno solo guardo gratitud por haberme ayudado siempre que les he preguntado algo. A Esther, Eva y Reyes además de la solicitud mostrada en el laboratorio también he de agradecer la amistad.

He de agradecer a los doctores Marta Martínez Pinilla, Jorge Toliva y Ana Navarro su inestimable ayuda para la preparación de muestras biológicas para TEM.

Esta tesis no hubiera tenido unos resultados tan espectaculares sin las "magas" en tiras de flujo lateral Carmen y Myriam.

También estoy muy agradecido al Instituto Universitario de Tecnología de Asturias (IUTA) por las becas de formación que he podido disfrutar, SV-14-GIJÓN-1.10 y SV-13-GIJÓN-1.3, al Principado de Asturias y al Ministerio cuya financiación, a través de los proyectos FC-15-GRUPIN14-037, MINECO-13-MAT2012-33405 y FC-09-IB09-128, fue imprescindible para este trabajo.

También he de agradecer a mis amistades y familiares, ciclistas o pachangueras, astronómicas e incluso astronáuticas. Nunca les ha falta palabras de ánimo cuando fueron necesarias.

A mis padres y hermana he de agradecer su cariño, pero también la paciencia que han tenido conmigo cuando sin querer reproduciamos una conversación del clásico "El tormento y el éxtasis":

- ¿Cuándo acabarás?
- ¡Cuando la acabe!

Índice general

Introducción **xv**

1. Nanopartículas magnéticas **1**
1.1. El superparamagnetismo 1
1.1.1. Zero-Field-Cooling, Field-Cooling 4
1.1.2. Ferrofluidos 6
1.2. Fabricación de NPM 9
1.2.1. Recubrimiento de las NPM 10
1.3. Caracterizacion de NPM 12
1.3.1. Concentración 12
1.3.2. Microscopía electrónica de transmisión 13
1.3.3. Caracterización magnética 13
1.4. Conclusiones 17

2. Aplicaciones biológicas de las NPM **19**
2.1. Conceptos básicos de biología 19
2.1.1. La célula 19
2.1.2. proteínas 21
2.2. Marcaje celular con NPM 24
2.2.1. MIC-A, ligando NKG2D 24
2.2.2. Materiales y métodos 25
2.2.3. Resultados y discusión 29
2.3. Conclusiones 33

3. Cintas magnetoimpeditivas **35**
3.1. ¿Qué es la magnetoimpedancia? 35
3.1.1. Definición 35
3.1.2. Fabricación de materiales magnetoimpeditivos 37
3.1.3. Sensibilidad de un sensor basado en GMI 38
3.1.4. Medida de Magnetoimpedancia 39
3.2. Desplazamiento de GMI 43

3.2.1. Materiales y técnicas 43
3.2.2. Resultados y discusión 44
3.2.3. Conclusiones 49
3.3. Detección de NPM 50
3.3.1. Procedimiento experimental 50
3.3.2. Resultados y Discusión 53
3.3.3. Conclusiones 54

4. Sensor electromagnético de NPM 57
4.1. Cintas e hilos conductores 57
4.1.1. Sensores de cobre 57
4.1.2. Elementos sensores de otros materiales 59
4.1.3. Calibración en función de la masa de NPM 60
4.2. Detección de NPM con pistas impresas 62
4.2.1. Equipamiento experimental 62
4.2.2. Influencia del diseño de la micropista 64
4.3. Influencia de las características de las nanopartículas 67
4.3.1. El superparamagnetismo es necesario 67
4.3.2. Influencia del tamaño de las nanopartículas 67
4.3.3. Concentración de NPM 68
4.3.4. Influencia de un campo magnético externo 70
4.4. Origen de la detección de NPM 73
4.4.1. Detección de NPM mediante sensores inductivos: estado del arte 73
4.4.2. Explicación física de la detección 73
4.5. Conclusiones 75

5. Aplicaciones del NPSensor 77
5.1. Tiras de flujo lateral 77
5.1.1. Componentes 77
5.2. Detección de nanopartículas fluyendo sobre el sensor 80
5.2.1. Materiales 80
5.2.2. Resultados y discusión 81
5.3. Cuantificación de PSA 86
5.3.1. Antígeno específico de próstata 86
5.3.2. Materiales y métodos 86
5.3.3. Resultados y discusión 89
5.4. Conclusiones 91

Conclusiones 93

Protocolos **99**

Artículos publicados **103**

Bibliografía **109**

Introducción

El mundo nanométrico está lleno de comportamientos anómalos que desafían nuestras ideas preestablecidas, acostumbrados como estamos a la experiencia macroscópica. El **superparamagnetismo** es un buen ejemplo, un comportamiento anómalo que tiene lugar cuando se fabrican imanes a escala nanométrica [1] [2]. En el transcurso de esta tesis se trabajó con nanopartículas magnéticas (NPM) de óxido de hierro. Dichas NPM tienen un gran potencial para su aplicación en el campo biomédico al tener dimensiones comparables a algunas entidades biológicas, como se puede ver en la figura 1. Entre las posibles aplicaciones de la nanotecnología magnética están el transporte guiado de medicamentos [3], la hipertermia [4], la separación de sustancias *in vitro* o magnetoforesis [5], y su uso como "etiqueta" para biosensores [6].

La aplicación de los biosensores se extiende a los campos de la salud humana y animal, seguridad alimentaria y, medio ambiente e implica a diversas disciplinas como la biología, la medicina, la química, la física y la ingeniería. En particular, el desarrollo de nuevos marcadores de uso diagnóstico abre el abanico de aplicaciones analíticas, mientras que las nuevas posibilidades llevan aparejadas nuevos condicionantes. Para aplicaciones *point-of-care* (POC), de emergencia, en países en desarrollo o en zonas catastróficas, a las tradicionales demandas de eficacia y buena sensibilidad, hay que añadir rapidez, facilidad de manejo, portabilidad y bajo coste.

Es a estas demandas a las que la presente tesis doctoral pretende contribuir a dar respuesta. Con este fin, se exploran las ventajas analíticas de un nuevo método de cuantificación de nanopartículas superparamagnéticas combinado con la técnica de flujo lateral. Este tipo de ensayos bioquímicos son sencillos, rápidos y altamente específicos. No obstante, en general, su utilidad está restringida a pruebas positivo/negativo como los conocidos test de embarazo. En esta tesis se propone una evolución de esta técnica mediante el uso de nanopartículas magnéticas para el etiquetado del bioanalito de interés y su posterior cuantificación mediante un sensor magnético desarrollado *ex profeso*. El biosensor propuesto se ha ensayado en esta tesis para la cuantificación de PSA (*Prostate Specific Antigen*). Esta proteína es el marcador más

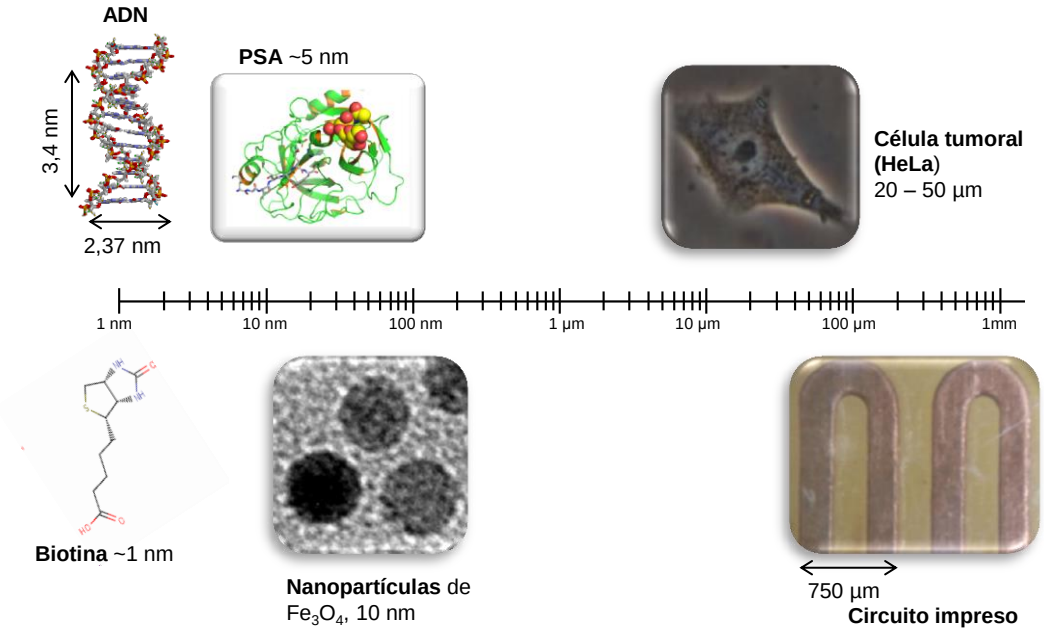

Figura 1: Escala de tamaños

utilizado para diagnóstico y control post-quirúrgico del cáncer de próstata. Tanto es así, que este control motiva el test a gran escala de la población masculina por encima de los 40 años mediante análisis de sangre que ha de ser realizado en laboratorios especializados por personal técnico cualificado. Este screening supone elevados costes económicos y de tiempo que podrían reducirse considerablemente de disponer de un dispositivo POC para uso en las consultas de atención primaria.

Así mismo en este trabajo se analiza, en base a resultados experimentales que pretenden relacionar la señal del sensor con las características estructurales y magnéticas de las partículas, la interacción física que está detrás de la capacidad sensora.

Organización de la memoria

El presente trabajo está dividido en cinco capítulos. Al ser una tesis en la que se combinan distintas disciplinas, cada capítulo versará sobre un campo distinto y consta a su vez de base teórica, resultados, discusión y conclusiones.

En el PRIMER CAPÍTULO se introducen algunos conceptos relativos a las nanopartículas magnéticas (NPM), que constituyen la parte central de esta tesis. También se tratan aspectos básicos sobre el magnetismo y los materiales

magnéticos, con especial dedicación al superparamagnetismo (SPM) de las NPM.

El SEGUNDO CAPÍTULO trata sobre aplicaciones biológicas de las NPM, empezando con un rápido repaso a conceptos básicos biológicos e introduciendo conceptos químicos sobre la modificación de la superficie de las NPM (proceso conocido como **funcionalización**). Ya en la parte de resultados se presenta el trabajo realizado en el desarrollo de NPM funcionalizadas para marcar específicamente un tipo de célula, lo que permitió el arrastre o separación magnética.

Cambiando completamente de tema, en el TERCER CAPÍTULO se habla de cintas magnéticas amorfas (es decir, sin ordenación cristalina) y del uso de las mismas como elemento sensor de campos magnéticos débiles. Las NPM producen un campo magnético despreciable para el orden de magnitud observable con sensores de este tipo, y sin embargo se prueba que la detección es posible. Habiendose encontrado diversas incoherencias en los resultados empíricos del efecto de las NPM, se pospone al siguiente capítulo la propuesta de una hipótesis alternativa del origen de dicha detección.

El CUARTO CAPÍTULO describe un nuevo tipo de sensor de NPM desarrolado en el transcurso de esta tesis, que hemos llamado **NPSensor**. Se describen el proceso de fabricación, así como la interacción entre NPM y sensor, y se analiza la influencia de las distintas variables en la señal.

Finalmente, en el QUINTO CAPÍTULO se dedica a las aplicaciones del NPSensor en combinación con **tiras de flujo lateral** (TFL). La primera de ellas descrita consiste en la detección dinámica de las NPM fluyendo por las TFL. La segunda aplicación culmina el objetivo de biodetección y es la detección y cuantificacion del antígeno específico de próstata (PSA por sus siglas en inglés *Prostate Specific Antigen*) en cantidades de interés clínico.

Capítulo 1
Nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPM) son pequeños sólidos de forma casi esférica compuestos de un material magnético. El sufijo "nano-" indica que su dimensión es menor que 100 nanómetros, por lo que sus propiedades físicas pueden ser muy diferentes de las observadas en un sólido macroscópico del mismo material. Una esfera de pocos nanómetros de diámetro contiene sólo un número pequeño de átomos (por ejemplo, una esfera de dos nanómetros de magnetita Fe_3O_4 tiene aproximadamente 60 átomos, mientras que una esfera de diez nanómetros tiene en torno a 6 000 átomos). Es este escaso número de átomos lo que explica las diferentes propiedades comparadas con las de un material macroscópico, cuya cantidad de átomos está en el orden del número de Avogadro (10^{23}).

1.1 El superparamagnetismo

El superparamagnetismo es un estado magnético que puede ocurrir en materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos dependiendo de su tamaño, anisotropia magnética y temperatura. El número de dominios magnéticos de una partícula depende en general de su tamaño. Si la partícula tiene un radio inferior a un cierto valor crítico (R_{MD}, radio del monodominio) el elevado valor de la energía asociada a las paredes de dominio en su interior es termodinámicamente desfavorable y el material se convierte en monodominio en el que todos sus momentos magnéticos están orientados en la misma dirección. En ausencia de campo magnético externo, el momento magnético tiene dos posibles orientaciones en la misma dirección, llamada **eje facil de anisotropía**. Las posibles orientaciones que puede tomar el momento magnético de un monodominio están separadas por una barrera de energía conocida como **energía de anisotropía** cuyo valor se suele expresar como

$$E_B = KV_{\mathrm{NPM}} \ , \tag{1.1}$$

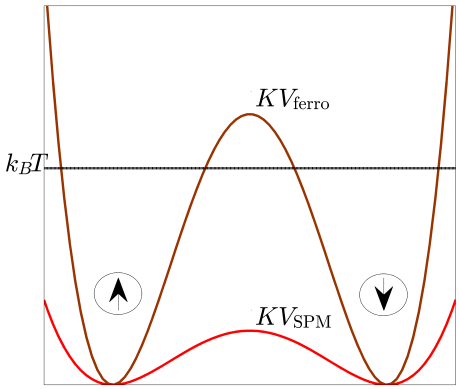

Figura 1.1: Diagramas de energías para dos partículas, una ferromagnética de volumen V_{ferro}, y otra superparamagnética de volumen V_{SPM}.

donde V_{NPM} es el volumen de la partícula y K se conoce como **constante de anisotropía**, siendo un parámetro dependiente del material, principalmente de su estructura cristalina, pero también de otros factores como su forma.

Por otro lado, la energía térmica se puede expresar como

$$E_T = k_B T \ , \tag{1.2}$$

donde $k_B = 1.381 \times 10^{-23}$ J K^{-1} es la constante de Boltzmann, y T la temperatura. Si la energía térmica domina sobre la energía de anisotropía, $E_T > E_B$ (ver figura 1.1), la imanación del monodominio puede cambiar espontáneamente de orientación.

El tiempo que transcurre entre cada cambio de orientación del momento magnético de la partícula, o fluctuaciones sucesivas, es el **tiempo de relajación de Néel** (τ_N):

$$\tau_N = \tau_0 \ \exp\left(\frac{KV_{\text{NPM}}}{k_B T}\right) \ , \tag{1.3}$$

donde τ_0 se conoce como **tiempo de atenuación** y es un factor que depende de varios parámetros, como la temperatura, el material o el campo magnético externo. Este factor toma valores típicos en torno a $10^{-9} - 10^{-13}$ s [2] para materiales superparamagnéticos en ausencia de campo aplicado.

Así, el valor R_{MD} determina el tamaño de transición monodominio-multidominio. Cuando se tiene una partícula cuyo radio es inferior a R_{MD}, la excitación térmica es suficientemente elevada como para producir el cambio de la dirección del momento magnético de la partícula, tal y como se muestra en

la figura 1.2 **(a)**. Si el tiempo promedio transcurrido entre dos cambios de orientación es muy pequeño comparado con el tiempo de observación o medida (τ_m), no hay imanación aparente. Dicho de otra forma, la imanación aparente se promediará a cero al considerar un gran número de orientaciones al azar. Esto produce que si se mide la imanacion M de una muestra superparamagnética aparente ser nula. El ciclo de histéresis de un material superparamagnético se asemeja al de un paramagnético en que ambos carecen de histéresis, como se puede observar en la figura 1.2 **(b)**. Es decir, a pesar de que el material macroscópicamente se comporta como un ferromagnético, su ciclo de histéresis no presenta remanencia ni coercitividad. La principal diferencia entre materiales superparamagnéticos y paramagnéticos se encuentra en los valores de la imanación de saturación B_s, la permeabilidad magnética relativa μ_r o la susceptibilidad magnética χ, mucho mayores en los primeros (ver Cuadro 1.1).

Por lo tanto, al igual que en el paramagnetismo, el superparamagnetismo tiene lugar cuando la temperatura es superior a un valor crítico, que en este caso se conoce como **temperatura de bloqueo** T_B. Mientras que en el paramagnetismo, la temperatura de Curie es una característica intrínseca del material, T_B depende de varios parámetros: el tamaño de la nanopartícula, influencia expresada por V_{NPM} en la ecuación (1.3); la forma de la partícula que produce la llamada **anisotropía de forma** e influye en el valor de la anisotropía K de la misma ecuación; y el tiempo de medida (τ_m). La temperatura de bloqueo se puede expresar como

$$T_B = \frac{KV_{\mathrm{NPM}}}{k_B \ln \frac{\tau_m}{\tau_N}} \ . \tag{1.4}$$

Por ejemplo, sea una NPM de magnetita, cuya anisotropía magnética es $1.1 \cdot 10^{-4}$ J m^{-3}, y diámetro 10 nm. Un factor determinante es la diferencia entre el tiempo de medida τ_m, y el tiempo de relajación de Néel, τ_N. Supóngase que en este ejemplo la diferencia es de 9 órdenes de magnitud ($\tau_N = 10^{-9}$ s, $\tau_m = 1$ s), por lo tanto $\ln \frac{\tau_m}{\tau_N} = 21$. Con estos datos, usando la ecuación (1.4) se puede estimar la temperatura de bloqueo en 20 K. En la sección 1.1.1 (página 4) se hablará de cómo estimar experimentalmente T_B.

Debido a las similitudes entre los ciclos de histéresis de una muestra superparamagnética y una paramagnética, la manera más habitual de simular un ciclo superparamagnético es recurriendo a la ecuación de Langevin (1.5). Esta ecuación, presente en la teoría paramagnética de Langevin (1905), describe la imanación de un material formado por monodominios magnéticos, con momento magnético μ como sigue:

$$\mathcal{L}\left(\frac{\mu H}{k_B T}\right) \equiv \coth \frac{\mu H}{k_B T} - \frac{k_B T}{\mu H} = \frac{M}{M_s}, \tag{1.5}$$

Material	χ	μ_r
Diamagnético	< 0, pequeña	< 1
Paramagnético	> 0, pequeña	> 1
Antiferromagnético	> 0, pequeña	> 1
Ferromagnético	> 0, grande	$>> 1$
Ferrimagnético	> 0, grande	$>> 1$

Cuadro 1.1: Valores de χ y μ_r para los distintos tipos de material.

donde $\mathcal{L}$ es la función de Langevin que depende, no solo del campo magnético aplicado H, si no también de la temperatura T y del momento magnético μ de las partículas superparamagnéticas. Un motivo que frecuentemente impide una buena correlación entre un ciclo de histéresis y la ecuación de Langevin es la dispersión de tamaños de las NPM. No todas las partículas de una muestra tienen las mismas dimensiones, ni siquiera forma, por lo que conviene usar una distribución de momentos magnéticos μ. La más habitual en la literatura, por corresponderse con muchos resultados experimentales, es la distribución log-normal, descrita como

$$f(x|\mu^*, \sigma, \theta) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\,\sigma\,(x-\theta)}\,\exp\left(\frac{-\big(\ln(x-\theta)-\mu^*\big)^2}{2\sigma^2}\right), \qquad (1.6)$$

donde μ^* indica el valor medio de la distribución de momentos magnéticos μ, σ es la desviación estándar y θ es el valor de desplazamiento horizontal de la curva.

Una diferencia importante entre paramagnetismo y superparamagnetismo es que en el primero la excitación térmica es suficientemente elevada como para que cada momento magnético atómico oscile independientemente de sus vecinos. Mientras que en el régimen SPM los momentos atómicos cooperan formando un monodominio ferro- o ferrimagnético y la excitación térmica produce que sea el momento magnético total de la partícula el que rote al completo, es decir, que todos los momentos magnéticos atómicos oscilen a la vez. Esta diferencia es crucial para entender las aplicaciones de las NPM, ya que aparentan comportarse como un material no magnético, pero sí se ven atraídas por los campos magnéticos externos, al contrario que un material paramagnético.

1.1.1 Zero-Field-Cooling, Field-Cooling

Una técnica muy utilizada para estudiar el magnetismo de nanopartículas magnéticas es la conocida como *Zero-Field-Cooling*, *Field-Cooling*, o ZFC-

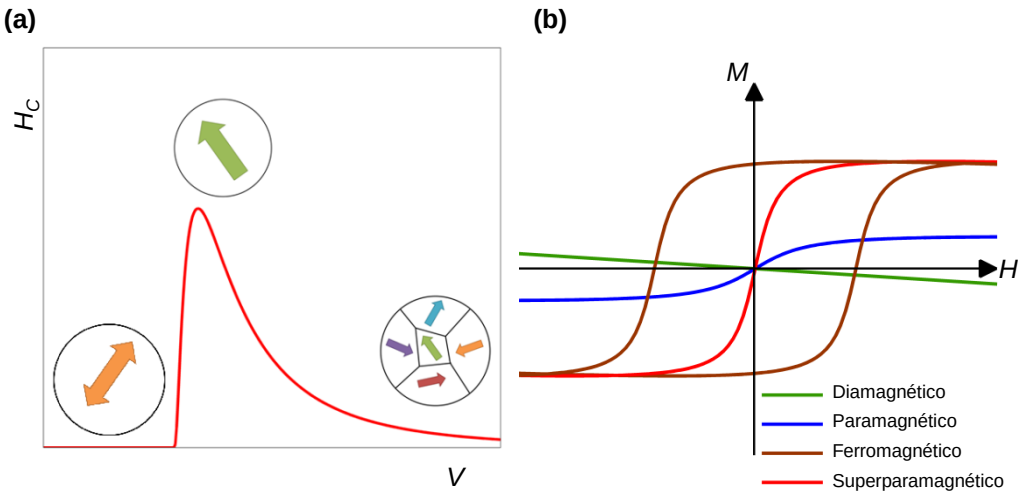

Figura 1.2: **(a)** Campo coercitivo de una única esfera magnética en función de su diámetro, mostrando la diferencia entre superparamagnetismo, monodomino y multidominio. **(b)** Curvas típicas de imanación magnética para distintos tipos de materiales magnéticos.

FC. Dicha técnica consiste en trazar dos curvas de imanación de la muestra en función de la temperatura.

Para medir la primera curva, *Zero Field Cooled*, primero hay que enfriar la muestra hasta temperaturas cercanas a 0 K sin campo magnético aplicado, y posteriormente medir la imanación de la muestra según se aumenta la temperatura de manera controlada mientras se aplica un campo magnético externo (del orden de decenas de Oe). Supóngase una muestra de NPM que en la que las partículas no interactúen entre sí. La imanación medida durante la curva ZFC irá aumentando al incrementar la temperatura hasta alcanzar un máximo. Dicho valor de T proporciona la medida experimental de la temperatura de bloqueo. A partir de este máximo la imanación decrece con la temperatura, acercándose asintóticamente a cero.

Para la curva *Field Cooled*, se enfría la muestra mientras se aplica un campo magnético constante y homogéneo a la misma, y posteriormente se vuelve a medir la imanación incrementando la temperatura. Considerando otra vez la misma muestra ideal de NPM no interactuantes; el valor de imanación inicial de la imanación será ahora mucho mayor que el de la curva ZFC (debido a que los momentos magnéticos de las NPM están orientados preferentemente en la dirección del campo aplicado). Al incrementarse la temperatura, la imanación disminuye según la energía térmica empieza a desordenar los momentos magnéticos y hasta alcanzar el mismo valor que la

curva ZFC. A partir de T_B los valores de las curvas FC y ZFC son iguales. Frecuentemente, la existencia de interacciones dipolares magnéticas entre las partículas hace que la coincidencia de las dos curvas se produzca en valores de temperatura ligeramente superiores.

Cabe recordar que el valor obtenido de T_B no es una propiedad intrínseca de la muestra de NPM, si no que depende del tiempo de medida, es decir, del procedimiento experimental seguido.

1.1.2 Ferrofluidos

Una dispersión estable de una fase sólida magnética en el seno de otra fase líquida se conoce como **coloide magnético** o **ferrofluido**. Estos líquidos se ven atraídos por los campos magnéticos, por lo que el líquido al completo dibuja las líneas del campo magnético, a veces adoptando curiosas formas.

El diámetro de las NPM es mayor que el de una molécula de agua, pero no tan grande como para poder despreciar los efectos de las moléculas de agua (o cualquier otro fluido en el que se hayan dispersado las partículas). La temperatura provoca que las moléculas que componen el fluido se muevan caóticamente y colisionen con las NPM, provocando que éstas se desplacen en el seno del fluido. Este fenómeno se conoce como **movimiento browniano** en referencia al biólogo Robert Brown que lo descubrió obsevando granos de polen con ayuda de un microscopio en 1827.

En la sección 1.1 (página 1) se habló de cómo la energía térmica puede cambiar el estado de imanacion de una NPM, es decir, de la relajación de Néel. Este mecanismo de relajación supone que únicamente cambia la orientación del momento magnético total de la NPM mientras que la misma no sufre desplazamiento ni rotación física. Sin embargo, cuando las NPM están dispersas en un fluido, la excitación térmica también puede rotar las NPM al completo, dependiendo de las condiciones tanto de las NPM como del fluido. Este segundo mecanismo de relajación magnética de las NPM se conoce como **relajación de Brown** en honor a William Fuller Brown que lo describió en 1963.

$$\tau_B = \frac{3V_{\text{hidro}}\eta}{k_B T} \tag{1.7}$$

En la ecuación, V_{hidro} representa el volumen hidrodinámico de la partícula (que se definirá a continuación), y η es la viscosidad del fluido.

Para conseguir que los coloides sean estables se busca que las partículas se repelan electrostáticamente entre sí, proceso que se conoce como **estabilización electrostática** y se tratará en la sección 1.2.1 (página 10). La carga eléctrica superficial de las NPM puede orientar las moléculas del fluido, estabilizándolas a su alrededor. Esto produce que dichas moléculas se comporten

como parte de la NPM, por lo que su diámetro aparente en un fluido suele ser mayor que el real. El tamaño hidrodinámico depende del recubrimiento de la NPM y de las propiedades del fluido, especialmente del pH o de la carga iónica del mismo. Por lo tanto, al trabajar con ferrofluidos hay que distinguir entre el diámetro real de la partícula, que es el que determina las propiedades magnéticas, y el **diámetro hidrodinámico**, que es el relevante en la interacción de las NPM con las entidades biológicas. La manera más habitual y directa de medir el tamaño de las NPM es la microscopía electrónica y se abordará en la sección 1.3.2 (página 13), mientras que el diámetro hidrodinámico se suele medir con métodos ópticos, como la Dispersión Dinámica de Luz o DLS.

Acción de un campo magnético sobre una NPM en un fluido

Esta sección describirá brevemente la interacción entre las NPM con campos magnéticos externos, lo que constituye la base de la aplicación más habitual de las NPM, la separación magnética y de la que se expondrá un ejemplo en el capítulo 2 (página 19). Cuando se aplica un campo magnético externo sobre un ferrofluido se observa que el líquido es atraído por el imán, de manera similar a como lo hacen unas limaduras de hierro. Sin embargo es importante detallar que el campo magnético producido por el imán no es uniforme, ya que si se aplicara un campo magnético uniforme y homogéneo sobre una NPM en un fluido, ésta sufrirá un par, rotando hasta alinear su momento magnético con el campo aplicado, pero no sintiéndose atraída por el imán.

Es posible calcular analíticamente la fuerza magnética que actúa sobre una NPM en un fluido y la velocidad inducida considerando dos simplificaciones. La primera es que el fluido esté en reposo y no disponga de iones. La segunda es aproximar la inducción como $B = \mu_0 H$ para el sistema NPM+fluido. Si se aplica un campo magnético H la fuerza magnética que actuaría sobre una partícula superparamagnética de volumen V_{NPM} será

$$\mathbf{F}_{mag} = \Delta\chi V_{\text{NPM}} \nabla\left(\frac{B^2}{2\mu_0}\right), \tag{1.8}$$

donde $\Delta\chi = \chi_{\text{NPM}} - \chi_{\text{fluido}}$ es la susceptibilidad magnética efectiva, calculada a partir de la susceptibilidad magnética del fluido χ_{fluido} y la susceptibilidad magnética de la NPM χ_{NPM}. Como la susceptibilidad magnética de las nanopartículas superparamagnéticas es mucho mayor que la susceptibilidad de un fluido diamagnético $|\chi_{\text{NPM}}| \gg |\chi_{\text{fluido}}|$, es habitual usar únicamente χ_{NPM} en lugar de $\Delta\chi$. Obsérvese cómo esta fuerza $\mathbf{F_{mag}}$ está relacionada con el gradiente de la inducción magnética, obteniéndose una fuerza nula si el campo

es homogéneo.

Al encontrarse la NPM en un fluido, es necesario calcular la fuerza de arrastre usando la fórmula de Stokes

$$\mathbf{F}_d = 6\pi\eta R_{\text{hidro}}\,\mathbf{v}, \tag{1.9}$$

donde η es la viscosidad del fluido, R_{hidro} el radio hidrodinámico de la NPM y $\mathbf{v}$ la velocidad límite a la que se desplaza la partícula en el fluido. Igualando la fuerza magnética (1.8) y la fuerza de arrastre (1.9) se puede calcular la velocidad $\mathbf{v}$ a la que se movería una NPM en un fluido bajo la acción de un gradiente magnético:

$$\mathbf{v} = \frac{\Delta\chi V_{\text{NPM}}}{6\pi\eta R_{\text{hidro}}}\,\nabla\Big(\frac{B^2}{2\mu_0}\Big), \tag{1.10}$$

1.2 Fabricación de NPM

Existen diferentes técnicas para obtener de manera eficiente nanopartículas magnéticas. Cada método tiene sus ventajas y desventajas, alguno métodos son muy simples y rápidos pero la distribución de tamaños resultante puede ser bastante ancha, otros métodos pueden controlar casi perfectamente el tamaño de las nanoesferas a cambio de mayor complejidad de síntesis y que pueden durar más de un día.

Algunas técnicas de fabricación de NPM son:

- Físicos
  - Deposición en fase gaseosa
  - Spray llama
- Químicos
  - Coprecipitación
  - Descomposición térmica
  - Microemulsión
  - Reacción hidrotermal
- Microbiológicos

En este trabajo se sintetizaron NPM mediante el método de coprecipitación, que se describe a continuación.

Coprecipitación de NPM

Uno de los métodos más extendidos para la producción de NPM de magnetita es el método de co-precipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) en presencia de un medio básico. Su popularidad se debe a su rapidez, el escaso material necesario y el bajo coste de los reactivos. La reacción de oxidación, que ha de tener lugar entre pH 9 y 14, se puede escribir como:

$$Fe^{2+} + Fe^{3+} + 8OH^- \longrightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O. \tag{1.11}$$

El tamaño, la forma y la composición de las partículas depende del tipo de sal utilizado (sulfatos, nitratos, cloruros...), de la ratio entre iones Fe^{2+}/Fe^{3+}, de la fuerza iónia o pH de la disolución e incluso de la temperatura de reacción.

Se trabajó con distintas muestras de NPM, algunas de ellas comerciales, y otras sintetizadas en el laboratorio. En este trabajo las sales se coprecipitan en

amoniaco y posteriormente se estabilican con ácidlo poliacrílico. El protocolo detallado de la fabricación y funcionalización pertenece intelectualmente a la empresa `Nanogap nanopowders SL`, en la que se realizó una estancia durante el desarrollo dede un proyecto de investigación conjunto.

1.2.1 Recubrimiento de las NPM

Para conseguir que las NPM no precipiten en el seno de un fluido, es necesario que la energía térmica ($E_T = k_B T$) sea superior a la acción de la gravedad sobre las partículas. La energía gravitacional E_g se puede expresar como:

$$E_g = \Delta\rho \; g \; V \; h \tag{1.12}$$

donde $\Delta\rho$ es la diferencia de densidad entre la partícula y el líquido, g es la aceleración de la gravedad (9.8 m s^{-2}), V es el volumen de la partícula y h es la altura del recipiente.

Se puede estimar el diámetro máximo que puede tener una partícula estable en un coloide imponiendo $E_T \geq E_g$. Suponiendo que las NPM sean esferas ideales de magnetita ($\rho = 5\ 200$ kg/m^3), estén dispersas en agua ($\rho = 1\,000$ kg/m^{-3}), el recipiente mida $h = 0.1\ m$ y la temperatura sea $T = 300$ K, el diámetro máximo será

$$d \geq \sqrt[3]{\frac{6 \; k_B \; T}{\pi \; \Delta\rho \; g \; h}} \Rightarrow d \geq 12 \text{ nm} \tag{1.13}$$

Sin embargo, es necesario incrementar la estabilidad de las NPM usando distintas estrategias de estabilización, entre las que destacan tres grandes grupos:

- **Estabilizacion electrostática**, en la que se inducen cargas eléctricas en la superficie de las partículas. Sustancias que puedan ganar o perder fácilmente protones, como el ácido cítrico o ácido poliacrílico, pueden ser añadidas a la superficie de las NPM para darles más estabilidad. La repulsión eléctrica entre partículas está obviamente relacionada tanto con la fuerza iónica como el pH del fluido.

- **Estabilización estérica** es una alternativa a la estabilización electrostática. Las partículas se pueden recubrir de una barrera hidrófila y eléctricamente neutra que "separe" las partículas entre sí. Los más habituales suelen ser el almidón, el chitosan y el poli(etileno glicol) (PEG).

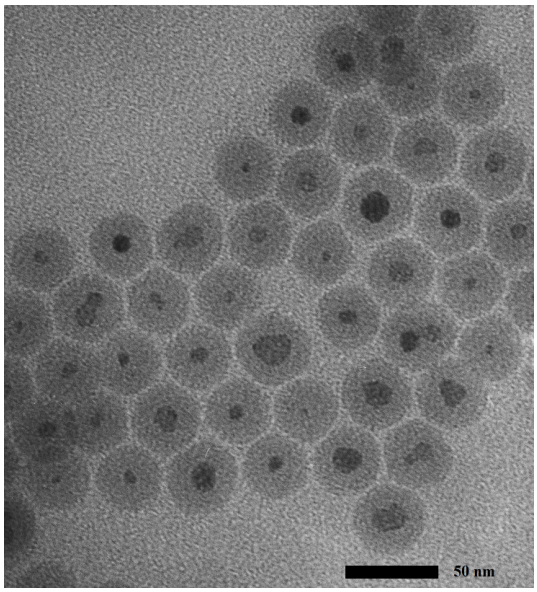

Figura 1.3: Micrografía de NPM de Fe_3O_4 (núcleos oscuros) recubiertas de SiO_2.

- **Encapsulamiento**. De la que cabe distinguir dos técnicas muy distintas:
  - **en óxido de silicio**. Hay numerosos trabajos en los que se incrementa la estabilidad de las partículas recubriendo el núcleo magnético de una capa externa formada por SiO_2, como las de las micrografía 1.3.
  - **en bicapas lípidas**. Una bicapa lípida es una membrana delgada compuesta por dos capas de moléculas lípidas. El lípido posee dos partes, una hidrosoluble y otra liposoluble, y al diluir en una disolución acuosa tienden a formar una esfera, llamada **liposoma** dentro de la cual se pueden introducir las NPM.

En cualquiera de estos métodos es importante estudiar la estabilidad de las NPM en las condiciones finales en que se quieren utilizar. Por ejemplo, si se desea que las NPM sean usadas en el interior de un ser vivo hay que conseguir que las NPM sean estables a pH fisiológico.

Por último, es conveniente que el material con el que se estabilice las NPM permita añadirle alguna sustancia que otorgue a las NPM alguna función desea, proceso que se conoce como **funcionalización** y se tratará en el capítulo 2.2.2 (página 25).

1.3 Caracterizacion de NPM

Los nanomateriales requieren técnicas de caracterización específicas debido a su pequeño tamaño. Aunque la fabricación y caracterización de NPM no es el objetivo primordial de este trabajo, sí que es necesario conocer las propiedades de las NPM utilizadas. Se han caracterizado un número elevado de nanopartículas para identificar la más apropiada para su uso en la detección. A continuación se puede leer una breve descripción de las técnicas más utilizadas en este trabajo y algunos resultados obtenidos con las mismas.

1.3.1 Concentración

Un parámetro crítico para esta investigación es la masa de nanopartículas presente en las disoluciones. No solo es importante determinar la concentración de NPM en cada síntesis, si no también la de las muestras comerciales, especialmente cuando éstas vienen expresadas en unidades confusas, como "concentración molar". En el presente trabajo se utilizarán preferentemente las anteriores definiciones de concentración en $\%\,\mathrm{m/m}$ o en unidades de masa por volumen (mg/mL o µg/µL).

Una forma simple de calcular la concentración de NPM por unidad de volumen es realizar análisis termogravimétricos (TGA). Esta técnica consiste en medir la masa de la muestra de manera contínua mientras se calienta la misma en el interior de un horno. La magnetita no es termodinámicamente estable, si no que se puede transformar a maghemita, $4Fe_3O_4 + O_2 \longrightarrow 6Fe_2O_3$. Para evitar que las NPM se oxiden durante el análisis falseando la medida del mismo, éste ha de hacerse bajo una atmósfera protectora de N_2. Es un análisis destructivo, por lo que es muy conveniente que se necesite poca muestra. La temperatura se aumenta a una velocidad predeterminada, por ejemplo a $1^{o}\mathrm{C\,s^{-1}}$ o $10^{o}\mathrm{C\,s^{-1}}$. El líquido de la disolución se evapora una vez sobrepasada su temperatura de ebullición, permaneciendo en la microbalanza la muestra de nanopartículas. Cuando las NPM están recubiertas por polímeros se hace necesario realizar el análisis hasta temperaturas suficientemente altas como para eliminar también el recubrimiento polimérico.

En este trabajo los análisis se realizaron en dos equipos distintos, dependiendo de las necesidades y la disponibilidad de los mismos. El más utilizado fue el `Mettler- Toledo TGA/SDTA851`, perteneciente a los Servicios Científico Técnicos de la Universidad de Oviedo. Permite realizar medidas en muestras muy pequeñas (en el orden de los µL o mg). El otro equipo utilizado puntualmente fue el `Leco TGA701` situado en el Instituto Nacional del Carbón. Si bien no está diseñado para muestras tan pequeñas como el ante-

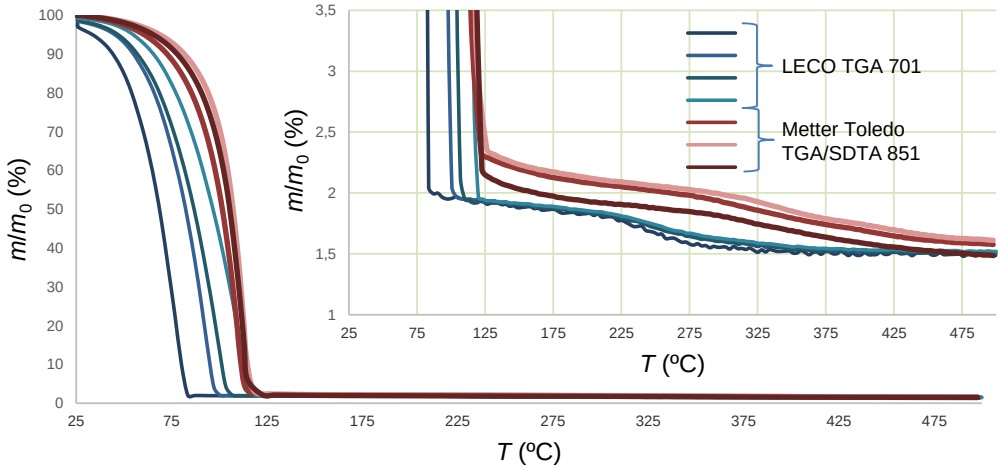

Figura 1.4: Comparación entre las termogravimetrías de la misma muestra de NPM realizadas en dos equipos diferentes.

rior, permite medir la concentración de NPM con igual precisión, tal y como se muestra en la comparación experimental mostrada en la figura 1.4.

1.3.2 Microscopía electrónica de transmisión

Para estudiar las nanopartículas se utilizó el microscopio electrónico de transmisión de los Servicios Científico-Técnicos `Jeol-2000`. Para preparar las nanopartículas a observar por TEM, se diluyen en etanol las muestras a 1 : 1 000, o 1 : 10 000. Posteriormente se deposita una gota con ayuda de una micropipeta sobre una rejilla para microscopía electrónica de transmisión y se deja secar varias horas al aire (aunque protegida para que no se le depositen artefactos). Se obtienen imágenes como la de la figura 1.5 **(a)**, en la que se aprecia incluso la estructura cristalina de las NPM. Finalmente, mediante un programa de procesamiento de imágenes, se mide el diámetro del mayor número posible de NPM y los resultados se ajustan a una distribución, como en la figura 1.5 **(b)**.

1.3.3 Caracterización magnética

La caracterización magnética de las NPM se suele hacer midiendo sus ciclos de histéresis a la temperatura de trabajo (en este caso a temperatura ambiente), y también midiendo su comportamiento con la temperatura para obtener, por ejemplo, su temperatura de bloqueo T_B a partir de los diagramas ZFC-FC (véase sección 1.1.1). Para realizar estas medidas se requiere

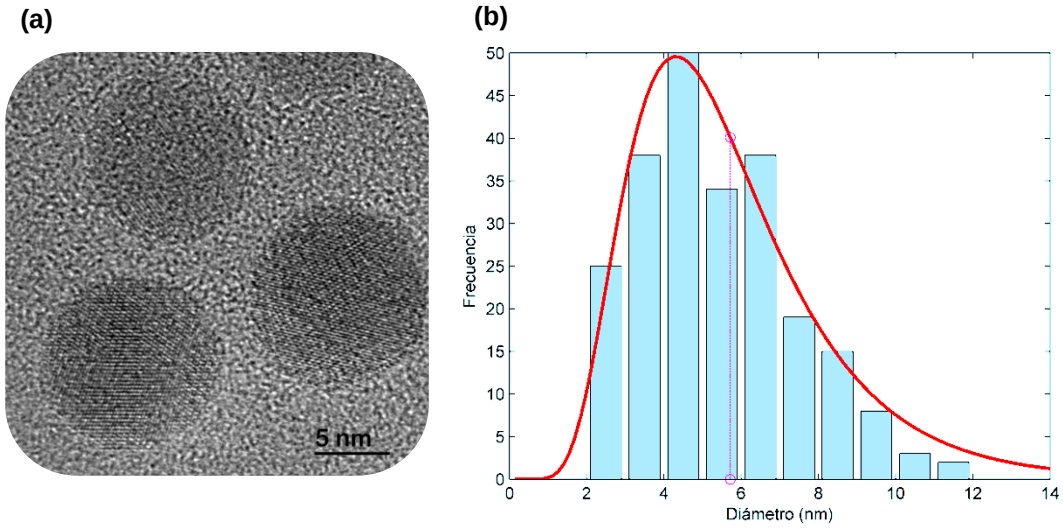

Figura 1.5: **(a)** TEM de NPM de Fe_3O_4 fabricada en el laboratorio. **(b)** Histograma con la distribución de tamaño. En rojo se muestra el ajuste por una distribución log-normal y en rosa el valor de la media de la distribución.

que las NPM estén estáticas, por lo que no es posible estudiarlas en disolución, siendo necesario secarlas previamente. Para ello, el procedimiento más común es calentar ligeramente la disolución con agitación continua y en atmósfera protectora de argon o N_2. Existe la posibilidad de aglomerar el polvo obtenido con ayuda de resinas o vidrio líquido, cuya contribución a la señal magnética es conocida y normalmente despreciable. En el presente trabajo se han medido las propiedades magnéticas de las NPM tanto en polvo secadas mediante el procedimiento anterior como depositadas.

Medidas magnéticas de NPM en polvo

Estas muestras fueron medidas en un equipo `PPMS-14 T` (*Physical Property Measurement System*) de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo. Mide la imanación de las muestras hasta campos de 14 T en temperaturas comprendidas entre 1.9 y 400 K, lo que permite estudiar tanto las curvas $ZFC - FC$ como los ciclos de histéresis.

De los ciclos de histéresis se puede extraer la imanación de saturación de las nanopartículas, M_s. El valor de M_s obtenido experimentalmente para las NPM no alcanza los 92 $\mathrm{emu\,g^{-1}}$ típico a las muestras masivas debido a la mayor importancia de los defectos superficiales en el caso de las NPM [7]. Esta relevancia aumenta al disminuir el tamaño de las NPM como puede

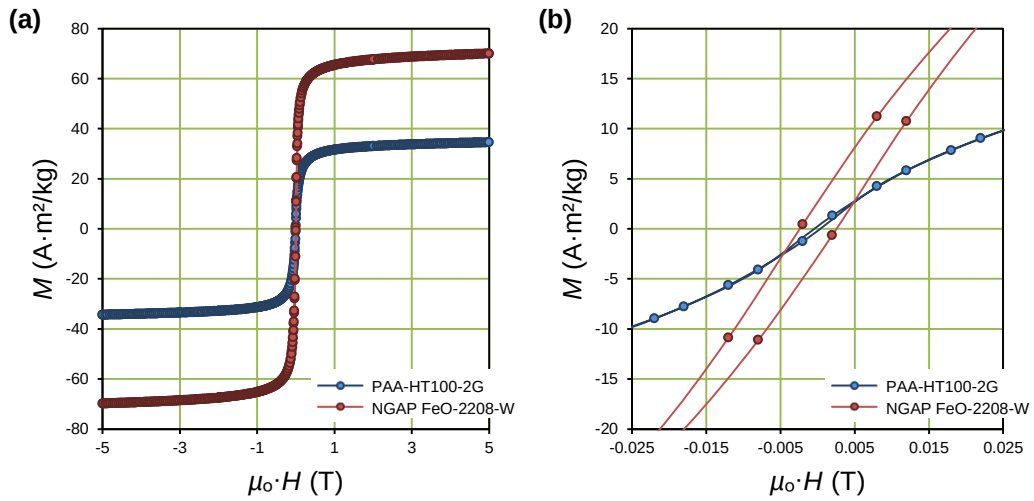

Figura 1.6: **(a)** Ciclos de histéresis de dos muestras de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas de ácido poliacrílico. **(b)** Detalle ampliado de las mismas curvas mostrando cómo la muestra FeO-2208-W presenta una pequeña coercitividad. La pequeña anchura del ciclo de la muestra NPM5.5 se puede atribuir al error experimental.

verse en la figura 1.8. Además, se puede comprobar en el gráfico ampliado, que las NPM de mayor tamaño presentan una coercitividad de 5 mT, un valor superior al del error experimental. El carácter superparamagnético de las muestras se evidencia estudiando las curvas *Zero-Field-Cooled, Field-Cooled* que se muestran en la figura 1.7. En la gráfica (b) se pone de manifiesto que algunas de las partículas NGAP FeO-2208-W (23.1 nm) están bloqueadas a 300 K. Por el contrario, la muestra NPM5.5 presenta las típicas curvas ZFC-FC que se superponen por encima de $T_B = 190$ K, indicando el estado superparamagnético a temperatura ambiente. En el cuadro 1.2 se muestran los parámetros optenidos de la caracterización magnética y estructural de las partículas: tamaño medio $< d >$, imanación a saturación M_s, susceptibilidad magnética inicial χ_i (obtenida como la pendiente del ciclo de histéresis para $H < 10$ Oe) y temperatura de bloqueo T_B.

Medidas magnéticas de NPM depositadas en papel

Para su detección con los sensores las NPM se depositan en papel secante y se dejan secar a temperatura ambiente. Ello permite manejar y posicionar las muestras de manera más fácil que en disolución o en polvo, y además su señal no se ve afectada por la contribución del diluyente. Por otro lado, este

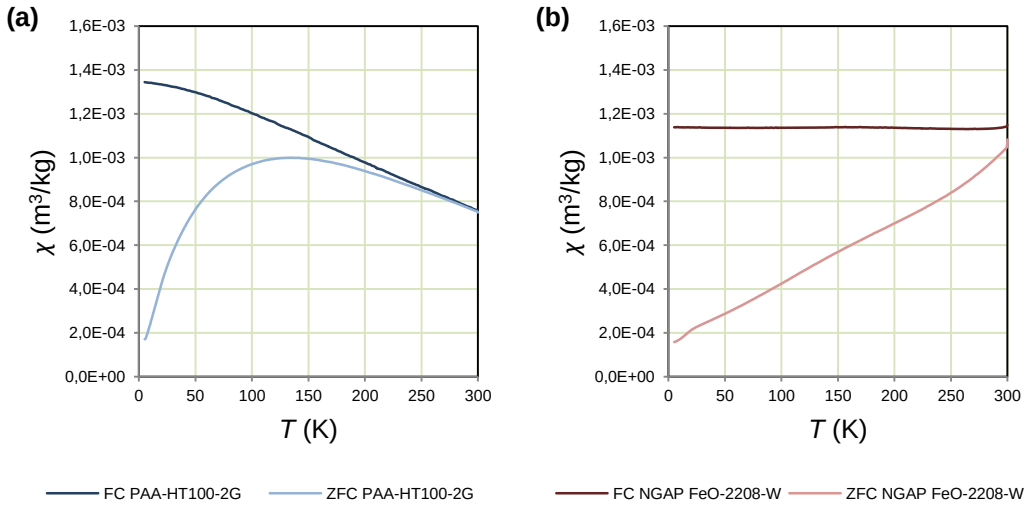

Figura 1.7: Curvas *Zero-Field-Cooled, Field-Cooled* de partículas de magnetita **(a)** NPM5.5 y **(b)** FeO-2208-W. Se observa que la temperatura de bloqueo de la segunda muestra está por encima de la temperatura ambiente.

	Muestra	$< d >$ (nm)	M_s (emu/g)	χ_i	T_B (K)
①	NPM4.6	4.6	38.3	500	183
②	NPM5.5	5.5	34.4	650	190
③	FeO-2204-W	10.5	37.7	800	143
④	PAA-CP	12.9	72.4	1000	200
⑤	PAA-HT	17.9	84.0	300	300
⑥	FeO-2208-W	23.1	59.5	765	350
⑦	SiMAG	2000	-	-	-

Cuadro 1.2: Propiedades magnéticas de distintas NPM.

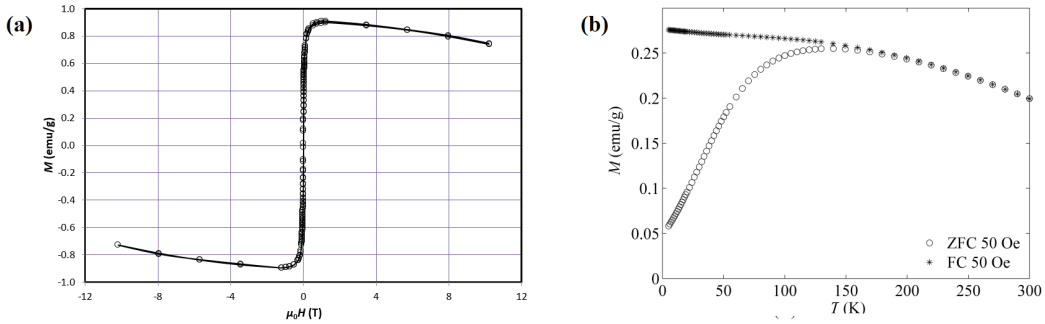

Figura 1.8: **(a)**Ciclo de histéresis de una muestra de 64 µm de NGAP FeO-2204-W depositada en un papel con $m \simeq 1$ mg. **(b)** Curvas *Zero-Field-Cooled, Field-Cooled*de la misma muestra, mostrando una temperatura de bloqueo en torno a 130 K.

sustrato es el más similar al de la aplicación biológica del objetivo final. Se obtuvieron mediante un magnetómetro SQUID hasta 10 T. Se depositaron volúmenes conocidos de ferrofluido sobre rectángulos de papel de dimensiones 10 mm × 2mm y espesor 20 µm. La masa de cada uno de estos soportes se encuentra en el rango 2-5 mg. A partir de los valores de concentración se calcula la masa de NPM depositada.

En la figura 1.8 se muestran tanto el ciclo de histéresis como las curvas FC-ZFC de un rectángulo de papel que incorpora 64 ± 10 % µg de las nanoesferas de magnetita NGAP FeO-2204-W. En la figura 1.8 **(a)** se observa la ausencia de histéresis, confirmando el superparamagnetismo de la muestra, y también cómo el ciclo de histéresis aparece "inclinado" respecto a los ejes. Esto se debe a la naturaleza diamagnética del papel, cuya imanación se opone al campo magnético aplicado. Corrigiendo la contribución diamagnética y expresando el valor de la imanación en función de la masa de NPM se obtiene que el valor $M_s = 55$ emu g^{-1}, muy próximo al dado por el fabricante en la hoja de características (50 emu g^{-1}). En la curva ZFC (figura 1.8 **(b)**) puede verse que la temperatura de bloqueo está en torno a 130 K, claramente por debajo de la temperatura ambiente.

1.4 Conclusiones

Se ha comprobado que a temperatura ambiente las nanopartículas magnéticas son estables en disolución acuosa y superparamagnéticas incluso depositadas en papel.

Capítulo 2
Aplicaciones biológicas de las NPM

El objetivo de esta tesis es usar nanoparticulas magnéticas (NPM) como etiquetas de sustancias biológicas para posteriormente cuantificarlas mediante un sensor magnetoimpeditivo (capítulo 3) o electromagnético (capítulos 4 y 5) En este capítulo se trata la modificación de la superficie de las NPM para que marquen específicamente una proteína en particular.

2.1 Conceptos básicos de biología

2.1.1 La célula

Una célula eucariota es el elemento de menor tamaño que se considera ser vivo, además de ser la unidad morfológica fundamental de los seres vivos pluricelulares, figura 2.1 (a). El tamaño de una célula humana varía entre entre 7 µm, como los hematíes, y 150 µm de los óvulos. En cualquier caso, este tamaño es al menos dos órdenes de magnitud mayor que el diámetro de las nanopartículas.

Membrana celular

Uno de los componentes de las células a tener en cuenta en el trabajo realizado es la membrana plasmática o celular. Consiste en una bicapa formada principalmente por fosfolípidos y glicolípidos que separa el espacio intracelular (o citosol) del mundo extracelular. Un fosfolípido es una molécula orgánica compuesta por dos ácido grasos y un grupo fosfato. Los fosfolípidos son unas moléculas anfifílicas, es decir, que están formadas por un extremo hidrofílico (el grupo fosfato) y otro hidrófobo (los ácido grasos). El extremo hidrófobo queda oculto en el interior de la bicapa, mientras que el extremo hidrofílico queda expuesto al exterior, esquematizado en la figura 2.1 (b).

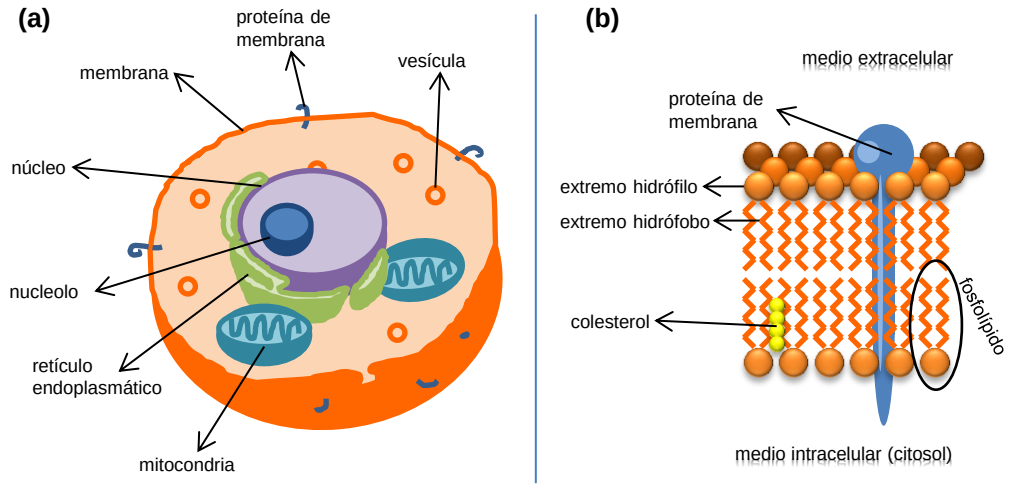

Figura 2.1: (a) Representación esquemática de una célula eucariota. (b) Estructura de una bicapa lípida.

Además de fosfolípidos, en una membrana también existen proteínas que forman parte de la misma. Estas proteínas pueden sobresalir a ambos lados de la membrana, participando en actividades fundamentales para el correcto estado de la célula, como canales, transportadores o receptores.

También existen membranas en el interior de las células que conforman sus distintos orgánulos, como el núcleo o las mitocondrias. Las membranas biológicas forman una doble capa continua de moléculas lípidas, cuyo espesor oscila entre los 5 y los 8 nm.

Una de las funciones de las membranas es permitir el paso de moléculas pequeñas sin carga, como por ejemplo el O_2, el CO_2, el N_2 y la molécula de agua H_2O. Pero también impide el paso de iones, moléculas polares grandes como proteínas, ácidos nucleicos y agentes externos.

Las membranas de la mayoría de las células no es rígida, aunque existe casos puntuales que sí lo son. Las membranas son flexibles y se pueden entender como un fluido, permitiendo que las proteínas de membrana se desplacen erráticamente por la membrana. Esta descripción es conocida como modelo del mosaico fluido. Esta posibilidad, unida a la flexibilidad de las membranas es necesario para uno de los mecanismos de intercambio de nutrientes, la **endocitosis**. La endocitosis es un proceso de incorporación de nutrientes al citosol,entre los que se incluye moléculas grandes o partículas. El proceso consiste en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana y se introduce en el citosol.

2.1.2 proteínas

Las proteínas son unas biomoléculas esenciales para los seres vivos, gracias a su versatilidad y especialización. Las proteínas realizan funciones estructurales (como el colágeno), inmunológica (anticuerpos), homeostática, enzimática... Están formadas por un gran número de unidades estructurales simples repetitivas, denominadas **aminoácidos**, unidas por entre sí por enlaces peptídicos. Los aminoácidos son moléculas compuestas por una cadena orgánica que posee un grupo amino (-NH_2) y un grupo carboxilo (-COOH). Además, las proteínas se pliegan formando una estructura tridimensional definida y esencial para su correcto funcionamiento. Dicha estructura es estable en parte debido a la interacción dipolar eléctrica entre dos o más fracciones polares de la proteína, por interacciones apolares de Van der Waals, o en ciertos casos por enlaces covalentes. El proceso conocido como "desnaturalización", consistentente en deshacer dicha estructura, impide el correcto funcionamiento de la proteína sin necesidad de haber roto los enlaces peptídicos entre los aminoácidos, es decir, sin haber cambiado la estructura química de la proteína.

Anticuerpos

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobinas, son un tipo de proteína sintetizados por un tipo de célula del sistema inmune denominado linfocito B, y cuya función esencial es identificar y neutralizar patógenos. Los anticuerpos son proteínas (150 kDa) y tienen generalmente forma similar a una "Y", compuestos por la denominada "cadena pesada" y dos "cadenas ligeras". En los extremos de las cadenas ligeras están las regiones sensibles. Idealmente, los anticuerpos reconocen una única entidad biológica, a la que se conoce como **antígeno** gracias a su región sensible. Un anticuerpo y su antígeno se unen gracias a interacciones débiles y no específicas, como los puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Walls u otras interacción electrostáticas. Es gracias a la complementación espacial a la que el enlace entre anticuerpos y sus antígenos es tan estable, como dos piezas que encajen de un puzzle. Los anticuerpos pueden existir de dos formas físicas, una forma soluble que los linfocitos segregan al torrente sanguíneo, y una forma enlazada a la membrana del propio linfocito. La alta especificadad de los anticuerpos los hace muy interesantes, ya que es posible obtener anticuerpos contra casi cualquier sustancia biológica.

Estreptavidina y Biotina

La **estreptavidina** es una proteína tetramérica (que tiene cuatro subunidades) sintetizada por la bacteria *Streptomyces avidinii*, cuya masa es de

52.8 kDa.

Se caracteriza por su elevada afinidad por la **biotina**, también conocida como vitamina H, una pequeña molécula que actúa como coenzima y toma parte en la síntesis de los ácidos grasos, entre otros. La constante de disociación, $K_d = 10^{-14}$ M, del complejo biotina-estreptavidina la muestra como una de las interacciones no-covalentes más fuertes que se conoce. Esta capacidad de unión se mantiene en condiciones extremas de pH, temperatura, disolventes orgánicos, desnaturalizantes, detergentes y peptidasas. Es precisamente esta propiedad la que hace que esta proteína sea muy usada en biología molecular y bionanotecnología.

Albúmina

La albúmina es una proteína (67 kDa) presente en el plasma de muchos mamíferos, así como en la clara de huevo. Se suelen clasificar por su origen, así por ejemplo, la albúmina obtenida de suero bovino se conoce como BSA por sus siglas en inglés (*Bovine Serum Albumni*). Es una proteína con carga negativa, y su función natural consiste en transportar iones positivos por el flujo sanguíneo, entre otras. En bioquímica se utiliza frecuentemente para bloquear superficies cargadas positivamente, como los pozillos de un ensayo ELISA o las tiras de flujo lateral (ver capítulo 5.1, página 77).

Enzimas

Las enzimas son una familia extensa de proteínas que pueden actuar como catalizadores moleculares, es decir, pueden unirse a varios ligandos a la vez que aceleran reacciones químicas entre ellos, pero sin alterarse la estructura de la propia enzima. A los ligandos de una enzima se les conoce como **sustratos**. A continuación se ponen dos ejemplos de reacciones enzimáticas:

- Fosfatasa alcalina, es una proteína responsable de eliminar los grupos fosfato de distintos tipos de moléculas o proteínas. Esta enzima es ampliamente utilizada en ensayos colorimétricos, en los cuales se produce un cambio de color. Uno de los posibles sustratos utilizados es el 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato (BCIP en lo sucesivo), que en presencia de la fosfatasa alcalina pierde su grupo fosfato convirtiéndose en 5-bromo-4-cloro-3-hidroxindol que posteriormente se oxida formando el dímero 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto que produce un color azul característico. Esta reacción enzimática se utiliza habitualmente en ensayos inmunocromatográficos y en preparaciones histológicas. En estos ensayos se marca la sustancia de interés con una

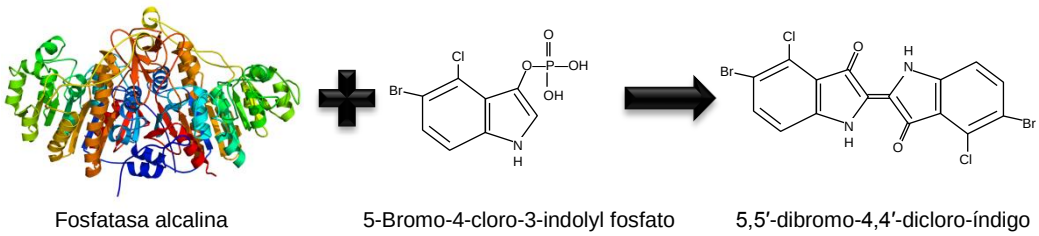

Figura 2.2: Reacción enzimática entre la fosfatasa alcalina y el BCIP.

inmunoglobina a la que previamente se le ha añadido la fosfatasa alcalina. Tras retirar el inmunoglobina que no se haya adherido a su antígeno, se añade el sustrato de la enzima, produciendo la reacción cromatográfica.

- Tripsina , es una enzima sintetizada en el páncreas y que interviene en la digestión. Una vez segregada en el intestino delgado se activa y cataliza la hidrólisis de los enlaces peptídicos de las proteínas ingeridas, degradándolas en péptidos (trozos de proteínas) más pequeños que pueden ser absorbidos por la mucosa intestinal y utilizados por otras células para generar nuevas proteínas. Sin entrar en detalles, la tripsina es utilizada habitualmente para despegar cultivos celulares que crecen pegados a superficies, ya que degrada las proteínas con las que las células se adhieren a la superfiecie.

2.2 Marcaje celular con NPM

Una de las aplicaciones más utilizada de las NPM es el marcaje celular. Se lleva utilizando décadas para separar magnéticamente las células deseadas en cultivos *in vitro* , proceso conocido como magnetoforesis [5]. En es esta sección se marcará un tipo celular concreto, HeLa, que expresan MICA en su superficie, una proteína de membrana de interés inmunológico.

2.2.1 MIC-A, ligando NKG2D

El NKG2D humano es un receptor transmembrana expresado principalmente en células del sistema inmunitario humano, como las células NK y los glóbulos blancos T [8]. Cuando un receptor NKG2D de una célula reconoce su ligando se inician distintas vías de señalización [9] que modulan la respuesta del sistema inmune. Uno de los posibles ligandos es la proteína de membrana **MICA** (*MHC class I chain-related gene A*). Esta proteína no se expresa en la mayoría de las células pero existe frecuentemente en tumores epiteriales y su expresión puede ser inducida por infecciones virales o bacterianas. MICA está relacionado con la propagación tumoral, la existencia de infecciones y enfermedades autoinmunes.

Debido al interés clínico del receptor NKG2D, se realizaron pruebas *in vitro* de marcaje de células que expresen su ligando MICA usando nanopartículas magnéticas como marcadores. Las NPM fueron conjugadas a un anticuerpo específico anti MICA y se probó la funcionalidad del complejo NPM@α-MICA usando dos líneas celulares como objetivo, las células HeLa (MIC-A positivas, es decir, que expresan MICA) y las células HL60 (MICA negativas).

Células HeLa

Las células HeLa constituyen una línea de células epiteliares humanas procedentes de un carcinoma cervical. De hecho, son las primeras células humanas de las cuales se estableció una línea celular permanente. Las células humanas sufren efectos de envejecimiento, conocido como senescencia celular. Las sucesivas multiplicaciones de las células provoca que su ADN se vuelva inestable y a veces que se formen toxinas. Esto provoca que las células sean incapaces de replicarse, o dividirse, nuevamente por lo que las células mueren. Esto es llamado muerte celular programada o apoptosis. Las células HeLa, bajo las condiciones adecuadas, son una línea celular inmortal, pueden dividirse indefinidamente. Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular a lo largo de las generaciones.

Además, son muy resistentes, fáciles de cultivar, almacenar y enviar, lo que les convierte en muy populares.

Las células HeLa expresan MICA en su superficie [10], a la vez que también producen MICA soluble, expresado en la superficie de exosomas, lo que parece ser anula la respuesta inmunológica [11]. Esta línea celular crece adherida a superficie y para conseguir su proliferación ha de ser cultivada en una estufa a 37ºC y 5 % de atmósfera de CO_2. El medio necesario para su crecimiento es el *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM en lo sucesivo, con un 10 % de albúmina y un 1 % de antibiótico.

Células HL60

Al contrario que las HeLa, estas células crecen en suspensión y no expresan MICA en su superficie, por lo que se usarán como evidencia de la especifidad de las NPM funcionalizadas. La línea celular HL60 fue obtenida a partir de una paciente enferma de leucemia aguda, y son unas células que requieren gran cantidad de nutrientes específicos, incluyendo insulina y transferina, por lo que el medio para cultivarlas también es diferente. Es necesario utilizar el medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*, RPMI en lo sucesivo, suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS) y un 1 % de antibiótico. Han de ser cultivadas en una cultivadora de cultivos celulares a 37ºC y 5 % de CO_2.

2.2.2 Materiales y métodos

Funcionalización de las NPM

Para separar magnéticamente las células se utilizaron nanopartículas de magnetita de 10 nm de diámetro medio, recubiertas de ácido polyacrílico y dispersa en agua (`Nanogap SL FeO-2204W`). Las partículas comerciales, están recubiertas de grupos carboxílicos, por lo que han de ser convenientemente funcionalizadas para que se unan específicamente a la proteína deseada. La funcionalización es un proceso que tiene lugar en varios pasos, y están detallados en la página 99. Por claridad, a continuación se presentan los distintos códigos para referirse a las NPM en cada paso del procedimiento:

- NPM@COOH. Son las nanopartículas comerciales sin modificar, especificando la presencia de grupos carboxílicos en la superficie de las mismas, debido al recubrimiento del ácido poliacrílico.

- NPM@Strep. Son las nanopartículas recubiertas de estreptavidina.

- NPM@α-MICA. Son las nanopartículas funcionalizadas contra la proteína MICA.

Las nanopartículas se recubrieron, como paso intermedio, de estreptavidina (`Sigma-Aldrich 85878`) que, al ser una proteína, se puede unir a superficies que contengan grupos amino (-NH2). Sin embargo las nanopartículas de magnetita presentan en su superficie grupos carboxílico (-COOH). Es necesario por tanto modificar la superficie de las nanopartículas antes de añadir la proteína. Para modificar la superficie se usó 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, EDC en lo sucesivo (`Sigma-Aldrich 39391`). La EDC se trata de una carbodiimida soluble en agua ampliamente utilizada en procesos de conjugación de proteínas. Funciona reaccionando con los grupos carboxílico formando un grupo amino altamente reactivo que en presencia de la proteína forma un enlace amida estable. Aquellos grupos amino que no se enlacen se disuelven formándose nuevamente grupos carboxílico en la superficie.

Las partículas recubiertas de estreptavidina, NPM@Strep, son muy versátiles, pudiéndo ser conjugadas a cualquier otra sustancia que esté biotinilada. Siguiendo con la intención de marcar específicamente las proteínas de membrana MICA, se añadió un anticuerpo biotinilado α-MICA (`R&D Systems BAF1300`) mediante la unión biotina-estreptavidina. Una vez realizada cada unión, pasos (b) y (c) de la figura 2.3, se realizaron distintos lavados magnéticos de la disolución para eliminar todo reactivo sobrante de la reacción. A los sobrenadantes se le realizaron estudios de espectroscopía de ultravioleta-visible `Perkin Elmer Lambda 900` para determinar si las conjugaciones se habían realizado correctamente, ya que las proteínas absorven radiación ultravioleta centrada en 280 nm.

Marcaje celular

Los protocolos detallados del marcaje celular están descritos en la página 100, aquí se comentan cualitativamente.

El protocolo para marcar las células HeLa está escalado para *flasks* de 25 cm^2, y se recomienda realizar el marcaje cuando las células ocupen aproximadamente el $75-80\,\%$ de la superficie del recipiente. Esta recomendación es debida a que cuando la confluencia celular es elevada, las células se "amontonan", quedando algunas células menos expuestas al medio, impidiendo que las NPM puedan marcarlas eficientemente.

Como las células HeLa emiten exosomas que llevan MICA[11], es necesario retirar el medio antes de iniciar el marcaje, y es recomendable lavar las células varias veces con PBS. Una vez retirado el medio, se añaden las nanopartículas dispersas en medio nuevo. Si bien cuando se quiere que las

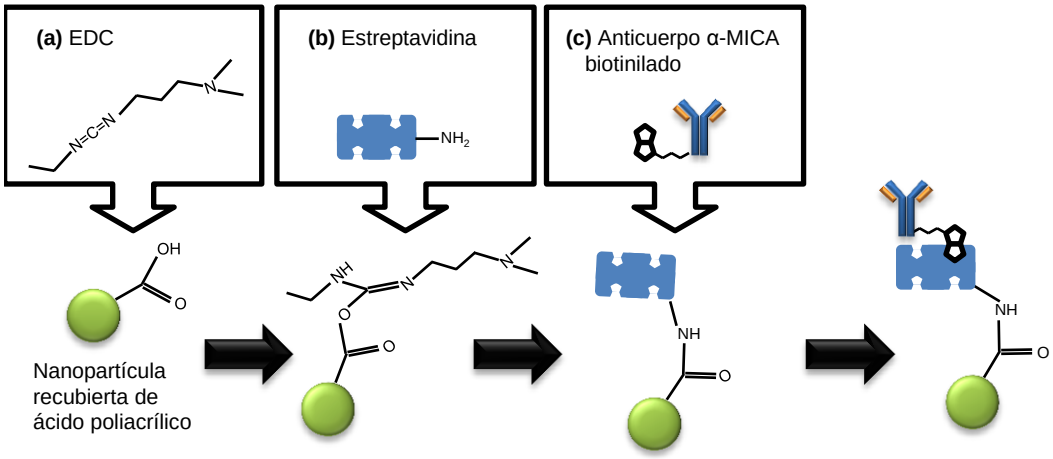

Figura 2.3: Esquema de los pasos de la funcionalización **(a)** Modificación de la superficie de las NPM con EDC, **(b)** enlace amida entre la estreptavidina y la superficie activada de las nanopartículas, **(c)** conjugación estreptavidina-biotina.

células se reproduzcan se añade un volumen de medio suficiente para facilitar nutrientes a las células durante más de 24 horas, en este caso no es necesario y hasta podría ser contraproducente. Es recomendable añadir únicamente 3 o 4 mL de medio, lo justo para cubrir todo el cultivo, incluyendo la cantidad deseada de NPM. La conjugación se realizó durante 15 minutos en el interior de la incubadora. Tras acabar el tiempo de conjugación sólo queda retirar las nanopartículas que no estén adheridas a las células.

El hecho que las células HeLa crezcan adheridas a la superficie de los recipientes es muy útil para descartar que en la muestra final haya NPM que no estén marcando las células. Sin embargo, para observar la movilidad magnética de las células es necesario despegarlas. La enzima tripsina (sección 2.1.2) rompe las proteínas con las que las células se adhieren a las superficies. Sin embargo, esta reacción no es específica para ese tipo de proteínas, si no que otras proteínas también pueden ser seccionadas por la tripsina. Esto incluye a la proteina de membrana MICA, el anticuerpo y la estreptavidna de las NPM. Para evitar degradar el marcaje de las células por las NPM, el tiempo que la tripsina esté actuando ha de ser el mínimo necesario para despegarlas. La acción de la tripsina se puede detener añadiendo nuevo medio, que al incluir nutrientes y antibiótico, la neutralizan.

Para marcar las células HL60 con las NPM se ha de seguir un protocolo diferente, ya que esta línea celular crece en suspensión. El primer paso nece-

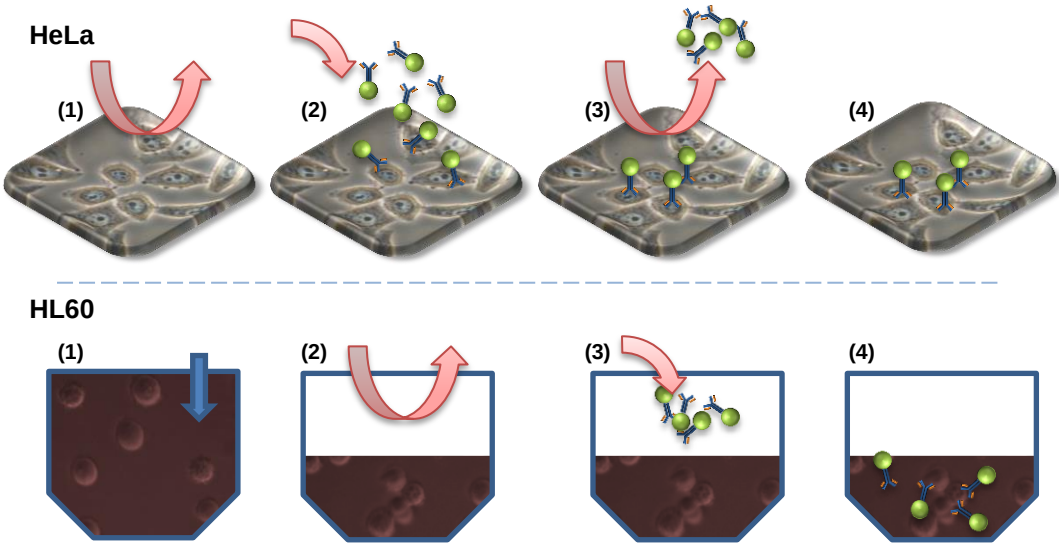

Figura 2.4: Esquema de los pasos de conjugación para las dos líneas celulares. **Células HeLa (1)** Retirar el medio, **(2)** añadir las NPM y conjugar durante 15', **(3)** retirar el medio, quedando únicamente las NPM que marquen las células **(4)**. **Células HL60 (1)** Centrifugar, **(2)** retirar parte del medio y redispersar las células, **(3)** añadir las NPM y conjugar durante 15', en este caso no se retiran las NPM que no estén marcando las células **(4)** .

sario es centrifugar las células para llevarlas a una mayor concentración, ya que si el volumen en el que están dispersas las células es demasiado grande la eficiencia del marcaje estaría comprometida. Se retira casi todo el medio de cultivo, dejando un volumen aproximado de 3 mL en el que se redispersan las células. A continuación se añaden las NPM y se dejan conjugar durante 15 minutos. En este caso, no se separaron las NPM libres de las NPM marcadoras, pero al ser una prueba para demostrar que las NPM no marcan inespecíficamente, es innecesario.

Micrografía y movilidad celular

Una vez retiradas las nanopartículas que no marquen las células, y separadas éstas del frasco, se llevan las células a una placa de Petri para observarlas a través de un microscopio óptico invertido. Para comprobar que efectivamente las nanopartículas están marcando las células se aplica un campo magnético con ayuda de un imán de NdFeB para atraer las nanopartículas, que a su vez arrastran las células a las que están enlazadas. Las nanopartículas no se observan en el microscopio óptico puesto que son demasiado pequeñas para su límite de resolución. Pero sí que se observa cómo las células se desplazan siguiendo el campo magnético aplicado. Se utilizaron dos microscopios ópticos distintos, un microscopio óptico invertido `Zeiss` y un microscopio óptico `Bresser BioLux NV` con cámara de vídeo incorporada.

2.2.3 Resultados y discusión

Estudio de la funcionalización de las NPM

El protocolo de funcionalización fue adaptado a partir de otros presentes en la bibliografía para estas NPM y anticuerpo. Para determinar los parámetros del protocolo (volumen y concentración de reactivos, tiempo de conjugación,...) los sobrenadantes fueron sistemáticamente analizados mediante espectrocopía UV-visible hasta encontrar la cantidad máxima de estreptavidina que se puede incorporar en la superficie de las NPM. Por otro lado, mediante microscopía óptica se analizó que no se formaron conjugados demasiado grandes, lo que implicaría un desperdicio de estreptavidina que no realizaría su función debido a impedimentos estéricos.

Por espectroscopía de infrarrojo de las NPM@COOH y las NPM@Strep se observa cómo se ha modificado la superficie de las nanopartículas. En la curva azul de la figura 2.5 se obsevan las bandas características del ácido poliacrílico en las NPM@COOH. En la curva roja aparecen las bandas de absorción relacionadas con la presencia de proteínas, como la banda de ami-

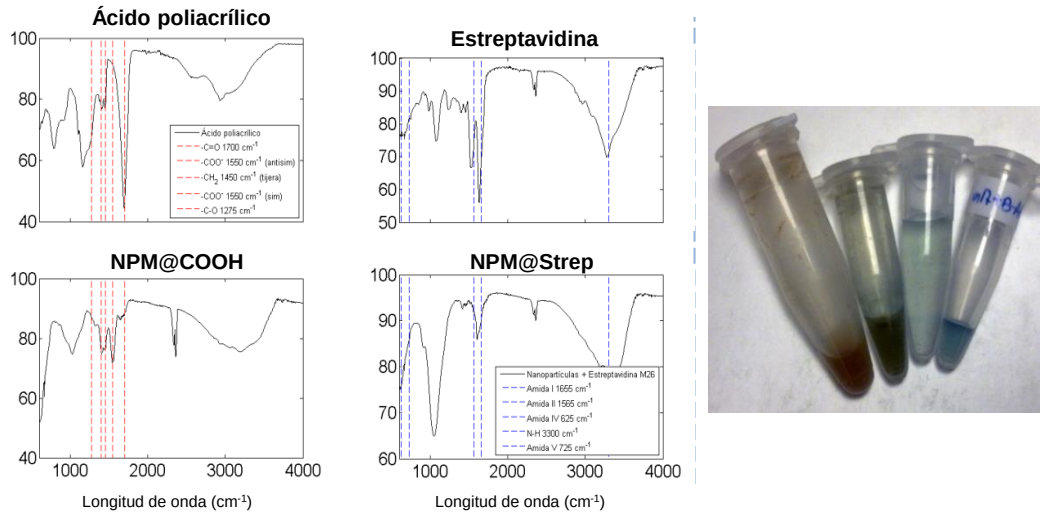

Figura 2.5: Espectros de FTIR. A la derecha una fotografía de distintas muestras de NPM@Strep tras haberse realizado la prueba enzimática.

nas a 3 300 cm^{-1} y las bandas amida I y amida II a 1 565 y 1 665 cm^{-1}, respectivamente. La espectroscopía de FTIR confirma la presencia de estreptavidina en la superficie de las NPM, pero no asegura que la misma no se haya degradado durante el proceso de funcionalización. Un momento crítico de la conjugación es el proceso de separación en el que se añade ácido clorhídrico a la muestra, ya que un exceso de acidez puede provocar que la estreptavidina se desnaturalize. Los análisis FTIR, DLS o por espectrocopía UV de los sobrenadantes pueden confirmar que la estreptavidina está, pero no pueden asegurar su funcionamiento correcto.

Para comprobar el correcto estado de la estreptavidina se realiza una prueba enzimática con una pequeña alícota del producto obtenido. Se realiza una rápida prueba enzimática utilizando fosfatasa alcalina biotinilada (B-AP) y su sustrato BCIP (página 22). Primero se estima numéricamente el número de estreptavidinas máximo presente en la muestra de NPM@Strep y se añade en exceso B-AP, tenidendo en cuenta que cada estreptavidina tiene 4 puntos de unión de biotina. Tras un corto periodo de agitación para que tenga lugar la unión biotina-estreptavidina se realizan varios lavados magnéticos, retirando toda la fosfatasa alcalina que no estuviera en la superficie de las NPM. Tras añadir el sustrato se comprueba cualitativamente que la estreptavidina sigue funcional a pesar de haber usado ácido.

Tras añadir el anticuerpo biotinilado se finaliza la funcionalización de las NPM. Se comprueba mediante UV que no haya anticuerpo en el sobrenadante Al producto obtenido, NPM@α-MICA, se le mide su radio hidrodinámico por

Tipo de NPM	HeLa (MICA +)	HL60 (MICA -)
NPM@COOH	NO	NO
NPM@Strep	NO	NO
NPM@α-MICA	SÍ	NO

Cuadro 2.1: Conjugación de cada línea celular con las diferentes NPM.

DLS.

Estudio del marcaje celular específico

Aunque se ha demostrado que las NPM de magnetita pueden ser internalizadas inespecíficamente por distintos tipos celulares, el tiempo necesario es de varias horas [12, 13]. Si embargo, los protocolos de marcaje fluorescente habituales requieren tiempos de marcaje de únicamente unos minutos. Es por eso que, en este trabajo, sólo se ha permitido que las NPM funcionalizadas y sin funcionalizar estuvieran 15 minutos en presencia de las células, para evitar, o al menos reducir, la captura inespecífica. Se realizó el proceso con dos líneas celulares, como ya se dijo, y se repitió el proceso con las nanopartículas magnéticas teniendo tres diferentes recubrimientos.

Tras el protocolo de conjugación, se inspeccionó la movilidad magnética con ayuda de un microscopio óptico. Las células fueron separadas magnéticamente en dos grupos o fracciones al aproximar un imán a la placa de Petri: una fracción positiva o marcada magnéticamente, y otra fracción negativa o no marcada magnéticamente. La figura 2.6 muestra el desplazamiento de distintas células HeLa. En la versión online del artículo [14] se dispone de un vídeo mostrando el desplazamiento celular. Enlace al vídeo: http://goo.gl/Qw9iOQ (se inicia la descarga de un archivo de 20 MB).

En el cuadro 2.1 se muestran los resultados que pueden resumirse en que únicamente las células HeLa marcadas con las partículas conjugadas con un anticuerpo específico, NPM@α-MICA, han sido marcadas durante el protocolo. No se consiguieron fracciones positivas en el resto de casos, ya fuera intentando marcar las células HeLa con NPM@COOH o las NPM@Strep, o cualquier NPM para la línea celular HL60.

Por último se inspeccionó por microscopía electrónica de transmisión el marcaje de las células HeLa por NPM@α-MICA. Para ello tanto las fracciones positiva y negativa fueron preparadas para microscopía, y en la figura 2.7 se pueden observar ambas. El protocolo de fijación de las células para microscopía electrónica fue adaptado a partir del artículo [15]. Es de destacar que el estudio por TEM evidencia que las NPM@α-MICA son internalizadas en el

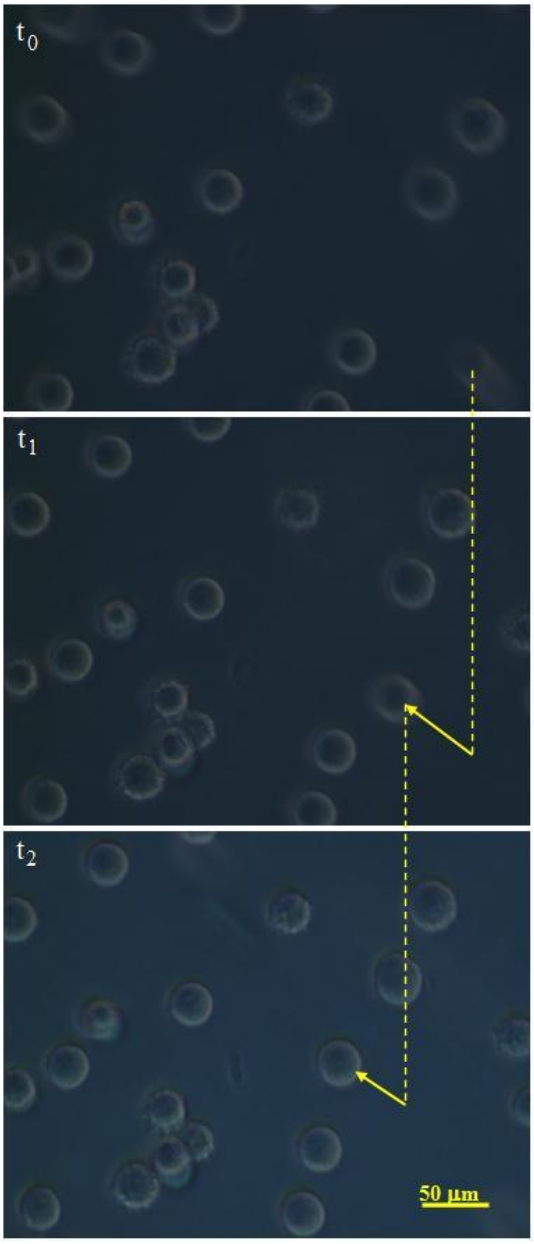

Figura 2.6: Movilidad celular bajo la acción de un campo magnético.

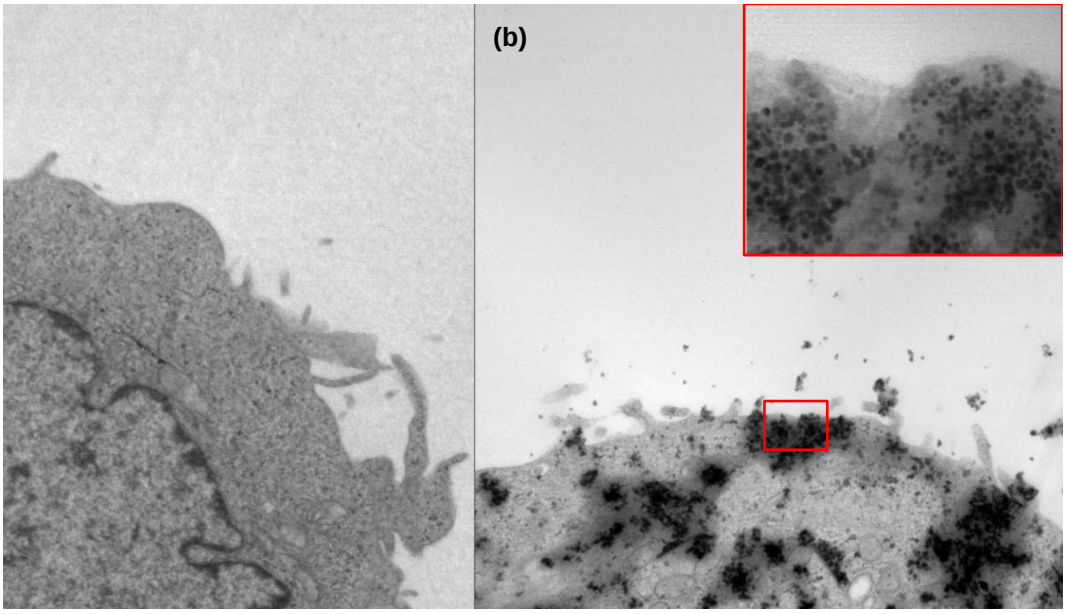

Figura 2.7: TEM de células HeLa, **(a)** fracción negativa a 20 000×, **(b)** fracción positiva a 25 000×, incluyendo un detalle a mayor aumento 300 000×.

interior de las células HeLa. Como el anticuerpo α-MICA está específicamente dirigido contra una membrana de proteína, se propone la endocitosis como mecanismo de internalización de las mismas. El protocolo de preparación para TEM (página 101) requiere varias horas, por lo que no se puede asegurar que las partículas hayan sido internalizadas en los 15 minutos del protocolo de conjugación. En cualquier caso, el objetivo era demostrar la posibilidad de marcar específicamente un cultivo celular.

2.3 Conclusiones

En el presente capítulo se han funcionalizado nanopartículas magnéticas de 10 nm con un anticuerpo frente a la proteína MICA. Se ha comprobado que este conjugado NPM@α-MICA marca específicamente las células que expresan dicha proteína en su membrana, y que un periodo de conjugación de sólo 15 minutos es suficiente para conseguir un marcaje exitoso. Se ha analizado la presencia de nanopartículas magnéticas en las células observando la movilidad de las mismas bajo la acción de un campo magnético externo, y se ha comprobado por microscopía electronica que las nanopartículas son internalizadas por las células.

Capítulo 3
Cintas magnetoimpeditivas

En este capítulo se describen los esfuerzos realizados para detectar las Nanopartículas Magnéticas (NPM) usando para ello un sensor basado en materiales magnetoimpeditivos. La **magnetoimpedancia gigante**, o GMI, fue descrita por primera vez por L.V. Panina y K. Mohri en aleaciones amorfas metálicas en el año 1994 [16]. Una descripción completa de la misma, y de sus aplicaciones se puede encontrar en el extenso review de M.H. Phan y H.X. Peng [17]. En 2005 se propusieron sensores basados en GMI aplicados a la detección de micropartículas ferromagnéticas [18] o micropartículas superparamagnéticas [19]. Este tipo de sensores ha sido capaz de detectar NPM fluyendo a través de microcanales sobre el elemento sensor [20],

3.1 ¿Qué es la magnetoimpedancia?

Para empezar el capítulo se definirán, con la intención de dejar aclarada la nomenclatura, las variables implicadas.

3.1.1 Definición

La impedancia eléctrica es la oposición que presenta un circuito a una corriente alterna cuando se aplica una tensión. Es una extensión del concepto de resistencia eléctrica al caso de la corriente alterna, y su principal diferencia respecto a ésta es que es un número complejo, $Z = |Z| \exp(i\varphi)$.

La magnetoimpedancia gigante, se puede definir como la variación relativa de la impedancia de un material ferromagnético causada por un campo magnético. Se suele expresar como una variación del valor de la impedancia a un campo determinado, $Z(H)$, respecto al valor de la impedancia cuando el campo magnético aplicado es un valor preestablecido, o campo magnético de referencia H_{ref}. Como la impedancia es una variable compleja, se puede definir la GMI como la variación, en tanto por ciento, de su módulo o de su

fase:

$$GMI_{|Z|}(H) = \frac{\Delta|Z|}{|Z|}(H) = \frac{|Z|(H) - |Z|(H_{\text{ref}})}{|Z|(H_{\text{ref}})} \times 100\ (\%)\ , \tag{3.1}$$

$$GMI_{\phi}(H) = \frac{\Delta\phi}{\phi}(H) = \frac{\phi(H) - \phi(H_{\text{ref}})}{\phi(H_{\text{ref}})} \times 100\ (\%)\ , \tag{3.2}$$

siendo mucho más frecuente encontrar la ecuación 3.1 en la literatura. El valor más habitual de H_{ref} suele ser un campo suficientemente intenso como para saturar magnéticamente el material, o campo de saturación, H_{sat}. Sin embargo, en otros textos se usa como valor de referencia $H = 0$ en su lugar. Esta última definición no es apropiada cuando $Z(0)$ depende del estado de remanencia magnética, algo que ocurre en las cintas magnetoimpeditivas usadas en este trabajo, así que en lo sucesivo $H_{\text{ref}} = H_{sat}$.

La magnetoimpedancia depende de varios parámetros, como la frecuencia de la corriente alterna que circula por el conductor (f), la conductividad eléctrica (σ) y permeabilidad magnética del mismo (μ). Otros factores externos, entre los que se encuentran la temperatura y la tensión o torsión aplicada también pueden influir en el valor de GMI. Esta dependencia se explica en gran medida por el efecto pelicular, ya que la impedancia es inversamente proporcional a la **profundidad de penetración** δ_m:

$$Z \propto \frac{1}{\delta_m}\ . \tag{3.3}$$

El efecto pelicular es la tendencia de la densidad de corriente alterna a concentrarse en la superficie de un conductor, y la profundidad de penetración se define como la profundidad a la que el valor de la densidad de corriente disminuye un factor $1/e$. Al aplicar un campo magnético se modifica la estructura de dominios de la cinta y en consecuencia la permeabilidad magnética transversal μ_{T} cambia, lo que produce una variación de la profundidad de penetración y por lo tanto modifica la impedancia. En la figura 3.1 se representa esquemáticamente cómo varía la profundidad de penetración en un medio magnético con geometría rectangular. El valor de δ_m se puede calcular con la ecuación 3.4.

$$\delta_m = \frac{c}{\sqrt{4\pi^2 f \sigma \mu_T}}\ , \tag{3.4}$$

donde c es la velocidad de la luz, f es la frecuencia de la corriente alterna que circula por el material, σ es la conductividad eléctrica del mismo y μ_T es la permeabilidad magnética transversal de la cinta.

Un ejemplo de magnetoimpedancia gigante se puede observar en la figura 3.2, en donde se muestra cómo varía el módulo de la impedancia $|Z|$ en función del campo aplicado H y su correspondiente curva de magnetoimpedancia, $GMI_{|Z|}$, calculada a partir de la ecuación 3.1, para el caso de una cinta amorfa de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$.

3.1.2 Fabricación de materiales magnetoimpeditivos

La GMI se describió por primera vez en hilos metálicos amorfos [16] y en algunos materiales nanocristalinos [21]. En general, los materiales magnetoimpeditivos tienen baja resistividad eléctrica, ρ, y son magnéticamente blandos. Los materiales amorfos y los nanocristalinos destacan al tener muy poca anisotropía cristalina. En la actualidad existen distintos tipos de materiales magnetoimpeditivos, entre los que destacan los microhilos y cintas amorfas fabricados por enfriamiento ultrarrápido, o las láminas delgadas fabricadas por técnicas de deposición.

Rueda de enfriamiento ultrarrápido

Existen diversos métodos de fabricación de materiales amorfos, entre ellos la rueda de enfriamiento ultrarrápido, o *melt-spinning*, que fue el utilizado para la fabricación de las cintas amorfas estudiadas en este trabajo. El sistema fue diseñado por Chen y Miller [22], y consiste en un horno de inducción donde se funde el material del que se desea hacer la cinta y una rueda metálica, normalmente de cobre, que al poseer mucha más masa que el fundido y tener una gran conductividad térmica actúa como foco frío. La figura 3.3 muestra una fotografía de la rueda en la que se fabricaron las cintas usadas. El compuesto a fundir se sitúa en un crisol de vidrio o cuarzo, que se introduce en el interior del horno de inducción. Una vez alcanzada la temperatura de fusión y, con ayuda del flujo de un gas inerte, se derrama el líquido sobre la rueda que se encuentra girando a decenas de revoluciones por segundo.

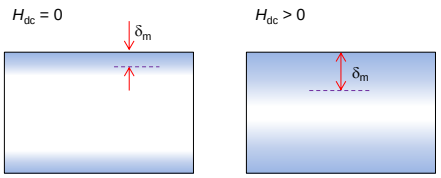

Figura 3.1: Representacion de la profundidad de penetracion en cintas al aumentar el campo magnético aplicado H_{dc}.

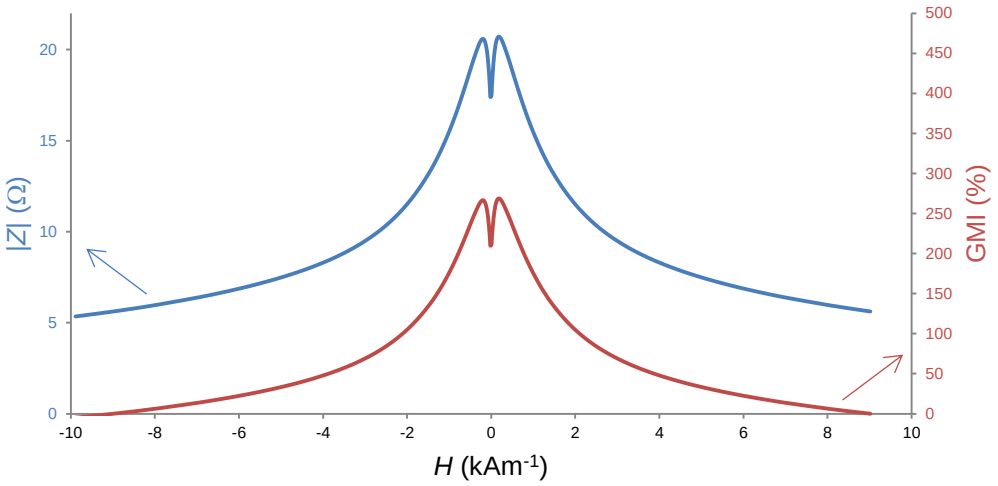

Figura 3.2: Variación de la impedancia (azul) y magnetoimpedancia (rojo) de una cinta amorfa de $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ medida con una corriente alterna de amplitud 500 mV y frecuencia 10 MHz.

Al entrar en contacto con la rueda se produce la solidificación rápida conservandose la misma estructura que cuando estaba en la fase líquida, motivo por el cual a los materiales fabricados por esta técnica se les conoce también comocomo vidrios metálicos. Las velocidades de enfriamiento que se alcanzan son del orden de 10^6 K s^{-1}.

La calidad y la amorficidad de la cinta están determinadas por la anchura y longitud de la rendija del crisol, la velocidad de la rueda de Cu, las condiciones de vacío y la presión del gas inerte en la inyección de la aleación fundida. Controlando estos parámetros se pueden conseguir cintas amorfas con distinta geometría (espesor y anchura), que a su vez influye en otras propiedades, como la resistencia eléctrica de la misma.

3.1.3 Sensibilidad de un sensor basado en GMI

La forma más extendida para estudiar la sensibilidad de un sensor basado en magnetoimpedancia es la definicion 3.1 (página 36). Es evidente que para evaluar la sensibilidad, cuanto más cambie la propiedad medida (en este caso la impedancia) respecto a su valor inicial mayor será su sensibilidad. Sin embargo, esta manera de estudiar la sensibilidad no es la más adecuada cuando se desea detectar NPM que producen un campo magnético órdenes de magnitud menor que el campo de saturación H_{sat}. Por este motivo, y para poder comparar la capacidad de detección de las NPM por distintas

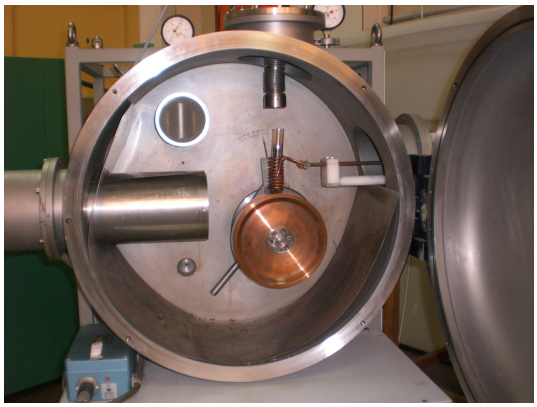

Figura 3.3: Rueda de enfriamiento ultrarrápido en la que se fabricaron las cintas amorfas.

cintas amorfas se usará presferentemente la pendiente como definición de sensibilidad:

$$m = \frac{\Delta X}{\Delta H} \tag{3.5}$$

donde X se puede referir tanto al módulo $|Z|$ como a la fase de la impedancia ϕ.

En la figura 3.2 se observa que la pendiente no es constante para cualquier valor de campo, si no que existen máximos y mínimos en los que la pendiente, y por tanto la sensibilidad a campos débiles, es nula. Además, en la mayoría de las cintas magnetoimpeditivas estudiadas se observa que para campos cercanos a cero la pendiente es casi horizontal, es decir, la sensibilidad es mínima en torno a $H = 0$.

3.1.4 Medida de Magnetoimpedancia

La obtención de las curvas de magnetoimpedancia de las cintas magnéticas requiere medir su impedancia eléctrica en función del de un campo magnético aplicado. Durante el transcurso de esta tesis la impedancia fue medida primero mediante el método $I - V$, y posteriormente usando un analizador de impedancias.

Método $I - V$

El método $I - V$ consiste en calcular la impedancia de un elemento a partir de la medida simultanea de la corriente que pasa a traves de ese elemento y de la caída de potencial en sus bornes. Para ello se coloca una resistencia patrón de valor conocido en serie con el elemento a examinar y se mide

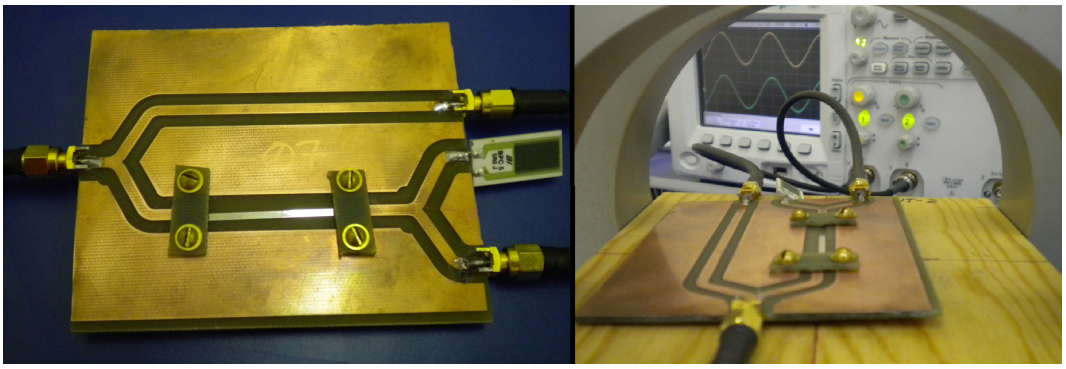

Figura 3.4: Fotografía del portamuestras utilizado (izquierda) y ya colocado en el interior de la bobina de Helmholtz (derecha)

la caída de voltaje en bornes de esta resistencia (para calcular la intensidad de corriente) y la caída de potencial en bornes de ambos elementos. El dispositivo experimental consta de:

- Generador de funciones `Tabor WW5061`, como fuente de alimentación del circuito $I - V$.
- Osciloscopio `Agilent DSO6012A`, donde se recogen las señales V_1 y V_2.
- Ordenador para control automático y adquisición de datos.
- Portamuestras impreso en PCB.

Analizador de impedancias

El método anterior estaba limitado por la máxima frecuencia de onda sinusoidal que podía generar el `Tabor WW5061`. Para poder medir la magnetoimpedancia a frecuencias más elevadas se utilizó un analizador de impedancias `Agilent 4294A`, con un rango de frecuencias entre 40 Hz y 110 MHz, intensidades de corriente entre 0.2 y 20 mA y amplitudes de voltaje entre 5 y 500 mV. La precisión del analizador está entre el 2 y el 4 %, dependiendo de los parámetros de la medida.

Para evitar cualquier efecto que el campo magnético producido por las bobinas de Helmholtz tengan sobre el equipo, se utilizó el adaptador de 1 m de longitud `Agilent 16048B`, que usa conectores SMC y permite medidas hasta 30 MHz, y el conector `Agilent 16048G`, que usa conectores BNC y permite alcanzar la frecuencia máxima del analizador, 110 MHz.

El último elemento, y al igual que en el método $I - V$ es un **portamuestras** diseñado según las necesidades del experimento. En la figura 3.4 se observa el portamuestras utilizado para medir la GMI de las cintas amorfas y nanocristalinas del trabajo . El analizador permite compensar la aportación de los conectores y pistas para trasladar el plano de referencia lo más cerca posible a la muestra y así reducir las impedancias parásitas.

Medida del campo magnético

Se utilizaron unos carretes de Helmholtz para producer el campo magnético sobre la cinta. Estos se alimentaron con una fuente `Agilent 6653A` de corriente continua, y para obtener los valores de campo negativo se añadió un relé para cambiar el sentido de paso de la corriente por los carretes. La corriente de alimentación de los carretes de Helmholtz fue medida mediante un multímetro digital `Agilent 34410A` y por software, usando la constante de calibración de los carretes, se calcula el valor del campo aplicado.

Con este equipo experimental es posible medir las curvas de magnetoimpedancia de las muestras para distintas frecuencias, como la superficie mostrada en la gráfica 3.5.

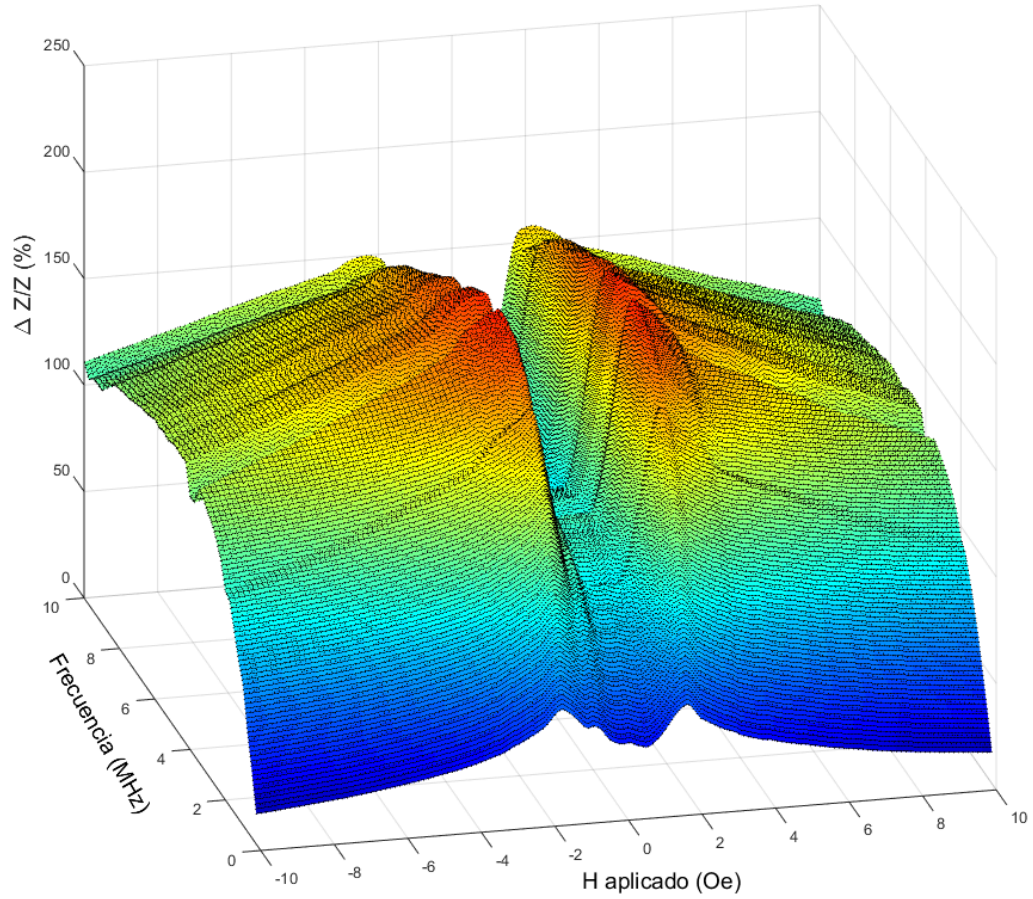

Figura 3.5: Detalle de la variación de la impedancia Z de una cinta amorfa de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ en función del campo magnético aplicado H y la frecuencia f.

3.2 Desplazamiento de GMI

En esta sección se mostará cómo modificando la estructura cristalina de una cinta magnetoimpeditiva se puede conseguir controlar la forma de la curva de magnetoimpedancia. Estudios anteriores [23] evidenciarion que las cintas amorfas de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ tienen un valor elevado de GMI, aunque sus curvas presentan una región "plana" en torno a campo nulo [24]. Esta característica es frecuente en la mayoría de los materiales amorfos. E implica una baja sensibilidad a la hora de medir campos débiles. La estrategia convencional para subsanar este problema es aplicar un campo magnético externo de manera que se realicen las medidas en una región de campo óptima. Como inconveniente, el uso de este H implica un aumento del consumo energético del sensor y de su complejidad. Trabajo anteriores mostraron que una cristalización parcial de cintas amorfas de base cobalto pueden producir un desplazamiento horizontal de los ciclos de histéresis y de las curvas de magnetoimpedancia [25]. La asimetría producida en GMI se puede incrementar si además se somete a las cintas a un **campo magnético preimanador**, H_p, en la dirección longitudinal de las mismas.

3.2.1 Materiales y técnicas

Se utilizaron cintas amorfas de dimensiones 40 mm $\times$ 2 mm, 20 μm de espesor y composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$. Las cintas se fabricaron por enfriamiento ultrarrápido y su composición se verificó mediante una microsonda electrónica.

Para cristalizar las cintas, se realizaron recocidos durante 15 minutos en un horno inductivo precalentado y en atmósfera protectora de argon. Las temperaturas de recocido fueron entre 455ºC y 520ºC.

Tras el recocido algunas cintas fueron preimanadas con anterioridad a las medidas magnéticas. Este tratamiento consiste en aplicar un campo magnético constante, H_p, en la dirección longitudinal de la cinta. La duración del mismo fue en torno a 10 s, habiéndose comprobado que pequeñas fluctuaciones, o tiempos mayores de preimanación, no influían en el resultado final.

Análisis estructural. DSC, Rayos-X y TEM

Al desearse una cristalización parcial de las cintas, era necesario conocer con anterioridad a qué temperaturas se produce la cristalización. Para determinar estas temperaturas se realizaron medidas en un calorímetro diferencial de barrido `Mettler-Toledo DSC 822e`, (DSC por sus siglas en inglés

Differential Scanning Calorimetry).

Tanto las cintas amorfas como las ligeramente cristalizadas fueron estudiadas estructuralmente mediante difracción de rayos X con un equipo `Siemens D-50` usando la radiación Cu $K_{\alpha 1}$.

Además, la cristalización de las cintas recocidas fue también comprobada mediante microscopía electrónica de transmisión con un equipo `Jeol-2000`. Como el grosor de las cintas es demasiado grande para ser atravesado por el flujo de electrones del microscopio, fueron adelgazadas por desvastado iónico.

Ciclos de histéresis

Para completar el estudio de las cintas magnéticas se midieron sus ciclos de histéresis y la distribución de campos de retorno (SFD por *Switching Field Distribution*) con un histeresímetro inductivo controlado por ordenador en el régimen cuasiestático, a una frecuencia del campo magnético de 0.5 Hz y $2 \cdot 10^4$ puntos por ciclo.

3.2.2 Resultados y discusión

Las cintas amorfas de $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ tienen un comportamiento magnetoimpeditivo notable, alcanzando valores de $GMI_{|Z|}$ cercanos a 300 % cuando la frecuencia del voltaje de alimentación es de 5 MHz. Las curvas de magnetoimpedancia tienen forma de doble pico simétrica, tal y como se puede ver en la figura 3.6. En la región central, comprendida entre -80 Am^{-1} y 80 Am^{-1}, la impedancia apenas varía, siendo su pendiente solo $m_0 = -0.1$ $m\Omega/(Am^{-1})$. La zona de mayor sensibilidad (definida según la ecuación 3.5) se consigue en la región en torno a 100 Am^{-1}, con un valor de $m = 31.7$ $m\Omega/(Am^{-1})$. Esta región de mayor pendiente y valor casi constante tiene una anchura de apenas 30 Am^{-1}, lo que limita el rango de campos detectables. Para campos mayores, la impedancia alcanza un máximo (y por lo tanto su sensibilidad sería despreciable) y a continuación, para $H > 170$ Am^{-1}, la sensibilidad toma valores menores de 2 $m\Omega/(Am^{-1})$. Desde un punto de vista práctico la región central no es útil, y si se deseara trabajar en una amplia región de campos magnéticos la tercera región sería la más adecuada ya que se extiende asintóticamente hasta $2 \cdot 10^4$ Am^{-1}. Como el objetivo es detectar los minúsculos campos magnéticos producidos por las NPM, la región de máxima sensibilidad sería la más adecuada, pero para usar esta zona de trabajo es necesario mantener un campo magnético externo.

El recocido de las cintas provoca que la impedancia se modifique sin perder la forma de doble pico. Puede parecer que en principio el tratamiento térmico no aporta ninguna mejora a la sensibilidad de la cinta ya que el valor

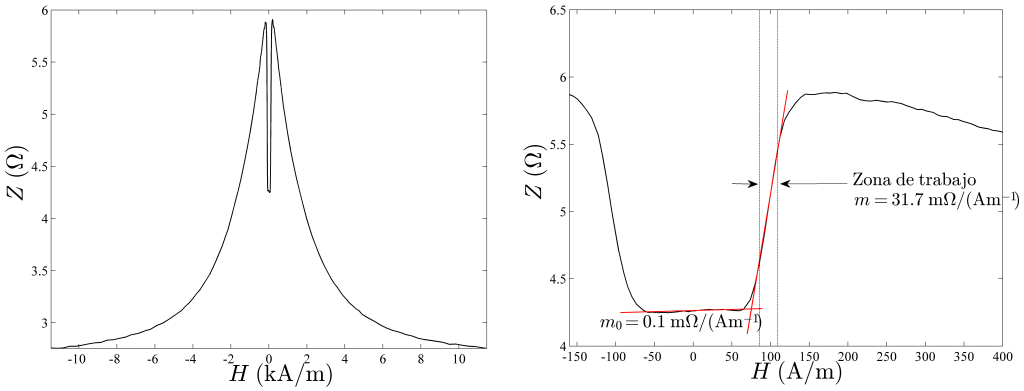

Figura 3.6: Variación del módulo de la impedancia de una cinta de $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$(izquierda). A la derecha, detalle de la zona a campos bajos, mostrando la forma de doble pico y detallando la sensibilidad en dos regiones distintas. $f = 5$ MHz.

de $GMI_{|Z|}$ es similar, desapareciendo la región plana en torno a campo cero (aunque sigue habiendo un mínimo) y se reduce ligeramente la pendiente en la parte interna de los picos. Es al preimanar las cintas cuando su respuesta se modifica con resultados: la curva de magnetoimpedancia pierde la simetría al crecer uno de los picos mientras que el otro pico decrece. Una de las nuevas características más interesantes es que el mínimo se ha desplazado horizontalmente, lo que implica que la región óptima de medida está ahora en torno a $H = 0$.

La posición de la región de trabajo puede ser controlada mediante el tratamiento térmico y la posterior preimanación. En la figura 3.8 (b) se muestra cómo varía la magnetoimpedancia en función del campo preimanador. El desplazamiento se incrementa con el valor de H_p hasta $H_p = 1.6 \times 10^5$ Am^{-1}.

En el cuadro 3.1 se muestra la influencia de la temperatura de los recocidos sobre la amplitud de la región de trabajo óptima de cada cinta ($\Delta H_{\text{trabajo}}$), el valor de la pendiente en el centro de dicha región (m_{trabajo}) y la pendiente m_0 cuando $H = 0$. La cinta con la que se obtuvo la mayor sensibilidad sin campo externo aplicado es la recocida a 475ºC, superando en casi dos órdenes de magnitud la sensibilidad previa al recocido, al mismo tiempo que se incrementa la región de trabajo. Sin embargo, un recocido excesivo provoca que la sensibilidad decrezca, por lo que las temperaturas óptimas de recocido corresponden al rango 465-475ºC. En la figura 3.9 se muestra la sensibilidad de la curva de magnetoimpedancia.

La evolución de la magnetoimpedancia con la temperatura de recocido

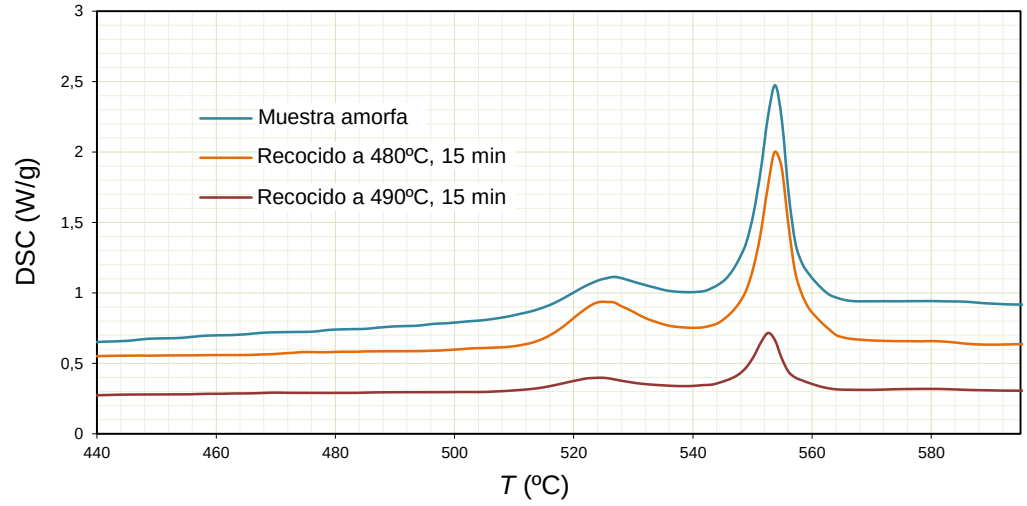

Figura 3.7: Calorimetría diferencial de barrido de una cinta amorfa y dos tratadas térmicamente de $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$. Se observa dos picos correspondientes a dos temperaturas de transición vítrea cuya intensidad decrece con la temperatura del tratamiento realizado.

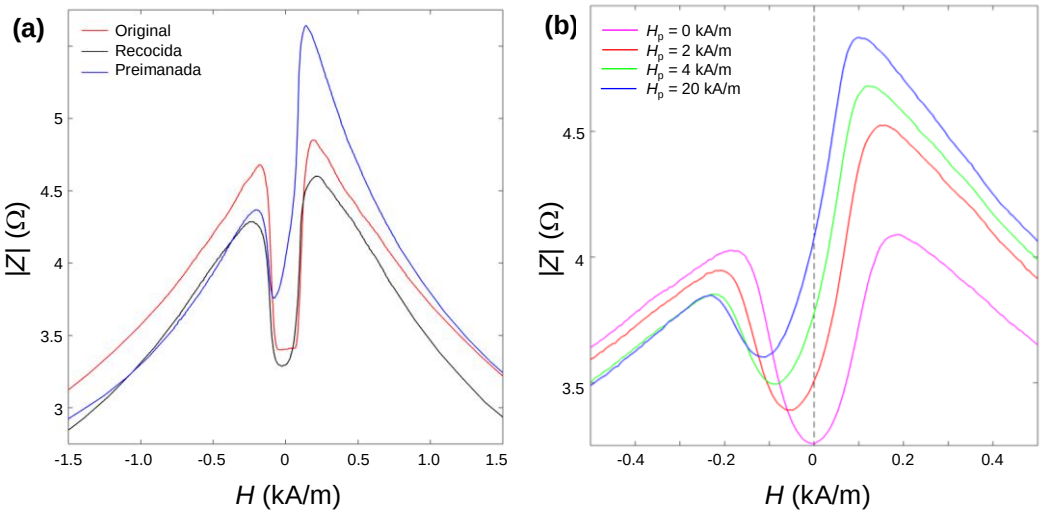

Figura 3.8: **(a)** Curvas de impedancia de una cinta de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ sin recocer, tras recocer a 465ºC, y tras recocer y preimanar con $H_p = 2 \cdot 10^5$ Am^{-1}. **(b)** Efecto del campo preimanador H_p sobre las curvas de magnetoimpedancia para una cinta recocida a 465ºC.

Tratamiento térmico	$\Delta H_{\text{trabajo}}$ Am^{-1}	m_{trabajo} $\text{m}\Omega/(\text{Am}^{-1})$	m_0 $\text{m}\Omega/(\text{Am}^{-1})$
AQ	30	31.7	0.1
455ºC	91	4.8	6.8
465ºC	75	17.2	6.2
475ºC	69	9.0	8.0
480ºC	105	5.6	5.8
500ºC	330	0.1	0.1
520ºC	8000	2×10^{-3}	–

Cuadro 3.1: Propiedades de las curvas de magnetoimpedancia para $f = 5$ MHz, tras haber preimanado la cinta con $H_{\text{p}} = 2 \cdot 10^5$ Am^{-1}.

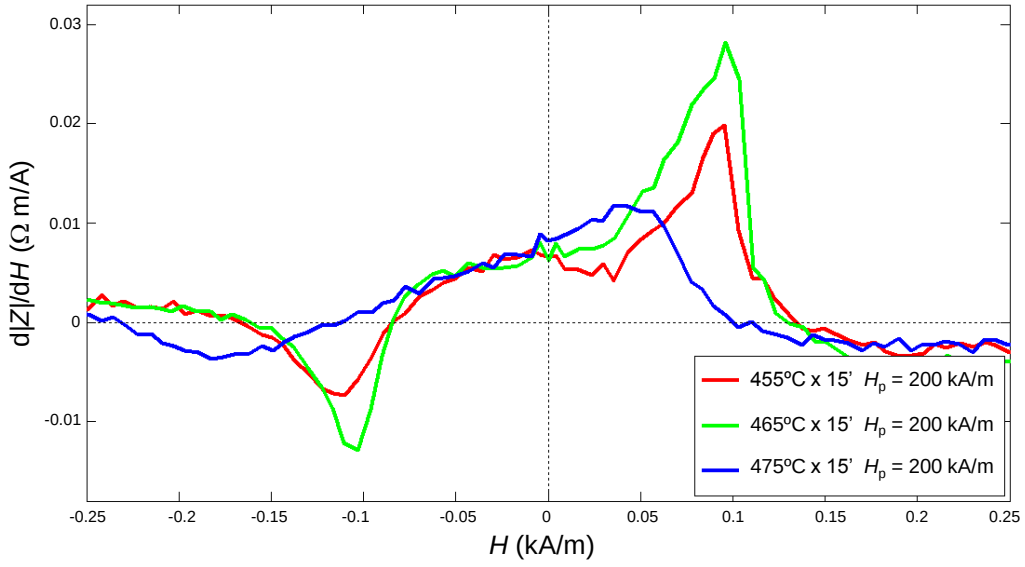

Figura 3.9: Variación de la sensibilidad en función del campo magnético externo para tres cintas recocidas y preimanadas

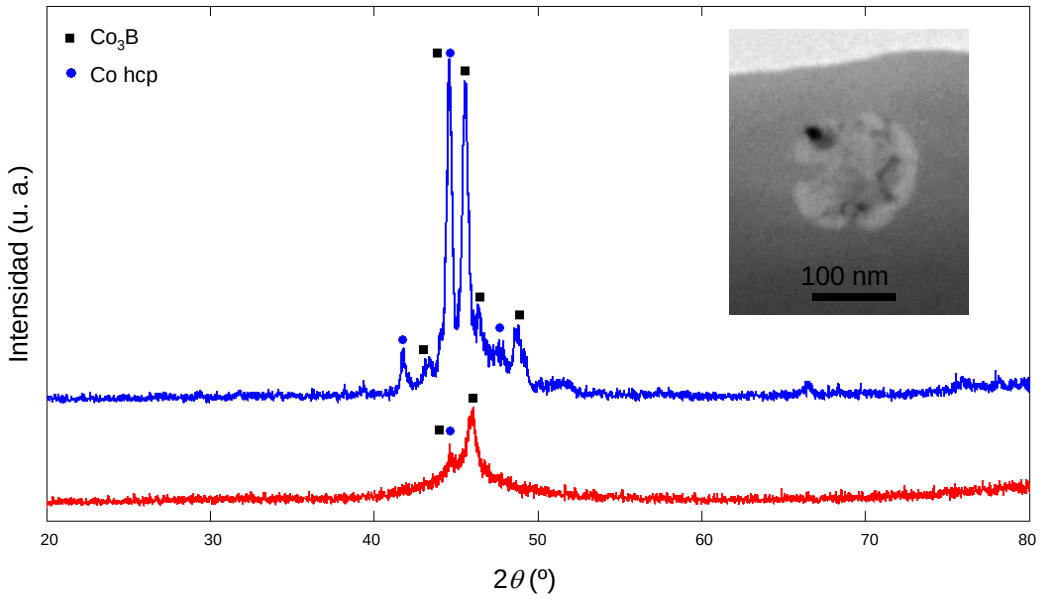

Figura 3.10: Diagramas de difracción de rayos X de las cintas recocidas a 480ºC y 520ºC **(inset)** Imagen por TEM de un cristal de CO_3B.

está relacionada con el grado de cristalización de las cintas. Desafortunadamente, la fracción cristalina es tan baja en las cintas más interesantes ($465 - 475$ºC) que apenas se distinguen picos cristalinos por difracción de rayos X. Para obtener indicios de cuáles son las fases cristalinas presentes en las cintas de interés se recocieron otras cintas a mayor temperatura, cuyos diagramas se muestran en la figura 3.10. Un ajuste de Le Bail permite identificar las fases cristalinas Co_3B y Co hcp. Estos resultados son consistentes con los DSC de la figura 3.7, donde se observa dos picos de cristalizacion y cómo ambos disminuyen de amplitud en las muestras recocidas.

Por microscopía electrónica de transmisión se pueden observar partículas de tamaño aproximado 150 nm, siendo mayoritariamente de Co_3B, identificación morfológica y por difracción electrónica (SAED). A partir del análisis estadístico de distintas micrografías se puede estimar la fracción cristalina de la cinta recocida a 520ºC está en torno al 1 %.

El desplazamiento de la magnetoimpedancia está relacionado con las interacciones magnéticas entre las distintas fases presentes en las cintas. Las cintas sin recocer presentan un comportamiento magnético blando, con campos coercitivos del orden de 30 Am^{-1}. Como consecuencia del recocido la coercitividad aumenta como se ve en la figura 3.11 (a). Se observa cómo el ciclo presenta una coercitividad notablemente superior al de las cintas amorfas. Más destacable aún es la asimetría del ciclo, que resulta desplaza-

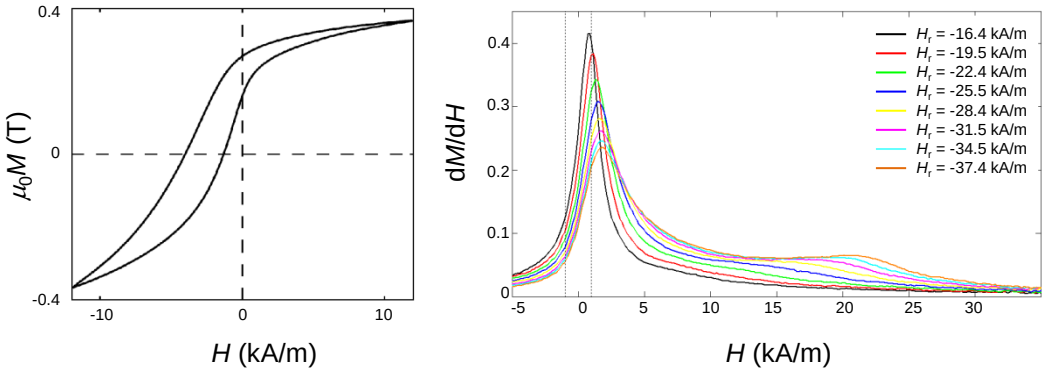

Figura 3.11: Ciclo de histéresis de una cinta recocida a 520ºC y preimanada con $H_p = 2 \cdot 10^5$ Am^{-1} (izquierda). Curvas SFD para distintos campos de retorno H_r mostrando la existencia de dos fases magnéticas diferentes (derecha).

do respecto a los valores de campo aplicado. Si se analizan las curvas SFD, figura 3.11 (b), se observa cómo existen dos picos correspondientes a dos fases magnéticas distintas. Se debe asignar el pico de campos mayores a los pequeños cristales presentes en el interior de la matriz amorfa que, por otro lado, sigue siendo dominante por lo que el pico a campos bajos es mucho mayor. Al preimanar con un campo intenso, éste orienta tanto la fase dura como la fase blanda o amorfa. Al retirar este campo y hacer el ciclo con una amplitud de campo mucho menor (por debajo del campo de inversión de la fase dura) la imanación de los cristales permanece orientada en la dirección de preimanación y ancla, a través de la integral de canje [25], la parte de la fase amorfa de su entorno próximo, produciéndose el desplazamiento del ciclo o *bias*. Este mismo efecto justifica las curvas de magnetoimpedancia y su desplazamiento proporcional al campo preimanador (figura 3.8 (b))

3.2.3 Conclusiones

Se ha inducido una ligera cristalizacion en cintas amorfas de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ mediante tratamientos térmicos. El proceso de preimanación orienta la imanación de dichos cristales creados, que al ser magnéticamente duros quedan orientados en la dirección de preimanación. Estos cristales producen un campo magnético que interactúa con la matriz amorfa, produciendo un desplazamiento, tanto de la magnetoimpedancia como de los ciclos de histéresis. Se ha demostrado que dicho efecto mejora la sensibilidad para campos magnéticos y amplía la región de trabajo.

3.3 Detección de NPM

Distintos autores han utilizado sensores basados en magnetoimpedancia gigante (GMI) para detectar nanopartículas superparamagnéticas (NPM) aisladas [26] o incluso marcando alguna entidad biológica [27]. En la presente sección se analiza la detección de NPM usando como elemento sensor las cintas magnetoimpeditivas. Los objetivos son, por un lado profundizar en la descripción física de la detección de NPM por sensores de GMI, y por otro aplicar las cintas magnetoimpeditivas para un biosensor. Como se ve en esta sección, los resultados experimentales cuestionan que el origen de la detección de NPM se deba a la GMI.

3.3.1 Procedimiento experimental

El procedimiento más habitual para detectar NPM en la literatura científica es medir dos veces la curva de impedancia de un sensor. Una primera vez sin NPM, lo que sería la curva GMI^0 de referencia, y una segunda vez con NPM, $\mathrm{GMI}^{\mathrm{NPM}}$. Para usar dicho el procedimiento es necesario suponer que el único motivo por el que cambia la impedancia del sensor se debe al campo magnético producido por las NPM, hipótesis que no siempre se cumple. Las medidas de toda una curva de GMI requieren de varios minutos, por lo que si se quiere comprobar la reproducibilidad de las medidas, con y sin NPM, el tiempo invertido es considerable. Además, se sabe que la variación de la temperatura ambiente influye en la impedancia de las cintas magnetoimpeditivas [28]. La duración de cada ciclo de GMI (varios minutos) y el propio valor de la señal de las NPM hacen necesario un sistema muy precio de aclimatación del equipo.

Con la intención de reducir el tiempo de medida para poder despreciar la deriva térmica se diseñó un procedimiento más rápido, a la vez que simple y efectivo. Este procedimiento consiste en medir directamente la variación de Z para valores discretos de campo H en presencia y ausencia de las muestras de NPM. Matemáticamente, se puede definir la señal de las NPM como

$$\Delta|Z| = |Z|^{\mathrm{NPM}}(H) - |Z|^0(H) \ , \tag{3.6}$$

o bien,

$$\Delta\phi = \phi^{\mathrm{NPM}}(H) - \phi^0(H) \ , \tag{3.7}$$

donde $|Z|$ y ϕ son el módulo y la fase de la impedancia del elemento sensor, H es el campo magnético aplicado, y los superíndices ^{0} y $^{\mathrm{NPM}}$ indican la ausencia y presencia de NPM, respectivamente. En la figura 3.12 se muestra una medida usando este procedimiento.

Muestra	Composición	Diámetro (nm)	Masa depositada (μg)
FeO32	Fe_3O_4	10.5	32
FeO64	Fe_3O_4	10.5	64
FeO128	Fe_3O_4	10.5	128
FeO192	Fe_3O_4	10.5	192
FeO320	Fe_3O_4	10.5	320
FeO480	Fe_3O_4	10.5	480
FeO640	Fe_3O_4	10.5	640
FeO800	Fe_3O_4	10.5	800
SiMAG800	Fe_3O_4/Si	2000	800
Au50	Au	80	50
Blanco	papel	-	0

Cuadro 3.2: Muestras de partículas depositadas en rectángulos de papel de dimensiones 10 mm × 2 mm.

Soporte de muestras de NPM

Se comprobó que la presencia de agua o de otro líquido afecta al valor de la impedancia, bien debido a la temperatura o a la constante dieléctrica. Para evitar dicha influencia las muestras se depositaron en pequeñas tiras de papel secante de dimensiones 10 mm × 2 mm tal y como se describe en la sección 1.3.3 (página 13), comprobándose que estas NPM mantienen su estado superparamagnético (página 15). Una vez depositadas se recubrieron de cinta adhesiva para poder mover las muestras directamente pero sin tocarlas.

Se utilizaron nanopartículas superparamagnéticas de 10 nm de diámetro medio de Fe_3O_4, recubiertas de ácido polyacrílico y dispersas en agua (Nanogap SL FeO-2204W) a una concentración de 16 $\mu g\,\mu L^{-1}$. Se depositaron muestras con distinta masa, etiquetadas como FeOxxx en el cuadro 3.2. También se prepararon muestras de micropartículas ferromagnéticas cubiertas de sílica cuyo diámetro promedio es 2 μm, comercializadas por `Chemicell`. Finalmente, se utilizaron nanopartículas de oro y diámetro medio 80 nm de `BBInternational`.

Para ver la influencia del soporte es conveniente medir siempre una muestra "blanco" y proceder con ella de la misma manera que con las muestras de NPM. Los blancos usados fueron tiras de papel como aquellas en las que se depositaron las partículas. Todas las muestras de este estudio están descritas en el cuadro 3.2.

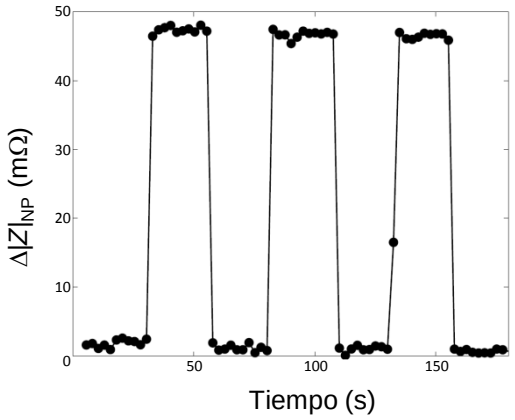

Figura 3.12: Variación del módulo de la impedancia $|Z|$ de un elemento sensor al introducir la muestra FeO800 (escalón positivo) y al retirarla (escalón negativo).

Sistema de detección

La muestra se inserta horizontalmente por una pequeña rendija de sección 14.0 mm×0.2 mm por la que se desplaza hasta llegar a un tope centradas bajo el elemento sensor. En presencia de NPM, la impedancia cambia, observándose un escalón tanto en el módulo como en la fase. Estas medidas son repetidas sucesivamente para estudiar la reproducibilidad de las mismas.

Como elemento sensor se utilizaron distintas cintas e hilos de 40 mm de longitud. Se empezó con cintas amorfas de sección 1.0 mm × 0.02 mm y composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$, en lo sucesivo CoR.

Sensibilidad y SNR

Además de la definición de sensibilidad habitual en los trabajos sobre GMI 3.5 (página 39), también se usa el cociente entre la desviación estándar de una medida y la amplitud de la misma, que se conoce como *Signal to Noise Ratio*,

$$\mathrm{SNR}_{|Z|} = \frac{\Delta|Z|}{\sigma(\Delta|Z|)} \tag{3.8}$$

donde $\Delta|Z|$ es la señal producida por las NPM según se la definición 3.6. Por supuesto, se puede usa la señal detectada en la fase de la impedancia, $\Delta\phi$, en lugar de en el módulo. Es de destacar que esta definición está influida no solo por la composición del elemento sensor, si no también por los parámetros de medida (*Bandwidth*, f, V, número de promediados...) y factores externos (como la temperatura).

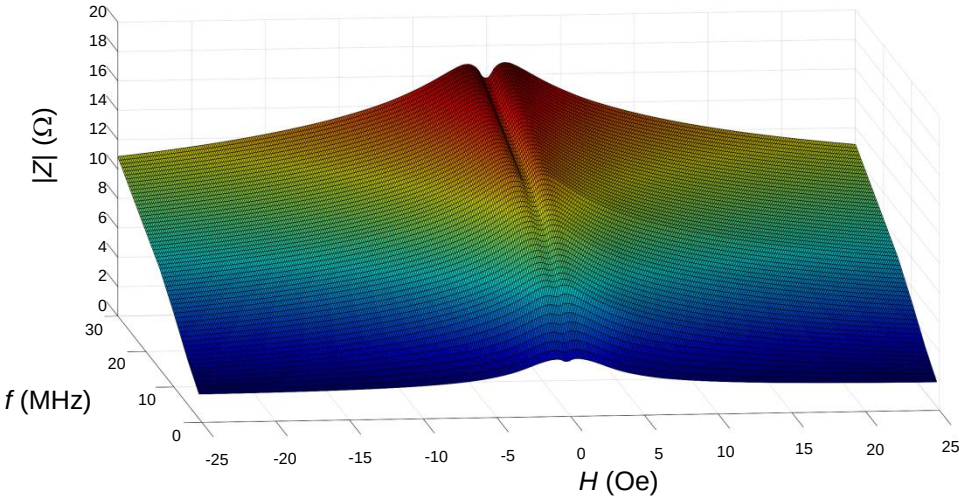

Figura 3.13: Variación de la impedancia $|Z|$ de una cinta de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$ en función del campo magnético aplicado H y la frecuencia f.

3.3.2 Resultados y Discusión

La magnetoimpedancia de las cintas de base cobalto, o CoR, a frecuencias 1-110 MHz y voltaje 500 mV, presenta una estructura de doble pico (figura 3.13). Es interesante analizar la pendiente de la curva de $|Z|$ en función del campo H como parámetro para estimar la sensibilidad, calculando $m = \mathrm{d}|Z|/\mathrm{d}H$ para cada punto. Para las cintas CoR la mayor sensibilidad se obtiene a $f = 110$ MHz y $H = 20$ Am^{-1}. En la gráfica 3.14 (b) se representa la pendiente m frente a H para $f = 110$ MHz.

Comparando escalones con curvas GMI

Una vez determinados los parámetros para alcanzar la mayor sensibilidad de las cintas CoR, se probó la capacidad de detección de NPM. Ésta requiere que el campo magnético extremadamente débil producido por las NPM sea suficientemente intenso como para ser detectado. Esto puede ser extremadamente difícil dado que cuando las partículas están en el régimen superparamagnético, por lo que es necesario aplicar un campo magnético externo suficiente para orientarlas, además de situar el elemento sensor en su región óptima de trabajo. Para la cinta CoR se midió la señal producida por las NPM en función del campo según la definición 3.6. Los resultados para la muestra con mayor cantidad de NPM, FeO800, se muestran en la

figura 3.14 (c).

Sería de esperar que la señal de las NPM fuese máxima en el punto óptimo de medida, marcado con una línea discontínua verde en la figura 3.14, y que al desplazarse a otros puntos de medida la señal decreciese. Sin embargo este razonamiento contradice las evidencias experimentales. La señal de las NPM apenas varía si cambia el campo magnético aplicado. La curva de $|Z|$ alcanza un máximo a 180 Am^{-1} (señalado en la figura 3.14 con una línea roja), por lo que su pendiente en ese campo es virtualmente cero, dificultando la detección de las NPM. Para valores de H mayores, la pendiente m se vuelve negativa, por lo que la señal de las NPM debería ser negativa también. Sin embargo, ninguno de estos dos razonamientos se ajusta a la evidencia experimental. La señal de las NPM permanece casi inalterable en torno a $\Delta|Z| = 50$ mΩ.

Esto pone seriamente en duda que el origen de la detección de las NPM sea la GMI.

Comparación con otros trabajos

Existen en la literatura varios trabajos en los que se detectan NPM con muestras magnetoimpeditivas. Hace una década ya se presentaron sensores basados en GMI de micropartículas ferromagnéticas [18] o superparamagnéticas [19]. Algunos artículos estudian la variación de la impedancia debido a las NPM [20] [29], de manera equivalente a la ecuación 3.6 usada en esta tesis, aplicando un campo magnético externo para orientar las NPM superparamagnéticas y a la vez llevar el sensor a su región óptima de trabajo. En otros se comparan las curvas de GMI con y sin NPM, como por ejemplo [19], en donde los resultados experimentales coinciden con los de la figura 3.14: el efecto de las NPM es independiente del campo aplicado.

En otros trabajos se utiliza para mostrar los efectos de las NPM la ecuación

$$\Delta\mathrm{GMI}(H) = \frac{|Z|^{\mathrm{NPM}}(H) - |Z|^{\mathrm{NPM}}(H_{\mathrm{ref}})}{|Z|^{\mathrm{NPM}}(H_{\mathrm{ref}})} - \frac{|Z|^{0}(H) - |Z|^{0}(H_{\mathrm{ref}})}{|Z|^{0}(H_{\mathrm{ref}})}. \qquad (3.9)$$

con $H_{\mathrm{ref}} = H_{\mathrm{sat}}$ [30] o $H_{\mathrm{ref}} = 0$ [27, 31, 32, 33, 34, 35]. Este procedimiento oculta precisamente la señal de las NPM en $H = H_{\mathrm{ref}}$, ya que es obvio que por definición, $\Delta\mathrm{GMI}\ (H = H_{\mathrm{ref}}) = 0$.

3.3.3 Conclusiones

Se ha comprobado que utilizando como elemento sensor cintas amorfas de base cobalto y como propiedad sensora la magnetoimpedancia, efectivamente se detectan las NPM. Sin embargo, los resultados experimentalses (señal

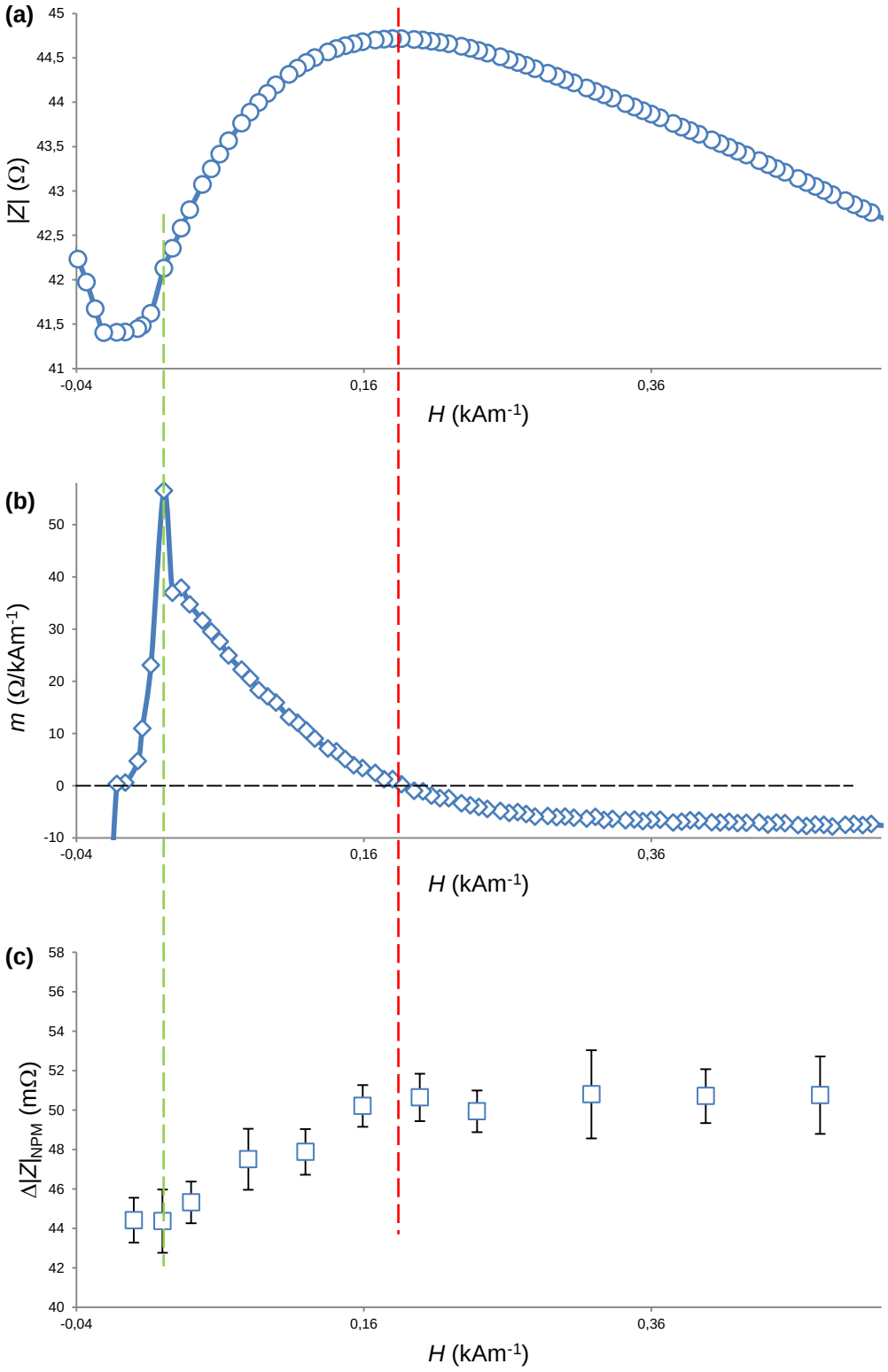

Figura 3.14: **(a)** Detalle de la impedancia en función del campo magnético aplicado H de una cinta amorfa de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$. **(b)** Dependencia de la sensibilidad. **(c)** Señal producida por las NPM FeO800 en valores discretos de H.

producida por las NPM en función del campo aplicado) entran en conflicto con la hipótesis de que el fenómeno de detección sea realmente la magneto-impedancia. Por lo que se concluye que deben contemplarse otros posibles orígenes de la detección.

Capítulo 4
Sensor electromagnético de NPM

En el capítulo anterior se ha demostrado que un sensor basado de magnetoimpedancia es capaz de detectar nanopartículas magnéticas. Sin embargo, analizando la señal en función del campo aplicado se hace dificil sostener que el motivo por el que se detecten las NPM sea la GMI. En este capítulo se utilizan elementos sensores de otros materiales, no magnetoimpeditivos, que detectan inequívacamente las NPM. Apoyándose en las evidencias experimentales se propone una descripción cualitativa que explica el origen de la detección.

4.1 Cintas e hilos conductores

En el cuadro 4.1 están descritos todos los elementos sensores utilizados en esta sección, incluyendo la cinta magnetoimpeditiva CoR. El material más utilizado fue el cobre, en forma de cinta o hilo. La anchura de las cintas varía entre 0.5 y 10 mm, mientras que su espesor es constante, 34 µm. Para abreviar se nombrarán como CuR0.5-CuR10, refiriéndose la R al término inglés *Ribbon*. Los hilos de cobre utilizados tienen distintos diámetros, cuyos valores son 0.03, 0.09, 0.23 y 0.49 mm, y en lo sucesivo serán nombrados como CuW0.03-CuW0.49. donde W procede de *Wire*. Por último se usaron de manera puntual otros materiales (aluminio, plata, kanthal...).

4.1.1 Sensores de cobre

A pesar de que el cobre es un material paramagnético, al medir $\Delta|Z|$ en las mismas condiciones que con la cinta magnetoimpeditiva CoR (110 MHz, $V = 500$ mV, $H = 0$) se obtuvo que es incluso algo superior ($\Delta|Z| = 46$ mΩ con CuR2 frente a $\Delta|Z| = 44$ mΩ con CoR). Es evidente que la GMI no puede estar detrás de la detección de las NPM usando una cinta de cobre, por lo que necesariamente tiene que haber otra explicación del fundamento

Muestra		Composición	Sección (mm^2)
Ag	□	Plata	0.02 ± 0.01
Al	□	Aluminio	0.14 ± 0.03
CoR	□	$Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$	0.022 ± 0.003
CuR0.5	□	Cu 99.95 %	0.017 ± 0.004
CuR1	□	Cu 99.95 %	0.034 ± 0.004
CuR2	□	Cu 99.95 %	0.068 ± 0.005
CuR3	□	Cu 99.95 %	0.102 ± 0.006
CuR4	□	Cu 99.95 %	0.136 ± 0.007
CuR10	□	Cu 99.95 %	0.340 ± 0.013
CuW0.03	○	Cu 99.95 %	0.0007 ± 0.0005
CuW0.09	○	Cu 99.95 %	0.0064 ± 0.0014
CuW0.23	○	Cu 99.95 %	0.042 ± 0.004
CuW0.49	○	Cu 99.95 %	0.189 ± 0.008
Constantan	○	$Cu_{55}Ni_{45}$	0.126 ± 0.006
CrNi	○	CrNi	0.008 ± 0.002
Níquel	○	Ni	0.071 ± 0.005
Kanthal	○	FeCrAl	0.071 ± 0.005

Cuadro 4.1: Elementos sensores utilizados. ○ = hilo. □ = cinta

físico de la detección. Por lo expuesto en el capítulo anterior, esta explicación probablemente sea aplicable a las cintas tipo CoR.

A continuacion se expone la influencia de distintos parámetros.

Se comprueba que la señal depende de la sección transversal del elemento sensor, como se puede observar en la figura 4.1. A menor sección la señal producida por las NPM es mayor, incluso cuando el elemento sensor es mucho menor que la muestra de NPM. Sería de esperar que cuando muestra y elemento sensor tienen las mismas dimensiones, como sucede con la cinta de cobre CuR2, destacada en la figura 4.1, la señal fuese máxima. Disminuyendo las dimensiones del sensor, pero no de la muestra, se consigue que parte de la muestra de NPM queda más alejada del sensor, lo que *a priori* debería producir un efecto negativo en la señal que no se observa empíricamente.

Nuestra hipótesis es que la relación inversa entre señal y sección está relacionada con el efecto pelicular. Para comprobarlo, se fabricó una cinta de cobre de anchura 10 mm, CuR10, aproximadamente cinco veces mayor que las muestras de partículas. La mayor anchura del sensor permitió medir la señal causada por las partículas en distintas posiciones relativas entre sensor y muestra. Se observa en la figura 4.2 (a) que la señal es notablemente mayor cuando la muestra se encuentra justo debajo de los bordes del sensor ($x = \pm 5$ mm), reduciéndose casi hasta cero cuando la muestra está justo en el centro de CuR10.

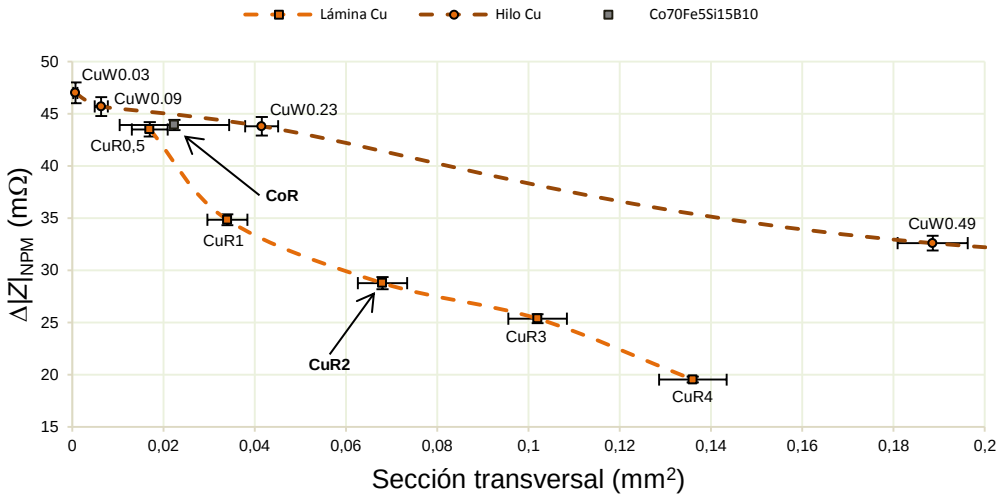

Figura 4.1: Influencia de la sección de los elementos sensores en la señal de las NPM. $f = 110$ MHz, $V = 500$ mV, $H = 0$.

Otro argumento a favor de la influencia del efecto pelicular en la detección de las NPM es la variación de la señal en función de la frecuencia alterna que alimenta el sensor. Se realizaron medidas de la señal de las NPM con los elementos sensores CoR y CuW0.03 para distintas frecuencias en el rango 1-110 MHz, obteniéndose una relación creciente para ambos sensores, como se muestra en la figura 4.2 (b). La sensibilidad de las medidas (según la definición 3.8) también aumenta con f. Es interesante destacar que no se encuentra una frecuencia en la que la detección sea máxima, por lo que es de esperar que la sensibilidad de ambos elementos sensores se pueda mejorar si $f > 110$ MHz.

4.1.2 Elementos sensores de otros materiales

Si el cobre, un material paramagnético, es capaz de detectar las NPM, cabe preguntarse qué tipos de materiales podrían ser más sensibles para la detección de NPM. Sospechando que la detección de NPM está relacionada con el efecto pelicular, es lícito sospechar que materiales con resistividades muy diferentes presentarían sensibilidades también muy diferentes. Sin embargo, a las frecuencias del orden de MHz la profundidad de penetración de la corriente es muy pequeña, del orden de las micras. Por ejemplo, en la figura 4.3 se representa la señal producida por la muestra FeO640 a $f = 110$ MHz en sensores de distintos materiales. Entre esos materiales, el kanthal es el que tiene la mayor resistividad, $\rho_{kanthal} = 1.45 \times 10^{-6}$ Ωm, mientras que el cobre

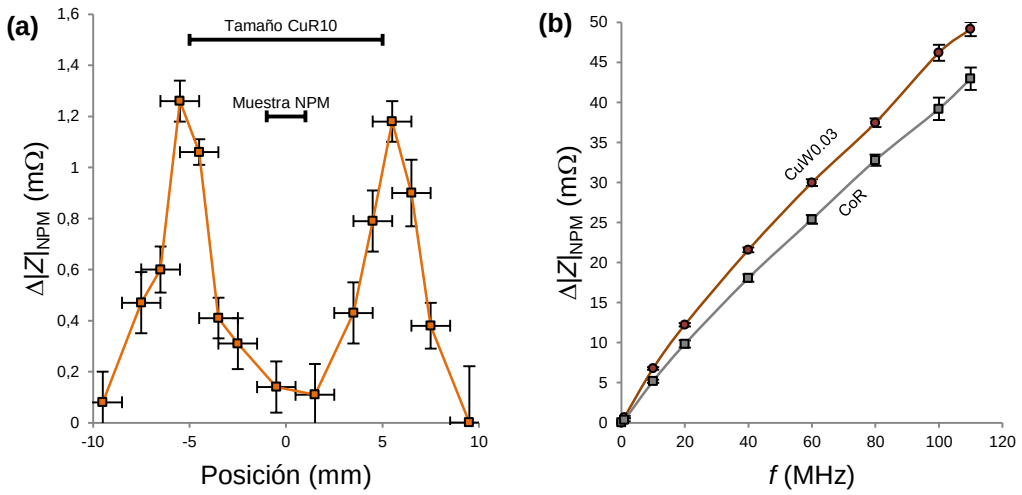

Figura 4.2: **(a)** Señal de las NPM en distintas posiciones bajo una cinta de cobre de 10 mm de anchura. El eje de abscisas representa la distancia de la muestra desde la posición central del elemento sensor. $f = 110$ MHz, $V = 500$ mV, $H = 0$. **(b)** Señal de las NPM en función de la frecuencia f. $V = 500$ mV, $H = 0$.

tiene una resistividad mucho menor, $\rho_{kanthal} = 1.71 \times 10^{-8}$ Ωm. A pesar de haber dos órdenes de magnitud entre estos dos materiales, y haber medido la señal de las NPM en muestras con sección transversal similar, la diferencia entre sus respectivas señales $\Delta|Z|_{\mathrm{NPM}}$ es de apenas un factor 2.

Si bien es probable que la resistividad del material influya en la detección, parece haber otros parámetros, como la sección y la rugosidad o imperfecciones de la superficie del sensor, que son más determinantes.

4.1.3 Calibración en función de la masa de NPM

Para la calibración del sensor se utilizo como elemento CuW0-03 que en el momento de hacer estos experimentos era el más sensible. Las medidas se realizaron a la máxima frecuencia permitida por el analizador, $f = 110$ MHz, sin campo magnético aplicado y sin promediados. Las muestras de NPM utilizadas fueron las de magnetita descritas en el cuadro 3.2. Los resultados están representados en la figura 4.4, donde se aprecia que CuW0.03 es capaz de detectar incluso la muestra FeO32, que contiene sólamente 32 µg de NPM. Además, se observa una relación lineal entre la masa de NPM y la señal que convenientemente pasa por el origen de coordenadas. Teniendo en cuenta que en ese momento ni el portamuestras ni el montaje experimental estaban opti-

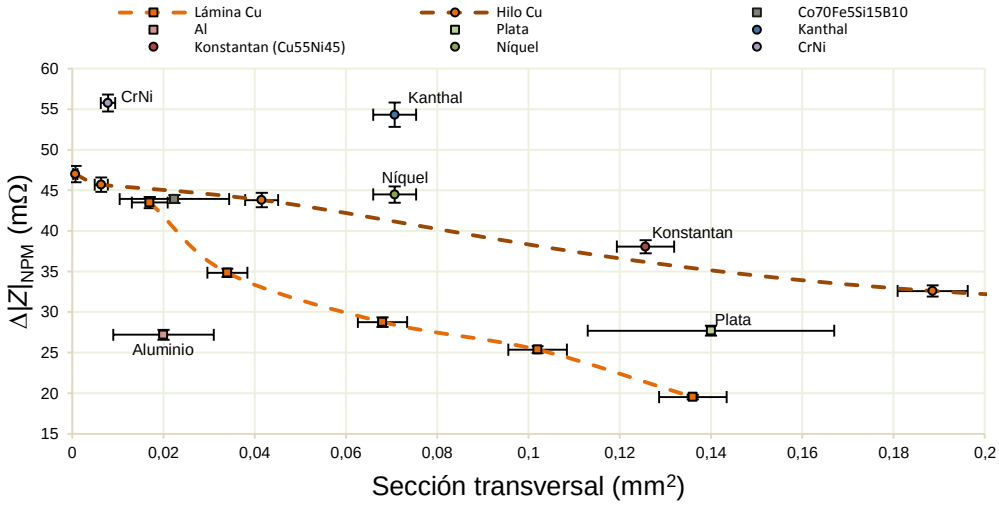

Figura 4.3: (a) Señal de las NPM en función de la sección del sensor para distintos materiales.

mizados para la detección de nanopartículas, este fue un resultado realmente prometedor. En las próximas secciones este límite de detección se expondrá cómo este límite de detección llego a superarse ampliamente.

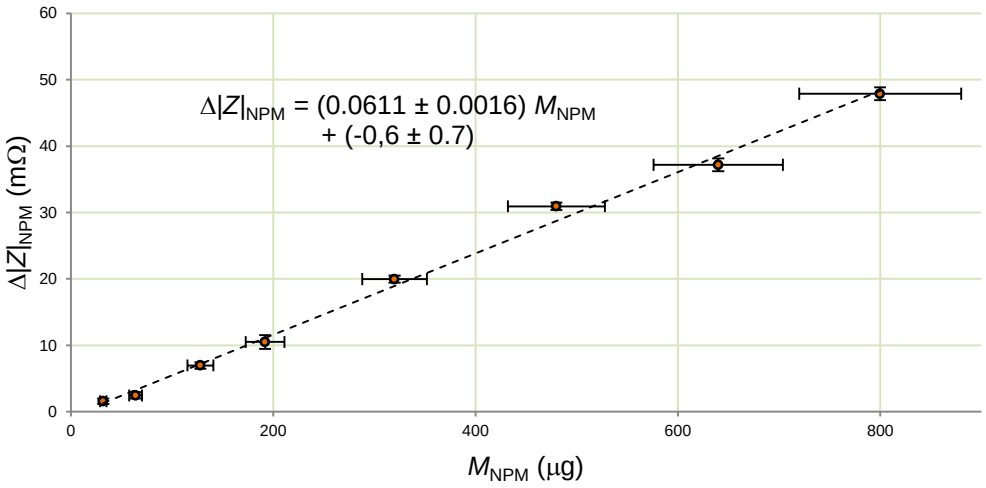

Figura 4.4: Incremento de la señal en función de la cantidad de nanopartículas usando el elemento sensor CuW0.03. $f = 110$ MHz, $V = 500$ mV, $H = 0$.

4.2 Detección de NPM con pistas impresas

El cobre, al ser el material más utilizado para fabricar circuitos electrónicos, es un candidato muy interesante para la detección de NPM, ya que permite hacer fácilmente sensores impresos. Esto evita tener que realizar contactos eléctricos entre el sensor y el resto del circuito, a la par que da robustez al sistema. Esta sección está dedicada exclusivamente a estudiar la detección de NPM mediante circuitos impresos de cobre.

4.2.1 Equipamiento experimental

Impresión de sensores de cobre

Para fabricar los sensores impresos se utilizaron dos métodos. En los inicios se trabajó con pistas fabricadas mediante insolación ultravioleta de placas fotosensibles. La menor anchura recomendada para una pista fabricada con esta técnica es de 0.25 mm. En una segunda etapa del trabajose utilizó una impresora/fresadora `LPKF ProtoMat 33` que permite realizar pistas hasta de 0.1 mm de anchura con un mejor acabado. En ambos casos se imprimen los circuitos sobre placas de fibra de vidrio con una capa de 35 µm de cobre en una superficie. La diferencia de resultados obtenidos mediante ambos métodos se observa claramente al microscopio. Obsérvese en la figura 4.5 **(a)** cómo los bordes de las pistas fabricadas mediante ataque químico no tienen

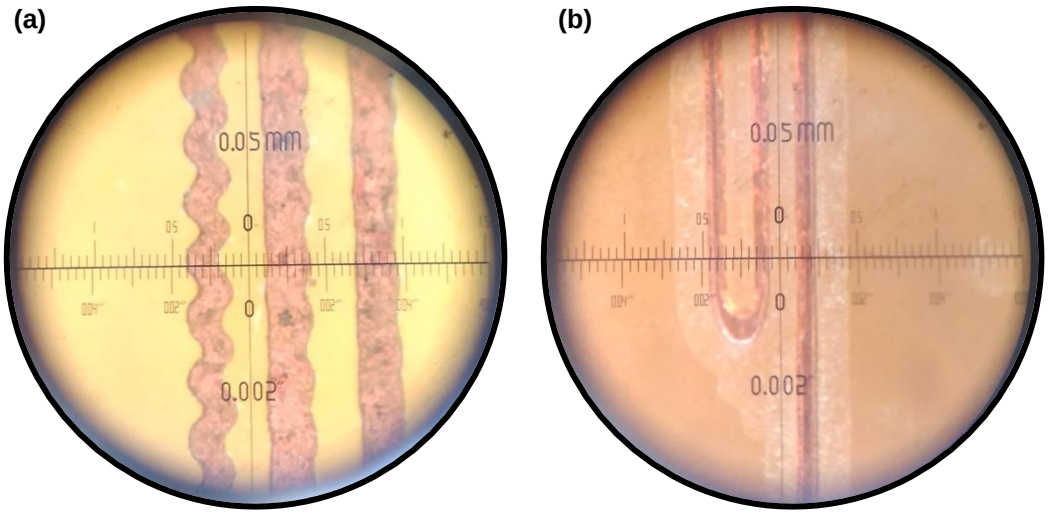

Figura 4.5: (a) Circuito impreso fabricado mediante ataque químico. (b) Circuito impreso fabricado usando la impresora-fresadora.

un borde recto, si no que presenta unas ondulaciones. Por el contrario, con la impresora/fresadora se consiguen pistas con mayor calidad incluso de menor anchura, como las de la figura 4.5 **(b)**. Aunque el mínimo paso de la impresora es menor que el diámetro de la fresa más pequeña, 0.1 mm, no es posible conseguir pistas más estrechas que este valor. Al pasar la herramienta, girando a altas revoluciones, intentando realizar una pista menor de 0.1 mm lo más probable es que la fresa arranque la pista entera.

Posicionamiento de la muestra

El correcto posicionamiento de la muestra de nanopartículas sobre el sensor es un factor que se hace más importante cuanto mayor es la sensibilidad de los sensores. En la primera fase del trabajo las muestras se posicionaban a mano, utilizando canales fabricados con láminas de vidrio instalados sobre los sensores. Como el esperor de las muestras de papel y cinta adhesiva es de aproximadamente 0.25 mm, y su anchura 10.0 mm, la sección más habitual de los canales es de 11.0 mm $\times$ 0.3 mm, como los de la figura 4.6. La sección del canal se puede modificar a conveniencia si el tamaño de la muestra es distinto, como por ejemplo las que se usarán en la sección 5.3 para medir en tiras de flujo lateral (ver capítulo 5.1), o las muestras de distinta concentración de la sección 4.3.3.

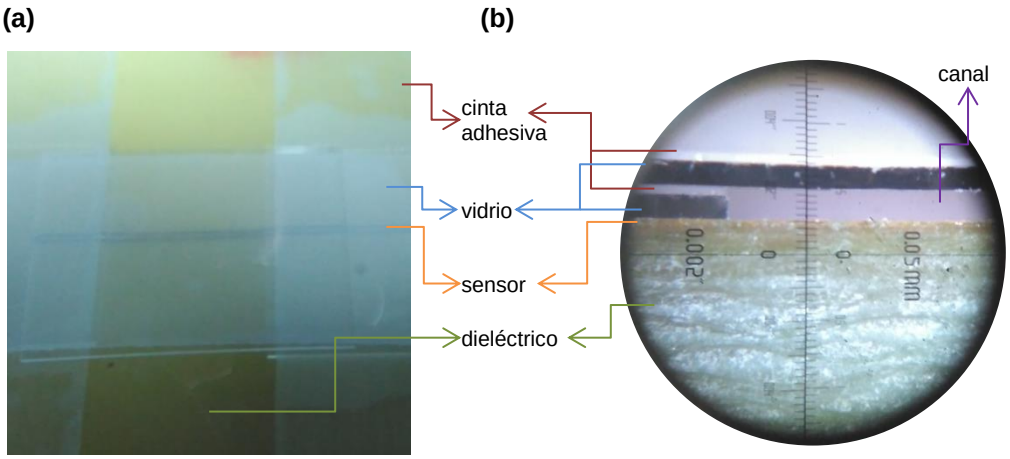

Figura 4.6: **(a)** Fotografía de un canal de posicionamiento. **(b)** Micrografía de la sección del canal.

4.2.2 Influencia del diseño de la micropista

En este apartado se estudia la detección con tres elementos sensores de diseños diferentes (ver figura 4.7):

- **PWB1**. Una pista de 40 mm de longitud, 4 mm de anchura y 35 µm de espesor.
- **PWB3M**. Estructura de tipo "meandro" consistente en una región de 12 mm de longitud compuesta por tres pistas paralelas de 4 mm de anchura y separadas entre sí 4 mm. Espesor del cobre 35 µm.
- **PWB3S**. Estructura de tipo "espiral", en una región de 12 mm de longitud compuesta por tres pistas paralelas de 4 mm de anchura y separadas entre sí 4 mm. Espesor del cobre 35 µm.

Para comparar los sensores se utilizó la muestra patrón FeO640, consistente en 640 µg de FeO-2204W, muestra ya utilizada en la sección 3.3, y una muestra "blanco" consistente en papel y cinta adhesiva, cuya señal es despreciable. Todas las medidas se realizaron en las mismas condiciones: $f = 110$ MHz, $V_{osc} = 500$ mV.

PWB1

Usando el portamuestras ideado para elementos sensores no impresos (cintas e hilos) se había encontrado experimentalmente que el hilo CuW0.03,

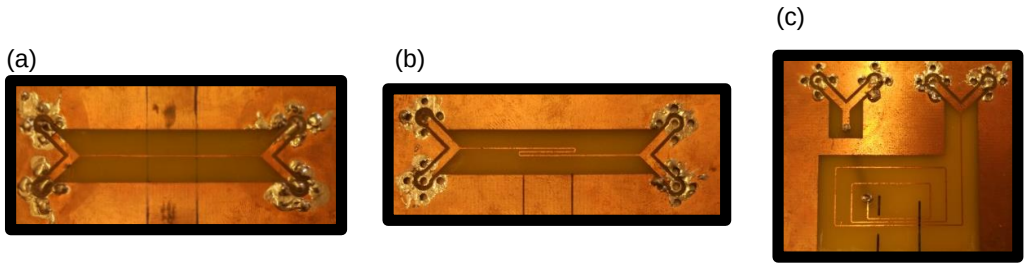

Figura 4.7: (a) Sensor PWB1. (b) Sensor PWB3M. (c) Sensor PWB3S.

Sensor	$\lvert Z\rvert_{110\text{MHz}}$ (Ω)	$\Delta\lvert Z\rvert_{\text{NPM}}$ (mΩ)	$\sigma(\Delta\lvert Z\rvert_{\text{NPM}})$ (mΩ)	$\frac{\Delta\lvert Z\rvert_{\text{NPM}}}{\lvert Z\rvert_{110\text{MHz}}}$ (%)	$\text{SNR}_{\lvert Z\rvert}$
CuW03	97.05	38.0	0.5	0.04 %	75
PWB1	28.52	140.1	0.5	0.49 %	280
PW3M	31.48	384.2	0.5	1.2 %	770
PWB3S	202.5	1 317	2	0.65 %	660

Cuadro 4.2: Señal de la muestra FeO640 a 110 MHz, detectada por distintos sensores.

era el más sensible. Por lo tanto se empieza esta seccion comparándolo con PWB1. Nótese que PWB1 y el portamuestras en el que se instala CuW0.03 son iguales salvo que el segundo dispone de una zona sin conductor para instalar CuW0.03.

El circuito PWB1, al ser una estructura más robusta que un hilo de cobre adherido al circuito permite acercar la muestra más a la zona sensora (el hilo o la cinta se pueden de doblar o arañar). Para aproximar la muestra al sensor CuW0.03 existe una distancia mínima de 0.2 mm mientras que para la placa impresa es posible colocar la muestra en contacto con el sensor 4.2.1.

Como se puede apreciar en el cuadro 4.2, la señal del circuito impreso PWB1 es muy superior en valor absoluto a la del hilo CuW03, así como en variación relativa y, más importante aún, en *Signal-to-Noise-Ratio*.

PWB3M

Un resultado *a priori* sorprendente de la sección 4.1 era que la señal era mayor a menor sección del sensor. Sin embargo es de suponer, y se comprueba en este apartado, que cuanto más similares sean las dimensiones del sensor y de la muestra de NPM mayor será la señal. Para verificarlo se imprimió el elemento sensor PWB3M. Esta estructura de tipo "meandro" tiene una anchura total de 2 mm, la misma que la muestra de NPM. Como era de

Sensor	$\lvert\Delta\lvert Z\rvert_{\text{papel}}\rvert$ (mΩ)	$\frac{\Delta\lvert Z\rvert_{\text{papel}}}{\Delta\lvert Z\rvert_{\text{NPM}}}$ (%)	$\text{SNR}^*_{\lvert Z\rvert}$
PWB1	-2.7 ± 0.5	1.9 %	140
PW3M	-1.7 ± 0.5	0.5 %	390
PWB3S	466 ± 2	35 %	210

Cuadro 4.3: Estudio de la señal de las muestras "blanco" de papel sin NPM.

esperar, la señal absoluta, la relativa y el SNR se incrementan utilizando este sensor, tal y como se muestra en el cuadro 4.2

PWB3S

Como se puede observar en el cuadro 4.2 PWB3S tiene una buena respuesta, especialmente en valores absolutos, $\Delta|Z|_{\text{NPM}}$, aproximadamente tres veces y media mayor que la de PWB3M. Su señal relativa, $(\Delta|Z|_{\text{NPM}})/(|Z|_{110\text{MHz}})$, es elevada aunque no tan espectacular como la absoluta, y su valor de $\text{SNR}_{|Z|}$ es el más elevado mostrado hasta el momento, ligeramente superior al de PWB3M. Sin embargo, este circuito resulta menos sensible debido a un parámetro del cual no se ha hablado todavía: la señal del sustrato de papel de las muestras. Los circuitos PWB1 y PWB3M, así como el hilo de cobre CuW0.03 apenas detectan una variación en la impedancia al medir un papel sin NPM, mientras que en el circuito PWB3S la señal del papel se ha incrementado más de tres órdenes de magnitud. En el cuadro 4.3 se muestran los valores de detección del papel para los circuitos impresos. Cuando la señal del papel cobra importancia, es más exacto interpretar que la señal debida a las NPM sea la diferencia $\Delta|Z|_{\text{NPM}} - \Delta|Z|_{\text{papel}}$. En este caso la definición de SNR utilizada hasta ahora (ecuación 3.8) debería ser corregida por la siguiente:

$$\text{SNR}^* = \frac{\Delta|Z|_{\text{NPM}} - \Delta|Z|_{\text{papel}}}{\sigma(\Delta|Z|_{\text{NPM}}) + \sigma(\Delta|Z|_{\text{papel}})} \tag{4.1}$$

Donde $\sigma(\Delta|Z|_{\text{NPM}}) + \sigma(\Delta|Z|_{\text{papel}})$ se puede considerar $2\sigma(\Delta|Z|_{\text{NPM}})$. En definitiva, se concluye que el circuito PWB3S no es realmente más sensible que el PWB3M.

4.3 Influencia de las características de las nanopartículas

4.3.1 El superparamagnetismo es necesario

Para demostrar que la detección de las nanopartículas de Fe_3O_4 está relacionada con su comportamiento superparamagnético, se midieron muestras de nanopartículas de oro, Au50, y de micropartículas ferromagnéticas, SiMAG800. Las nanopartículas de oro son morfológicamente similares a las NPM, esferas metálicas de tamaño nanométrico. Sin embargo, y debido al carácter no magnético del oro, esta muestra no produce una señal apreciable en el mejor sensor en el momento del experimento (CuW0.03), en las mejores condiciones de medida ($f = 110$ MHz, $V = 500$ mV, 16 promediados).

Las micropartículas SiMAG800 son ferromagnéticas, lo que nos permite comprobar si la detección se debe a una inducción electromagnética mutua, o expresado equivalentemente, se comprueba si existe interacción entre la corriente del sensor y la imanación del material ferromagnético. Incluso en las condiciones más favorables, la señal debida a estas partículas es del orden de solo 3 mΩ, un orden de magnitud menor que la señal de las NPM superparamagnéticas de igual masa (800 µg).

Los resultados obtenidos son un potente indicio de la importancia del estado superparamagnético de las partículas en este tipo de detección.

Dado que se intuye una relación entre el superparamagnetismo y la señal, es muy interesante analizar el efecto del tamaño de las NPM, siempre por debajo del tamaño crítico para que se produzca dicho comportamiento.

4.3.2 Influencia del tamaño de las nanopartículas

Conocer cómo el tamaño de las NPM afecta a la señal medida por el detector es de gran interés, no sólo desde un punto de la aplicación, sino también desde el punto de vista fundamental, para conocer mejor cómo es la interaccion entre las NPM y los sensores.

Es importante remarcar que para discernir exclusivamente el efecto en la señal de las dimensiones de las NPM, las muestras escogidas debían ser equivalentes, es decir, misma composición (Fe_3O_4), recubrimiento (ácido poliacrílico) y diluyente (medio acuoso a pH básico). Algunas de estas partículas son comerciales, como las ya mencionadas NGAP FeO-2204-W y NGAP FeO-2208-W, nanoesferas de 10.5 nm y 23.1 nm de diámetro, respectivamente. Otras partículas fueron cedidas por el *International Iberian Nanotechnology Laboratory* (Braga, Portugal) [36].

Se diseñó un elemento sensor dimensionado para estas muestras:

- **PWB4M**. Cuatro pistas paralelas tipo meandro de 0.25 mm separadas 0.25 mm. Longitud: 10 mm.

En las gráficas de la figura 4.8 se representa la relación entre la señal del NPSensor por unidad de masa de particula y las propiedades estructurales y magnéticas de las mismas (mostradas en el cuadro 1.2). En una primera observación llama la atención que el tamaño correspondiente a la máxima señal es 10.5 nm, con independencia de la imanación a saturación y la susceptibilidad inicial. También es destacable la correlación entre la señal y la temperatura de bloqueo, salvo para las partículas más pequeñas (4.6 nm y 5.5 nm). Estas partículas son también las que tienen una imanación llamativamente baja para esta composición. Esta degradación de la imanación es típica de los tamaños tan pequeños para los cuales los defectos superficiales cobran una importancia relativa muy grande.

4.3.3 Concentración de NPM

En la sección 1.3.3 (página 15) se comprobó mediante medidas de SQUID que las NPM depositadas en papel, si bien presentan curvas FC-ZFC que evidencian interacción dipolar, tienen comportamiento superparamagnético a temperaturas superiores a 150 K.

Para estudiar cómo la interacción entre las NPM pudiera influir en la detección se prepararon varias muestras de NPM depositadas en papel con la misma masa, pero diferentes dimensiones del sustrato, lo que implica diferente concentración C_{V}. Las longitudes de las muestras son 30, 25, 20, 15 y 10 mm, mientras que su anchura y espesor son constantes (2 mm y 150 µm respectivamente). En cada muestra se depositó el mismo volumen de ferrofluido, equivalente a 408 µg. Para medir estas muestras se usó un nuevo elemento sensor:

- **PWB2M**. Dos pistas paralelas tipo meandro de 0.25 mm separadas 0.25 mm. Longitud: 40 mm.

En la gráfica 4.9 **(b)**se observa cómo la señal $\Delta|Z|_{\mathrm{NPM}}$ es aproximadamente la misma para cinco muestras a concentraciones diferentes. Este resultado, junto con la linealidad de la señal en función de la masa mostrada en la figura 4.2 **(b)**, indica que las interacciones entre las NPM no afectan significativamente a la señal.

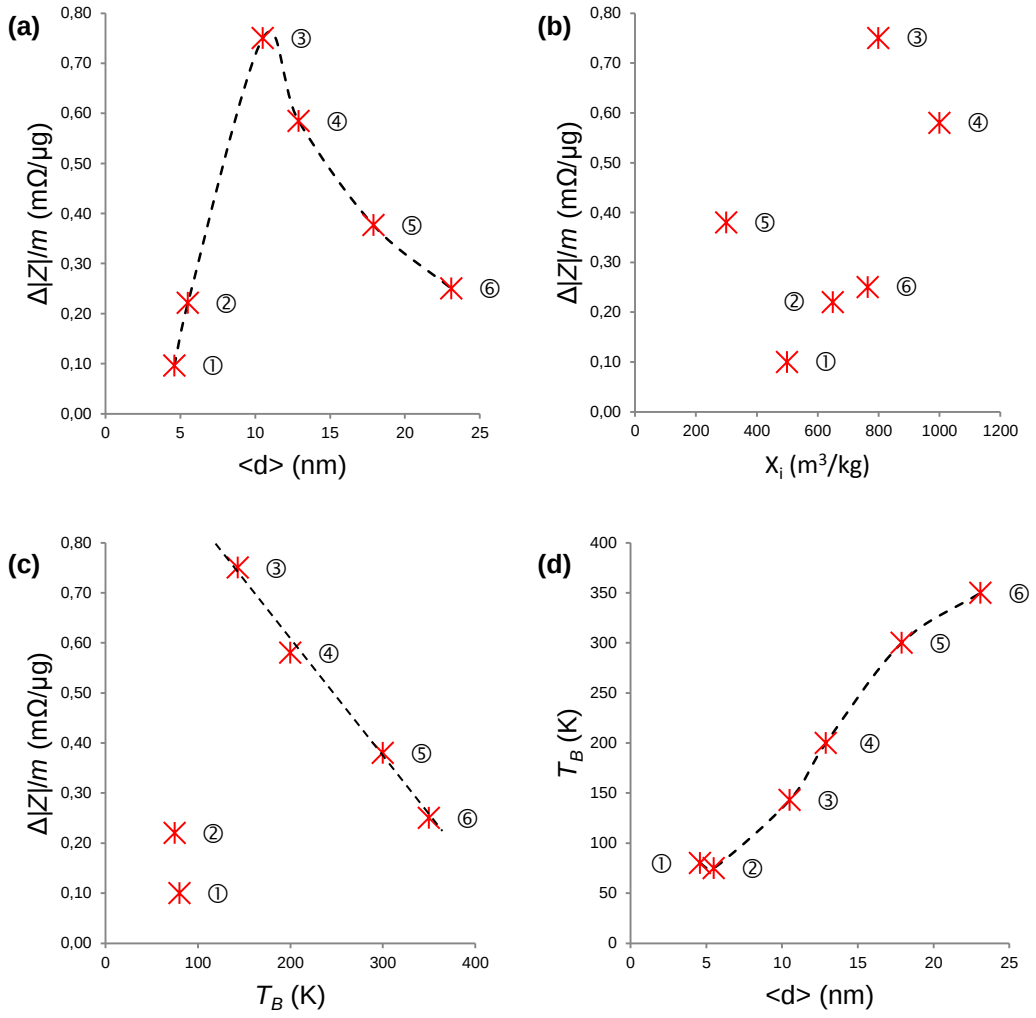

Figura 4.8: **(a)** Señal por unidad de masa en función del tamaño de las NPM. **(b)** Relación entre la señal y la imanación inicial. **(c)** Relación entre la señal y la temperatura de bloqueo. **(d)** Temperatura de bloqueo frente a diámetro de las NPM.

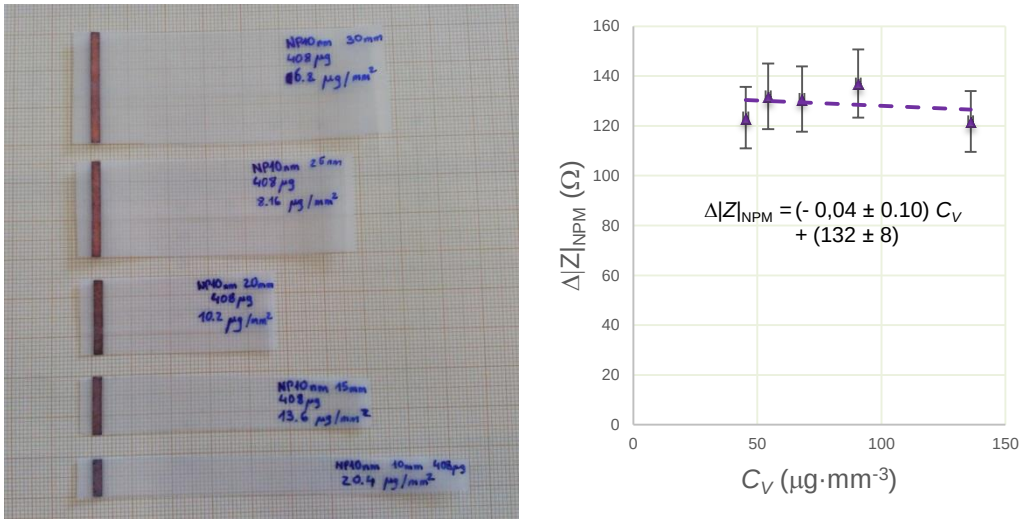

Figura 4.9: **(a)** Fotografía de las muestras utilizadas. **(b)**Variación de la señal en función de la concentración C_V de NPM en el rectángulo de papel.

4.3.4 Influencia de un campo magnético externo

En el apartado 3.14 se comprobó que la señal de las NPM apenas difiere realizando la medida con o sin campo magnético externo aplicado. Dichas medidas fueron realizadas con cintas magnetoimpeditivas como elemento sensor y aplicando campos magnéticos débiles, hasta 400 A m^{-1} o 5 mT.

Además, se realizaron pruebas del efecto de un campo magnético de 1 T creado por un imán de NdFeB, colocado sobre el canal de posicionamiento, separado aproximadamente 0.3 mm de la muestra y 0.6 mm del sensor, tal y como se observa en la figura 4.10 **(a)**.

Se utilizaron dos muestras distintas: la primera de 640 µg de FeO-2204-W, y la segunda de 650 µg de fluidMAG-Protein G (micropartículas compuestas de una matriz de almidón conteniendo NPM superparamagnéticas y recubiertas de "Proteína G", `Chemicell GmbH`, código 4204). Su presentación es la habitual, depositadas en papel y recubiertas de cinta adhesiva. El elemento sensor para este estudio fue el PWB4M.

En el cuadro 4.4 se observa cómo, al posicionar el imán, la impedancia del circuito sin NPM Z_0 decrece ligeramente por la inducción mutua. La señal debida a las NPM se reduce significativamente, tanto en módulo $|\Delta|Z|_{\mathrm{NPM}}|$ como en fase $|\Delta\phi_{\mathrm{NPM}}|$, en presencia del imán.

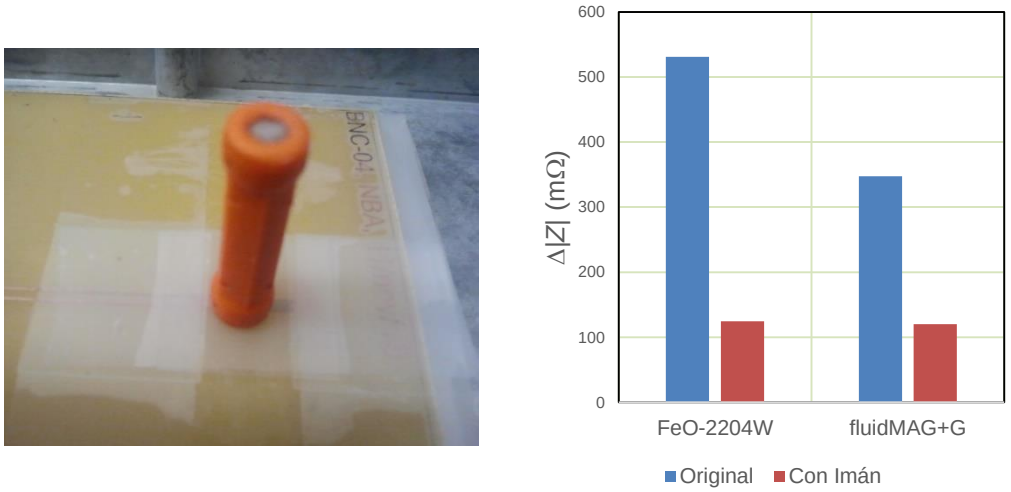

Figura 4.10: **(a)** Posicionamiento del imán sobre el sensor. **(b)** Señal de las NPM con y sin imán.

Muestra	Imán	Z_0 (Ω)	$\lvert\Delta\lvert Z\rvert_{\text{NPM}}\rvert$ (mΩ)	$\phi_0(^o)$	$\lvert\Delta\phi_{\text{NPM}}\rvert$ (m^o)
FeO640	No	60.751	530.9	84.794	-154.3
	Sí	60.592	124.5	84.802	-2.1
fluidMAG+G	No	60.796	347.5	84.801	-50.9
	Sí	60.606	120.2	84.814	-3.1

Cuadro 4.4: La señal de las NPM disminuye notablemente cuando se aplica un campo magnético intenso.

4.4 Origen de la detección de NPM

4.4.1 Detección de NPM mediante sensores inductivos: estado del arte

Existen pocos artículos en la literatura científica sobre detección de partículas magnéticas mediante sensores inductivos. Por ejemplo, Kriz *et al.*[37] desarrollaron un sensor consistente en una bobina cuya autoinductancia L se modifica en presencia de partículas magnéticas. Hawkins *et al.*[38] construyeron un sensor parecido, también basado en una bobina que genera un campo magnético, y detectan la presencia de la partículas paramagnéticas debido a su influencia en la frecuencia de resonancia de la bobina, que está relacionada con su autoinductancia. Otra aproximación diferente es la seguida por Meyer *et al.*[39], o por Nikitin *et al.*[40], que aplican un campo magnético intenso (varios teslas) cuya función es saturar las NPM. A continuación miden la imanación de la muestra con magnetómetros en forma de pequeñas bobinas de cobre que detectan la contribución de las NPM superparamagnéticas. También existe la posibilidad de fabricar bobinas planas, como las usadas por Mäkiranta *et al.*[41], cuya autoinductancia se ve afectada por la presencia de las partículas magnéticas. Otro ejemplo es la patente US6046585 A [42] en la que dos bobinas planas idénticas están sumergidas en un intenso campo magnético uniforme generado por dos imanes enfrentados. Sobre una de las bobinas se coloca la muestra de NPM, por lo que la diferencia de imanación medida por cada una será debida a la imanación de las NPM y en consecuencia directamente proporcional a las mismas.

En todos estos trabajos se someten las NPM al influjo de un campo magnético intenso, orientando sus momentos magnéticos, y observándo cómo influyen en un sensor consistente normalmente en una bobina.

4.4.2 Explicación física de la detección

Aunque en principio podría suponerse que el origen de la detección mediante NPSensor es similar a los descritos en las líneas anteriores, a continuación destacaremos los resultados experimentales que descartan esta hipótesis.

En primer lugar hay que señalar que con NPSensor no se utiliza ningún campo aplicado distinto del que pueda generar la propia corriente alterna de detección. Esta corriente tiene una amplitud máxima de 20 mA. Utilizando la ley de Biot-Savart para una estimación del campo generado a 0.2 mm de la micropista, resulta una amplitud de campo magnético de 20 μT (corroborado por calibración experimental utilizando corriente contínua), lo que

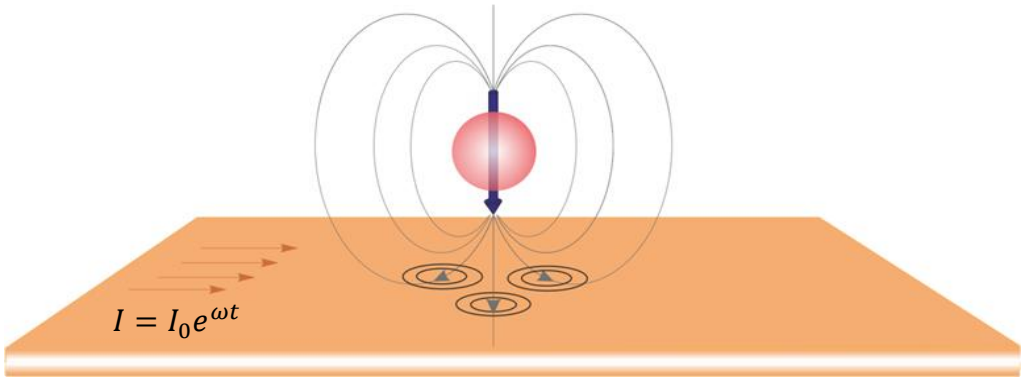

Figura 4.11: Representación esquemática de una nanopartícula superparamagnética induciendo corrientes de Foucault en la superficie de un conductor por el que circula una corriente alterna.

hace un campo demasiado pequeño como para excitar significativamente las partículas superparamagnéticas. De hecho, si la amplitud de la intensidad de corriente se disminuye en dos órdenes de magnitud el valor de la señal no cambia en absoluto (si bien, empeora la señal sobre ruido). En cualquier caso, la ausencia de correlación entre la señal del NPSensor y la susceptibilidad magnética inicial (figura 4.8 **(b)**) apoya fuertemente el descarte de esta primera hipótesis.

En este trabajo se baraja como hipótesis más plausible que la detección está causada por la oscilación espontánea de los momentos magnéticos de las partículas debida a la agitación térmica y característica de su estado superparamagnético. Así, estas partículas produce en su entorno un campo magnético variable con el tiempo que al alcanzar la superficie del conductor induce localmente corrientes de Foucault (figura 4.11). Estas corrientes de torbellino interfieren con el flujo de la corriente principal que fluye por el sensor, actuando como obstáculos (o defectos) y en consecuencia produciendo el aumento de la impedancia medida [43]. Cabe destacar que si bien los campos magnéticos creados por las partículas son realmente muy débiles, su frecuencia de oscilación es muy elevada y por tanto las corrientes inducidas significativas. Este efecto es efectivamente independiente del campo magnético generado por el sensor.

Son consistentes con esta hipótesis los resultados experimentales de las pruebas de aplicación de un campo intenso mediante la aproximación de un imán permanente (4.10). Bajo la acción de un campo magnético intenso, un gran número de NPM superparamagnéticas se bloquean, reduciendo la

oscilación de la imanación debido a la acción de la excitación térmica, y por lo tanto disminuyendo su señal.

En la figura 4.2 **(a)**se observa que la señal sí depende de la frecuencia f que circula por el sensor. Esto se explica por el efecto pelicular. Según la ecuación 3.4, la profundidad de penetración es proporcional al inverso al cuadrado de la frecuencia. Por lo tanto, a mayor frecuencia, mayor es la fracción de corriente que se ve afectada por las corrientes de Foucault causadas por las NPM. Por otro lado, la frecuencia a la que éstas oscilan se puede calcular como el inverso del tiempo de bloqueo (ecuación 1.4), $f_{\mathrm{NPM}} = 1/\tau_N$, y su valor está en el orden de los gigahertzios. Es de esperar que cuando ambas frecuencias tengan valores similares ($f_{\mathrm{NPM}} \sim f$) se observe un fenómeno de resonancia que maximice la señal.

Esta interacción entre las partículas y la corriente también explica por qué la señal es inversamente proporcional a la sección transversal del conductor. A una frecuencia tan elevada como 110 MHz, la profundidad de penetración de la corriente del sensor es inferior a 10 µm. Para un sensor de sección rectangular donde uno de los lados es del orden de milímetros la corriente se concentra casi exclusivamente en las esquinas del conductor. Las NPM que están sobre la zona central del sensor producen corrientes de Foucault igualmente, pero las producen en una zona en la que apenas circula corriente, por lo que no afectan apreciablemente a la impedancia. De la misma manera, se favorece que la señal sea mayor en un conductor de sección circular que en otro de sección rectangular, explicando la forma de la figura 4.1 **(a)**.

Otro argumento que apoya esta hipótesis es la correlación entre la temperatura de bloqueo y la señal por unidad de masa (figura 4.8 **(c)**): Puede considerarse que a mayor T_{B} menor oscilación de los momentos magnéticos, lo que implica una reducción de la señal. Lógicamente el efecto también debe estar relacionado con la imanación a saturación de las partículas, por lo que las más pequeñas (4.6 y 5.5 nm) al tener un valor tan reducido de M_{s} no pueden compararse con las demás y tienen una señal en el sensor considerablemente menor.

El valor máximo de la señal por unidad de masa para el tamaño de 10.5 nm (figura 4.8 **(a)**), en virtud de lo expuesto en el párrafo anterior, parece ser el resultado del compromiso entre una temperatura de bloqueo baja y un valor razonable de la imanación a saturación.

4.5 Conclusiones

En este capítulo se ha discutido el origen físico de la detección de las NPM. Todos los resultados experimentales parecen confirmar la hipótesis de

que el incremento de la impedancia del sensor está causado por la interacción entre las partículas y la corriente que circula por el sensor. La oscilación de los momentos magnéticos de las partículas, producida por la energía térmica, conlleva la inducción local de corrientes de Foucault en la superficie del conductor, dificultando la conducción y aumentando la impedancia.

Capítulo 5
Aplicaciones del NPSensor

En este último capítulo se describen dos aplicaciones del NPSensor usando NPM funcionalizadas: en la primera se muestra cómo el NPSensor es capaz de detectar NPM fluyendo en la proximidad del mismo; en la segunda se utiliza el NPSensor para detectar y cuantificar una proteína en concentraciones de interés clínico, como ejemplo de su capacidad como sensor de analitos.

Para detectar las NPM con el NPSensor es necesario aproximar la muestra al sensor de manera controlada, y en esta investigación se utilizaron Tiras de Flujo Lateral (TFL), para lo cual se contó con la colaboración de la Dra. Mª del Carmen Blanco-López y de Myriam Oliveira-Rodríguez, que prepararon las membranas utilizadas en este trabajo además de participar con útiles discusiones y sugerencias.

5.1 Tiras de flujo lateral

Las Tiras de Flujo Lateral son una familia de dispositivos basados en papel cuyo objetivo es detectar la presencia o ausencia de un analito (la proteína o compuesto químico de interés) en una muestra líquida. Entre las ventajas de esta técnica están la rapidez y la simplicidad de su uso. Al no necesitar equipamientos especializados y costosos para la lectura, su uso está muy extendido fuera del laboratorio, lo que se conoce como *home testing* o *point of care testing*, incluso sin necesitar personal especializado. Así, la aplicación más conocida de las TFL son los conocidos test de embarazo.

5.1.1 Componentes

Las TFL se basan en membranas porosas compuestas de polímeros sintéticos, como la nitrocelulosa, que permiten el flujo espontaneo de fluidos por capilaridad. La figura 5.1 representa esquemáticamente el funcionamiento de una TFL.

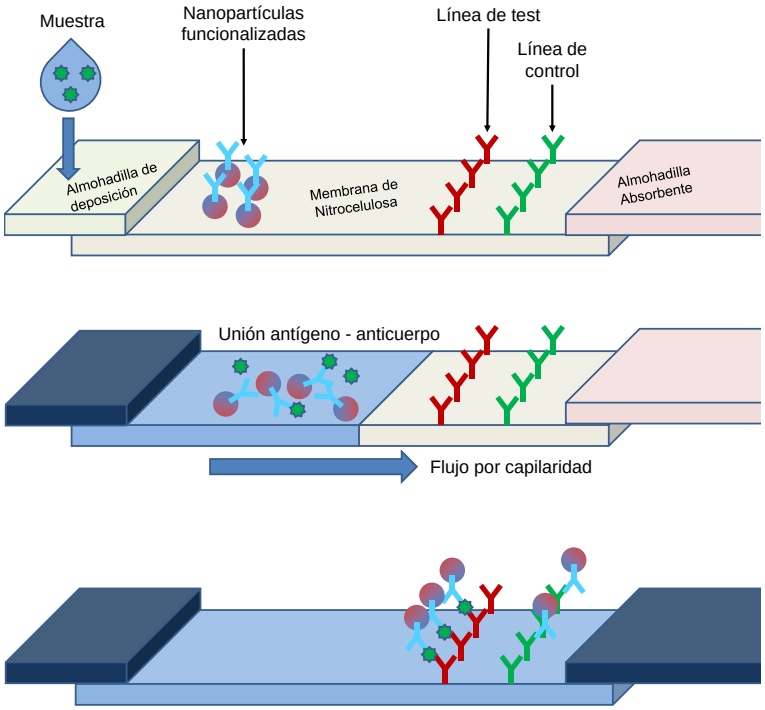

Figura 5.1: Representación esquematizada de una TFL.

La especifidad de este tipo de ensayos se debe al uso de anticuerpos u otras proteínas que capturan específicamente el analito que se desea detectar. En una TFL suelen utilizarse tres anticuerpos:

Anticuerpo de marcaje . Va unido al agente que otorga el color a las líneas, habitualmente partículas micrométricas o nanométricas de látex, oro o plata. Su antígeno es el analito que se desea detectar.

Anticuerpo de captura . Se deposita en la **línea de test** y, al igual que el anticuerpo de marcaje, va contra el analito a detectar, normalmente contra un epítopo distinto. Su objetivo es retener el analito, si está presente, junto con las partículas que lo han marcado.

Anticuerpo de control . Se deposita en la **línea de control**, y su antígeno suele ser el anticuerpo de marcaje para así detener las partículas no marcadoras, que no quedan capturadas en la línea de test.

Las proteínas de captura se han de depositar o imprimir en la membrana antes de su uso, y se adhieren a la misma por interaccion electrostática. Para evitar que otras proteínas se adhieran inespecíficamente a las membranas, éstas se sumerjen en un agengte bloqueante, como por ejemplo la albúmina (una pequeña proteína de apenas 67 KDa y elevada concentración de cargas eléctricas negativas), que se adhiere a las fibras de las membranas sin impedir el flujo normal. Las membranas básicas componentes de una TFL son:

Almohadilla de deposición. Es la primera membrana del test y en ella se deposita la muestra líquida. Su misión es absorber la mayor cantidad posible de fluido y transferirlo en flujo laminar a la siguiente membrana.

Membrana central. Es la parte central del ensayo y en ella se han de imprimir las líneas de captura.

Almohadilla absorbente. Es la membrana en la parte final de la TFL y su objetivo es absorber todo el volumen de la muestra una vez que ha fluido a través de las líneas de captura.

5.2 Detección de nanopartículas fluyendo sobre el sensor

El objetivo de este experimento es probar si el NPSensor es capaz de detectar NPM fluyendo en una TFL en la proximidad del mismo.

5.2.1 Materiales

Se prepararon membranas de nitrocelulosa con una línea de captura creada mediante deposición de albúmina de suero bovino biotinilada (BSA-biotinilada). La proteína BSA (por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*), previamiente marcada con biotina (de la que se habló en el apartado 2.1.2, página 21) tiene mucha carga eléctrica por lo que se adhiere firmemente a las membranas. Precisamente por esta propiedad suele utilizarse también para bloquearlas. La línea de captura de BSA-biotinilada se depositó a una concentración de 2 mg mL^{-1} usando el equipo IsoFlow (Imagene Technology) y se secó durante una hora a 37ºC. Cada TFL utilizada estaba compuesta por una almohadilla de deposición de fibra de vidrio (GFCP001000, Millipore), la membrana de nitrocelulosa (UniSart CN95), y una almohadilla absorbente. La membrana CN95 presenta un lado cubierto de plástico que se adhirió a la superficie del NPSensor, teniendo especial cuidado en dejar la línea de captura exactamente sobre la superficie del elemento sensor. Las almohadillas también se adhirieron sobre la placa del sensor, montando 2 mm de su longitud sobre la membrana.

En esta ocasión su utilizaron las pistas PWB2M, ya que su tamaño ajusta casi a la perfección con la anchura de la línea de captura en la membrana de nitrocelulosa. Su impedancia fue medida usando el Analizador de Impedancias Agilent 4294A y el conector 16048G, a una frecuencia fija de 110 MHz y 500 mV de amplitud.

Se hicieron pruebas con dos NPM distintas. Para la primera de ellas, se utilizó la nanopartícula de 10 nm de diámetro medio de magnetita, recubierta de ácido poliacrílico y dispersa en agua (Nanogap SL FeO-2204W) que ya se había usado en experimentos descritos en capítulos anteriores. Para la segunda se utilizo un compuesto de nanopartículas superparamagnéticas de Fe_3O_4y radio en torno a 12 nm embebidas en una matriz de almidón y recubierta de estreptavidina, adquirida en Chemicell (fluidMAG-Streptavidin).

Por último, para asegurar un correcto flujo a través de la membrana, y también para asegurar el funcionamiento de la unión biotina-estreptavidina, se usó un buffer concreto para humedecer las membranas antes de hacer circular las partículas, que también estaban dispersas en dicho buffer. El

	FeO-2204W	fluidMAG-Streptavidin
Imanación/masa*	50 Am^2kg^{-1}	40 Am^2kg^{-1}
Masa de NPM	640 µg ± 5 %	650 µg ± 5 %
$\Delta\|Z\|$	529.5 ± 0.7 mΩ	353.6 ± 0.7 mΩ
Resolución |Z|	0.86 µg	1.3 µg
$\Delta\phi$	−155.4 ± 0.7 m°	−51.8 ± 0.7 m°
Resolución ϕ	2.9 µg	8.8 µg

Cuadro 5.1: Señal medida con el NPSensor BNC-03 de las partículas utilizadas. * Valores de imanación nominales.

buffer usado fue un suero salino, PBS (de sus siglas en inglés *Phosphate Buffer Saline*), en concentración 9.55 mM a pH 7.4 y con 2 % del tensoactivo Tween 20.

5.2.2 Resultados y discusión

En primer lugar, y como referencia, se midieron muestras de los dos tipos de partículas sobre papel secante, tal y como está descrito en el apartado 1.3.3. En la tabla 5.1 se muestran los valores obtenidos. Se observa que las NPM de 10.5 nm producen una señal notablemente mayor.

Detección del buffer

En los capítulos anteriores, para medir las NPM en seco siempre se comprobaba con anterioridad la señal de una muestra "blanco". Sin embargo, para detectar las partículas fluyendo sobre el sensor no es necesario, ya que la TFL permanece sobre el NPSensor durante toda la medida. Sí que resulta interesante conocer cómo varía la impedancia del sensor debido a la presencia del buffer ya que, en general, ésta depende de la constante dieléctrica de su entorno. La constante dieléctrica del aire se suele considerar idéntica a la del vacío (ε_0), mientras que la de cualquier otro material será mayor ($\varepsilon_r > \varepsilon_0$). Como la impedancia es proporcional a la inversa de la raíz cuadrada de la constante dieléctrica relativa del entorno del sensor, se puede concluir que si se reemplaza el aire presente entre los poros de las membranas por cualquier otro material la impedancia medida del elemento sensor se reducirá.

$$Z \propto \frac{1}{\varepsilon_r} \tag{5.1}$$

Para observar el efecto que produce la presencia del buffer en la señal del NPSensor se procedió a depositar, sobre una TFL inicialmente seca, peque-

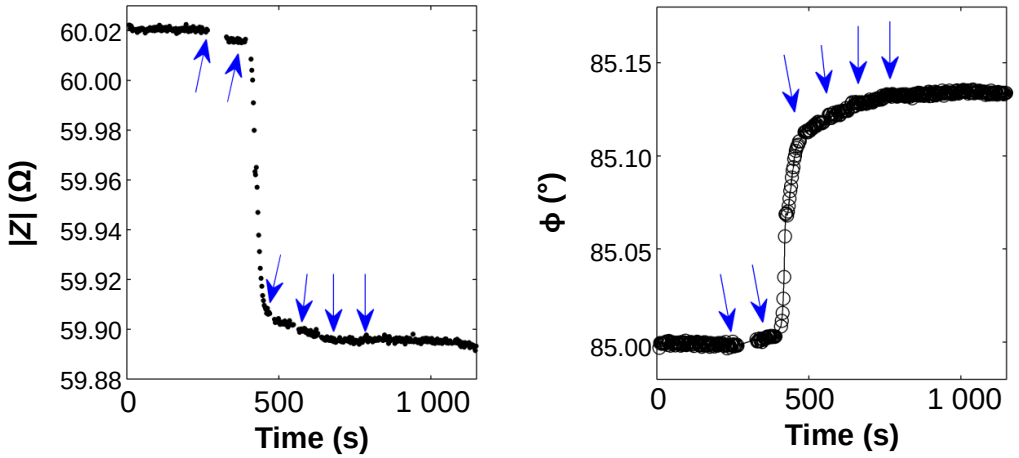

Figura 5.2: Variación de la impedancia causada por la deposición de 20 µL de buffer. Las líneas azules indican los instantes en los que se depositó cada gota.

ñas gotas de 20 µL de buffer. Como la micropipeta utilizada para manejar los fluidos tiene partes metálicas e incluso ferromagnéticas, se modificó el software `LabView` para que se detuviera la medida cada vez que se realizó una deposición. Cada parada y deposición está señalada en la figura 5.2 como flechas azules. Tras la primera deposición la membrana de nitrocelulosa se humedeció parcialmente sin llegar a humedecerse la región sobre el sensor. Tras la segunda deposición el buffer alcanzó la zona sensora y, como era de esperar, la impedancia del NPSensor varió bruscamente. Las sucesivas deposiciones no producen apenas variaciones en la impedancia, siendo su efecto despreciable, ya que cuando todo el volumen muerto de la membrana está lleno de fluido, no es posible introducir más, y el fluido se desplaza hacia la almohadilla absorbente.

Por ello, en los siguientes experimentos se decidió humedecer las TFL con 60 µL antes de hacer fluir las partículas por ellas.

Detección de partículas magnéticas fluyendo por las TFL

Para evidenciar que el NPSensor es capaz de detectar nanopartículas magnéticas se depositó en las TFL una cantidad fija (100 µg). Se usaron dos tipos de partículas magnéticas, las FeO-2204W y las fluidMAG-Streptavidin. La membrana disponía de una línea de captura con BSA-biotinilada, que presenta una gran afinidad por la estreptavidina que recubre las partículas fluidMAG-streptavidin, pero no por el ácido poliacrílico que recubre las FeO-

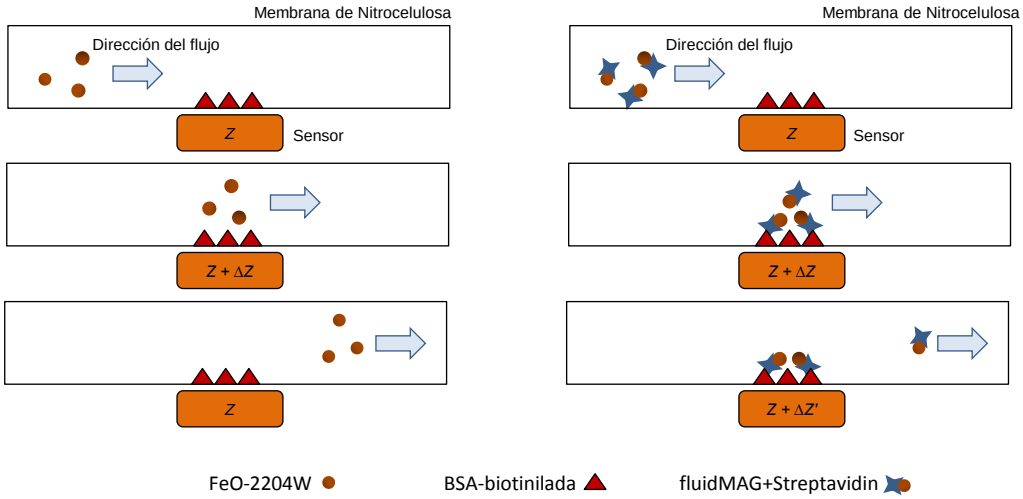

Figura 5.3: Diagrama representando el flujo en el interior de la membrana de nitrocelulosa y la señal producida por las partículas.

2204W. Era de esperar por tanto que ambas partículas se comportasen de forma diferente, unas quedándose atrapadas en la línea de captura y otras fluyendo hasta la almohadilla absorbente, tal y como se muestra en la figura 5.3. El protocolo de deposición de las partículas fue el siguiente:

1. Deposición de 60 µL de buffer. Se espera 200 s hasta que la membrana queda húmeda y la señal del NPSensor estable.

2. Deposición de 100 µg de partículas en 10 µL de disolución.

3. Deposición de 10 µL de buffer para "empujar" las partículas.

4. Incorporación cada 200 s de 10 µL de buffer para evitar que el flujo por capilaridad se ralentice en exceso.

Primero se hicieron circular sobre el sensor las partículas FeO-2204W. Su recubrimiento de ácido poliacrilico les dota de una gran estabilidad a la vez que evita que se adhieran a la fibras de las membranas. Además, como no poseen ninguna afinidad por la BSA-biotinilada, estas partículas no quedan atrapadas en la línea de captura. Como puede observarse en la figura 5.4 la concentracion a lo largo de la tira no es uniforme. No obstante, cuando las primeras partículas se aproximan al elemento sensor la impedancia aumenta hasta alcanzar un máximo, que en el caso particular esta figura fue de 18 mΩ. Las NPM siguen fluyendo, aclarándose el color de la membrana en la región sobre el sensor a la vez que el valor de la impedancia decrece

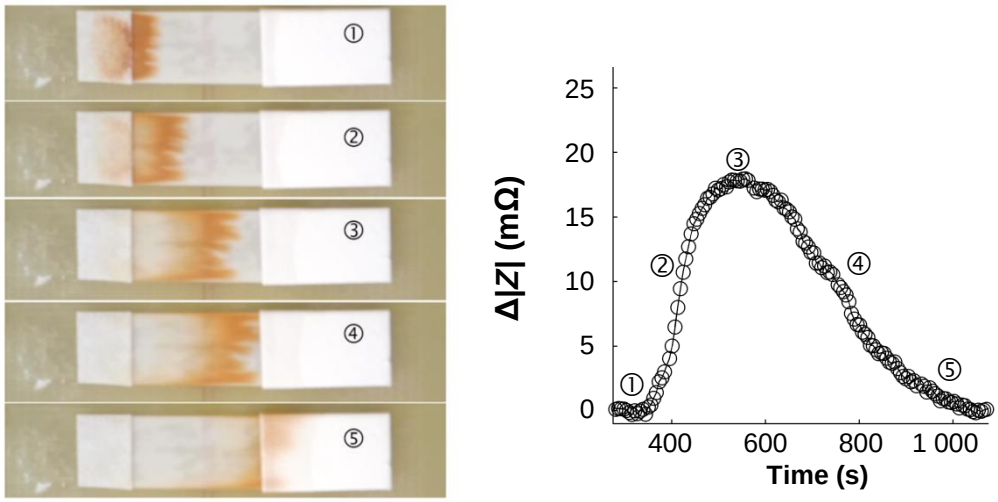

Figura 5.4: Señal de las NPM FeO-2204W y fotografías de la TFL en distintos instantes de la medida.

progresivamente hasta alcanzar el valor inicial. Como era de esperar, no se aprecian NPM FeO-2204W detenidas en la línea de captura. Sabiendo que 650 µg de las mismas producen una señal de aproximadamente 530 mΩ (ver cuadro 5.1) se puede estimar que la mayor concentración de NPM sobre el sensor fue de aproximadamente 22 µg. En la figura 5.5 se muestra el mismo experimento realizado esta vez con fluidMAG-Streptavidin. Estas partículas sí que tienen una gran afinidad por la BSA-biotinilada debido a la interacción estreptavidina-biotina. De nuevo se depositaron 100 µg en la almohadilla que fluyeron por la membrana, incrementando el valor medido de impedancia hasta alcanzar un máximo. El valor de este máximo, 6 mΩ, es menor que el obtenido con las partículas FeO-2204W, algo esperado desde las medidas realizadas con las muestras patrón (cuadro 5.1). Sin embargo, en este caso la impedancia no retorna a su valor inicial, si no que se estabiliza en un valor aproximado de 2 mΩ. Como una muestra de 650 µg de fluidMAG-Streptavidin produjo una señal aproximada de 350 mΩ se puede estimar que aproximadamente el 4 % de las partículas fue retenido en la línea de captura.

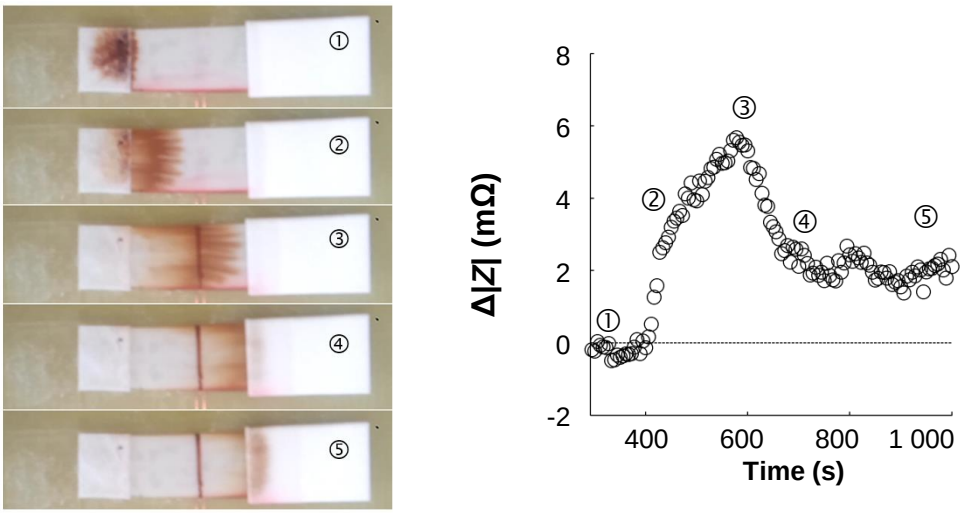

Figura 5.5: Señal de las partículas fluidMAG-Streptavidin y fotografías de la TFL en distintos instantes de la medida.

5.3 Cuantificación de PSA

Como colofón de este trabajo, y para mostrar la capacidad del NPSensor para la detección y cuantificación de una sustancia biológica, se prepararon los inmunoensayos de flujo lateral con NPM de magnetita para la detección selectiva de un analito determinado: el antígeno específico de próstata (**PSA** por sus siglas en inglés, *Prostate Specific Antigen*).

5.3.1 Antígeno específico de próstata

El PSA es una pequeña proteína, de 30 kDa de masa molecular y cuya principal función es hacer fluido el semen (ver figura 5.6. El cáncer de próstata es el segundo más frecuente en hombres, con casi 900 000 nuevos diagnósticos anuales en el mundo entero.

En la actualidad se utiliza de manera sistemática el análisis del PSA en combinación con la exploración rectal para examinar si hombres asintomáticos presentan cáncer de próstata. En principio, pacientes con una concentración de PSA menor que 4 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$ presentan un riesgo bajo de cáncer de próstata, mientras que pacientes con concentraciones mayores que 10 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$ presentan un riesgo alto [44]. Tambien es un marcador de interés para seguimiento post-operatorio de pacientes a los que previamente se les hubiera extirpado la próstata. En estos casos, los niveles de PSA que se desean detectar son del orden de 0.01 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$.

5.3.2 Materiales y métodos

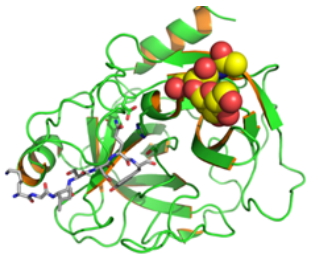

Figura 5.6: Estructura del PSA (estilo de cintas, en verde y naranja). También están representados un sustrato enzimático (estilo de varillas) y un disacárido (estilo de esferas, en amarillo y rojo).

PSA, NPM y TFL

En lugar de utilizar muestras reales de pacientes, se utilizó PSA recombinante (Recombinant Human Kallikrein 3/PSA) adquirido a la empresa Vitro, que fue diluido en suero salino (PBS).

Para capturar el PSA se adquirieron a la misma empresa dos anticuerpos ya preparados para hacer un ensayo tipo sandwich de PSA, es decir, que sus antígenos son distintos epítetos de la proteína. Uno de ellos, de código MAB13442, se usó como anticuerpo de captura en la membrana. Mientras que el otro, RYD-BAF1344, es un anticuerpo ya biotinilado para favorecer la unión a las NPM. Se usó un anticuerpo *Anti-mouse* IgG para capturar las partículas en la línea de control.

Se utilizaron NPM de 10 nm de diámetro medio de Fe_3O_4, recubiertas de ácido poliacrílico y dispersas en agua (Nanogap SL FeO-2204W). Las partículas fueron funcionalizadas con estreptavidina y posteriormente conjugadas al anticuerpo biotinilado.

Las TFL utilizadas estaban compuestas de una almohadilla de deposición de fibra de vidrio (GFCP001000, Millipore), una membrana de nitrocelulosa (UniSart CN95), y una almohadilla absorbente. Las líneas de captura se depositaron usando el equipo IsoFlow (Imagene Technology) a una concentración de 2 $\mathrm{mg\,mL^{-1}}$ y se secaron las TFL durante una hora a 37 °.

Se prepararon alícuotas de PSA a distintas concentraciones mediante disolución en PBS, añadiendo en todos los casos 2 µL de NPM funcionalizadas hasta completar un volumen total de 100 µL. Las TFL fueron introducidas en el *eppendorf* con la muestra y ésta subió por capilaridad en unos pocos minutos (figura 5.8 (1)). Se dejaron secar antes de llevarlas al NPSensor, y se marcó en la cara posterior la posición de las líneas de captura (figura 5.8 (2)). Las concentraciones usadas fueron 10 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$, 4 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$, 1 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$, 0.5 $\mathrm{ng\,mL^{-1}}$ y un blanco (B).

Para cada concentración se realizaron tres TFL.

Medida por intensidad de color

Para validar el método NPSensor se utilizó un método óptico que estima la concentración de partículas a partir de la intesidad de color de las líneas de captura. Para ello se usó el procesador de imágenes libre `ImageJ` y se adaptó el protocolo [45] para separacion por electrofóresis en gel de proteínas para esta aplicación. De manera resumida, el protocolo consiste en

1. Realizar una fotografía de las TFL, como la de la figura 5.7 (1).

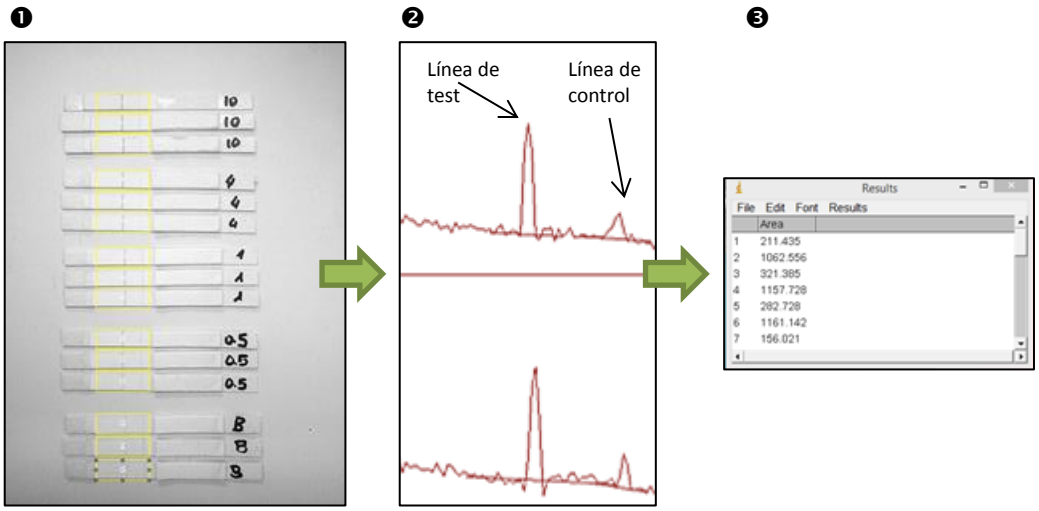

Figura 5.7: **(a)**Determinación de la intensidad de color de las líneas de test y control usando el software `ImageJ`.

2. Corregir el brillo y la nitidez de las imágenes, si es necesario. También rotarla y recortarla para que las TFL sean paralelas a los bordes de la imagen.

3. Seleccionar las regiones en las que están las líneas de captura (los rectángulos amarillos en 5.7 (1)).

4. Con ayuda del programa, promediar por filas o columnas la intensidad de color de todos los píxeles dentro de los rectángulos, obteniendo una gráfica como las de la figura 5.7 (2) para cada tira. (el fondo puede ser eliminado si es necesario)

5. Seleccionar los picos que se desean medir.

6. Exportar los valores del área bajo cada pico en unidades píxeles^2 o px^2 (figura 5.7 (3)).

Por último, las medidas para las TFL con la misma concentración se promedian.

Medidas con el NPSensor

En la última fase de esta tesis se incorporó al sensor un microposicionador que permite el deslizamiento de la TFL sobre el NPSensor sin intervención del usuario (ver figura 5.8). En la gráfica 5.8 puede verse, como ejemplo,

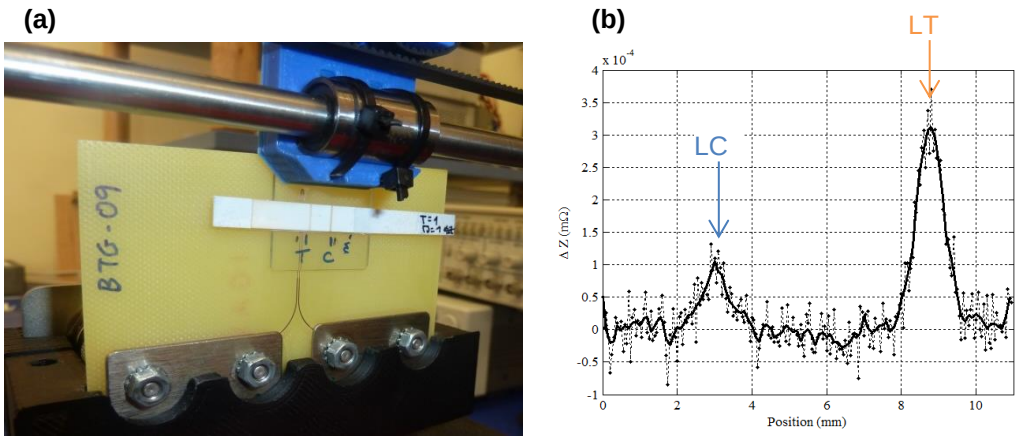

Figura 5.8: **(a)** TFL colocada en el microposicionador para su medida con el NPSensor. **(b)** Ejemplo de medida, observándose claramente la línea de control (LC) y la línea de test (LT).

el escaneo de una TFL realizada con 10 ng/mL de PSA y que muestra los picos correspondientes a la LT y la LC. En este nuevo protocolo de medida se integra la señal bajo los picos para obtener la cuantificación de todas las partículas capturadas con independencia de su distribución.

5.3.3 Resultados y discusión

Los resultados promedio de cuatro medidas con NPSensor en tripletes de TFL están representados en la gráfica 5.9 junto con los resultados del método óptico. Se observa que los resultados de cantidad de NPM en las líneas de test (LT) por los dos métodos utilizados son congruentes, validando el nuevo método magnético.

Se observa además que la señal no es lineal con la concentración de PSA, lo que indica que hay una saturación del PSA capturado en la LT. Esto es habitual en las TFL y se debe a que el espacio disponible para capturar la proteína y las NPM es limitado. Para ampliar la zona lineal es suficiente con hacer mayor la zona de captura, bien cortando las membranas más anchas o imprimiendo varias líneas consecutivas.

También se observa que los blancos dan una señal no nula, lo que parece indicar una pequeña captura accidental, pero no despreciable, de las partículas funcionalizadas.

Para comprobar si los resultados son razonables se estimó la cantidad de masa magnética capturada a partir de la calibración previa del elemento sensor PWB2M. Si bien es cierto que el soporte de las muestras de calibración

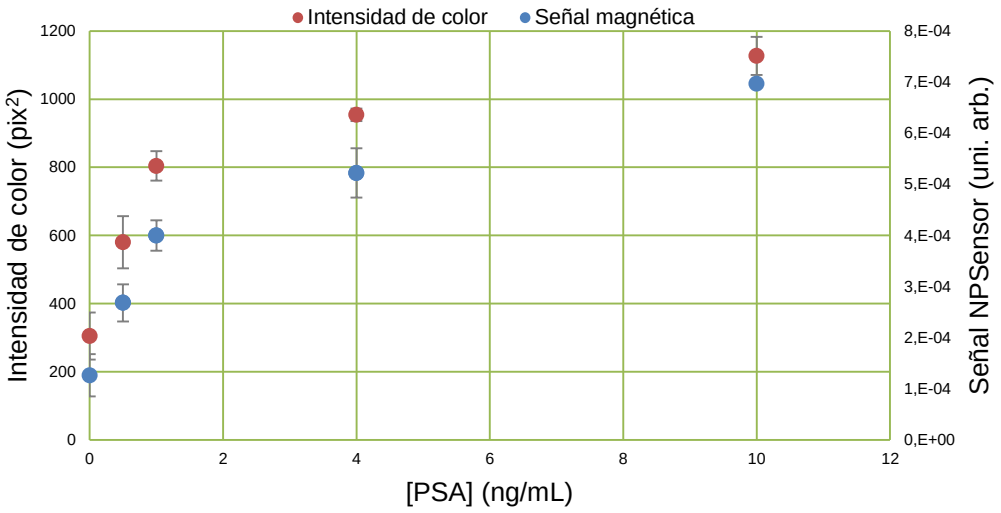

Figura 5.9: Valores de señal magnética y de intensidad de color de las líneas de test para muestras con distinta concentración de PSA.

Muestra	Señal NPSensor (uni. arb.) $\times 10^{-4}$	$M_{\mathrm{NP}}(\mu\mathrm{g})$
10 ng mL^{-1}	7.0 ± 0.8	3.9 ± 0.4
4 ng mL^{-1}	5.2 ± 0.4	3.7 ± 0.7
1 ng mL^{-1}	4.0 ± 0.5	2.8 ± 0.4
0.5 ng mL^{-1}	2.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2
B (0 ng mL^{-1})	1.3 ± 0.4	0.74 ± 0.25

Cuadro 5.2: Señal medida con el NPSensor de las TFL para distintas concentraciones de PSA.

(papel secante y cinta adhesiva) y de las muestras de TFL (membrana de nitrocelulosa) no es exactamente el mismo, se espera que el orden de magnitud de la masa magnética estimada sea el mismo, al influir los materiales dieléctricos de manera mucho más débil que las NPM en el sensor.

Ya se ha visto que las LT saturan y en las pruebas a mayores concentraciones no se está capturando todo el PSA. Sin embargo, y solo con la intención de hacer un cálculo aproximado, se supone que en la muestra con menor concentración de PSA, toda la proteína ha sido capturada en la línea de test, esto es, que se han capturado los $0.5\ \mathrm{ng\,mL^{-1}} \times 0.1\ \mathrm{mL} = 0.05\ \mathrm{ng}$ de PSA.

Por lo tanto, un máximo de 0.05 ng de PSA producen una señal magnética equivalente a 1.5 µg de NP. Sabiendo que la masa de una única proteína de PSA es 5.5×10^{-23} kg, y la masa de una nanopartícula ideal de magnetita y diámetro 10 nm es 2.7×10^{-21} kg, se puede estimar cuántas nanopartículas están marcando cada PSA, llegando al resultado que hay 600 ± 100 NPM por cada proteína de PSA.

Debido al pequeño tamaño del PSA, no es probable que varios anticuerpos biotinilados (los que están funcionalizando las NPM) hayan marcado una misma proteína de PSA. Es por lo tanto evidente que se han formado agregados de nanopartículas durante la funcionalización. Si bien en otras aplicaciones la agregación de NPM es negativo, en este caso es positivo, ya que a mayor número de nanopartículas por proteína de PSA, mayor será la resolución del NPSensor.

5.4 Conclusiones

En el presente capítulo se han presentado los resultados de la detección de Nanopartículas Magnéticas presentes en Tiras de Flujo Lateral usando el NPSensor. Se ha demostrado que el NPSensor es capaz de detectar las NPM fluyendo sobre el sensor y también es posible cuantificar una proteína en concentraciones de interés clínico. La sensibilidad del NPSensor no es suficiente como para detectar con seguridad cantidades minúsculas de proteínas a la vez que fluyen, pero sí para detectarlas y cuantificarlas una vez están secas.

Conclusiones

Las principales conclusiones de esta tesis doctoral se centran en tres aspectos: (1) el desarrollo de un sensor que permite cuantificar nanopartículas superparamagnéticas de una forma sencilla, rápida y económica; (2) la hipótesis sobre el origen principal de la detección y (3) la capacidad del sensor para cuantificar el biomarcador PSA en el rango de concentraciones de interés clínico.

1. Principales logros en el desarrollo del sensor

- Se detectaron NPM mediante el cambio que su presencia produce en la impedancia radiofrecuencia (10-110 MHz) de cintas con magnetoimpedancia gigante GMI de composición $Co_{70}Fe_5Si_{15}B_{10}$. Al mismo tiempo, se descubrió que la magnetoimpedancia es una propiedad innecesaria para la detección ya que no existe ninguna correlación entre la sensibilidad al campo de la GMI y la detección de las NPM.

- Se utilizaron entonces conductores no magnetoimpeditivos, incluso no ferromagnéticos, encontrándose el mismo tipo de variación de la impedancia como respuesta a las NPM. Se concluyó por tanto que el origen de la variación de la impedancia no es la interacción entre los dos materiales, si no la interacción entre NPM y la corriente radiofrecuencia que circula por el conductor.

- Este descubrimiento redundó en una enorme simplificación del dispositivo experimental (ya que se pudo prescindir del campo aplicado externamente mediante carretes de Helmholtz o bobinas y su correspondiente alimentación), e introdujo la posibilidad de usar las técnicas de impresión de circuitos y pistas de cobre sobre sustrato aislante (PCB o PWB), con la consiguiente mejora de la robustez del sensor y la reducción del coste de fabricación. Al mismo tiempo se eliminó la enorme influencia de la temperatura sobre la impedancia de las cintas de base cobalto, aumentando la fiabilidad del método.

2. Origen de la detección de NPM mediante NPSensor (pistas de cobre)

- La señal debida de las NPM se reduce al bloquear su imanación mediante la aplicación de un campo magnético intenso. En consecuencia, se considera que la detección de las NPM es debida a la oscilación de sus momentos magnéticos que producirían un campo magnético variable con el tiempo el cual, a su vez, generaría la inducción localizada de corrientes de Foucault en la superficie del conductor. Dichas corrientes interactuarían con la corriente alterna que fluye por el mismo produciendo un aumento de la impedancia medida.

- La señal de las NPM es directamente proporcional a su masa, lo que permite una conveniente calibración lineal.

- No se observa una correlación entre la señal por unidad de masa de las NPM de distinto tamaño y su susceptibilidad magnética inicial. Además, se comprobó que el campo que la corriente del conductor produce sobre las partículas es demasiado pequeño para producir una excitación magnética observable en las mismas. Todo ello tiende a descartar la inducción magnética mutua como origen predominante de la señal en el sensor.

- La señal por unidad de masa tiene una relación inversa con la temperatura de bloqueo de las partículas (salvo por los dos tamaños de partículas más pequeños, en los que es previsible que los defectos superficiales dominen el comportamiento magnético). Además, las partículas de magnetita micrométricas, en estado ferrimagnético, tienen una señal apenas observable (dos órdenes de magnitud inferior a la de las superparamagnéticas en igualdad de masa). Estos indicios experimentales apuntan hacia la energía térmica como causa de la oscilación de los momentos magnéticos que en última instancia produce la variación sensora. Hay que destacar que, si bien los campos magnéticos producidos por las NPM serían débiles en magnitud, su ritmo de oscilación sería elevado, lo que daría lugar a la inducción de corrientes de Focault significativas.

3. Cuantificación de la proteína PSA

- Se comprobó que las NPM pueden ser efectivamente cuantificadas mediante el NPSensor, tanto en régimen estático (depositadas o impresas sobre membrana) como en régimen dinámico (fluyendo a través de tiras de flujo lateral).

- Se lograron inmunoensayos de flujo lateral tipo sándwich para PSA, utilizando dos anticuerpos monoclonales para el marcaje y la línea de test y un anticuerpo igG para imprimir la línea de control.

- La cuantificación de los inmunoensayos fue eficaz mediante el NPSensor en el rango de concentraciones de PSA de interés clínico. La curva de calibración se validó comparándola con la obtenida a partir de análisis de la intensidad del color de las líneas. El primer prototipo de NPSensor, desarrollado en el curso de esta tesis doctoral, ha resultado ser un método de cuantificación que, si bien presenta varios puntos mejorables, cuenta ya con suficiente fiabilidad para el propósito de evaluación cuantitativa de TFL. Es además una técnica prometedora para producir un prototipo POC rápido, económico y de fácil manejo.

- La técnica de flujo lateral resulta un complemento ideal para NPSensor ya que mantiene absolutamente las características de rapidez, economía y facilidad de uso al mismo tiempo que permite por sí misma una evaluación positivo/negativo y una comprobación óptica. En el caso de las proteínas, de tamaño y masa comparables a las NPM, se concluye que es la técnica óptima para realizar la separación entre las NPM marcadoras (cuya señal es proporcional a la cantidad de analito) y las NPM libres (que no están unidas a la entidad de interés). Es esperable que, no sólo allí donde el filtrado o el centrifugado de la muestra fallan, las TFL proporcionan no sólo la separación de los dos conjuntos de NPM, si no también una comprobación de la efectividad de la funcionalización de las NPM (mediante la línea de control).

Futuras líneas de investigación

Dada la multidisciplinaridad de esta tesis, es posible establecer diferentes líneas futuras de investigación relacionadas.

1. Desarrollo de prototipos mejorados de NPSensor

Desde un punto de vista aplicado, es interesante mejorar en la medida de lo posible la sensibilidad del NPSensor, siempre buscando un compromiso de mantenimiento de la simplicidad del dispositivo. Para ello se puede proceder por dos caminos, trabajando sobre el sensor y/o sobre las NPM.

Un estudio de la mejora de la sensibilidad mediante el incremento de la frecuencia de la corriente alterna sería interesante. Los indicios experimentales indican que su aumento (hasta valores en el entorno de algunos GHz) produciría un aumento de la señal, y aunque sin duda llevaría aparejado un aumento de la complejidad del dispositivo de medida, aportaría información fundamental relevante con posibilidades de ampliar el espectro de aplicaciones del NPSensor. Por el contrario, la reducción de la frecuencia puede aportar simplicidad al dispositivo final y reducir el efecto de señales espúreas y otros efectos no deseados como la contribución a la señal de los sustratos dieléctricos.

La reducción de la sección transversal de las pistas del sensor, dentro de unos límites a determinar según las características de la corriente, conduciría al aumento de la señal debido al efecto pelicular. Así mismo, una menor separación entre pistas paralelas, nuevos diseños impresos y una mejor definición de las líneas, mediante el uso de técnicas de impresión más profesionales y específicas, son condiciones claras para señales mayores y más limpias que permitirían reducir los límites inferiores de detección.

Desde el punto de vista de las partículas utilizadas para el marcaje hay varios caminos que pueden producir mejoras notables, empezando por la síntesis reproducible de partículas con distribuciones de tamaños más estrechas y mayor calidad cristalina. Otra línea de actuación interesante, tanto desde el punto de vista fundamental como de la aplicación propuesta es la utilización de nanopartículas compuestas core@shell con mejor imanación de saturación y/o temperaturas de bloqueo más bajas o que permitan la funcionalización por rutas más eficicaces.

2. Origen principal de la detección mediante NPSensor

La descripción teórica de la detección de las NPM por el NPSensor ha de completarse. Para avanzar en este sentido sería interesante realizar simulaciones de la distribución de corriente alterna a lo largo de la sección del conductor, así como de las corrientes de Foucault de las NPM actúan sobre el sensor y su efecto en la conducción.

Así mismo, la realización de experimentos de detección a temperaturas por debajo de la de bloqueo y/o por encima de la temperatura ambiente permitirían profundizar sobre la relación de la señal con el caracter superparamagnético de las partículas.

3. Cuantificación de PSA

La evaluación magnética de las TFL permitió concluir que el bloqueo de las TFL debe mejorarse para reducir la señal del blanco (NPM funcionalizadas en ausencia de analito que quedan inespecíficamente capturadas en la línea de test).

Se obtuvieron claros indicios que sugieren que las NPM se han aglomerado durante el proceso de funcionalización antes de marcar la proteína. Esta aglomeración puede ser muy positiva ya que aumenta la cantidad de partículas superparamagnéticas por unidad de analito. Explorar formas de aglomerar las NPM de forma controlada puede ser una estrategia muy valiosa para mejorar la sensibilidad y reproducibilidad de los ensayos.

Protocolos

Conjugación de NPM@PAA con estreptavidina

1. Diluir 10 µL de EDC en 100 µL de ddH_2O.
2. Agitar durante 5 minutos.
3. Añadir 2 µL de NPM@COOH (concentración 20 $mg \cdot mL^{-1}$).
4. Agitar durante 60 minutos.
5. Añadir 500 µL de estreptavidina (concentración 2 $mg \cdot mL^{-1}$).
6. Agitar durante 120 minutos.
7. Añadir gota a gota y durante agitación leve aproximadamente 50 µL de HCl 1M para provocar la floculación de las NPM.
8. Separar magnéticamente las NPM. Guardar sobrenadante para analizar por UV.
9. Resuspender las NPM en 500 µL de PBS.
10. Repetir los dos pasos anteriores (lavado magnético) otras dos veces.

Conjugación de NPM@Strep con anticuerpo biotinilado

1. Mezclar 10 µL de NPM@estreptavidina con 1 000 µL de anticuerpo biotinilado (2 µg).
2. Agitar durante 15 minutos.
3. Lavar magnéticamente ($\times$ 3)

Comprobación enzimática

1. Coger una pequeña muestra de NPM@Strep (entre 2 y 10 µL) y calcular la concentración tanto de NPM como de estreptavidina.
2. Calcular qué volumen de B-AP es necesario para tener una relación en la que haya exceso de B-AP (al menos 4 veces el número de estreptavidinas) y añadir aproximadamente 10 veces más B-AP que estreptavidina debería haber en la muestra (entre 20 y 100 µL).
3. Agitar durante 15 minutos.
4. Lavar magnéticamente, redispersando en 100 µL de Tris-HNO_3 0,1 M, 10 mM M6(NO3)2 pH 9.8. (× 3)
5. Añadir BCIP, de concentración 15.6 mM, en una relación 1:1 con el volumen añadido de B-AP.
6. Observar el color tras un minuto.

Marcaje de células HeLa con NPM

El siguiente protocolo describe cómo marcar las células HeLa con nanopartículas. El protocolo está ideado para flasks de 25 cm^2, sin llegar al 100 % de confluencia. Se recomienda realizar el marcaje cuando las células ocupen aproximadamente el $75 - 80$ % de la superficie del recipiente.

1. Retirar el medio de cultivo, ya que puede contener MICA soluble.
2. Lavar con PBS. (× 3)
3. Añadir 4 mL de medio de cultivo nuevo, incorporando 10 µg de NPM.
4. Mantener en la incubadora a 35ºC y 5 % CO_2 durante 15 minutos.
5. Retirar el medio.
6. Lavar con PBS. (× 3)
7. Añadir 4 mL de tripsina para despegar las células.
8. Mantener en la incubadora a 35ºC y 5 % CO_2 durante 5 minutos.
9. Añadir medio de cultivo nuevo para detener la acción de la tripsina.
10. Llevar alícuota a microscopía para analizar la movilidad celular.

Marcaje de células HL60 con NPM

El siguiente protocolo describe cómo marcar las células HL60 con nanopartículas. Se recomienda realizar el marcaje cuando en el volumen total del recipiente haya del orden de 10^6 células.

1. Centrifugar las células a 300 g.
2. Retirar parte del medio y resuspender el pellet en un volumen máximo de 3 mL.
3. Añadir 10 µg de NPM.
4. Mantener en la incubadora a 35ºC y 5 % CO_2 durante 15 minutos.
5. Llevar alícuota a microscopía para analizar la movilidad celular.

Preparación células HeLa para TEM

El protocolo de fijación de las células para microscopía electrónica fue adaptado a partir del artículo [15].

1. Incubar las células en DMEM suplementado con 3 % de glutaraldehido durante 10 minutos.
2. Incubar en PBS con 3 % de glutaraldehido durante 30 minutos.
3. Incubar las células en PBS con 1 % de ferricianuro de potasio y 1 % de tetróxido de osmio.
4. Centrifugar las células y lavar

Artículos publicados

Artículos sobre funcionalizacion de NPM y marcaje celular:

- **David Lago-Cachón**, Montserrat Rivas, Carlos López-Larrea, Antonio López-Vázquez, Graciela Martínez-Paredes, and José Ángel García. HeLa cells separation using MICA antibody conjugated to magnetite nanoparticles. *Phys. Status Solidi C*, 11(5-6):1043–1047, 2014. doi:10.1002/pssc.201300729

Artículos sobre cintas amorfas con GMI:

- **David Lago-Cachón**, José Carlos Martínez-García, Montserrat Rivas, and José Ángel García. Biased giant magnetoimpedance and switching field distribution curves in Co70Fe5Si15B10 nanocrystalline ribbons. *Journal of Alloys and Compounds*, 536:S312–S314, 2012. doi:10.1016/j.jallcom.2011.11.056

Artículos sobre detección de NPM:

- **David Lago-Cachón**, Montserrat Rivas, José Carlos Martínez-García, and José Ángel García. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, 24:245501–7, 2013. doi:10.1088/0957-4484/24/24/245501

- Montserrat Rivas, **David Lago-Cachón**, José Carlos Martínez-García, José Ángel García, and Antonio Javier Calleja. Eddy-current sensing of superparamagnetic nanoparticles with spiral-like copper circuits. *Sensors and Actuators A: Physical*, 216:123–127, 2014. doi:10.1016/j.sna.2014.05.023

Artículo sobre detección de NPM en tiras de flujo lateral:

- **David Lago-Cachón**, Montserrat Rivas, José Carlos Martínez-García, Myriam Oliveira-Rodríguez, María del Carmen Blanco-López, and Jo-

sé Ángel García. High frequency lateral flow affinity assay using superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 423:436–440, 2017
doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.09.106

Bibliografía

[1] C P Bean and J D Livingston. Superparamagnetism. *J. Appl. Phys.*, 30:S120, 1959.

[2] W F Brown. Thermal fluctuations of a single-domain particle. *Phys. Rev.*, 130(5):1677–1686, June 1963.

[3] C Alexiou, W Arnold, R J Klein, F G Parak, P Hulin, C Bergemann, W Erhardt, S Wagenpfeil, and A S Lübbe. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Research*, 60(23):6641–6648, 2000.

[4] E A Périgo, G Hemery, O Sandre, D Ortega, E Garaio, F Plazaola, and F J Teran. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Applied Physics Reviews*, 2(4), 2015.

[5] M Zborowski and J J Chalmers. *Magnetophoresis: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 1999.

[6] J Llandro, J J Palfreyman, A Ionescu, and C H W Barnes. Magnetic biosensor technologies for medical applications: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 48(10):977–998, 2010.

[7] X Batlle and A Labarta. Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35(6):R15, 2002.

[8] S González, A López-Soto, B Suárez-Álvarez, A López-Vázquez, and López-Larrea. C. {NKG2D} ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol.*, 29(8):397 – 403, 2008.

[9] E Serrano Pertierra. *Characterization of NKG2D-mediated signaling pathways and its role in the regultaion of cell migration*. PhD thesis, Universidad de Oviedo, 2013.

[10] N W Zwirner, K Dole, and P Stastny. Differential surface expression of {MICA} by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Human Immunology*, 60(4):323 – 330, 1999.

[11] O Ashiru, P Boutet, L Fernández-Messina, S Agüera-González, J N Skepper, M Valés-Gómez, and H T Reyburn. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human nkg2d ligand mica*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Research*, 70(2):481–489, 2010.

[12] C Sun, R Sze, and M Zhang. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 78:550, 2006.

[13] O Osman, L F Zanini, M Frénéa-Robin, F Dumas-Bouchiat, N M Dempsey, G Reyne, F Buret, and N Haddour. *Biomed. Microdevices*, 14:947, 2012.

[14] D Lago-Cachón, M Rivas, López-Vázquez A López-Larrea, C, G Martínez-Paredes, and J A García. *Phys. Status Solidi C*, 11:1043–1047, 2014.

[15] E Martínez, A Navarro, C Ordóñez, E Del Valle, and J Tolivia. *J. Alzheimers Dis.*, 36:129, 2013.

[16] L V Panina and K Mohri. Giant magneto–impedance effect in amorphous wires. *Appl. Phys. Lett.*, 65:1189–1191, 1994.

[17] M H Phan and H X Peng. Giant magnetoimpedance materials: Fundamentals and applications. *Prog. Mater. Sci.*, 53:323–420, 2008.

[18] H Chiriac, M Tibu, A-E Moga, and D D Herea. Magnetic GMI sensor for detection of biomolecules. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293:671–676, 2005.

[19] G Kurlyandskaya and V Levit. Magnetic Dynabeads Â® detection by sensitive element based on giant magnetoimpedance. *Biosensors & bioelectronics*, 20:1611–1616, 2005.

[20] A García-Arribas, F Martínez, E Fernández, I Ozaeta, G Kurlyandskaya, A Svalov, J Berganzo, and J M Barandiaran. GMI magnetic-particle concentration detection in continuos flow. *Procedia Engineering*, 5:1324–1327, 2010.

[21] M Knobel, M L Sanchez, P Marín, C Gómez-Polo, M Vazquez, and A Hernando. Influence of nanocrystallization on the magneto-impedance

effect in fecunbsib amorphous wires. *IEEE Transactions on Magnetics*, 31(6):4009–4011, Nov 1995.

[22] H S Chen and C E Miller. Centrifugal spinning of metallic glass filaments. *Materials Research Bulletin*, 11(1):49 – 54, 1976.

[23] G V Kurlyanskaya and V Fal-Miyar. Surface modified amorphous ribbon based magnetoimpedance biosensor. *Biosens. Biolectron.*, 22:2341–2345, 2007.

[24] E C Silva, L A P Gusmao, C R H Barbosa, E C Monteiro, and F L A Machado. High sensitivity giant magnetoimpedance (*gmi*) magnetic transducer: magnitude versus phase sensing. *Meas. Sci. Technol.*, 22, 2011.

[25] J C Martínez-García, M Rivas, L Elbaile, R Díaz-Crespo, J A García, and S Volchkov. Asymmetrical magnetoimpedance effect in partially devitrified $Co_{66}Fe_4Si_{16}B_{12}Mo_2$ ribbons. *Sensors Letters*, 7:507–511, 2009.

[26] G V Kurlyandskaya and V Levit. Magnetic dynabeadsÂ® detection by sensitive element based on giant magnetoimpedance. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(8):1611 – 1616, 2005. Selected Papers from the Eighth World Congress on Biosensors, Part I.

[27] H Yang, L Chen, C Lei, J Zhang, D Li, Z-M Zhou, C-C Bao, H-Y Hu, X Chen, F Cui, S-X Zhang, Y Zhou, and D-X Cui. Giant magnetoimpedance-based microchannel system for quick and parallel genotyping of human papilloma virus type 16/18. *Applied Physics Letters*, 97(4), 2010.

[28] C Gómez-Polo and M Vázquez. Thermal dependence of magnetoimpedance in FeCrSiBCuNb nanocrystalline alloy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 272-276:1853–1854, 2004.

[29] A García-Arribas, F Martínez, E Fernández, I Ozaeta, G V Kurlyandskaya, A V Svalov, J Berganzo, and J M Barandiarán. GMI detection of magnetic-particle concentration in continuous flow. *Sensors & Actuators: A. Physical*, 172(1):103–108, 2011.

[30] F Blanc-Béguin, S Nabily, J Gieraltowski, A Turzo, S Querellou, and P Y Salaun. Cytotoxicity and GMI bio-sensor detection of maghemite nanoparticles internalized into cells. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321:192–197, 2009.

[31] T Wang, Y Zhou, C Lei, J Lei, and Z Yang. Sensors and Actuators B : Chemical Development of an ingenious method for determination of Dynabeads protein A based on a giant magnetoimpedance sensor. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 186:727–733, 2013.

[32] T Wang, Y Zhou, C Lei, J Lei, and Z Yang. Ultrasensitive detection of Dynabeads protein A using the giant magnetoimpedance effect. *Microchimica Acta*, 180:1211–1216, 2013.

[33] T Wang, Z Yang, C Lei, J Lei, and Y Zhou. Quantitative determination of magnetic beads using a magnetoimpedance-based lab-on-a-chip platform. *Journal of Applied Physics*, 115:223901, 2014.

[34] T Wang, Z Yang, C Lei, J Lei, and Y Zhou. A giant magnetoimpedance sensor for sensitive detection of streptavidin-coupled Dynabeads. *Physica Status Solidi A*, 211(6):1389–1394, 2014.

[35] T Wang, Z Yang, C Lei, J Lei, and Y Zhou. Biosensors and Bioelectronics An integrated giant magnetoimpedance biosensor for detection of biomarker. *Biosensors and Bioelectronic*, 58:338–344, 2014.

[36] Y V Kolen'ko, M Bañobre-López, C Rodríguez-Abreu, E Carbó-Argibay, A Sailsman, Y Piñeiro-Redondo, M F Cerqueira, D Y Petrovykh, K Kovnir, O I Lebedev, and J Rivas. Large-scale synthesis of colloidal fe_3o_4 nanoparticles exhibiting high heating efficiency in magnetic hyperthermia. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(16):8691–8701, 2014.

[37] K Kriz, F Ibraimi, M Lu, L-O Hansson, and D Kriz. Detection of C-Reactive Protein Utilizing Magnetic Permeability Detection Based Immunoassays. *Analytical Chemistry*, 77(18):5920–5924, 2005.

[38] P Hawkins, R Luxton, and J Macfarlane. Measuring system for the rapid determination of the concentration of coated micrometer-sized paramagnetic particles suspended in aqueous buffer solutions. *Review of Scientific Instruments*, 237(1):237–242, 2012.

[39] M H F Meyer, M Hartmann, H-J Krause, G Blankenstein, B Mueller-Chorus, J Oster, P Miethe, and M Keusgen. CRP determination based on a novel magnetic biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 22:973–979, 2007.

[40] P I Nikitin, P M Vetoshko, and T I Ksenevich. New type of biosensor based on magnetic nanoparticle detection. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 311:445–449, 2007.

[41] J Mäkiranta and J Lekkala. Optimization of a novel magnetic nanoparticle sensor. In *XVIII IMEKO WORLD CONGRESS Metrology for a Sustainable Development*, Rio de Janeiro, Brazil, 2006.

[42] M B Simmonds. METHOD AND APPARATUS FOR MAKING QUANTITATIVE MEASUREMENTS OF LOCALIZED ACCUMULATIONS 0F TARGET PARTICLES HAVING MAGNETIC PARTICLES BOUND THERETO, 2000.

[43] D Lago-Cachón, M Rivas, J C Martínez-García, and J A García. Cu impedance-based detection of superparamagnetic nanoparticles. *Nanotechnology*, 24:245501–7, 2013.

[44] J H Hayes and M J Barry. Screening for prostate cancer with the prostate-specific antigen test: A review of current evidence. *JAMA*, 311(11):1143–1149, 2014.

[45] L Miller. Analyzing gels and western blots with ImageJ, 2010.