

NANOTECNOLOGÍA Y NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS: LA FÍSICA ACTUAL EN LUCHA CONTRA LA ENFERMEDAD

ANTONIO HERNANDO GRANDE *

* Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Instituto de Magnetismo Aplicado. 28230 Las Rozas (Madrid). ahernando@renfe.es

INTRODUCCIÓN

La investigación del comportamiento de la materia en la escala nanométrica abre una prometedora perspectiva de nuevos conocimientos. Cuando las dimensiones de las partículas de un sólido son del orden del nanómetro, o milésima de micra, el número de átomos que las constituyen es del orden de centenas. La mayoría de ellos se encuentran situados en la superficie de las partículas. Las propiedades físicas de estas partículas son muy distintas de las que se observan en un sólido de tamaño normal o macroscópico con la misma composición química. Hoy día comienzan a utilizarse de modo habitual técnicas experimentales que permiten fabricar, caracterizar y manipular partículas de este tamaño minúsculo que llamamos nanopartículas, NPs.

La sorprendente combinación de nuevas propiedades físicas detectadas en diferentes tipos de NPs ha despertado una curiosidad investigadora comparable a la que ejerce el enorme panorama de posibles aplicaciones futuras. De especial relevancia es la coincidencia de escala de tamaño, el nanómetro, con las unidades básicas de la vida encerradas dentro de la membrana celular o de su núcleo, como son los cromosomas. Dicha convergencia de escala ha condicionado el aterrizaje de la Nanotecnología en el núcleo de la Biofísica. La utilización de NPs magnéticas puede tener una trascendental incidencia en fenómenos como la hipertermia y el transporte selectivo de fármacos, ambos de prometedor futuro en la terapia del cáncer. Fenómenos, todos ellos, basados en la endocitosis celular mediante la cual la célula capta e introduce en su interior a las NPs magnéticas.

Repasaremos brevemente las características básicas de la física asociada a la nanoescala y algunas de las aplicaciones relacionadas con la terapia del cáncer y las NPs magnéticas.

I. ASPECTOS BÁSICOS DE LA FÍSICA DE NPs

Las nanopartículas del tamaño de un nanómetro presentan dos características relacionadas con las propiedades magnéticas: a) la enorme fracción de átomos de superficie que presentan una simetría local distinta y, por tanto, una anisotropía magnética de distinto valor que el volumen y b) una estructura del espectro de energía electrónica caracterizada por un mayor espaciado entre niveles. Esta modificación conlleva variaciones de la densidad de estados al nivel de Fermi y consecuentemente de las propiedades magnéticas intrínsecas de los materiales.

La estructura electrónica de las nanopartículas es también regulable mediante el enlace con diferentes tipos de moléculas. El enlace, mas o menos, fuerte con moléculas es necesario para preservar la precipitación y aglomeración de las NPs y para que así, cada una de ellas, mantenga su unidad aislada del resto de las NPs. Este enlace es fundamental en un campo de aplicaciones de enorme interés actual como es el de la biomedicina. Se pretende que nanopartículas metálicas transporten moléculas como ácidos nucleicos, aminoácidos, azúcares o ADN enlazadas a los átomos de la superficie y que puedan viajar por el organismo hasta depositarse en dianas bien definidas (S. G. Ray et al.). En su lugar de anclaje liberarían las moléculas trans-

portadas dando lugar a una quimioterapia selectiva que reduciría al máximo los efectos colaterales. Recientemente P. Crespo ha encontrado que partículas de oro de 1.4 nanómetros de tamaño recubiertas con moléculas orgánicas a través de enlaces oro-azufre presentan magnetismo permanente incluso a temperatura ambiente. Lo sorprendente de este hallazgo no es exclusivamente la presencia de magnetismo en un metal diamagnético como es el oro sino la superación del límite superparamagnético a temperatura ambiente con tamaños tan pequeños de partícula.

Un excelente experimento llevado a cabo con átomos aislados de cobalto sugiere que la Nanofísica constituye una física no descrita previamente en el marco de lo macroscópico. Gambardella y colaboradores, observaron mediante dicroísmo magnético que a 5°K un átomo aislado de cobalto depositado en una superficie de Pt <111> presentaba una curva de imanación con marcada anisotropía, siendo el eje de fácil imanación la dirección perpendicular a la película de Pt. Este experimento indica que un átomo aislado puede constituir un imán, un imán que podríamos denominar atómico. Cuando un átomo aislado posee momento magnético es de esperar que este fluctúe en dirección agitado por la temperatura. Sin embargo en este experimento se muestra que como consecuencia del enlace del átomo a los átomos de Pt se elimina la agitación térmica del momento magnético. Parece obvio que el límite inferior del tamaño de una nanopartícula es un átomo. En este experimento el átomo magnético está aislado aunque, en realidad, solo magnéticamente aislado ya que se encuentra enlazado a los átomos de platino. El hecho de que el momento magnético del átomo de Co no fluctúe térmicamente sugiere que pueden reducirse los tamaños de los bits y que una nueva perspectiva de la física involucrada en el origen de la anisotropía magnética tiene que desarrollarse para esta escala. Los átomos aislados serán imanes en el futuro próximo.

II. TÉCNICAS DE FABRICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NPs

La investigación de propiedades físicas de las NPs requiere: métodos que posibiliten su fabricación y métodos experimentales de caracterización estructural. Los métodos de fabricación pueden clasificarse

como físicos o químicos. La molienda mecánica de partículas micrométricas, la nanolitografía o la pulverización catódica constituyen ejemplos característicos de los métodos físicos. Sin embargo, recientemente los métodos químicos se vienen utilizando con mayor frecuencia.

Un método muy utilizado es el conocido en la literatura como método de Brust y que es el que ha permitido la obtención de las partículas de oro que recu-

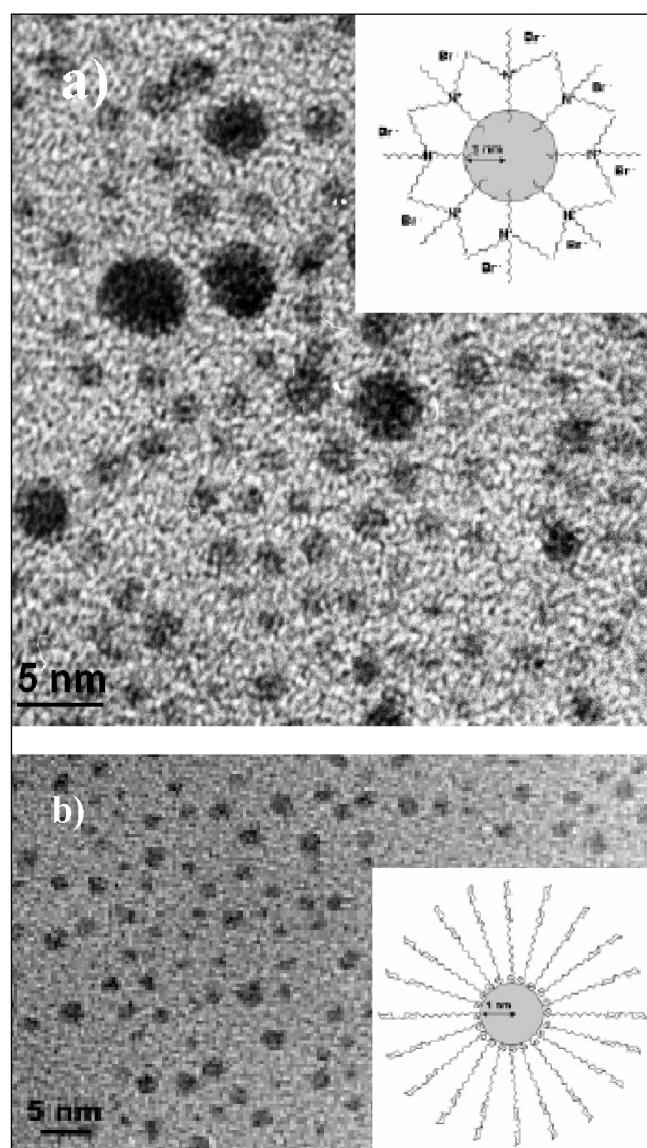


Figura 1. Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de dos tipos de nanopartículas de Au: a) nanopartículas de Au dispersadas mediante un surfactante; b) nanopartículas de Au estabilizadas mediante dodecanotíoles. Se muestra también un esquema de las nanopartículas y las cadenas estabilizadoras.

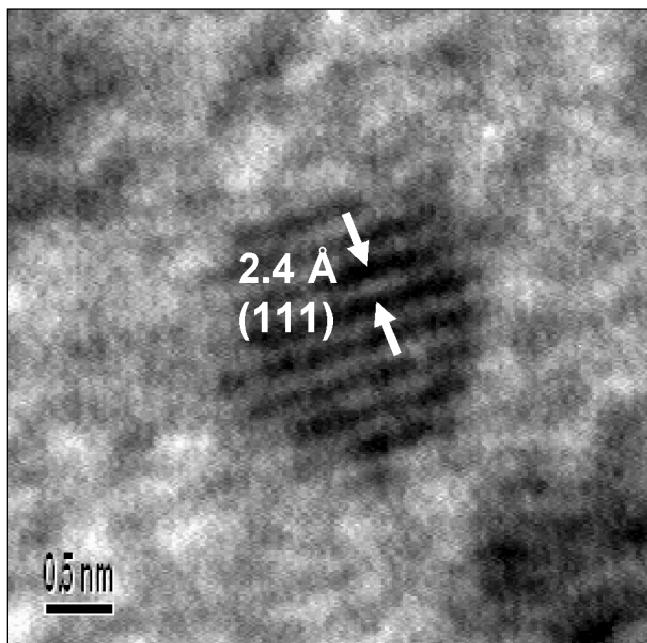


Figura 2. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de una nanoparticula de Au de 1,8 nm.

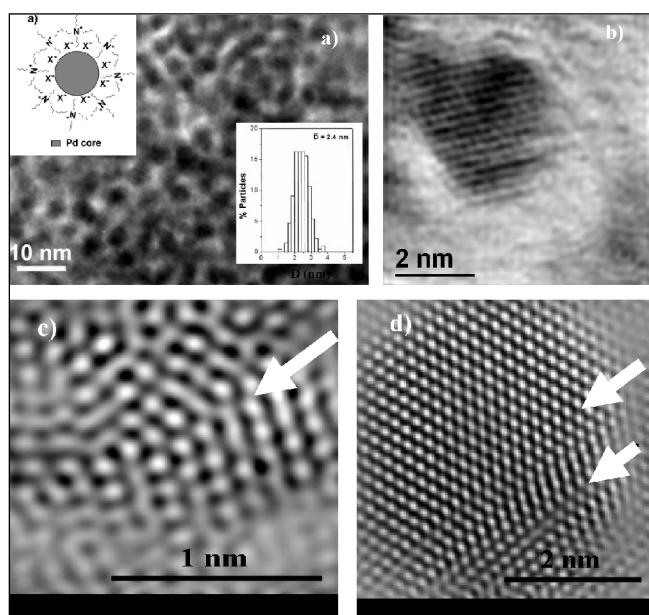


Figura 3. Nanopartículas de Paladio. (a) Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión de nanopartículas de Pd dispersadas mediante un surfactante; (b) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de una nanoparticula de Pd de 2 nm; (c) y (d) Transformada de Fourier (filtrada) de imágenes de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de nanopartículas de 2nm (c) y (d) 4nm. Las flechas indican las maclas o faltas de apilamiento.

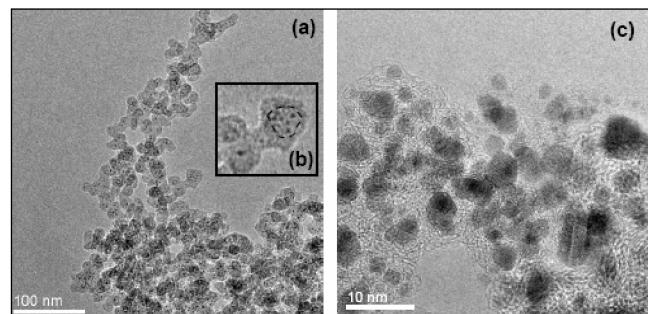


Figura 4. (a) Imagen de nanopartículas de Pt embebidas en una matriz de carbono; (b) imagen con mayores aumentos mostrando la presencia de puntos negros en la matriz de carbono; (c) Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución.

bierdas con átomos de azufre presentan las propiedades ferromagnéticas, referidas más arriba. Por citar un ejemplo de método de fabricación describimos el seguido para obtener NPs de Paladio por reacción redox, utilizando $R_4N^+X^-$ como surfactante en tetrahidrofureno. Como precursor del Pd se usa $Pd(NO_3)_2$ en un exceso de acetato tetrabutiamonio ($n - C_4H_9)_4N^+(CH_3CO_2^-)$. El nitrato es desplazado por ligando de acetato que es mas efectivo, lo que es seguido por la reducción del Pd^{2+} que mediante transferencia de electrones genera clusters estabilizados de Pd^0 . Las reacciones químicas deben llevarse a cabo en atmósfera inerte para evitar contaminación de oxígeno.

Una vez obtenidas las NPs deben caracterizarse mediante diversas técnicas. La que más comúnmente se requiere para cualquier estudio es la microscopía de transmisión y la de alta resolución. Estas técnicas permiten a) el estudio del tamaño de las NPs y de su dispersión y b) la estructura de los átomos que se aglomeran formado la NPs, esto es su órden de corto y relativamente largo alcance. La Figura 1 muestra la imagen directa, obtenida por microscopía electrónica de transmisión de NPs de oro recubiertas con surfactante y con enlaces tiol, así como su distribución de tamaños.

Otra técnica muy adecuada para la caracterización electrónica de los átomos de superficie de las NPs y que permiten los actuales sincrotrones es el análisis combinado XANES y EXAFS (estructura fina de absorción de rayos X). El estudio de la resonancia del plasmón de superficie también permite obtener infor-

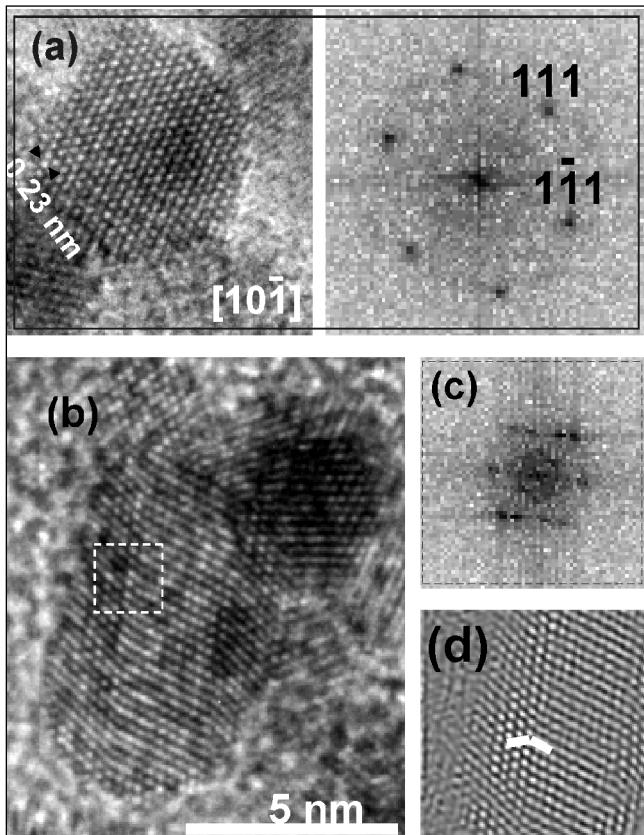


Figura 5. Imagen obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de una nanopartícula de Pt y su correspondiente transformada de Fourier de un nanocrystal de Pt a lo largo del eje de zona [101], mostrando la estructura fcc de la nanopartícula; (b) microscopía electrónica de transmisión de alta resolución de una nanopartícula de Pt maclada a lo largo de eje de zona [101]; (c) transformada de Fourier de la imagen de la nanopartícula mostrada (b); (d) la macla se observa más claramente después de eliminar el ruido.

mación del carácter localizado o itinerante de los electrones de superficie.

En el caso de las NPs magnéticas utilizadas en aplicaciones biomédicas es necesario realizar la caracterización de estas propiedades o su respuesta a los campos magnéticos. La magnetometría SQUID (dispositivo de interferencia cuántica macroscópica) es la habitualmente empleada para la obtención de curvas de imanación y para el estudio de la dependencia térmica de la temperatura.

Las Figuras muestran sistemas de distintas NPs tal como se observan con las técnicas experimentales descritas. La Figura 2 corresponde a una imagen de microscopía de alta resolución obtenida en una NPs

aislada de oro de 1.8 nm de tamaño. En la foto se aprecian los planos atómicos $\langle 111 \rangle$ de la NPs y puede observarse que solo existen ocho. La Figura 3 describe la estructura atómica de NPs de paladio de 2.4 nm. de tamaño medio como se aprecia en la distribución. A partir de la imagen de microscopía de transmisión se obtiene su transformada de Fourier lo que permite apreciar nitidamente las maclas o faltas de apilamiento en la ordenación de los átomos de la NP. Las Figuras 4 y 5 ponen de manifiesto la estructura atómica de NPs de platino en la que también se observan maclas. Estas maclas aparecen por la importancia porcentual en átomos de las superficies. En estas NPs con tamaños del orden de uno ó dos nm. el porcentaje de átomos de superficie es superior al 50%. La energía libre de la NPs se minimiza generalmente con estructuras distintas en la superficie que en el volumen. Por esta razón la tensión entre dos tendencias, por ejemplo, estructuras bcc y fcc, se resuelve con la formación de maclas. Las maclas tienen relevancia en las propiedades magnéticas ya que modifican localmente la estructura electrónica introduciendo cambios en la densidad de estados al nivel de Fermi, que como es sabido, condiciona el comportamiento magnético de la NP.

III. APPLICACIONES BIOMÉDICAS

Las nanopartículas magnéticas son de sumo interés en biomedicina por sus diversas e importantes aplicaciones: i) para transporte de drogas terapéuticas o de radioisótopos, ii) como separadores magnéticos de células marcadas, iii) para el catabolismo de tumores vía hipertermia, y iv) como agentes de contraste en aplicaciones de resonancia magnética. El hecho de que puedan fabricarse con un tamaño homogéneo que va desde unos pocos nanómetros hasta decenas, las coloca en una dimensión comparable a una entidad biológica como una célula (10-100 μm), un virus (20-450 nm), una proteína (5-50 nm) o un gen (2 nm de ancho por 10-100 nm de largo).

III-1. Transporte de fármacos

Hasta el presente, la mayor desventaja de los tratamientos que implican transporte de drogas o radioisótopos, es la inadecuada distribución de los medicamen-

tos en el cuerpo. Las drogas terapéuticas se administran en forma intravenosa y por lo tanto se distribuyen en el torrente sanguíneo, con el consecuente efecto no deseado de que atacan todo tipo de células, incluidas las sanas. Por ejemplo, los efectos secundarios de la administración de anti-inflamatorios en pacientes con artritis crónica llevan a la suspensión de su uso; sin embargo, si su aplicación pudiera localizarse sólo en la parte afectada, entonces podría aplicarse una droga potente y efectiva de forma continua.

A fines de la década de los 70, científicos dedicados a este tema propusieron usar portadores magnéticos con el fin de atacar sitios específicos dentro del cuerpo humano, como por ejemplo un tumor cancerígeno. El objetivo era lograr una mayor localización de la droga para disminuir a) los efectos colaterales, b) las dosis aplicadas. En una terapia dirigida magnéticamente, una droga citotóxica se enlaza a una nanopartícula magnética y biocompatible que funciona como portador. Este complejo droga-portador se inyecta al sistema sanguíneo del paciente, normalmente en forma de ferrofluido biocompatible. Cuando las partículas han entrado en el torrente sanguíneo se aplica un campo magnético externo para concentrar el ferrofluido en algún sitio específico del cuerpo. Una vez localizada en el objetivo deseado, la droga puede liberarse por medio de alguna actividad enzimática, por cambios en las condiciones fisiológicas o bien por variación de temperatura⁴, y ser absorbida por el órgano o células afectadas.

Desde aquellos primeros ensayos de la década de los 70 se han desarrollado muchos y diversos tipos de portadores magnéticos, pero aún en la actualidad la optimización de estos portadores sigue siendo un tema de gran interés.

Las nanopartículas están formadas por un núcleo magnético, que normalmente es magnetita Fe_3O_4 o maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, recubierto con un material biocompatible. El revestimiento de la nanopartícula magnética tiene la función de aislarla del medio evitando así que se disuelvan o se oxiden en el medio fluido, pero también puede favorecer la funcionalización de, por ejemplo, grupos carboxilos, biotin, avidin carbodiimide u otras moléculas.

Los recubrimientos más utilizados son los polímeros, como el polivinil alcohol o el dextran, o los

compuestos inorgánicos como la sílica; sin embargo, últimamente, se están estudiando los recubrimientos con metales nobles como el oro. Por otro lado, aunque el níquel y el cobalto son tóxicos y susceptibles de oxidación, se están investigando distintos tipos de recubrimientos para convertirlos en biocompatibles. Por ejemplo, actualmente se trabaja en cobalto recubierto de sílica para su uso oftalmológico en el tratamiento de desprendimiento de retina.

Se usaron portadores magnéticos por primera vez para concentrar dexterubicin en un sarcoma implantado en una rata. Los resultados iniciales fueron muy alentadores, mostrando la remisión total del sarcoma; en cambio, en otro grupo de ratas donde la dexterubicin fue aplicada en una dosis diez veces mayor pero sin usar el transporte magnético los sarcomas no remitieron. Desde aquél primer estudio se han reportado varias investigación exitosas sobre el transporte de droga terapéutica y la remisión de tumores, incluso usando diferentes animales como cerdos, conejos y ratas.

A pesar de que estos resultados fueron tan prometedores, se han encontrado serias dificultades en el transporte de drogas por portadores magnéticos. Estas limitaciones incluyen i) la posibilidad de embolia debido a la acumulación de portadores magnéticos, y ii) la toxicidad de los portadores magnéticos. Sin embargo, resultados preclínicos y experimentales recientes indican que aún es posible vencer estas limitaciones.

III-2. Hipertermia

En medicina se usa la hipertermia como un procedimiento terapéutico basado la elevación de la temperatura de una región del cuerpo, afectada por un proceso maligno, con el fin de eliminar dicho proceso. Hasta ahora, la hipertermia ha sido usada en tumores superficiales, como un tratamiento complementario dentro de la Oncología, pero cada vez existen mas comunicaciones y publicaciones, en la bibliografía médica y física, que sitúan a la hipertermia en un papel mas importante. Se ha descrito el uso de la hipertermia en el tratamiento de tumores cerebrales, prostáticos, pélvicos, cáncer de mama, carcinomas escamosos de cabeza y cuello, basaliomas dérmicos etc. Asimismo se han descrito nuevos avances técnicos en la sepa-

ración de partículas magnéticas dispensación de dichas partículas y sus aplicaciones en biomedicina uso de liposomas catiónicos magnéticos así como su papel como coadyuvante con la quimioterapia o con la radioterapia en el tratamiento de los tumores malignos, basado en el aumento de la capacidad para “matar” células (cell-killing effect) a temperaturas superiores a 41-42°C.

Las investigaciones más recientes sobre hipertermia tienen como objetivo estabilizar y homogeneizar la temperatura alrededor de 42-43°C en la masa tumoral, aunque existe una línea alternativa, denominada generalmente termoablación magnética, basada en el empleo de temperaturas de hasta 55°C. Los efectos perjudiciales sobre las células sanas a esta temperatura son importantes, aunque se trata de minimizarlos restringiendo la localización de las partículas al interior de la masa tumoral. Para alcanzar la temperatura deseada dentro de la masa tumoral se han utilizado, a lo largo de la última década, nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (Fe_2O_3 ó Fe_3O_4), compuestos metálicos (Fe C, Sm Co) y metales (Fe, Au, etc.), con diámetros entre 10 y 500 nanómetros. Estas nanopartículas pueden ser bien toleradas por el organismo (dextran-magnetita, Fe) o precisar un recubrimiento para ser biocompatibles.

La idea no es nueva: el uso de óxidos de hierro para calentar y destruir tumores ya fue propuesto por Gilchrist en 1957. Sin embargo, al día de hoy, subsisten varios problemas técnicos sin resolver de modo satisfactorio, lo que ha impedido la utilización clínica de una terapia tan prometedora. La razón estriba en que las soluciones sencillas, que pueden mejorar el comportamiento de las nanopartículas en un determinado aspecto, con frecuencia afectan negativamente a otro. Esto da lugar a que materiales que “funcionan” en los ensayos *in vitro* den resultados negativos *in vivo*.

III-3. Problemas mas inmediatos a investigar y resolver

a) *Implantación de las partículas en el área tumoral*

Partiendo de la base de la biocompatibilidad del material utilizado o de su recubrimiento, la inyección de las partículas en el torrente sanguíneo y su guiado

hasta el área del tumor requiere diseñar estrategias para evitar, en lo posible, su captación y eliminación por el *Sistema Retículo - Endotelial*. Las partículas, una vez inyectadas por vía intravenosa, son inmediatamente recubiertas por las proteínas del plasma, en el proceso denominado opsonización. Este proceso hace a las partículas reconocibles por los fagocitos del SER que las elimina rápidamente. Las últimas investigaciones apuntan al recubrimiento de las nanopartículas con polímeros hidrófilos y a la reducción de su tamaño, factores ambos que parecen ralentizar el proceso descrito, aunque no evitarlo.

b) *Confinamiento de las partículas en el área tumoral*

Una vez inyectadas las partículas magnéticas, deben permanecer confinadas en el volumen del tumor para que el tratamiento de hipertermia sea eficaz. Desde este punto de vista podría ser interesante el uso de partículas con una distribución de tamaños que permitiera, por una parte la difusión de las partículas menores por el tumor, y por otra la embolización, desde dentro, del mismo, lo que contribuiría eficazmente al confinamiento deseado. En cualquier caso es necesario un confinamiento magnético, que se puede realizar en primer lugar *in vitro*, mediante la construcción de una maqueta del modelo animal y el diseño y construcción de una configuración adecuada de imanes permanentes. Posteriormente se procedería a la utilización del dispositivo en los ensayos *in vivo*.

c) *Generación de calor y control de la temperatura*

Como es sabido, la generación de calor en las partículas magnéticas puede producirse por dos mecanismos: las corrientes eléctricas inducidas en la partícula por un campo magnético alterno y, en las partículas ferromagnéticas por las pérdidas irreversibles en el proceso de imanación. En primera aproximación, el calor generado por el primer mecanismo aumenta con el cuadrado de la frecuencia y el segundo con la frecuencia del campo magnético aplicado. En ambos casos aumenta con la permeabilidad y con el momento magnético del material, que es el producto de la imanación del material por el volumen del mismo. Teniendo en cuenta estos aspectos creemos que los materiales más adecuados serían los ferromagnéticos, ya que su permeabilidad y su imanación son

mucho más altas que en otros materiales, lo que permite, para generar la misma potencia, la utilización de campos magnéticos de menor frecuencia e intensidad. Dentro de este tipo de materiales, los amorfos metálicos y los nanocristalinos son los que presentan una mayor permeabilidad magnética.

Por otra parte, estos materiales ferromagnéticos dejan de serlo a una temperatura crítica, conocida como temperatura de Curie (T_c), disminuyendo drásticamente su permeabilidad y su momento magnético y, por consiguiente las corrientes eléctricas inducidas. Esta propiedad proporciona un método ideal para el control de la temperatura del tratamiento, fabricando un material con la temperatura de Curie adecuada.

En el Instituto de Magnetismo Aplicado de la Universidad Complutense-(ADIF) hemos desarrollado recientemente dos nuevos materiales, las aleaciones Fe-Cu y Fe-Cu-Zr, cuya temperatura de Curie puede ser ajustada en función de la composición, lo que las convierte en buenos candidatos para estos tratamientos. Otra alternativa a los, podríamos llamar, materiales magnéticos tradicionales la presentan las nanopartículas magnéticas de metales nobles como el Au. Su comportamiento ferromagnético, hasta temperatura ambiente, en nanopartículas de oro funcionalizadas con diámetros medios por debajo de los 3nm. ofrece una vía alternativa para producir un calentamiento local controlado utilizables con fines terapéuticos como los tratamientos de hipertermia. También es potencialmente interesante el comportamiento de nanohilos magnéticos, obtenidos por electrodeposición y de microhilos obtenidos por enfriamiento ultrarrápido. Los nanohilos magnéticos presentan además la posibilidad de ser fabricados con "tramos" de dos materiales diferentes, uno de los cuales podría ser un metal noble, que permitiría ligarle moléculas orgánicas, con distinta funcionalidad.

El comportamiento de los distintos materiales, la generación de calor y el control de la temperatura debe estudiarse *in vitro*, en cultivos celulares, con células sanas y tumorales, seleccionando los mejores para los ensayos *in vivo*.

d) Tolerancia del organismo y efectos secundarios

Los animales, objeto de los ensayos *in vivo* deben ser sometidos a un seguimiento prolongado, con el fin

de estudiar los efectos producidos sobre su organismo por los tratamientos de hipertermia, o por las posibles complicaciones surgidas de la posterior difusión y eliminación de las partículas por el SER. Desde este punto de vista, los efectos que se han observado, y que se recogen en la literatura, son tanto menores cuanto menor es el tamaño de las partículas. Sin embargo la reducción de tamaño conlleva un aumento del volumen de material inyectado, así como de la intensidad y frecuencia del campo magnético alterno utilizado, para generar la misma potencia calorífica. Asimismo, supone un aumento del gradiente de campo magnético empleado en el confinamiento, para compensar la disminución del momento magnético de las partículas. Por lo tanto, es conveniente determinar (y utilizar) el mayor tamaño posible, que no provoque las complicaciones aludidas anteriormente.

CONCLUSIONES

Las técnicas actuales de producción y caracterización de NPs están permitiendo descubrir un nuevo mundo de propiedades físicas que no pueden explicarse con los esquemas clásicos bien establecidos en la teoría de la materia condensada. El tamaño de las NPs y su capacidad para enlazar moléculas orgánicas permite su utilización como transportador de fármacos a dianas concretas dentro del organismo. Cuando las NPs son ferromagnéticas se abre la posibilidad de ser conducidas a través del torrente circulatorio hasta su objetivo mediante gradientes de campos magnéticos.

Agradecimientos. El autor está en deuda con los doctores Patricia Crespo, Guillermo Rivero, José González Calbet, Soledad Penadés y Asunción Fernández por su colaboración en los trabajos experimentales sobre propiedades magnéticas de NPs de Au, Pd y Pt.

BIBLIOGRAFÍA

1. Europhysicsnews. Magnetism Special Issue 34/6, (2003)
2. H. Ohno, Science 281, 951 (1998)
3. S. G. Ray et al. Phys. Rev. Lett. 96, 036101 (2006)
4. P. Crespo et al. Phys. Rev. Lett. 93, 087204 (2004)
5. P. Gambardella et al, Science 300, 1130 (2003)