

VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 4, 5 y 6 de junio de 2015 “Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento”

SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS CORE-SHELL DE $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ y $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ PARA APLICACIONES EN TERAPIA HIPERTÉRMICA.

Ibarra Salas Emmanuel, Garay Barragán Mariana Isabel,
Méndez Rojas Miguel Angel, Sánchez Salas José Luis,

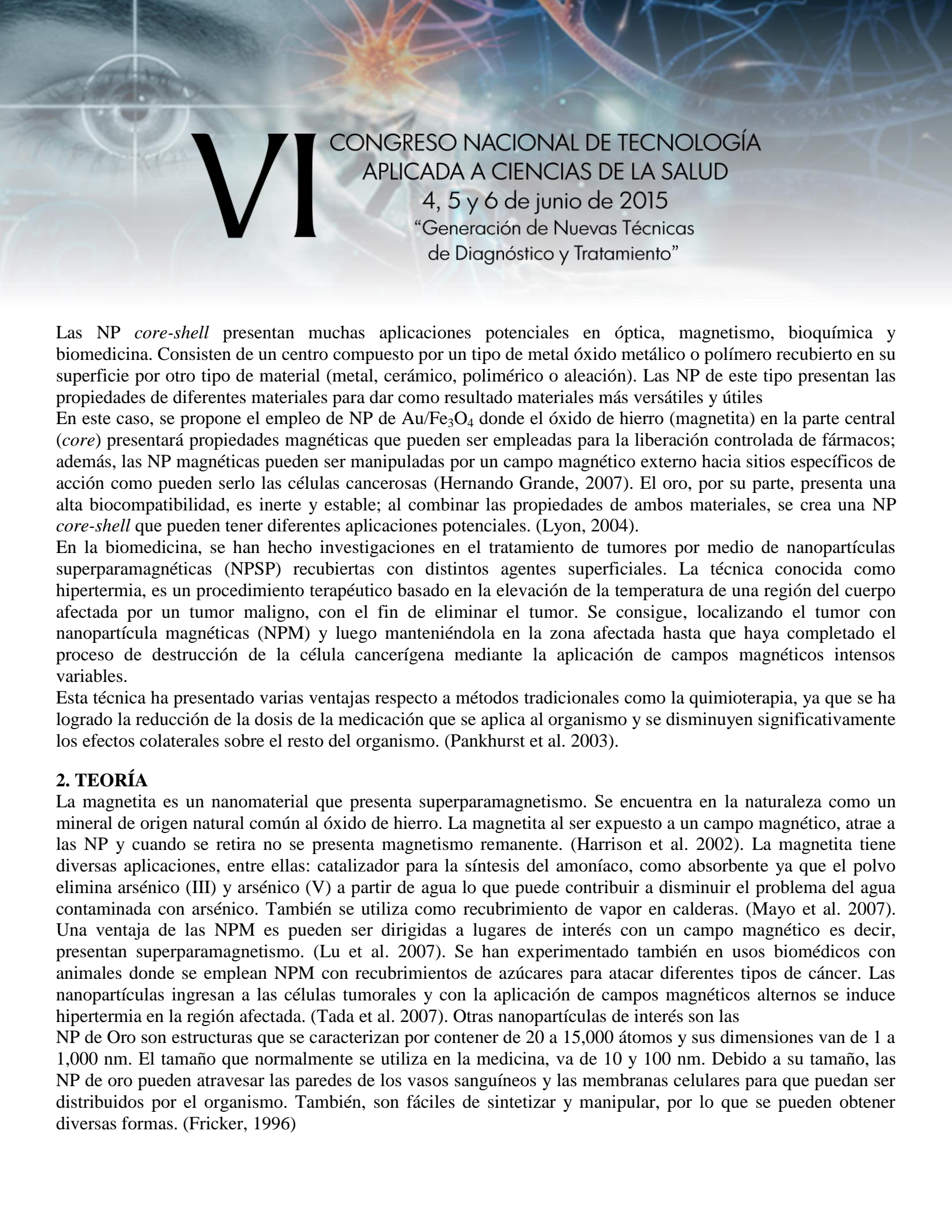
Departamento de Ciencias Químico-Biológicas. Escuela de Ciencias.
Universidad de las Américas Puebla. emmanuel.ibarrass@udlap.mx; mariana.garaybn@udlap.mx;
miguela.mendez@udlap.mx; jluis.sanchez@udlap.mx

RESUMEN

El desarrollo de nanopartículas capaces de capturar o irradiar energía en regiones del espectro electromagnético como el UV, visible e infrarrojo, llama la atención por sus potenciales aplicaciones. Estas nanopartículas se pueden usar en procesos de desinfección de agua, así como para aplicaciones biomédicas como agentes sensibilizantes o en terapia hipertérmica. El objetivo de este proyecto fue sintetizar nanopartículas con estructura *core-shell*, de oro, recubiertas de magnetita y de magnetita recubiertas de oro, y evaluar su capacidad de inducir calentamiento en un medio por irradiación con luz infrarroja. Las nanopartículas se sintetizaron por métodos reportados en la literatura y se caracterizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), Espectroscopia Ultravioleta-visible (UV/Vis) y análisis por *Dynamic Light Scattering* (DLS) para determinar morfología, tamaño y distribución en solución. Posteriormente el efecto hipertérmico de las nanopartículas se evaluó empleando una suspensión de las mismas en 20 mL de agua con 1×10^8 UFC/mL de la cepa de *Escherichia coli* K-12, irradiados con una lámpara de luz infrarroja de 50 watts a 20 cm de distancia. Se tomaron muestras de la suspensión irradiada a diferentes tiempos y se determinó la capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano en cada caso, en comparación a los sistemas control. Se obtuvieron nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ con tamaños entre 140-1000 nm, así como nanopartículas de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ entre 400-1400 nm. Las nanopartículas inducen un incremento de temperatura de la solución de $\sim 1^\circ\text{C}$ después de 10 minutos de irradiación con luz infrarroja de 50 W, y una disminución mayor al 90% de las UFC/mL de bacterias. Concluimos que los sistemas preparados ayudan a aumentar la temperatura del sistema al mejorar la captura de luz IR. También que el tratamiento con estas condiciones disminuyen más del 90% el número de bacterias con 10 minutos de tratamiento por sensibilización a la radiación.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad cuyo índice de mortalidad en los últimos años se ha incrementado notablemente y es ya la tercera causa de muerte en nuestro país. (Reachi, F. SSA Federal, 2014). La Organización Mundial de Salud (OMS) estima que en las próximas dos décadas se presentarán 22 millones de casos de cánceres nuevos, 8 millones más que en el 2012. (Martel et al. 2014). Este hecho es alarmante, y ha motivado la búsqueda de alternativas a los tratamientos quimioterapéuticos. Por ello, en los últimos años, se ha considerado el uso de nanopartículas (NP) *core-shell* del tipo $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$.



VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

4, 5 y 6 de junio de 2015
“Generación de Nuevas Técnicas
de Diagnóstico y Tratamiento”

Las NP *core-shell* presentan muchas aplicaciones potenciales en óptica, magnetismo, bioquímica y biomedicina. Consisten de un centro compuesto por un tipo de metal óxido metálico o polímero recubierto en su superficie por otro tipo de material (metal, cerámico, polimérico o aleación). Las NP de este tipo presentan las propiedades de diferentes materiales para dar como resultado materiales más versátiles y útiles

En este caso, se propone el empleo de NP de Au/Fe₃O₄ donde el óxido de hierro (magnetita) en la parte central (*core*) presentará propiedades magnéticas que pueden ser empleadas para la liberación controlada de fármacos; además, las NP magnéticas pueden ser manipuladas por un campo magnético externo hacia sitios específicos de acción como pueden serlo las células cancerosas (Hernando Grande, 2007). El oro, por su parte, presenta una alta biocompatibilidad, es inerte y estable; al combinar las propiedades de ambos materiales, se crea una NP *core-shell* que pueden tener diferentes aplicaciones potenciales. (Lyon, 2004).

En la biomedicina, se han hecho investigaciones en el tratamiento de tumores por medio de nanopartículas superparamagnéticas (NPSP) recubiertas con distintos agentes superficiales. La técnica conocida como hipertermia, es un procedimiento terapéutico basado en la elevación de la temperatura de una región del cuerpo afectada por un tumor maligno, con el fin de eliminar el tumor. Se consigue, localizando el tumor con nanopartícula magnéticas (NPM) y luego manteniéndola en la zona afectada hasta que haya completado el proceso de destrucción de la célula cancerígena mediante la aplicación de campos magnéticos intensos variables.

Esta técnica ha presentado varias ventajas respecto a métodos tradicionales como la quimioterapia, ya que se ha logrado la reducción de la dosis de la medicación que se aplica al organismo y se disminuyen significativamente los efectos colaterales sobre el resto del organismo. (Pankhurst et al. 2003).

2. TEORÍA

La magnetita es un nanomaterial que presenta superparamagnetismo. Se encuentra en la naturaleza como un mineral de origen natural común al óxido de hierro. La magnetita al ser expuesto a un campo magnético, atrae a las NP y cuando se retira no se presenta magnetismo remanente. (Harrison et al. 2002). La magnetita tiene diversas aplicaciones, entre ellas: catalizador para la síntesis del amoníaco, como absorbente ya que el polvo elimina arsénico (III) y arsénico (V) a partir de agua lo que puede contribuir a disminuir el problema del agua contaminada con arsénico. También se utiliza como recubrimiento de vapor en calderas. (Mayo et al. 2007). Una ventaja de las NPM es pueden ser dirigidas a lugares de interés con un campo magnético es decir, presentan superparamagnetismo. (Lu et al. 2007). Se han experimentado también en usos biomédicos con animales donde se emplean NPM con recubrimientos de azúcares para atacar diferentes tipos de cáncer. Las nanopartículas ingresan a las células tumorales y con la aplicación de campos magnéticos alternos se induce hipertermia en la región afectada. (Tada et al. 2007). Otras nanopartículas de interés son las NP de Oro son estructuras que se caracterizan por contener de 20 a 15,000 átomos y sus dimensiones van de 1 a 1,000 nm. El tamaño que normalmente se utiliza en la medicina, va de 10 y 100 nm. Debido a su tamaño, las NP de oro pueden atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y las membranas celulares para que puedan ser distribuidos por el organismo. También, son fáciles de sintetizar y manipular, por lo que se pueden obtener diversas formas. (Fricker, 1996)

VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 4, 5 y 6 de junio de 2015 “Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento”

Las nanopartículas de oro pueden formar enlaces estables con azufre, carbono y otros elementos como flúor, bromo y cloro. Una unión con una molécula biológica es con el ácido fólico porque se han utilizado para atacar células cancerígenas ya que se internalizan mejor por la unión a receptores del el ácido fólico en este tipo de células. (Dykman y Khlebstov 2012)

La estrategia de este trabajo es desarrollar NP *core-shell* con núcleo de magnetita recubierta de oro y núcleo de oro recubierta de magnetita, aprovechando las características magnéticas y propiedad térmica del oro después de irradiarse con luz infrarroja. Estas NP *core-shell* pueden ser utilizadas para diferentes aplicaciones como desinfección de agua u otras en biomedicina.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Síntesis de nanopartículas magnéticas

La síntesis de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) se realizó por el método de co-precipitación básica de acuerdo al procedimiento descrito por Cong et al, (2008) y Angheluta, et al, (2012).

Síntesis de Nanopartículas de oro

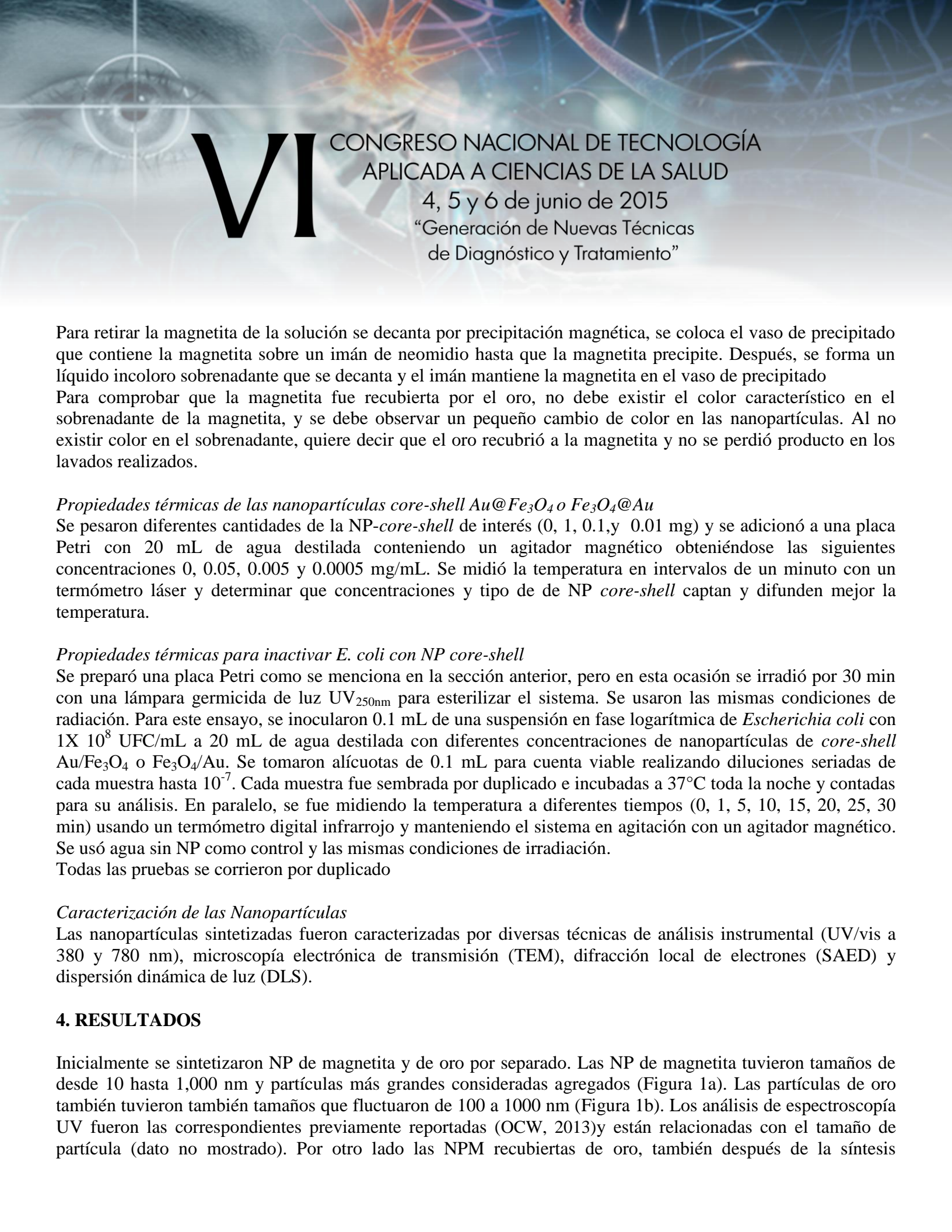
Las nanopartículas de oro se realizaron por medio de la reducción de $HAuCl_4$ con citrato de sodio en medio acuoso. Se realizaron dos formas, una empleando ácido tánico como agente estabilizante y otra sin la utilización del ácido tánico, de acuerdo a las instrucciones de Slot y Geuze (1985).

Síntesis de nanopartículas magnéticas recubiertas de oro ($Fe_3O_4@Au$)

Una vez que se tuvo la magnetita pulverizada, en un vaso de precipitado de 250 mL, se pesaron 100 miligramos de Fe_3O_4 y se diluyeron en 100 mL de agua destilada. Posteriormente, y en constante aplicación se agregaron 15 mL de $HAuCl_4$ a 46.5 Mm y 15 mL de ácido tánico mediante dos pipetas separadas y a una razón de 4 mL por minuto. Al añadirlo, hubo un cambio de color a café-rojizo y se hicieron lavados para remover impurezas. Una vez lavadas, se realizó precipitación magnética para remover el sobrenadante y observar las nanopartículas magnéticas recubiertas de oro.

Nanopartículas de oro recubiertas de magnetita ($Au@Fe_3O_4$)

Primero, se preparó la solución de Cloruro Férrico ($FeCl_3$) a 0.4M. Se agregó 1.08g de $FeCl_3$ en 10 mL de agua destilada. Después, se agitó aproximadamente por 10 minutos hasta obtener una solución de color naranja translúcido. Posteriormente, se preparó una solución de $FeCl_2$ a 0.2M. Se agregaron 0.3975g a 10 mL de agua destilada. La solución se agitó hasta obtener un color verde translúcido. (Cong, Y. 2008). Una vez que se tiene la solución de cloruro ferroso 0.2M, se agrega rápidamente a la solución de cloruro férrico 0.4M, que se encuentra en agitación. Al tener esta solución, se agrega una cantidad de nanopartículas de oro y se colocan en agitación constante. (Angheluta et al. 2012)



VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 4, 5 y 6 de junio de 2015 “Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento”

Para retirar la magnetita de la solución se decanta por precipitación magnética, se coloca el vaso de precipitado que contiene la magnetita sobre un imán de neodimio hasta que la magnetita precipite. Después, se forma un líquido incoloro sobrenadante que se decanta y el imán mantiene la magnetita en el vaso de precipitado. Para comprobar que la magnetita fue recubierta por el oro, no debe existir el color característico en el sobrenadante de la magnetita, y se debe observar un pequeño cambio de color en las nanopartículas. Al no existir color en el sobrenadante, quiere decir que el oro recubrió a la magnetita y no se perdió producto en los lavados realizados.

Propiedades térmicas de las nanopartículas core-shell Au@Fe₃O₄ o Fe₃O₄@Au

Se pesaron diferentes cantidades de la NP-core-shell de interés (0, 1, 0.1, y 0.01 mg) y se adicionó a una placa Petri con 20 mL de agua destilada conteniendo un agitador magnético obteniéndose las siguientes concentraciones 0, 0.05, 0.005 y 0.0005 mg/mL. Se midió la temperatura en intervalos de un minuto con un termómetro láser y determinar que concentraciones y tipo de de NP core-shell captan y difunden mejor la temperatura.

Propiedades térmicas para inactivar E. coli con NP core-shell

Se preparó una placa Petri como se menciona en la sección anterior, pero en esta ocasión se irradió por 30 min con una lámpara germicida de luz UV_{250nm} para esterilizar el sistema. Se usaron las mismas condiciones de radiación. Para este ensayo, se inocularon 0.1 mL de una suspensión en fase logarítmica de *Escherichia coli* con 1×10^8 UFC/mL a 20 mL de agua destilada con diferentes concentraciones de nanopartículas de core-shell Au/Fe₃O₄ o Fe₃O₄/Au. Se tomaron alícuotas de 0.1 mL para cuenta viable realizando diluciones seriadas de cada muestra hasta 10^{-7} . Cada muestra fue sembrada por duplicado e incubadas a 37°C toda la noche y contadas para su análisis. En paralelo, se fue midiendo la temperatura a diferentes tiempos (0, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min) usando un termómetro digital infrarrojo y manteniendo el sistema en agitación con un agitador magnético. Se usó agua sin NP como control y las mismas condiciones de irradiación.

Todas las pruebas se corrieron por duplicado

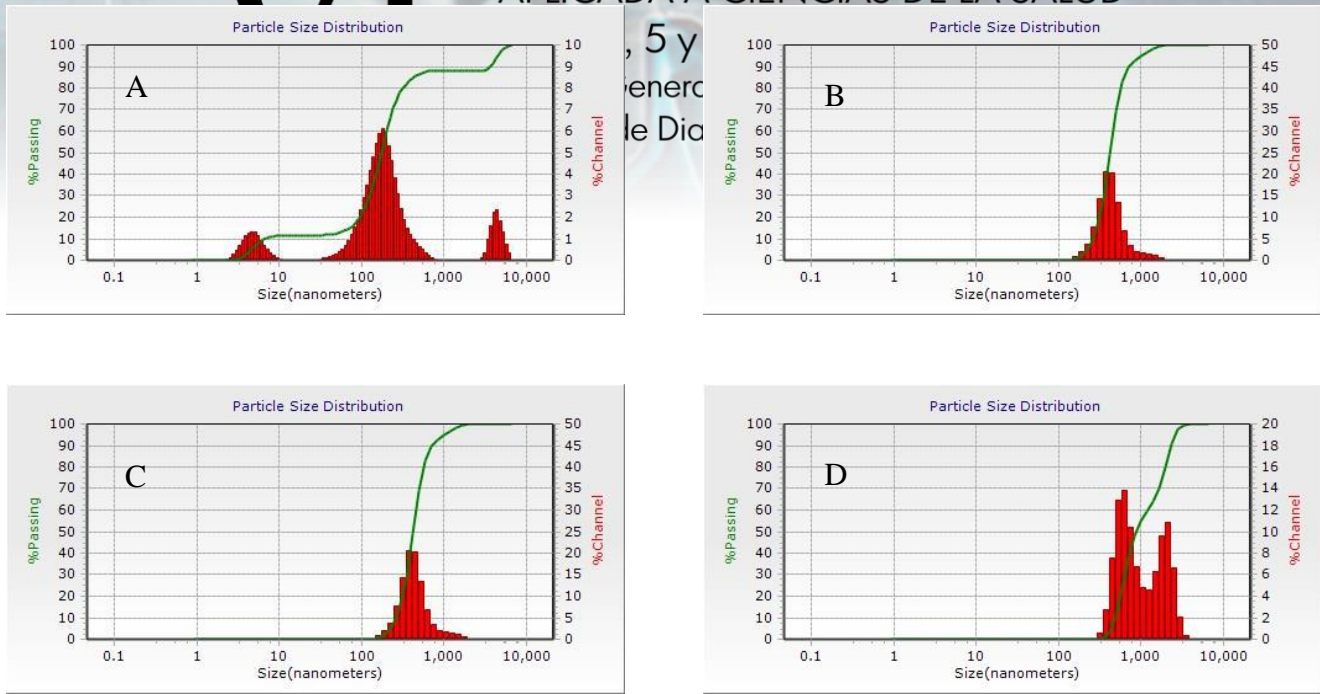
Caracterización de las Nanopartículas

Las nanopartículas sintetizadas fueron caracterizadas por diversas técnicas de análisis instrumental (UV/vis a 380 y 780 nm), microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción local de electrones (SAED) y dispersión dinámica de luz (DLS).

4. RESULTADOS

Inicialmente se sintetizaron NP de magnetita y de oro por separado. Las NP de magnetita tuvieron tamaños de desde 10 hasta 1,000 nm y partículas más grandes consideradas agregados (Figura 1a). Las partículas de oro también tuvieron tamaños que fluctuaron de 100 a 1000 nm (Figura 1b). Los análisis de espectroscopía UV fueron los correspondientes previamente reportadas (OCW, 2013) y están relacionadas con el tamaño de partícula (dato no mostrado). Por otro lado las NPM recubiertas de oro, también después de la síntesis

VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD



ura 1c) y las NP de oro recubiertas con magnetita mostraron tamaños alrededor de 400 a 5,000nm debido a la formación de agregados (figura 1d). Imágenes selectas de TEM se muestran en la Figura 2.

Figura 1. Análisis por DLS de los tamaños relativos de las diferentes NP sintetizadas. A, NP de magnetita; B, NP de oro; C, NPM recubiertas con oro y D, NP de oro recubiertas con magnetita.

VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

4, 5 y 6 de junio de 2015
“Generación de Nuevas Técnicas
de Diagnóstico y Tratamiento”

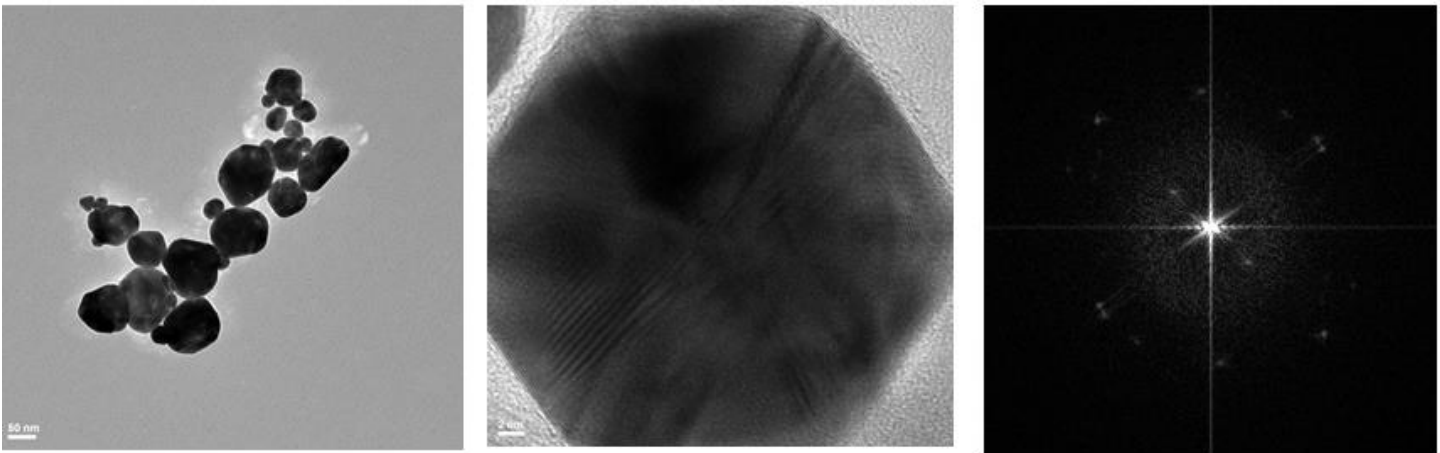


Figura 2. Micrografías TEM y difracción de electrones selecta para una nanopartícula de Fe_3O_4 recubierta de Au. La imagen muestra una estructura cristalina tipo icosaédro, típica del oro.

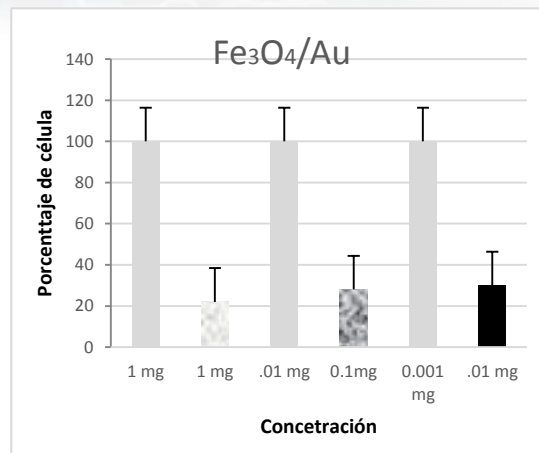
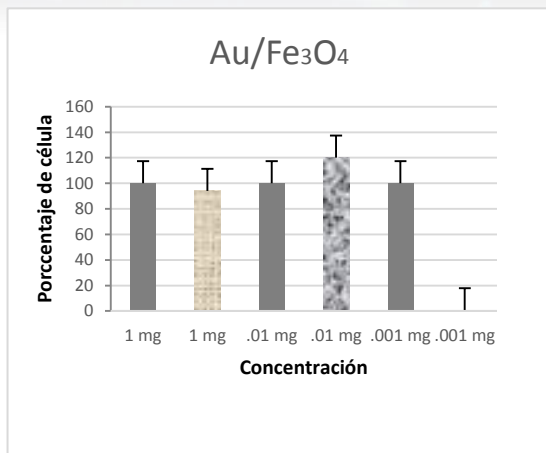
Propiedades de difusión térmica

Se midieron las propiedades de difusión térmica de los dos tipos de NP core-shell, encontrándose que las NP de oro recubiertas con Fe_3O_4 , mantienen una difusión de calor más alta que las NP de Fe_3O_4 recubiertas con oro, excepto donde se usó mayor concentración como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Incremento de difusión de temperatura en un sistema acuoso conteniendo diferentes concentraciones de NP de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ o $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ por irradiación infrarroja.

Tiempo de exposición	°C sólo agua	°C con 0.05 mg/mL de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$	°C con 0.05 mg/mL de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$	°C con 0.005 mg/mL de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$	°C con 0.005 mg/mL de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$	°C con 0.0005 mg/mL de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$	°C con 0.0005 mg/mL de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$
0 min	20.7	21.5	21.5	21.9	21.5	21.5	21.5
1 min	23.7	23.8	24.4	24	24.01	23.6	24.8
2 min	23.8	25.5	25.2	25.5	24.6	24.6	25.8
3 min	25.5	26.2	26.0	26.6	25.8	25.4	27.2
4 min	25.7	26.5	27.0	27.5	26.6	26.0	27.7
5 min	26.8	27.5	28.0	27.7	27.3	26.7	28.0
6 min	27.06	27.8	28.8	28.3	28.5	27.5	28.8

VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD 4, 5 y 6 de junio de 2015 “Generación de Nuevas Técnicas de Diagnóstico y Tratamiento”




7 min	27.6	28.8	29.0	29.1	28.7	28.0	29.3
8 min	27.8	28.9	29.5	29.3	29.4	28.2	29.5
9 min	28.0	29.7	30.3	29.8	29.8	28.5	30.1
10 min	28.9	30.7	30.8	30.2	30.2	28.6	30.5
Cambio de T°	8.2	9.2	9.3	8.3	8.7	7.1	9.0

En las pruebas de inactivación de bacterias, se observó un mejor efecto de inactivación con las NP de Fe_3O_4 que con las NP de oro recubiertas con Fe_3O_4 como se muestra en la Figura 3.

Figura 3. Porcentaje de inactivación de *Escherichia coli* durante la irradiación de infrarroja y con las dos NP *core-shell*. Las barras de un solo color en cada gráfica corresponden al ensayo en presencia de NP pero sin radiación.

5. CONCLUSIONES



VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

4, 5 y 6 de junio de 2015
“Generación de Nuevas Técnicas
de Diagnóstico y Tratamiento”

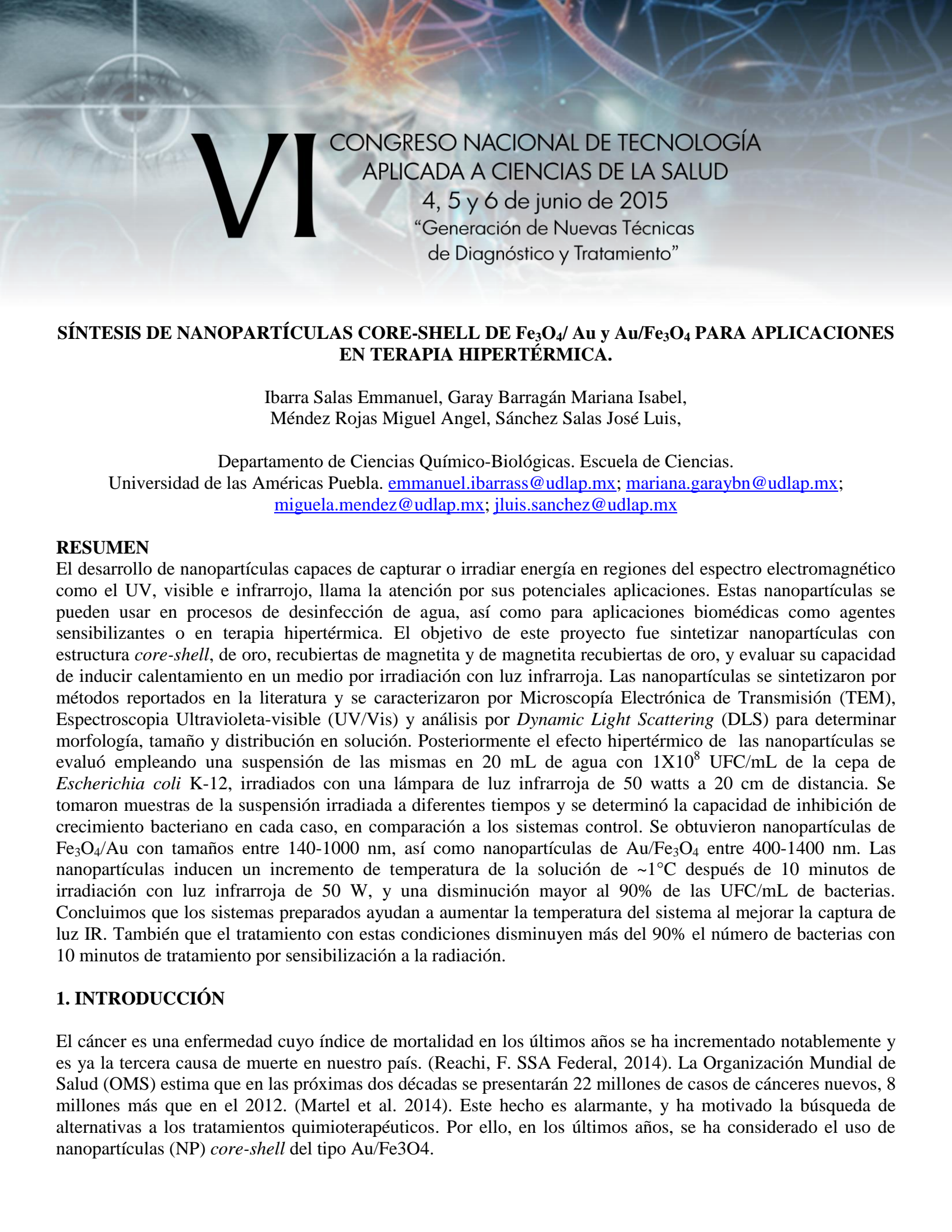
En este trabajo, se obtuvieron nanopartículas *core-shell* de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ con tamaño intervalo de 140-1000nm y de $\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ con tamaño intervalo de 400-1400nm, Estas nanopartículas incrementaron la temperatura con respecto al control en 1°C después de 10 minutos de irradiación con una lámpara de 50 Watts estando a una distancia de 20 cm y usando 0.0005 mg/mL. Se esperaba que sólo las NP magnetita/oro, incrementaran la temperatura del agua pero también se encontró que las NP de oro recubiertas con magnetita son igualmente efectivas. En el intento de inactivar las células de *Escherichia coli* bajo estas condiciones, la NP de magnetita/oro aparentemente fueron más eficientes para inactivar a esta bacteria en 10 minutos. Es necesario caracterizar mejor las NP sintetizadas, y probar nuevos tiempos de radiación para encontrar las mejores condiciones de inactivación de bacterias con este sistema. Este tipo de nanomateriales puede ser útiles en procesos de desinfección de agua potable o sistemas acuosos, donde la propiedad magnética de estas nanopartículas permita su remoción antes de usar el agua. Así mismo, estas NP pueden ser útiles en otros procesos biomédicos como en el tratamiento de cáncer. Sin embargo, se hace necesario estandarizar mejor el sistema

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Jeffery L. Coffey y al estudiante Roberto González-Rodríguez (Department of Chemistry, Texas Christian University) por apoyo en la obtención de micrografías TEM de nuestras muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Angheluta, A., Pinteala, M., & Simionescu, B.(2012) Tailored and functionalized magnetite particles for biomedical and industrial applications. INTECH. Noviembre 2014
2. Hernando Grande A. (2007). Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. Vol. 101, No. 2, pp 321-327. Noviembre 2014
3. Cong, Y., Wang, G., Xiong, M., Huang, Y., Hong, Z., Wang, D., Li, J., & Li, L. A (2008).Facile Interfacial Reaction Route To Prepare Magnetic Hollow Spheres with Tunable Shell Thickness. Noviembre 2014.Langmuir, 24, 6624-6629.
4. Dykman, L., Khlebstov N. (2012). Gold Nanoparticles in Biomedical Applications: Recent Advances and Perspectives. Noviembre 2014. Chem. Soc. Rev., 41: 2256-2282.
5. Fricker, S.P. (1996). Medical Uses of Gold Compounds: Past, Present and Future. Gold Bulletin, 29(2): 53-60.
6. Harrison, RJ; Dunin-Borkowski, RE; Putnis, A (2002). Direct imaging of nanoscale magnetic interactions in minerals. Noviembre 2014. Proceedings of the National Academy of Sciences **99** (26): 16556–16561.
7. Lu H., E. L. Salabas and F. Schüth (2007). Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. Angew. Chem. Int. Ed. **46** (8): pp. 1222–1244. Noviembre 2014



VI CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

4, 5 y 6 de junio de 2015
“Generación de Nuevas Técnicas
de Diagnóstico y Tratamiento”

8. Lyon J., D. Fleming, M. Stone, P. Schiffer, M.E. Williams, NanoLetters 4 (2004) 719. Noviembre 2014
9. Martel C, Ferlay J, Franceschi S, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. The Lancet Oncology 2012;13: 607-615. Noviembre 2014
10. Mayo JT. et al. (2007). The effect of nanocrystalline magnetite size on arsenic removal. Sci. Technol. Adv. Mater. 8:71. Noviembre 2014.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200602866/abstract;jsessionid=31DA521F77F40494AE43E16B0B8166BD.f02t03>
11. OCW. (2013). Espectroscopía ultravioleta visible. noviembre 2014, de Instituto de Química Sitio web:
<http://ocw.uc3m.es/ingenieria-quimica/quimica-ii/practicas-1/PR-F-Anexos.pdf>
12. Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K, Dobson J. (2003) J. Phys. D: Appl. 36: R167 – R181. Noviembre 2014
13. Reachi, F. SSA Federal, 2014. <http://portal.salud.gob.mx/>
14. Slot, J; Geuze, H. J. (1985) A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. Noviembre 2014. Eur. J. Cell Biol., 38, 87-93
15. Tada, Dayane B.; Vono, Lucas L. R.; Duarte, Evandro L.; Itri, Rosangela; Kiyohara, Pedro K.; Baptista, Maurício S. and Ross, Liane M. (2007). Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. Langmuir, vol. 23, pp. 8194-8199.