

Obtención y caracterización de ferrofluidos magnéticos y magnetoliposomas

Hermida, L. ⁽ⁱ⁾; Defain Tesoriero, M.V. ⁽ⁱ⁾; Lloret, P. ⁽ⁱⁱ⁾; Gauna, R. ⁽ⁱ⁾; Moina, C. ⁽ⁱⁱⁱ⁾, Barnadas, R. ⁽ⁱⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ INTI-Química

⁽ⁱⁱ⁾ INTI-Procesos Superficiales

⁽ⁱⁱⁱ⁾ Centro de Estudios Biofísicos, Universidad Autónoma de Barcelona

Introducción

En el campo de la nanobiotecnología, el empleo de nanopartículas magnéticas está cobrando una creciente importancia en los últimos años. Entre las aplicaciones en el área de diagnóstico se destaca su empleo como agentes de contraste para resonancia magnética. Entre las aplicaciones terapéuticas, se encuentran en pleno desarrollo los tratamientos oncológicos mediante hipertermia inducida por campos magnéticos ^{[1][2]}.

Dentro de los sistemas más promisorios utilizados con los fines mencionados se hallan las preparaciones coloidales de ferrofluidos y magnetoliposomas. Estos sistemas están compuestos por óxidos magnéticos que deben ser fluidificados mediante el agregado de ciertas sustancias, o bien incorporados en vesículas, como los liposomas, que permitan su dispersión homogénea en fase acuosa. En ambos casos, suelen emplearse núcleos nanométricos de magnetita (Fe_3O_4) y/o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) debido a su baja toxicidad y a sus propiedades magnéticas adecuadas. Generalmente los sólidos magnéticos se sintetizan *in situ*, ya que las aplicaciones de estas preparaciones dependen, básicamente, de la forma y del tamaño del núcleo sólido.

Por otro lado, las características físicoquímicas y de biocompatibilidad de las sustancias que recubren dichas partículas establecen aspectos tales como su estabilidad y permanencia en el cuerpo humano ^{[3][4]}. Por lo tanto, es de suma importancia establecer metodologías robustas tanto para el control del proceso de formación del óxido magnético como para el proceso de recubrimiento que permita obtener suspensiones homogéneas y estables.

Además, este tipo de coloides puede ser obtenido mediante procesos escalables y por lo tanto transferibles.

El objetivo del presente trabajo es la obtención de ferrofluidos magnéticos y magnetoliposomas empleando distintas metodologías. Su caracterización físicoquímica ha permitido

establecer las metodologías más eficientes para la estabilización de los núcleos magnéticos.

Metodología

Preparación de magnetita

Se realizó mediante co-precipitación en medio básico, analizando los factores que podían afectar al dicho proceso, según lo expuesto por otros autores ^{[5][6]}.

Se prepararon soluciones 0,05 M de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en HCl. Se mezclaron ambas soluciones, resultando 1,492 M de hierro total. Luego se añadió una solución NH_4OH 25 % p/v con agitación mecánica (350 rpm) hasta pH final 9,28, obteniéndose un precipitado negro de magnetita.

Preparación de ferrofluidos

La magnetita obtenida se dividió en tres porciones para obtener ferrofluidos estabilizados con distintas sustancias: ácido láurico (AL), hidróxido de tetrametil amonio (TMA) y citrato sódico (CS).

En todos los casos se realizaron lavados de la magnetita antes del proceso de fluidificación para eliminar los cloruros, que interfieren en la obtención de ferrofluidos.

a) Ferrofluido con AL

El protocolo experimental se basó en los trabajos de Khalafalla y Reimers ^[7], Thapa et al. ^[8] y Bulte W.M. y De Cuyper M. ^[4]. Se partió de 2 g de magnetita húmeda obtenida previamente, que se lavó 3 veces con NH_4OH 1,25 % p/v. Posteriormente se calentó la muestra a 90 °C, se agregó AL (en relación 40,2 g AL/mol Fe) y se agitó la mezcla durante 5 min. Finalmente, se centrifugó durante 10 minutos a 3.500xg obteniéndose un pellet que se descartó y un sobrenadante constituido por magnetita fluidificada. Este sobrenadante fue conservado en atmósfera de N_2 para evitar la oxidación.

b) Ferrofluido con TMA

El protocolo experimental se basó en los métodos descritos por Chun D. et al. [9] y Korenacká et al. [10].

Se partió de 2 g de magnetita húmeda, que se lavó 3 veces con agua, decantando el líquido con ayuda de un imán potente. Posteriormente se añadió el TMA al 25 % (en relación 167 mL TMA 25 % / mol Fe) y se homogeneizó mediante agitación mecánica. A continuación se procedió según lo descrito para el ferrofluido con AL.

c) *Ferrofluido con CS*

Se siguió el método descrito por Domingo et al. [11]. Se partió de 2 g de magnetita húmeda y se lavó 3 veces con HNO₃ 2M. Seguidamente se añadieron 6,4 mL de CS 50 mM y se procedió según lo descrito para los otros ferrofluidos.

Obtención de magnetoliposomas por precipitación interna

Se realizaron variantes del protocolo descrito por Nawroth et al. [12] y Sangregorio [13] et al. Los procedimientos tienen como etapa común la obtención de liposomas multilamelares (MLVs) a partir de la mezcla y agitación de fosfolípidos con un medio acuoso que contiene sales de hierro. En un caso, la mezcla se realizó a pH ácido resultante de la disolución de sales de hierro, mientras que en el segundo protocolo se ajustó previamente el pH llevándolo a valores cercanos a la neutralidad. Este ajuste de pH se realizó con el objeto de minimizar la degradación química de los fosfolípidos insaturados empleados.

a) *Obtención de magnetoliposomas en medio muy ácido*

Con el objeto de obtener MLVs se mezclaron a 40 °C y con agitación magnética durante 1 h, 7,2 g de fosfatidilcolina de huevo (EPC) y 120 mL de una disolución compuesta por FeCl₃ 0,88 M, y FeCl₂ 0,6 M en CS 1M (pH<1). La suspensión así obtenida se homogeneizó a alta presión con un EmulsiFlex C50 operando en modo recirculación. La suspensión final, formada por liposomas de pequeño diámetro, mostró signos evidentes de inestabilización, por lo que fue descartada.

Por lo tanto se reemplazó EPC por fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC), una mezcla natural de fosfolípidos que resulta mucho más estable frente a la oxidación. En este caso la mezcla y agitación de los fosfolípidos con la solución de sales de hierro se llevó a cabo a 55 °C, una temperatura superior a la de fusión de la HSPC.

b) *Obtención de magnetoliposomas en medio levemente ácido*

La solución de sales de hierro mencionada en el apartado anterior se neutralizó con NH₄OH 25 % p/v hasta un pH de 5,6. Posteriormente se

añadieron 7,2 g de EPC (resultando 60 mg EPC/mL) y se mantuvo la mezcla a 40 °C con agitación magnética durante 1 h. A continuación la suspensión de MLVs se homogeneizó a alta presión. A partir de esta suspensión se obtuvieron liposomas con hierro encapsulado mediante cromatografía de exclusión molecular en columnas PD-10 rellenas con Sephadex G50. Alícuotas de la suspensión obtenida se llevaron a pH 8, 10 ó 12 añadiendo NH₄OH 25 % p/v. En teoría, el cambio de pH originado provocaría la precipitación de la magnetita en el interior de los liposomas.

Obtención de vesículas magnéticas por coprecipitación en presencia de fosfolípidos

Se realizaron variantes del protocolo descrito por Giri et al. [14] a) incrementando la concentración de fosfolípidos y b) trabajando con medio etanólico, con el fin de emplear un alcohol menos tóxico que el utilizado por el autor previamente citado. Por lo tanto, la precipitación de la magnetita con una base se realizó en un sistema ternario monofásico constituido por medio acuoso con sales de hierro, un alcohol (metanol o etanol) y fosfolípidos.

En este caso se prepararon dos soluciones: 1) FeCl₃ 60 mM y FeCl₂ 40 mM en HCl 0,05 M. 2) solución alcohólica (metanol o etanol) de EPC. Se añadió la solución alcohólica a la de sales de hierro con agitación mecánica (350 rpm) a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó NH₄OH 25 % p/v, resultando un pH final de 9,95. La adición se realizó a un caudal aproximado de 1 mL/min. Durante dicho proceso tuvo lugar la formación de la magnetita. El producto formado se lavó tres veces con 50 mL de agua destilada.

De este modo se obtuvieron dos preparaciones acuosas diferentes. Una proveniente de la coprecipitación en un sistema monofásico con metanol, y otra originada a partir de un sistema monofásico con etanol.

Caracterización de muestras

-Distribución de tamaño de partícula: se determinaron mediante *Laser Light Scattering* (LLS) con un equipo Zetasizer 4 Malvern Instruments (UAB, España).

-Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM): se empleó un equipo Hitachi H-7000 con una resolución de 2,04 Å (UAB, España).

-Microscopía de Fuerza Atómica (AFM): las muestras se diluyeron en agua destilada y la suspensión se depositó sobre una placa de silicio 1 0 0, que se secó en estufa a 45 °C. La caracterización se realizó en un microscopio de fuerza atómica UltraObjective (Surface Imaging Systems) operando en el modo no contacto.

Resultados

Preparación de magnetita

Por cada 18 g iniciales de sales de hierro totales se obtuvieron aproximadamente 6 g de magnetita. Su posterior análisis por LLS (ver Fig.1) mostró una baja estabilidad física durante el almacenamiento. En efecto, 15 días después de la obtención, la muestra presentó una distribución bimodal con un diámetro medio de 3.481 ± 641 nm, atribuida a aglomerados.

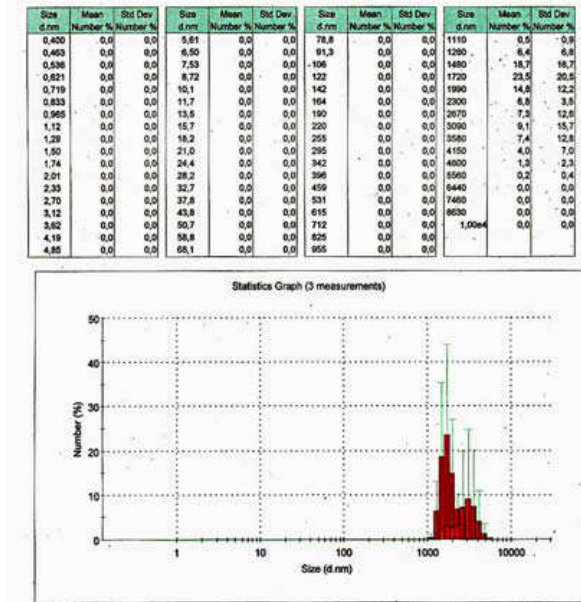


Fig. 1. Análisis de magnetita por LLS.

Preparación de ferrofluidos

a) Ferrofluido con AL

Se obtuvo un ferrofluido estable en el tiempo y frente a la dilución, que fue analizado mediante LLS y TEM. La distribución de diámetros correspondiente presentó dos poblaciones centradas a 18 y 33 nm, lo cual coincide con el rango de diámetros observado por TEM (ver Fig. 2a).

b) Ferrofluido con TMA

Este ferrofluido resultó menos estable frente a la dilución que el obtenido con AL. El resultado del análisis por espectroscopia LLS mostró dos poblaciones centradas en los 10 y 24 nm, que pueden correlacionarse con las imágenes obtenidas por TEM (ver Fig. 2b).

c) Ferrofluido con CS

No se obtuvo un ferrofluido estable. Debido a ello no se realizó la caracterización de la muestra.

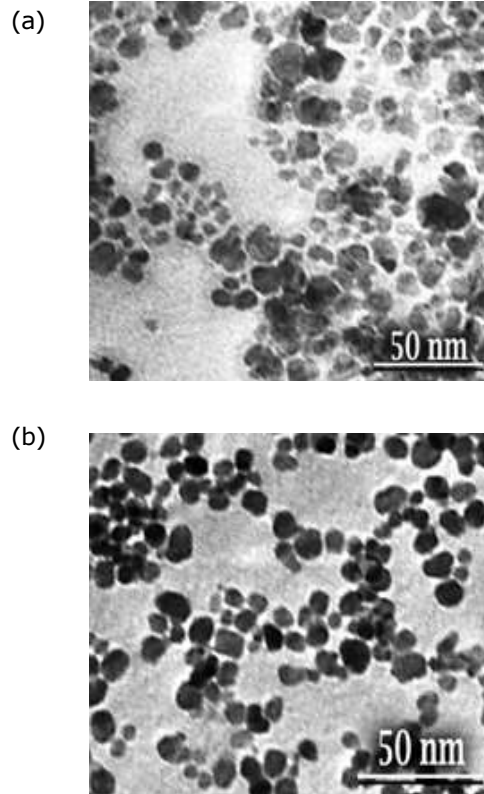


Fig. 2: Imágenes de TEM de los ferrofluidos obtenidos con ácido láurico (a) y con TMA (b).

Obtención de magnetoliposomas por precipitación interna

a) Obtención de magnetoliposomas en medio muy ácido

El resultado obtenido fue una mezcla heterogénea, no apta para su homogeneización.

b) Obtención de magnetoliposomas en medio levemente ácido

La suspensión obtenida resultó homogénea y por lo tanto pudo ser homogeneizada a alta presión. En la Tabla I se muestran los valores de diámetros medios obtenidos para los magnetoliposomas obtenidos precipitando a diferentes pHs. Como puede observarse las vesículas de menor tamaño se obtuvieron a un pH final de 10, hallándose distribuciones de tamaños unimodales.

Tabla I. Diámetro medio de los magnetoliposomas obtenidos en medio levemente ácido, precipitando las sales de hierro a distintos pHs.

pH	Diámetro medio (nm)
8,0	566
10,0	150
12,0	396

Obtención de vesículas magnéticas por coprecipitación en presencia de fosfolípidos

En ambos tipos de preparaciones (etanol o metanol) las distribuciones de tamaño resultantes fueron bimodales. En el caso de la de origen metanólico, los picos principales se hallaron a 615 y 2.300 nm, mientras que en la de origen etanólico a 340 y 615 nm. En las imágenes obtenidas por TEM se observan estructuras opacas claramente inferiores a los 100 nm. Esta discrepancia con los resultados obtenidos por LLS podría indicar que se están produciendo agregados de gran tamaño en el medio acuoso, estructuras que serían las determinadas mediante LLS. (ver Fig. 3)

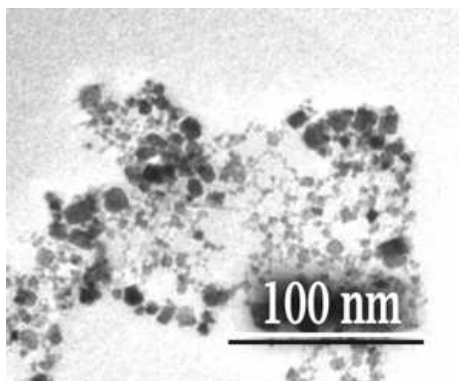


Fig. 3: Imágen de TEM de vesículas magnéticas obtenidas por coprecipitación en presencia de fosfolípidos, partiendo de un sistema monofásico con etanol.

Este hecho fue confirmado mediante AFM. En la imagen obtenida para la suspensión de vesículas magnéticas partiendo de etanol, se observó un aglomerado de nanopartículas con una distribución de tamaño homogénea de 10 a 30 nm de altura (Fig.4a). Cuando esta suspensión es diluida, se observa claramente el tamaño nanométrico de las partículas (Fig.4b).

Conclusiones

—Los ferrofluidos obtenidos con TMA y AL resultan los más estables y, por lo tanto, los que pueden ofrecer mayores ventajas para distintas aplicaciones. El mayor diámetro observado en el ferrofluido obtenido con AL, respecto al de TMA, podría deberse a la longitud de la cadena del ácido láurico. De hecho, la diferencia de diámetro entre las poblaciones de cada tipo de preparación es de sólo unos 8 nm, una longitud aproximadamente equivalente a dos cadenas de dicho ácido.

—Si bien fue posible obtener magnetoliposomas en medio levemente ácido, evitando así la degradación de los fosfolípidos, la incorporación de magnetita en estas vesículas es muy baja, lo cual limita sus aplicaciones.

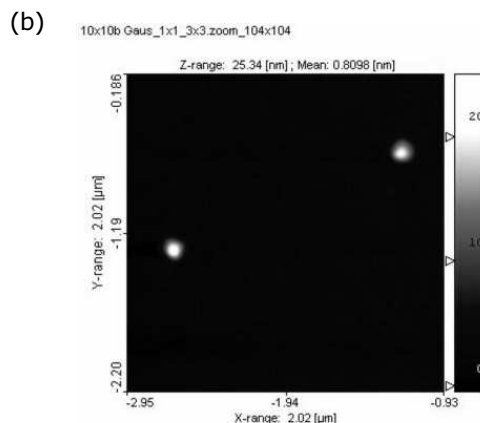
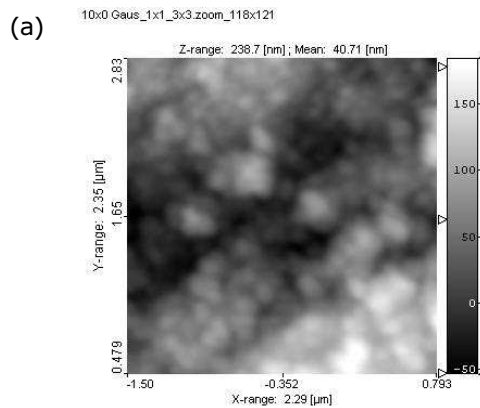


Fig.4: Imágenes de AFM de vesículas magnéticas obtenidas por coprecipitación en presencia de fosfolípidos, partiendo de un sistema monofásico con etanol. Se muestran los aglomerados correspondientes a la suspensión tal cual (a) y partículas aisladas, luego de diluir la muestra (b).

—La coprecipitación en presencia de fosfolípidos es la metodología que podría resultar más eficiente, ya que se parte de altas concentraciones de hierro en solución. Los resultados obtenidos sugieren que el empleo de la homogenización a alta presión podría contribuir a la desagregación de las macroestructuras formadas. Con el mismo fin, también podrían incluirse en la formulación fosfolípidos con carga negativa en las formulaciones.

—En lo referente a la caracterización de las preparaciones, una vez optimizados los métodos de obtención, se empleará la difracción de rayos X y la espectroscopia de infrarrojo para su caracterización química (proporción de magnetita y maghemita) y se realizarán las medidas de magnetización de las vesículas obtenidas.

Referencias

- [1] Tartaj P. et al. J.Phys. D: Appl. Phys. 36. R182-R197 (2003).
- [2] Pakhurst Q.A. et al. J.Phys. D: Appl. Phys. 36. R167-R181 (2003).
- [3] Wang Y.-X.J. et al. Eur. Radiol. 11: 2319-2331 (2001).
- [4] Bulte J.W. M. and De Cuyper M. Meth. Enzymol. 373. Part C. (II): 175-198 (2003).
- [5] Itoh et al. J. Col. Int. Sci 265: 283-295 (2003).

-
- [6] Correa J. et al. Mat. Res. But. 42: 703-713 (2006).
[7] Khalafalla S.E. and Reimers G.W. IEE Trans. Mag. Mag-16 (2): 178-183 (1980).
[8] Thapa et al. Mater. Let. 58 (21): 2692-2694 (2004).
[9] Chun D. et al. California NanoSystems Institute. Un. California. (2005).
[10] Korenacká et al. J. Mag. Mag. Mat. 293: 271-276 (2005).
[11] Domingo et al. J. Microencap. 19 (1): 41-54 (2001).
[12] Nawroth et al. Physica B: e635 - e638 (2004)
[13] Sangregorio et al. J. Appl. Phys. 85: 8 (1999).
[14] Giri J. et al. J. Magn. Magn.Mater. 293, 62-68 (2005).

Para mayor información contactarse con:
Laura Hermida – lhermida@inti.gov.ar