

Estudio de nanopartículas de magnetita biosintetizada con aplicaciones para hipertermia

Daniela Hernández González¹, María C. García Castañeda²,
Teodoro Córdova Fraga¹, Gloria Barbosa Sabanero³

¹ Universidad de Guanajuato,
División de Ciencias e Ingenierías,
México

² CONACyT-Universidad de Guanajuato,
México

³ Universidad de Guanajuato,
Departamento de Ciencias Médicas,
México

danietta_@403hotmail.com

Resumen. En el presente trabajo se evalúa la posibilidad de utilizar nanomateriales magnéticos obtenidos por química verde en la física médica, específicamente como materia prima para la hipertermia. Las nanopartículas obtenidas corresponden a magnetita (Fe_3O_4), cuya fase fue corroborada por difracción de rayos X, y han un tamaño de cristal del orden de 14,8 nm, calculado con la ecuación de Debye-Scherrer. Las pruebas de calentamiento se realizaron con un campo inducido por bobina. Las mediciones se realizaron por triplicado a diferentes frecuencias de campo: 87, 256, 357 y 568 KHz, mientras que los cambios de temperatura se registraron con una cámara térmica FLUKE Ti400 IR FUSION TECHNOLOGY, permitiendo que las nanopartículas magnéticas subieran su temperatura de 3,5 a 39,9 ° C.

Palabras clave: biosíntesis, nanopartículas magnéticas, hipertermia.

Study of Biosynthesized Magnetite Nanoparticles with Applications for Hyperthermia

Abstract. In the present work, the possibility of using magnetic nanomaterials obtained by green chemistry in the medical physics is evaluated, specifically as raw material for hyperthermia. The obtained nanoparticles correspond to magnetite (Fe_3O_4), which phase was corroborated by x-ray diffraction, and have a crystal size in the order of 14.8nm, calculated with Debye-Scherrer [1] equation. Heating tests were conducted with a coil induced field. Measurements were carried out by triplicate at different field frequencies: 87, 256, 357 y 568 KHz, while the temperature changes were registered with a FLUKE Ti400 IR

FUSION TECHNOLOGY thermal camera, allowing the magnetic nanoparticles to rise their temperature from 3.5 to 39.9°C.

Keywords: biosynthesis of magnetic nanoparticles, hyperthermia.

1. Introducción

La nanotecnología es la ciencia encargada de la síntesis, manipulación y aplicación de materiales que tienen al menos una de sus dimensiones en el orden mencionado (10^9 m) [2]. La principal característica de estos materiales, son sus propiedades a menudo radicalmente distintas de las que presentan en bulk [3], ocasionando un gran interés por encontrar novedosas aplicaciones en distintas áreas, siendo una de las cuales la medicina.

La aplicación de nanomateriales en la medicina se divide en tres grupos principales: prevención, diagnóstico y terapia.

Las nanopartículas utilizadas para la prevención y el diagnóstico de enfermedades se reportan con distintas morfologías y tamaños, ya que generalmente sirven como marcadores de enfermedades específicas, siendo importante el control de estos factores. Mientras que, para la terapia, lo más usual es encontrar nanopartículas capaces de actuar como sistemas liberadores de fármacos que normalmente tendrían problemas para acceder al punto exacto donde son necesitados [4], sin embargo, la aplicación de materiales magnéticos para hipertermia en tejidos biológicos como terapia en tumores es conocida desde hace más de cuatro décadas [5], tiempo durante el cual se ha trabajado exhaustivamente in vitro e in vivo probando distintos materiales en varios tipos de tumores y líneas celulares [6].

Sin embargo, lo novedoso de este trabajo reside en la obtención de las nanopartículas propuestas, ya que se consiguen mediante una biosíntesis a partir de cáscaras de mango, lo que usualmente serían desechos. El calentamiento de los materiales magnéticos se debe a que al alternar la polaridad del campo magnético al que son sometidos, existe un proceso de reorientación magnética de los mismos [7], ocasionando un movimiento mecánico tanto de los espines desapareados del material como de las partículas en sí, generando energía cinética que se transforma en calorífica.

2. Metodología

Se obtuvieron nanopartículas de magnetita por síntesis verde empleando extractos de cáscaras de *Mangifera indica* como agente reductor de una sal precursora de Fe III. Este tipo de síntesis, generalmente se realizan en una etapa mediante una técnica de coprecipitación [8] sin embargo, nosotros realizamos una combinación de dos métodos: coprecipitación y una segunda fase empleando un tratamiento solvotermal, lo cual no se ha reportado anteriormente.

Inicialmente se obtiene el extracto de las cáscaras de *Mangifera indica* por medio de una extracción simple con un sistema de reflujo y filtración a vacío. Posteriormente, en un medio básico, se mezcla dicho extracto con cloruro férrico en agitación constante durante 3 horas, proceso durante el cual se reduce el hierro (3+) a hierro (2+) en una

proporción 2:1, y finalmente, la mezcla se somete a un tratamiento hidrotermal para favorecer la fase cristalina deseada.

Los materiales obtenidos se caracterizaron por difracción de rayos x, utilizando un equipo PANalytical Modelo Empyrean. Las muestras se corrieron de 10 a 70° en la escala 2θ con un paso angular de 0.02°/s y una fuente de CuKα, con la finalidad de conocer la fase cristalina del material y calcular el tamaño de los cristales. Para las pruebas de calentamiento fue necesario el arreglo de una bobina conectada a una fuente de poder, la cual genera un campo electromagnético inducido.

Este equipo permite variar la frecuencia de este, de este modo, fue posible hacer un estudio empleando diferentes frecuencias al cambiar los bancos de capacitores de 87, 256, 357 y 568 KHz. Para las mediciones de temperatura, se colocó en un tripi una cámara térmica FLUKE Ti400 IR FUSION TECHNOLOGY para evaluar el calentamiento de las nanopartículas, realizando todas las mediciones por triplicado para su correcto uso estadístico.

Por otra parte, se desarrollaron pruebas de viabilidad celular dentro de las instalaciones del departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato, evaluando la citotoxicidad de las nanopartículas mediante la disrupción membranal que presentaron [9] sobre la línea celular HEK-293T.

3. Resultados

Los materiales obtenidos se han caracterizado por diferentes técnicas, para este trabajo en particular se decidió presentar los resultados que nos permitieran conocer su estructura cristalina, la respuesta al calentamiento, y la primera etapa de las pruebas de citotoxicidad. En la Figura 1, podemos observar el difractograma de rayos X obtenido del material magnético sintetizado por rutas verdes, el cual muestra señales en $2\theta = 18.4, 29.4, 35.1, 42.5, 52.8, 55.5$ y 75.6° , correspondientes a los planos 111, 220, 311, 222, 400, 422 y 511 respectivamente, características de magnetita [8], comparados con los reportados en la base de datos JCPDS tarjeta 85 1433.

De acuerdo con lo cual, confirmamos la identidad de las nanopartículas, las cuales muestran mayormente una estructura cristalina perteneciente al grupo de espinela inversa, sin embargo, existen señales más débiles que indican la presencia de otras fases cristalinas de óxidos de hierro, lo cual se debe, a que como está ampliamente reportado en la literatura [10, 11, 12], la magnetita, presenta una estructura metaestable, y al ser expuesta a láseres de alta intensidad en pruebas como rayos X y raman o simplemente al oxígeno del aire, tiende a oxidarse fácilmente, presentando señales de distintas fases de óxidos de hierro, principalmente hematita.

Posteriormente, con la ecuación de Debye- Scherrer, se calculó el tamaño promedio del cristal del material, resultando en 14.8 nm.

Por otra parte, en la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos del promedio de las temperaturas de las pruebas del calentamiento de las nanopartículas de magnetita, mostrando una relación con la frecuencia del campo aplicado: a mayor frecuencia menor calentamiento, lo cual corresponde con lo esperado debido a los efectos de relajación magnética, ya que si los dominios magnéticos de las nanopartículas se alinean en periodos de tiempo muy cortos (frecuencias más pequeñas) el movimiento que sufren es mayor, por lo que la temperatura se eleva más, y por el contrario, al ser

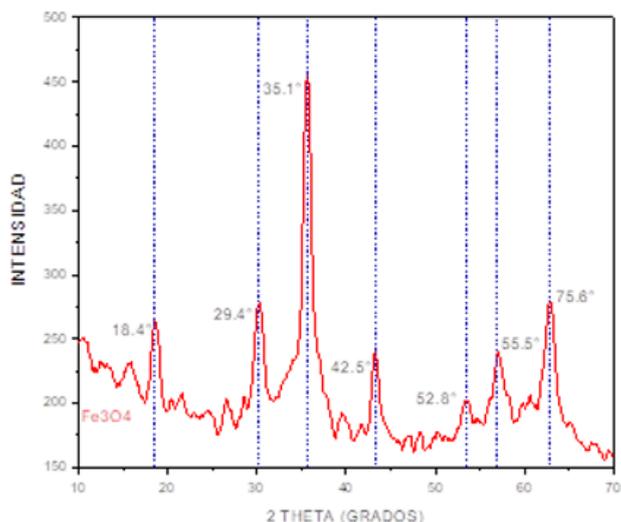


Fig. 1. Difractograma de rayos x de las nanopartículas magnéticas obtenidas por síntesis verde.

Tabla 1. Diferencia de temperaturas de las nanopartículas de magnetita al ser expuestas a distintas frecuencias de un campo magnético

Frecuencia del campo inducido [KHz]	87	256	357	568
ΔT [°C]	39.9	13	7.8	3.5

afectadas por un campo inducido de mayores frecuencias, cuenta con tiempos más largos para alinearse al campo magnético inducido, produciendo un incremento de la temperatura mucho menor.

La temperatura basal de las nanopartículas para esta prueba fue de 22.4°C en promedio. Es importante señalar que estas primeras mediciones se realizaron en un medio seco, por lo que valdría la pena llevar a cabo estas mismas mediciones en un medio acuoso que nos permita simular las condiciones intra e inter celulares en las que las nanopartículas de magnetita estarían expuestas para predecir de forma más efectiva la respuesta de las mismas en los tratamientos de hipertermia.

En el procedimiento de viabilidad celular, se reporta el número de células viables (vivas) de acuerdo con la integridad de su membrana: las células se exponen al estímulo y posteriormente se realiza una tinción con azul de tripano, ya que es indispensable para diferenciar las células muertas (con disrupción membranal).

Las Figuras 2 y 3 muestran las células embrionarias de riñón humano 293, conocidas como línea celular HEK-293T, en distintas etapas de desarrollo que se emplearon en estas pruebas. Las células embrionarias de riñón son adherentes, esto significa que para poder llevar a cabo las funciones celulares vitales necesitan estar adheridas en una superficie.

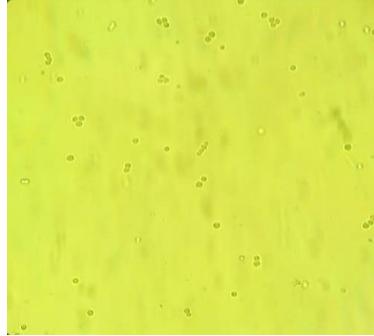


Fig. 2. Células HEK 293 antes de adherirse.



Fig. 3. Células HEK 293 adheridas.

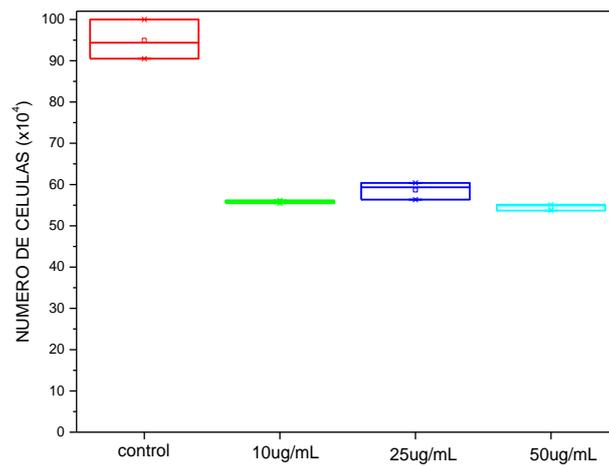


Fig. 4. Resultados de viabilidad celular de la línea HEK-291T expuestas a distintas concentraciones de NPs de magnetita.

En una primera etapa, se trabajó con su reproducción y estabilización, para continuar con las pruebas de viabilidad con el método explicado anteriormente, el cual se llevó a cabo en 3 experimentos independientes por triplicado para asegurar su validez estadística.

La Figura 2, muestra las células después de descongelarlas, de una temperatura de 80°C a 37°C, en la Figura 3, se observan las mismas células 72 horas después, en condiciones de 37°C y con un flujo de dióxido de carbono del 5% adheridas sobre la superficie, en forma de monocapa, las cuales se expusieron a las nanopartículas en concentraciones de 10, 25 y 50 mg/mL.

Los resultados se muestran en la Figura 4, donde se puede apreciar que aún para la concentración más baja (10 mg/mL), la viabilidad celular disminuye entre un 35 y 40%, indicando que la citotoxicidad de las nanopartículas obtenidas con el método aquí propuesto resulta significativa en células embrionarias de riñón.

Es importante mencionar, que no existe una diferencia significativa en la citotoxicidad que muestran las NPs de magnetita a las diferentes concentraciones estudiadas, por lo que se sugieren mayores estudios de citotoxicidad en distintas líneas celulares para determinar la viabilidad de la utilización de estos materiales en tratamientos de hipertermia.

4. Conclusiones

Las nanopartículas utilizadas son obtenidas por rutas verdes, lo que supone mayor sustentabilidad en el proceso de síntesis en caso de que se utilicen de forma rutinaria para tratamientos de hipertermia, logrando mostrar tamaños de cristal de 14.8 nm, el cual está dentro de los rangos reportados [13] para una eficiencia tamaño-calentamiento útil en tratamientos de hipertermia en sistemas biológicos.

Al utilizar una frecuencia de 568 KHz en el campo inducido al material, la temperatura de las nanopartículas de magnetita aumenta 3.5°C, resultando favorable para su aplicación en hipertermia, ya que un aumento en la temperatura de más de 42°C produce apoptosis y posteriormente necrosis celular [14], resultando contraproducente con los resultados deseados. La diferencia de temperaturas registradas con el resto de las frecuencias varía entre 7.8 hasta 39.9 °C, lo cual no es viable en aplicaciones médicas, sin embargo, podían ser aplicadas en el área de la electrónica.

Los resultados de la prueba de viabilidad celular no son concluyentes, ya que existe más de un método para determinar la citotoxicidad de acuerdo con la integridad de estructuras celulares, actividad metabólica, etc., por lo que se plantea como trabajo futuro realizar pruebas de proliferación celular.

Referencias

1. García, M.L.R.: Determinación del tamaño de cristal utilizando el software Jade 6.5. Centro de Investigación en Energía, UNAM (2007)
2. Pájaro-Castro, N., Olivero Verbel, J., Redondo Padilla, J.: Nanotecnología aplicada a la medicina. Guillermo de Okham, pp. 125–133 (2013)
3. Lechuga, L.M.: Nanomedicina: Aplicación de la nanotecnología en la salud. Grupo de Nanobiosensores y Aplicaciones Bioanalíticas (2011)

4. Cuadros Celorrio, M., Llanos Méndez, A., Villegas Portero, R.: *Nanotecnología en Medicina*. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía (2009)
5. Gilchrist, R.K., David, V.C.: Selective inductive heating of lymph nodes. *Annals of Surgery*, 146(596), pp. 596–606 (1957)
6. Chan, D.K.P.B.J.D.C.F.: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 122(374) (1993)
7. Monalisa-Pattanayak, P.L.: Ecofriendly green synthesis of iron nanoparticles from various plants and spices extract. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 3(1), pp. 68–78 (2013)
8. Hiergeist, R., Andrä, W., Buske, N., Hergt, R.: Application of magnetite ferrofluids for hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 201, pp. 420–422 (1999)
9. Panta, P.C., Bergmann, C.P.: Raman spectroscopy of iron oxide nanoparticles (Fe₃O₄) *Journal of Material Sciences & Engineering*, 5(217) (2015)
10. Hassan, S.A., et al.: Interaction characteristics governing the synthesis of Magnetite nanoparticles-conjugated Poly (amido amine) Dendrimer-based Rice Straw ash. *Egyptian Journal of Chemistry*, pp. 681–697 (2015)
11. Chan, D. K. P. B. J. D.C.F.: *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 122(374) (1993)
12. Shrader, B.: *Infrared and raman spectroscopy*. Edit. VCH (1995)
13. Hassan, S.A., Darwish, A.S., Nour, E.A., Abed-Elsatar, Heba A. Gobara, Safaa A. Rushdy: Interaction Characteristics Governing the synthesis of Magnetite nanoparticles-conjugated poly (amino amine) dendrimer- base rice Straw ash. *Egyptian Journal of Chemistry*, 6, pp. 681–697 (2015)
14. Shaterabadi, Z., Nabyouni, G., Soleymani, M.: Optimal size for heating efficiency of superparamagnetic dextran-coated magnetite nanoparticles for application in magnetic fluid hyperthermia. *Physica C: Superconductivity and its Applications*, pp. 84–87 (2018)