

Actividad Antioxidante de nanopartículas de magnetita Fe₃O₄

Sandoval Flores V¹, Ortega Cardenas JA¹, Ravelo Acuña D², Santoyo Salazar J³, Mora Escobedo R¹ y Yee Madeira H⁴.

¹Laboratorio de Bioquímica de la Nutrición, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México. ²Unidad Profesional Interdisciplinaria de Energía y Movilidad, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México. ³Departamento de Física, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México. ⁴Laboratorio de Espectroscopia Mössbauer y Técnicas Complementarias, Escuela Superior de Física y Matemáticas, Instituto Politécnico Nacional, CDMX, México.
Teléfono (722) 3902909 e-mail: vsandovalf1900@alumno.ipn.mx

Resumen — Las nanopartículas de óxido de hierro se han usado como transporte de fármacos e hipertemia. En el presente trabajo se sintetizaron nanopartículas de Fe₃O₄ por coprecipitación, recubiertas con 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) para su uso como transportadores de péptidos bioactivos, se caracterizaron por las técnicas: FT-IR, DRX, TEM y SQUID. Se determinó la actividad antioxidante por el método de poder reductor y actividad atrapadora del radical OH. Se obtuvieron nanopartículas superparamagnéticas con las características deseadas.

Palabras Clave – nanopartículas, magnetita, antioxidantes

Abstract — Iron oxide nanoparticles have been used for drug transport and hyperthermia. In the present research, Fe₃O₄ nanoparticles were synthesized by coprecipitation method, coated with 3-aminopropyl triethoxysilane (APTES) to act as carrier of bioactive peptides, characterized by the following techniques: FT-IR, DRX, TEM and SQUID. The antioxidant activity was determined by reducing power and radical OH scavenging activity. Superparamagnetic nanoparticles with the desired characteristics were obtained.

Keywords — nanoparticles, magnetite, antioxidants

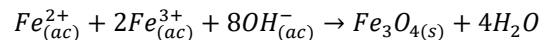
I. INTRODUCCIÓN

La oxidación es provocada por una serie de reacciones químicas que se lleva a cabo en todos los organismos vivos de forma inevitable, esta forma especies reactivas de oxígeno (EROS) y radicales libres que conllevan al envejecimiento y desarrollo de enfermedades como cáncer, aterosclerosis, Alzheimer entre otras, induciendo estrés oxidativo [1]. Debido a los efectos indeseables de los procesos oxidativos, su inhibición es importante, por lo que han surgido múltiples investigaciones en la búsqueda de compuestos con actividad antioxidante. Se definen como “cualquier sustancia que, estando presente en baja concentración en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato”. Las nanopartículas de Fe₃O₄ aparte de servir como transporte de moléculas en sistemas biológicos pueden ejercer un efecto antioxidante [2]. Existen diversas técnicas para determinar la actividad antioxidante, como el Poder Reductor y la Actividad Atrapadora de Radical -OH, que son las que más se asemejan al comportamiento de oxidación celular.

II. METODOLOGÍA

A. Síntesis de Nanopartículas por coprecipitación

Se siguió el método reportado por [2] mezclando soluciones salinas acuosas de cloruro de Fe²⁺ y Fe³⁺ en una proporción 1:2 en un medio básico de NH₄OH⁻ obteniendo magnetita, como se muestra en la reacción:



A una disolución acuosa de NH₃ (250 ml, 0.7 M) contenida en un matraz de tres bocas, se goteó una mezcla de disoluciones ácidas (HCl, 2 M) de sales de FeCl₂·2 H₂O (5 ml, 5 M) y FeCl₃·6 H₂O (20 ml, 2.5 M), con una bomba peristáltica, se utilizó N₂ (g), antes de iniciar la síntesis. Se agitó a temperatura ambiente en atmósfera de N₂ (g) durante 25 min a 500 rpm y ultrasonido. Concluido el tiempo de reacción, el precipitado se separó del sobrenadante con un imán [4]. Posteriormente, se lavó con agua desionizada, para obtener un sólido negro, correspondiente a la magnetita, se secó durante 12h en una desecadora con sílica y vacío para su deshidratación.

B. Recubrimiento y Funcionalización con APTES

Este recubrimiento se realizó en un solo paso de reacción, se dispersaron 500 mg del sólido sintetizado anteriormente en una mezcla de etanol (80 ml) y H₂O desionizada (40 ml), se ajustó a pH 10 con una disolución acuosa de NH₃ (0.7 M) y se homogenizó con baño ultrasónico, se goteó una disolución alcohólica de APTES (5 ml, 10%), con agitación constante, pasadas 24 h, se separó el precipitado con un imán y se realizaron los lavados del fluido magnético con etanol (2 x 50 ml) [5] como último paso, el producto de la reacción se secó 12 horas en desecador con sílica activada para obtener alrededor de 300 mg de magnetita recubierta con APTES, en forma de un polvo negro.

C. Caracterización de la magnetita

a. Espectros FT-IR

Se formó una pastilla fina y cristalina con la muestra y bromuro de potasio (KBr), en un mortero de ágata, se maceró 1mg de Fe₃O₄ con 10 mg de KBr se colocaron en una prensa ejerciendo presión para formar la pastilla con la muestra, esta se colocó en el portamuestras del espectrofotómetro FT-IR EQUINOX 55 de Bruker y se

realizó la lectura de absorción en el intervalo de los 4000 a 400 cm^{-1} .

b. Difractograma (DRX)

La magnetita se analizó por Difracción de Rayos X en un difractómetro D8 de la firma Bruker. Las mediciones se realizaron en el intervalo angular de $20^\circ - 70^\circ$ en 2θ con un paso angular de 0.02° , con un tiempo de conteo de 10s en cada paso y una rendija de divergencia primaria de 0.6° .

c. Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Mediante la técnica (DLS) se obtuvo la distribución de tamaños hidrodinámicos y los valores de potencial zeta de la magnetita. Para ello, 10 mg de Fe_3O_4 se dispersaron 10 mL de agua destilada en un baño ultrasónico. La suspensión se leyó en un equipo NanoZ de Malvern.

d. Microscopía Electrónica de Transmisión (MET)

La caracterización morfológica y la determinación de la distribución de tamaños de las nanopartículas obtenidas se realizó mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión. Se utilizó un equipo JEM-2100, el cual operó en un intervalo de 100 a 200 kV y utilizó un filamento de LaB6 como fuente de electrones. La muestra se dispersó en metanol mediante ultrasonido y se depositó una gota de cada suspensión respectivamente en una rejilla de cobre. Una vez evaporado el solvente en la rejilla se observó en el microscopio.

e. SQUID

Las propiedades magnéticas fueron analizadas en un equipo SQUID. La masa usada para hacer la medida fue de $m=15.01\text{mg}$. Se midieron los lazos de histéresis a 10, 100 y 300K. Con una medición de -70000 a 70000 Oesterd.

D. Actividad Antioxidante

a. Poder Reductor

El Poder Reductor de los conjugados se determinó según el método descrito por [3]. Se basa en la reducción del ferricianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3}$ al anión ferrocianuro $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-4}$. Debido a esta reducción, se formó azul de Prusia en presencia de Fe^{3+} . Se añadió en una microplaca de 96 pocillos 20 μL de muestra en concentraciones de 116, 87,58,29 $\mu\text{g/pozo}$, Magnetita y su forma recubierta con APTES 50 μL buffer de fosfatos y 50 μL de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1%). La mezcla se incubó a 40°C durante 20 min. Posteriormente, se añadieron 50 μL de TCA (10%) y 10 μL de FeCl_3 (0,1%) y se incubaron durante 10 min a 40°C . La absorbancia se leyó a 700 nm utilizando un lector de microplacas.

b. Actividad Atrapadora de radical OH

El porcentaje de actividad atrapadora de radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) de los conjugados fue determinado según el método desarrollado por Lin et al., 2008. En este procedimiento se genera el radical OH mediante la reacción de Fenton. Se colocaron 20 μL de cada muestra a las concentraciones de 116, 87,58,29 $\mu\text{g/pozo}$ de Péptido y Magnetita y su forma recubierta con APTES en una microplaca de 96 pocillos. Posteriormente, se añadieron 50

μL de 1,10-fenantrolina y FeSO_4 (3 mM). Para comenzar la reacción se añadieron 50 μL de H_2O_2 y se incubaron a 37°C durante 60 min. La absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas a 515 nm.

III. RESULTADOS

A. Síntesis de Nanopartículas por coprecipitación

Se obtuvo un polvo fino color negro este tiende a oxidarse fácilmente por lo que se conserva en tubos de microcentrífuga en desecador al vacío para su posterior recubrimiento, caracterización y ensayos.

B. Recubrimiento y Funcionalización con APTES

En cuanto a característica física se observa un polvo con mayor brillo. En la Fig. 1 se muestra un esquema los grupos amino libres alrededor del núcleo de la magnetita.

C. Caracterización morfológica, estructural y magnética

a. FT-IR

En la Fig. 2 muestra una banda cercana a los 580 cm^{-1} referente a la vibración del enlace Fe-O, característico de la magnetita, en 1380 cm^{-1} y 1636 cm^{-1} se observan las bandas correspondientes a las vibraciones de los enlaces O-H, N-H atribuidas a los remanentes de amoniaco NH_4^+ utilizado como reactivos para la síntesis. A los $3700\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$ una banda ancha de poca intensidad correspondiente a los iones OH^- y NH_4^+ ya se por remanentes o por la humedad de las muestras que se encuentran en la superficie de las NPM's.

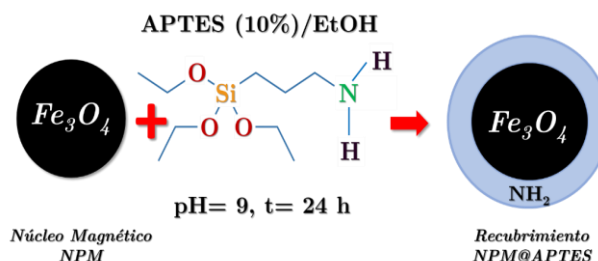


Fig. 1. Recubrimiento con APTES

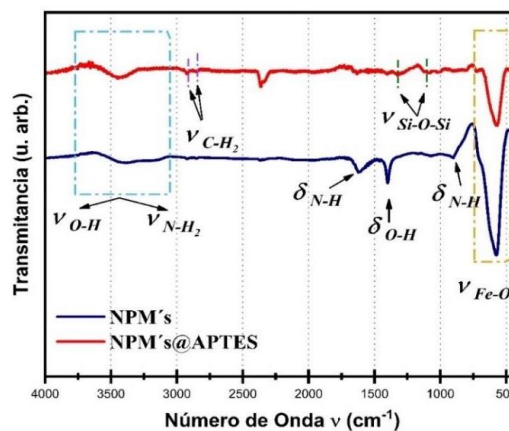


Fig. 2. Espectro FT-IR de la magnetita

b. DRX

En la **Fig. 3** se observa el patrón de difracción de la magnetita este patrón de difracción fue comparado con la base de datos de las cartas cristalográficas PDF (por sus siglas en inglés Powder Diffraction File), que corresponden a la fase cristalina de la magnetita (PDF No. 19-0629) con grupo espacial Fd3m (227) y parámetro de red $a = 8.396 \text{ \AA}$.

c. DLS

Los resultados muestran un diámetro hidrodinámico mayor al ser recubierto como se esperaba ya que el recubrimiento forma una capa alrededor de la nanopartícula para que queden los grupos amino libres, comparado con los resultados de tamaño que el TEM indica este es mucho mayor ya que se forman aglomeraciones debido a la naturaleza de las nanopartículas.

d. TEM

La **Fig. 4** se muestran las microfotografías de las partículas con recubrimiento (APTES). Se puede apreciar que las nanopartículas sintetizadas por el método de coprecipitación se aglomeran y se sugiere que tienen forma esférica con un tamaño de 10-20 nm.

e. SQUID

Se obtuvo una magnetización de saturación de 70.4 emu/g. Para la muestra medida a 15 K el campo coercitivo (H_c) es de 203 Oe. Mientras que para la muestra a 100 K y 300 K es de 24 y 23 Oe respectivamente. La curva de histéresis obtenida concuerda con la curva de un material superparamagnético, a temperatura ambiente el lazo de histéresis es menor que los anteriores.

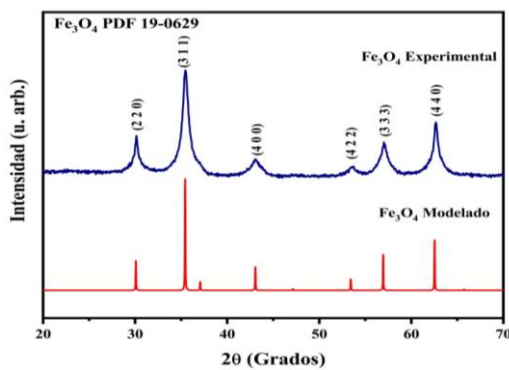


Fig. 3. Difractograma de la magnetita

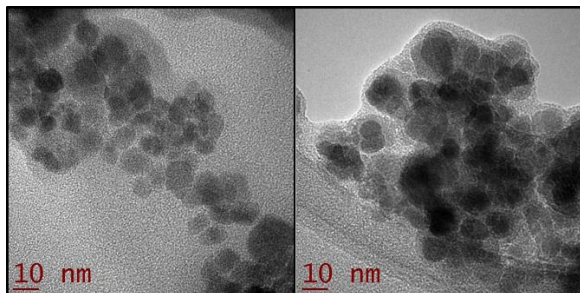


Fig. 4. Micrografías x 50,000 de la magnetita

D. Actividad Antioxidante

a. Poder Reductor

Se realizó un ANOVA de una vía con tres repeticiones, el control que se utilizó fue BHT, en la **Fig. 6** se muestra la gráfica, en el eje de las ordenadas el resultado está expresado en absorbancia en donde el valor de 1 representa el máximo poder reductor con el control positivo BHT. Se observa que no existe diferencia entre la magnetita con y sin recubrimiento de APTES. Las dos muestras tienen un potente efecto reductor, que podría tener un efecto antioxidante en el metabolismo celular, debido a las constantes especies reactivas de oxígeno producidas, es importante mantener la homeostasis celular.

b. Actividad Atrapadora de radical OH

En la **Fig. 7** se muestra el resultado expresado en porcentaje donde el valor de 100 representa el máximo valor de actividad atrapadora de radical OH. La actividad atrapadora del radical OH no es estadísticamente significativa entre la magnetita con y sin recubrimiento.

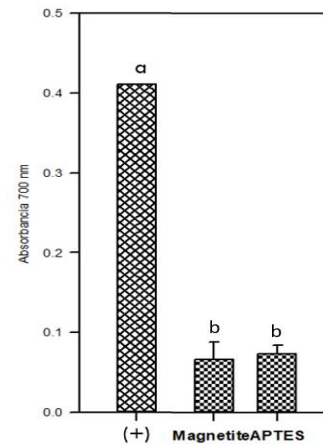


Fig. 6. Poder Reductor

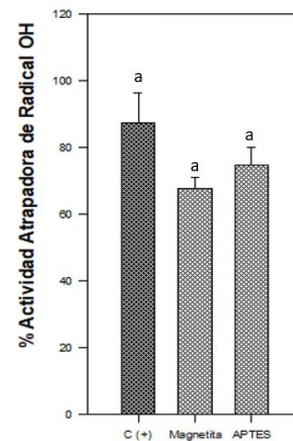


Fig. 7. Actividad Atrapadora de Radical OH

IV. DISCUSIÓN

Las nanopartículas de magnetita tienen un futuro prometedor para el uso en prevención y tratamiento de enfermedades ya que se han comenzado a proponer como sistema de transporte de fármacos, y al estudiar sus propiedades físicas y químicas se ha encontrada baja toxicidad por lo que se pueden reconocer como seguras. Se logró sintetizar mediante el método de coprecipitación magnetita, recubriendo y funcionalizando para su posterior uso como transportador de moléculas, la caracterización por las técnicas de FT-IR, DRX, DLS, TEM y SQUID permitieron asegurar que se tenía el material requerido y de carácter superparamagnético, que es un requerimiento necesario para uso en sistemas biológicos el tamaño menos a 20 nm. Al realizar la evaluación de la actividad antioxidante con los métodos más utilizados por su similitud con el comportamiento biológico poder reductor y actividad atrapadora de radical OH, se ha demostrado que son potentes antioxidantes, esto ayuda disminuir el estrés oxidativo y la inhibición de la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, que generalmente están relacionados con padecimientos como el cáncer. Por lo que a parte de su función de transporte podrían hacer sinergia con las moléculas potencializando su efecto antioxidante. El poder reductor de una muestra se refiere a la habilidad de actuar como aceptor de protones o donador de electrones en una reacción redox, por lo que este material podría ejercer una acción antioxidante.

V. CONCLUSIONES

Se obtuvieron nanopartículas de Fe_3O_4 por el método de coprecipitación, se recubrieron y funcionalizaron con APTES para obtener grupos amino libre en la superficie. Se caracterizaron mediante FT-IR, DRX, DLS, TEM y SQUID obteniendo las características deseadas para las

nanopartículas y su uso en sistemas biológicos. Se determinó la capacidad antioxidante mediante las técnicas de Poder Reductor y Actividad Atrapadora de Radical OH encontrando que las nanopartículas podrían ser potentes antioxidantes y aumentar su capacidad al conjugarlos a péptidos bioactivos haciendo sinergia y potencializar el efecto antioxidante.

Agradecimientos

Agradecimiento ESFM-IPN por el apoyo brindado y por el uso de sus instalaciones para desarrollar parte de este trabajo a CONACyT y Proyecto SIP 20220892, SIP 20221245.

REFERENCIAS

- [1] Augusto Jimenez, Y. E. (2019). *Síntesis de nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas para la conjugación de péptidos bioactivos de soya germinada*. [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional].
- [2] Augusto Jimenez, Y. E., González-Montoya, M., Naranjo-Feliciano, D., Uribe-Ramírez, D., Cristiani-Urbina, E., Díaz-Águila, C., Yee-Madeira, H., & Mora-Escobedo, R. (2021). Antioxidant activity of bioactive peptide fractions from germinated soybeans conjugated to Fe_3O_4 nanoparticles by the ugi multicomponent reaction. *Molecules*, 26(19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195726>
- [3] Oyaizu, M. (1986). *Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine*. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44(6), 307–315. <https://doi.org/10.5264/EIYOGAKUZASHI.44.307>
- [4] Ravelo-Acuña, D., Fuentes-García, J. A., Yee-Madeira, H. T., Diaz-Cano, A. I., Goya, G. F., & Santoyo-Salazar, J. (2019). *Sonochemical magnetite encapsulation in silica at low irradiation power*. Materials Letters, 250, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.073>
- [5] Ravelo Acuña, D. (2020). *Nanopartículas magnéticas, obtención y recubrimiento para posibles aplicaciones en biomedicina*. [Tesis de Doctorado, Instituto Politécnico Nacional].