

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

Programa de Nanociencias y Nanotecnología

**“ Biosíntesis de nanopartículas superparamagnéticas con extractos de
canela y vainilla: propiedades y generación de hipertermia *in vitro* en un
modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas y cerebrales”**

T E S I S

Que presenta

M. en. C. Ana Luisa Ramírez Núñez

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias

en

Nanociencias y Nanotecnología

Directores de Tesis:

Dr. Jaime Santoyo Salazar

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Ciudad de México

Julio, 2018

Contenido

Índice de abreviaturas.....	8
RESUMEN	11
SUMMARY.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Nanotecnología y sus aplicación en medicina.....	18
2.2 Características de los sistemas funcionales magnéticos nanoestructurados.	27
2.2.1 Bases del magnetismo.....	28
2.2.2 Superparamagnetismo.....	33
2.2.3 Radiación electromagnética y su acoplamiento con las MNPs.....	36
2.2.4 Magnetita (Fe ₃ O ₄) y maghemita (γ-Fe ₂ O ₃).....	38
2.3 La hipertermia como tratamiento.....	41
2.3.1 Hipertermia magnética.....	45
2.3.2 La absorción específica de potencia (SPA) de las MNPs.	46
2.3.3 Anisotropía magnética.....	53
2.3.4 Funcionalización de las MNPs.....	54
2.3.5 Influencia de la funcionalización de las MNPs y vías de internalización celular.	57
2.3.6 Efectos biológicos de la hipertermia.	60
2.4 Enfermedades neurodegenerativas, tumorales y su relación con las células microgliales.	65
2.4.1 Modelo <i>in-vitro</i> de estudio: células de la microglía BV-2.....	70
2.4.2 Tasa de crecimiento de las células BV-2.....	70
2.5 Síntesis de las MNPs.	72
2.5.1 Biosíntesis de las nanopartículas metálicas.....	75
2.5.3 Mecanismo de síntesis de MNPs por bioreducción.....	84
2.5.4 Caracterización fitoquímica de <i>Cinnamomun verum</i> y <i>Vanilla planifolia</i>	88
2.5.5 Biosíntesis MNPs con extractos vegetales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer.	95
2.6 HIPÓTESIS.....	100
2.7 OBJETIVO GENERAL.....	100
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	103
3.1 Materiales.....	103
3.2 Preparación de los extractos naturales de canela y vainilla.	103
3.3 Determinación de fenoles totales en los extractos.	104
3.4 Síntesis de las MNPs de Fe ₃ O ₄	104
3.5 Determinación del contenido de hierro en los coloides magnéticos.....	105
3.6 Caracterización de propiedades físicas de MNPs.....	105
3.7 Medición de la absorción específica de potencia (SPA).....	106
3.8 Condiciones de cultivo de células BV-2.	106
3.9 Ensayos de viabilidad o toxicidad celular.	107

3.10 Determinación de las MNPs internalizadas por las células BV2.....	107
3.11 Mediciones con AMF (<i>Alternating Magnetic Field</i>).	108
3.12 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido de haz de iones (FIB-SEM).....	109
4. RESULTADOS.	111
4.1 Análisis de propiedades físicas de las MNPs.	112
4.2 Mediciones de la absorción de potencia.	123
4.3 Experimentos <i>in vitro</i> de toxicidad, internalización y poder de absorción.	124
4.4 Determinación del SPA en <i>pellets</i> de células BV-2.....	129
4.5 Hipertermia magnética (MHT) <i>in vitro</i>	130
4.6 Análisis de los cambios morfológicos ultraestructurales del daño celular después del tratamiento por MHT.....	135
4.7 DISCUSION.....	138
4.8 CONCLUSIONES.....	147
4.9 PERSPECTIVAS.....	148
5. ANEXO	151
5. ANEXO. Principios básicos de las técnicas de caracterización.....	151
A1. UV-Vis (Espectroscopía Ultravioleta)	151
A2. FT-IR (<i>Fourier Infrared Spectroscopy</i>)	152
A3. DLS (<i>Dinamic Light Scattering</i>)	155
A4. VSM (<i>Vibrating Sample Magnetometer</i>)	158
A5. XRD (<i>X-Rays Diffraction</i>).....	159
A6. AFM-MFM (<i>Atomic Force Microscopy in Magnetic Force Mode</i>)	161
A7. TEM (<i>Transmission Electron Microscopy</i>).....	164
A8. SEM-FIB (<i>Scanning Electron Microscopy-Focused Ion Beam o Dual Beam</i>)	168
6. PRODUCTOS GENERADOS Y LISTA DE PARTICIPACIONES.....	171
7. REFERENCIAS.	172

DEDICATORIA

Agradezco a Dios por que renueva mis fuerzas cada día, me sustenta con la diestra de su justicia y me concede vida para concluir este trabajo. Mi todo en todo.

A mi familia quienes me han apoyado en todo momento a lo largo del camino, me han guiado con sus sabios consejos y me impulsan a continuar.

AGRADECIMIENTOS:

A mis tutores por su dirección en la realización de este trabajo, en particular al Dr. Jaime Santoyo-Salazar, quién tomó las riendas acertadamente durante toda la realización de este proyecto y me apoyó para mi formación con cursos, congresos y estancia en el extranjero en los laboratorios de clase mundial del INA-España. Esto no hubiera sido posible sin el apoyo de los proyectos del Programa Estratégico de Desarrollo e Innovación CONACyT 2012-2017, proyecto 198368. Así como al apoyo para la realización de estancias en el extranjero del CINVESTAV-IPN, gracias.

Al Dr. Gerardo Goya Rossetti por todo el apoyo proporcionado durante mi estancia en su laboratorio (INA-España), por las facilidades de uso de sus instalaciones, equipo, guía durante la realización y análisis de los experimentos de hipertermia magnética *in vitro*. Este trabajo también fue apoyado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) proyecto MAT2016-78201-P y el Gobierno Regional de Aragón (DGA, Proyecto No. E26).

Se agradece el apoyo técnico y enseñanzas muy valiosas durante la realización de los análisis al Dr. Jaime Santoyo Salazar, Dr. Guillén (EDS-X, TEM), Ing. Marcela Guerrero (XRD, FTIR) (CINVESTAV-IPN), al Dr. Rafael Cabreira (Université Pierre et Marie Curie) y Dr. Pavel Strichovanec (INA-España) por su apoyo en las mediciones de VSM, a la Dra. Bea Sanz (INA-España), al Dr. Rodrigo Pacheco (HRTEM, INA-España), Dr. T. Torres (SEM-FIB, INA-España) y al LANE-CINVESTAV-IPN por el uso del AFM.

Al comité sinodal y revisores de tesis quienes dedicaron de su valioso tiempo a la revisión de este manuscrito y con sus observaciones cuidadosas aportaron mucho a enriquecer este trabajo, la Dra. Issis Caludette Romero Ibarra, Dra. Josefina Barrera, Dr. Mauricio Ortega, Dr. Juan Pedro Luna Arias y el Dr. Jesús Arenas Alatorre.

Al personal técnico del departamento de física del estado sólido del CINVESTAV-IPN, por su amable disposición en la elaboración de los dispositivos, ayuda técnica, convivios laborales, etc., para la realización de las síntesis. A Íñigo Echaniz por su amable atención y asistencia técnica durante mi estancia en el INA, gracias.

El presente trabajo fue realizado en los laboratorios de departamento de Física del Estado Sólido del CINVESTAV-IPN, México y del Instituto Universitario de Investigación en Nanociencia de Aragón (INA), Universidad de Zaragoza, España.

Se agradece al CONACyT por la beca con número de registro 190521 otorgada durante la realización de mis estudios de doctorado.

" Victory usually goes to those green enough to underestimate the monumental hurdles they are facing

"

Richard Feynman

Índice de abreviaturas

MNPs:	Nanopartículas Magnéticas
NPs:	Nanopartículas
AC ó AMF :	campo magnético alterno
T _v :	Transición de Verwey
M _s :	Saturación magnética
H _c :	Campo coercitivo
M _r :	Magnetización remanente
H:	Campo magnético aplicado
<i>f</i> :	Frecuencia del campo magnético aplicado
H ₀ :	Intensidad del campo magnético aplicado
χ :	Suceptibilidad magnética
kOe:	Kilo Oersted
D _c :	Tamaño crítico de dominio
DWs:	Paredes de dominio (<i>Domain walls</i>)
UV:	Ultravioleta
RF:	Radiofrecuencia
IR:	Infrarrojo
FT-IR:	Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

MRI:	Imagen por resonancia magnética (<i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
RES:	Sistema retículo endotelial
CNS:	Sistema nervioso central
TMA:	Macrófagos asociados a tumores (<i>Tumor associated macrophages</i>)
SPA:	Absorción específica de potencia (<i>Specific Absorption Power</i>)
LRT:	Teoría de la respuesta lineal (<i>Linear Response Theory</i>)
C _S :	Capacidad calorífica
η :	Viscosidad del medio
V _H :	Volumen hidrodinámico
V _M :	Volumen del núcleo magnético
T:	Temperatura absoluta
T _N :	Temperatura de Néel
T _C :	Temperatura de Curie
ϕ :	Concentración en masa de MNPs
τ_B :	Relajación de Brown
τ_N :	Relajación de Néel
KV:	Energía de anisotropía
k _B :	Constante de Boltzmann
τ_0 :	Tiempo de intento de relajación ($\sim 10^{-9} - 10^{-13}$ s)
τ_{eff} :	Tiempo efectivo de relajación
τ_R :	Tiempo de relajación Brown-Néel
TD:	Tiempo de duplicación
κ :	Constante específica de crecimiento celular

d_H :	Diámetro hidrodinámico
$\langle d \rangle$:	Tamaño de partícula
a :	Parámetro de red o celda
d :	Distancia interplanar
C:	Extracto de canela natural
VP:	Extracto natural de vainas de vainilla
SV:	Extracto sintético de vainilla
C-MNPs:	Nanopartículas magnéticas obtenidas con extracto de canela
VP-MNPs	Nanopartículas magnéticas obtenidas con extracto de vainas de vainilla.
SV-MNPs:	Nanopartículas magnéticas obtenidas con extracto de vainilla sintético.
UV-Visible:	Ultravioleta-visible
XRD:	Difracción de rayos-X
VSM:	Magnetometría de muestra vibrante (<i>Vibrating Sample Magnetometry</i>)
SEM-FIB:	Microscopía electrónica de barrido con haz de iones enfocado (<i>Focused-Ion Scanning Electron Microscopy</i>)
TEM:	Microscopio Electrónico de Transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
SAED:	Difracción de electrones por área selecta (<i>Selected Area Electron Diffraction</i>)

RESUMEN

En este trabajo se reporta una metodología de síntesis amigable con el ambiente en medio acuoso (agua desionizada), para obtener nanopartículas magnéticas (MNPs) de Fe_3O_4 usando extractos de las plantas *Vanilla planifolia* y *Cinnamomun verum*. La bondad de esta síntesis, es que evita el uso de disolventes tóxicos comunes en las síntesis químicas. Estos extractos generan una cubierta orgánica en la superficie de MNPs, la cual es capaz de acoplarse a sistemas biológicos sin tratamientos largos y costosos. Esto abre la posibilidad de disminuir o reemplazar diversas bases orgánicas por compuestos de menor toxicidad provenientes de extractos vegetales, por lo cual son de interés por su potencial aplicación en el área biomédica. Estos extractos acuosos tienen la doble función de agentes reductores debido a sus grupos fenol, así como de recubrimiento mediante la formación de enlaces -OH con la superficie de las MNPs. Las MNPs obtenidas tienen un tamaño promedio $\approx 10\text{-}14$ nm, con características superparamagnéticas que contribuye a su direccionamiento con campo magnético externo. La superficie final de éstas MNPs posee una estructura núcleo-cubierta de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ debido a la oxidación conducida por los grupos fenol mediante la unión covalente de OH. Los valores de saturación de la magnetización de $M_S=70.84$ emu/g (*C. verum*) y $M_S=59.45$ emu/g (*V. planifolia*) se encuentran entre los más grandes de los reportados dentro de las metodologías de biosíntesis. Los datos por microscopía electrónica y espectroscopía infrarroja mostraron una cubierta orgánica delgada en las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4 @\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, compuesta de los grupos fenol provenientes de los extractos de *C. verum* y *V. planifolia*. La prueba de concepto de éstas MNPs como agentes de calentamiento en los experimentos de hipertermia magnética (570 kHz, 23.9 kA/m) se realizó *in vitro*, mostrando su eficacia para inducir la muerte celular en células de la microglia BV2 después de 30 minutos a una temperatura blanco de $T = 46$ °C.

SUMMARY

In this work a novel, environment-friendly aqueous synthesis route is reported to produce Fe₃O₄ magnetic nanoparticles (MNPs) from extracts of the plants *Vanilla planifolia* and *Cinnamomun verum*. The main advantage of these syntheses is that it avoids the use of toxic solvents commonly used in nanoparticles chemical synthesis. These extracts produce an organic layer over the MNPs surface, which is able to be bonding to biological entities without long and expensive treatments. The possibility of diminishing or replacing them with compounds of diminished toxicity, such as, those derived from plant extracts, are of interest due to their potential application in the biomedical field. These aqueous plants extracts have the double function as reducing agents due to their phenolic groups, and also capping materials through the -OH bonding over the MNPs surface. The resulting MNPs have average sizes \approx 10-14 nm with superparamagnetic features, which contribute to addressable response with applied magnetic field AC. The final surfaces of MNPs have core-shell Fe₃O₄- γ Fe₂O₃ structure due to oxidation driven by the phenolic groups through OH⁻ covalent bonding. Saturation magnetization values of M_S=70.84 emu/g (*C. verum*) and M_S=59.45 emu/g (*V. planifolia*) are among the largest reported so far from biosynthetic samples. Electron microscopy and infrared spectroscopy data showed a thin organic layer coating the Fe₃O₄@ γ Fe₂O₃ MNPs, composed by the phenolic groups from the starting extracts of both *C. verum* and *V. planifolia*. A proof of concept for these MNPs as heating agents in magnetic hyperthermia experiments (570kHz, 23.9 kA/m) was performed *in vitro*, showing their efficacy to induce cell death on BV2 microglial cells after 30 min at a target temperature T=46°C.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro (MNPs) tienen una amplia gama de aplicaciones en el área biomédica, principalmente para la entrega de medicamentos (1), el contraste de tejidos en la resonancia magnética nuclear (2) y en hipertermia magnética (MHT) (3). Estas MNPs pueden obtenerse por métodos químicos, físicos y biológicos, con el propósito de modificar sus propiedades en la escala nanométrica en función de la estructura, forma y tamaño (4). La magnetita (Fe_3O_4) es utilizada como núcleo magnético con una estructura cúbica en espinela inversa, con los átomos de oxígeno formando un empaquetamiento *fcc*, y los iones de Fe^{2+} ocupando los sitios tetraédricos y los iones de Fe^{3+} los octaédricos (5). Las desviaciones de la razón $\frac{1}{2} \text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ de la fase pura de la magnetita por oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} , usualmente deriva en la formación de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en la superficie de las nanopartículas. La $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ es una espinela deficiente de cationes representada por la fórmula $[\text{Fe}^{3+}]_A[\text{Fe}^{2+}_{1-3X}\text{Fe}^{3+}_{1+2X}\text{®}_X]_B\text{O}_4$ donde ® representa las vacancias de hierro originadas durante el proceso de síntesis y/o por su subsecuente oxidación. Típicamente, la oxidación de la superficie las MNPs resulta en una estructura núcleo-cubierta (*core-shell*) de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Esta diversidad de aplicaciones ha motivado el desarrollo de una extensa variedad de rutas de síntesis como: pulverización catódica (6), sol-gel (7), activación mecano-química (8), coprecipitación (9), ablación láser (10), hidrotermal (11) y ultrasónica (12), etc. Para asegurar su biocompatibilidad para las aplicaciones biomédicas, estos métodos requieren de procesos controlados de separación para remover los químicos peligrosos de su superficie derivados del proceso de síntesis (13). Por lo tanto, el desarrollo de una tecnología amigable con el ambiente ha sido un reto innovador de investigación (14). En años recientes se ha reportado la síntesis amigable con el ambiente de nanopartículas metálicas (15,16) basadas en el uso de materiales verdes como la biomasa, extractos de plantas o biomoléculas reductoras en un proceso conocido como biorreducción o biosíntesis (17).

En particular se ha propuesto la síntesis de MNPs, que emplea como estrategia el uso

de plantas (14,18,19), su biomasa o su extracto (14), en comparación con las síntesis biológicas (por ejemplo: las que emplean hongos, microorganismos, células de mamífero o enzimas). Los extractos acuosos vegetales representan una ventaja porque no requieren procesos elaborados para mantener cultivos celulares y son posibles de escalar a un proceso industrial (17).

Se ha reportado la síntesis exitosa de nanopartículas de hierro utilizando extractos de hojas de té (20,21), biomasa de alfalfa (22) y extractos de sorgo (23) entre otros. Los extractos vegetales proveen los agentes reductores a partir de fuentes naturales reemplazando reactivos sintéticos tóxicos (15,27). Adicionalmente, muchos de estos extractos contienen biomoléculas con grupos funcionales tipo alcohol, que modifican la morfología final de las MNPs (20,28). Los compuestos fitoquímicos activos de los extractos (por ejemplo, polifenoles, taninos, flavonoides, carbohidratos, etc.) actúan como agentes reductores y de recubrimiento durante el crecimiento de las MNPs (18,22). Dependiendo de la concentración en cada especie vegetal pueden reaccionar con los iones metálicos en tiempos de minutos a horas, en comparación con moléculas similares de microorganismos (14,29,30).

Los reportes de algunas de estas biomoléculas en los extractos provenientes de biomasa de *C. camphora* indican que tienen una función de protección y adicionalmente, modifican la forma final de nanopartículas de Au y Ag (24). Estas biomoléculas en medio acuoso funcionan como agentes de recubrimiento evitando el colapso de las nanoestructuras en formación, mientras que los compuestos heterocíclicos son los responsables principales de la biorreducción de los iones metálicos en solución (23). En general, este proceso resulta en la formación de superficies con cubiertas con propiedades bioactivas, que es la ventaja principal de las rutas biosintéticas de MNPs, que hace de ésta una estrategia muy útil para las aplicaciones biomédicas (25). Su baja toxicidad ha beneficiado el uso de estas MNPs como agentes de contraste en MRI constituyendo una mejora a los métodos convencionales basados en el contraste con agentes de yodo (25,26).

Los polifenoles han recibido especial atención en terapias de neuroprotección basándose en sus propiedades antioxidativas y antiinflamatorias de los flavonoides, catequinas (27–29), etc. A nivel molecular, los efectos terapéuticos potenciales de estas moléculas en procesos relacionados al envejecimiento está ligado a su capacidad de detener

la formación de péptidos β -amiloides relacionados con la degeneración en procesos como el Alzheimer, Parkinson y la esclerosis amiotrófica lateral (27). La evidencia *in vivo* indica que los flavonoides tienen efectos de protección en enfermedades como Parkinson y Huntington (27,29). Existe un consenso en que estas moléculas pueden rezagar o impedir la proliferación de los péptidos β -amiloides o su transformación hacia agregados neurotóxicos. En reportes recientes, se utilizan MNPs como acarreadores de polifenoles *in vitro*, ya que han demostrado propiedades antineoplásicas eficaces como conjugados de curcumina para el tratamiento de cáncer de mama, gliomas, y en modelos de xenotransplante de páncreas (30). A partir de estas consideraciones las MNPs sintetizadas por vías más naturales con cubiertas de polifenoles se espera que contribuyan a nuevas estrategias terapéuticas (27). La síntesis verde de MNPs es una alternativa escasamente explorada para los tratamientos por hipertermia, debido a su producción de alto costo que emplea vías de síntesis de microorganismos, las cuales inducen reacciones inmunológicas en los humanos por su origen (31). La síntesis basada en vegetales, especialmente aquéllas de extractos, ofrecen una alternativa, dado que estos contienen aceites esenciales o compuestos orgánicos que pueden permear fácilmente la membrana celular (32), convirtiéndose en una alternativa accesible, de bajo costo proveniente de fuentes renovables para la síntesis de MNPs. Reportes previos han demostrado que es posible controlar el tamaño final y la morfología de las MNPs mediante extractos acuosos (pH, temperatura, y atmósfera inerte, etc.) y la concentración de sus polifenoles durante el crecimiento de las nanopartículas (14,17,33).

En este trabajo se reporta la viabilidad de los polifenoles y sus ácidos orgánicos para obtener MNPs, usando dos sistemas de extractos acuosos de: (1) *Cinnamomun verum* y (2) *Vanilla planifolia* (natural y sintética). Se muestran las ventajas de emplear una ruta de síntesis sencilla y amigable con el ambiente para la obtención de MNPs. Además, se presenta la caracterización de sus propiedades físicas y se provee una prueba de concepto para su aplicación potencial en la MHT *in vitro*, en un modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas y tumores cerebrales.

CAPÍTULO 2.

ANTECEDENTES

2. ANTECEDENTES

2.1 Nanotecnología y su aplicación en medicina.

La nanotecnología (*lat. nanus = enano*) es la ciencia que se ocupa del procesamiento, manipulación y análisis de propiedades de materiales en la escala nanométrica (1×10^9 m) (Figura 1). Es considerada una ciencia de frontera donde convergen diversas disciplinas como la física, química, ingeniería, biología, medicina etc., para el desarrollo y aplicación de nanomateriales (1-100 nm) que mejoren el entorno y calidad de vida en diversas áreas del ser humano que abarcan desde adsorbentes en procesos de separación, para la inmovilización de enzimas, aplicaciones en la biomedicina hasta el tratamiento de aguas residuales, entre otros, ejemplos de esto se expondrán brevemente en párrafos posteriores (34).

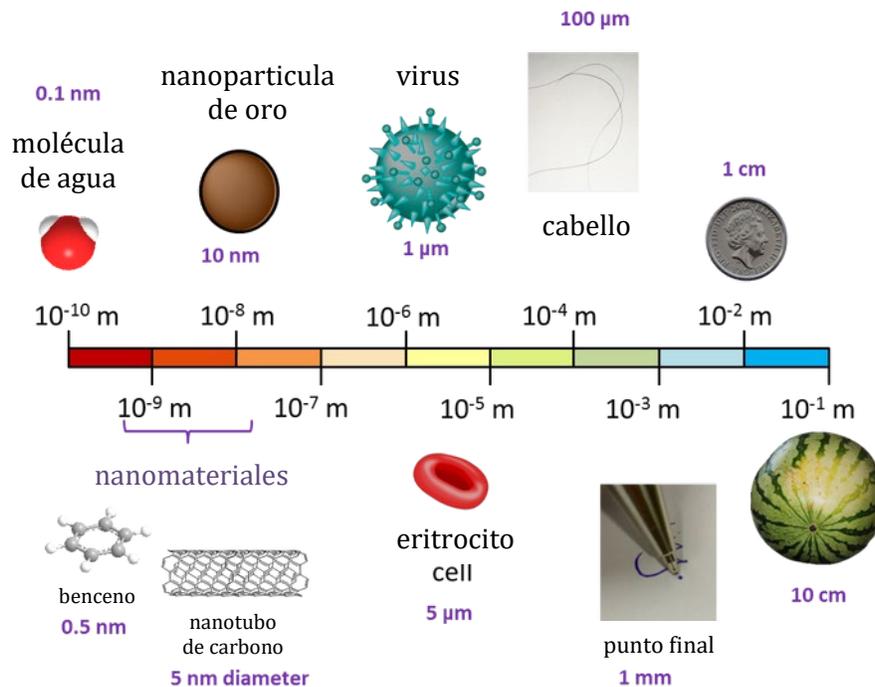


Figura 1. Comparación a escala de “objetos pequeños” y nanomateriales (34).

El uso de la nanotecnología no es algo nuevo. En la antigüedad se aplicaba en forma empírica. Los artesanos en la Edad Media mezclaban pequeñas cantidades de oro o plata con vidrio para obtener la variedad de colores que ahora observamos en los vitrales de las iglesias (34). El azul maya en los diversos murales que han resistido el paso de los años es otro

ejemplo. Ahora sabemos que tal pintura era elaborada por la mezcla de índigo y arcilla de tamaño nanoscópico creando una estructura con gran estabilidad (34).

Las ideas y conceptos del control y manipulación de la materia en la nanoescala fueron expuestos en 1959 por Richard Feynman en su conferencia “*There’s a plenty of room at the bottom*”. En su charla describió la posibilidad de manipular la materia en la nanoescala para la miniaturización de computadoras y almacenamiento de grandes cantidades de información en un cubo del tamaño de una partícula de polvo, así como la posibilidad de construir nanomáquinas con átomos y moléculas para realizar las funciones de un nanocirujano dentro del cuerpo humano, reparando y reportando sus daños (34).

En la actualidad el rápido desarrollo de la nanotecnología ha logrado superar algunos de esos retos, debido principalmente al creciente interés en la miniaturización de dispositivos electrónicos, donde los nanomateriales han encontrado una diversa gama de aplicaciones como el extenso empleo de los materiales nanoestructurados en la industria de los semiconductores y optoelectrónica. En la competencia tecnológica ha hecho posible la manipulación de átomos y moléculas en la nanoescala (35). Aunado al rápido avance en la tecnología durante la década de 1980, ha impulsado el desarrollo multidisciplinario de diferentes áreas como química, biología, física, energía, medicina, ciencia aeroespacial e inclusive en productos de consumo habitual (36). Ejemplos de las aplicaciones potenciales de los nanomateriales nanoestructurados al mejoramiento en la calidad de vida del ser humano son: celdas solares que incrementan su eficiencia y potencia (37), dado que reducen la cantidad de mercurio liberada por las lámparas fluorescentes (38). En la agricultura y producción de alimentos permiten detectar con mayor facilidad su contaminación (39). Los compositos de nanomateriales añaden fuerza y reducen el peso de raquetas de tenis, de beisbol y bicicletas. En lentes las nanocubiertas mejoran la dureza de las superficies protegiéndolas de ralladuras. Las nanocerámicas aplicadas a implantes dentales y hueso equiparan las propiedades mecánicas y químicas de los tejidos que los rodean (40,41). En procesos de separación fina, aumentan el rendimiento de las moléculas purificadas (41). En combinación con plásticos biodegradables mejoran la preservación de los alimentos evitando su contaminación por agentes biológicos (42). Los sensores son más efectivos para la

detección de gases a bajas concentraciones (43), y debido a su alta reactividad por su elevada superficie, remueven con mayor eficiencia los contaminantes por metales pesados de aguas residuales (44). En combinación con medicamentos, promueven una administración de forma controlada disminuyendo los efectos adversos en tejidos sanos (45,46).

En el área médica, la nanotecnología ha demostrado su impacto clínico en las novedosas herramientas de diagnóstico y agentes terapéuticos, para tratamientos más efectivos en enfermedades complejas como el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), desórdenes neurodegenerativos (Alzheimer, Parkinson) y cáncer (45,47–49). La aplicación de los nanomateriales al área médica ha dado lugar al surgimiento de la nanomedicina, la cual abarca nanotecnologías en el desarrollo de nanoacarreadores, dispositivos terapéuticos, agentes de contraste, biosensores nanoelectrónicos, nanodispositivos y microdispositivos con nanoestructuras. A diferencia de los materiales de aplicación industrial, estos deben cumplir normas muy estrictas de bioseguridad (47,48).

La nanotecnología en la medicina se aplica principalmente en el diagnóstico como agentes de contraste de tejidos, y como nanoacarreadores para la entrega de sustancias terapéuticas (48). Estos sistemas denominados nanovectores, están compuestos de lípidos (liposomas), materiales nanofabricados (fullerenos, nanotubos de carbón, sílice), metales (oro, plata, hierro, platino) y polímeros (micelas, dendrímeros) (Figura 2) (50–55). Debido a su escala inherente es posible manipular una variedad de parámetros como la modificación de su superficie, tamaño, forma, composición, etc. En los desarrollos a futuro se tiene la visión de hacer posible el diseño de medicamentos y terapias personalizadas, las cuales optimizarán los protocolos de tratamiento de cada paciente con el fin de disminuir los efectos secundarios, como la destrucción de órganos y tejidos sanos.

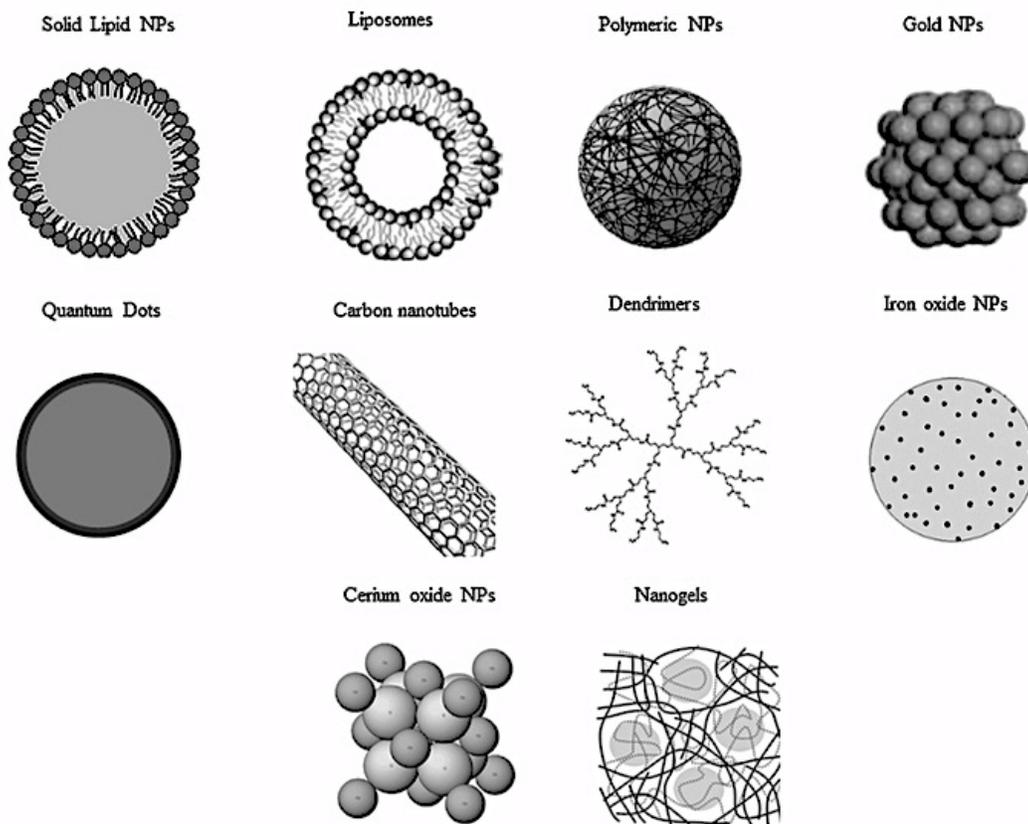


Figura 2. Diferentes tipos de nanomateriales de uso biomédico. Los nanomateriales se definen comúnmente como objetos con dimensiones de 1-100 nm, los cuales incluyen nanogeles, nanofibras, nanotubos y nanopartículas. En esta figura se representa la morfología de los de uso común en terapia y diagnóstico (49).

En el diagnóstico, los dispositivos terapéuticos que combinan la nanotecnología se han desarrollado utilizando la fotolitografía enfocada a la química de los ácidos nucleicos. Esta tecnología ha permitido integrar circuitos para producir sistemas microelectromecánicos (MEMS) para el sensado molecular selectivo y para la liberación controlada de medicamentos (56–58). En las estrategias de entrega de medicamentos, su aplicación es mucho más específica, ya que estos pueden ser direccionados a su sitio de acción (blanco), con el fin de aumentar su eficacia al concentrar localmente el fármaco disminuyendo la toxicidad en los tejidos sanos (59).

La investigación sobre el diseño de estos sistemas adaptados al ambiente biológico ha avanzado rápidamente. Los de primera generación consisten en introducir un fármaco poco soluble o muy tóxico en liposomas con cubiertas hidrofílicas que aumenten su tiempo de circulación en sangre. La segunda generación de nanovectores integra funciones adicionales como la unión de una biomolécula que reconozca su sitio de acción (anticuerpo, aptámero, péptido, ligando), el cual está sobreexpresado en la célula tumoral. La tercera generación corresponde a los sistemas multifuncionales, los cuales integran diversas funciones simultáneamente en un solo sistema y/o actúan de forma sinérgica. Estos evitan ser degradados por el RES (*Sistema Retículo Endotelial*), tienen un blanco de acción, y liberan el medicamento localmente al ser activados externamente (por ejemplo, al interactuar con campos magnéticos, luz láser, radiación etc.). Algunos como las nanopartículas de hierro y oro pueden además mejorar el contraste del sitio blanco para las imágenes por resonancia magnética y tomografía computarizada (60,61).

El desarrollo de nanopartículas funcionalizadas ha resultado una opción direccionable para futuras aplicaciones en el tratamiento de cáncer. Las investigaciones realizadas han mostrado resultados alentadores, ya que la entrega del agente terapéutico es más efectiva que la quimioterapia convencional. Los tratamientos convencionales están limitados por su toxicidad en los tejidos sanos, bajo tiempo de circulación en sangre, limitada solubilidad y vía de administración que carece de direccionamiento hacia el área del tumor, afectando de forma negativa al organismo en su totalidad. En consecuencia, se desarrollan efectos secundarios, como la supresión en la producción de células por parte de la médula ósea, mal funcionamiento del hígado, riñones, etc. Los sistemas de entrega de medicamentos diseñados con nanopartículas están siendo desarrollados para liberar pequeñas dosis del agente quimioterapéutico de forma selectiva y controlada, para disminuir estos efectos tóxicos (62).

La FDA (*Food Drug Administration, USA*) ha aprobado el uso de algunas plataformas de entrega de fármacos que emplean nanotecnología, ya que ofrecen una solución a la elevada toxicidad de diversos fármacos (como en el brentuximab vedotina, trastuzumab emtansine,

doxorubicina, paclitaxel), su baja solubilidad (por ejemplo, Abraxane) y a los efectos secundarios asociados a las dosis elevadas del fármaco libre (como Doxil, DaunoXome, Marquibo) (Tabla 1) (63).

Tabla 1. Nano-medicamentos en fase clínica o aprobados por la FDA.

Nombre comercial de la formulación/ tipo de nanopartícula	Tecnología	Uso clínico	Fase de desarrollo	Ref.
Doxil TM	Doxorrubicina encapsulada en liposomas pegilados	Sarcoma de Kaposi Metástasis de cáncer de seno y ovarios	Aprobado para uso clínico en 1995	(64)
Abraxane TM	Nanopartículas de albumina y paclitaxel	Varios tipos de cáncer	Aprobado en 2005	(65)
Nanopartículas de MnO	Nanopartículas de MnO	Imagen de tumores en cerebro: gliomas	Etapa preclínica	(66)
Ferumoxitol y Ferumoxtran-10	SPIOS (<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>)	Para contraste de tejidos de tumores en cerebro	Clínica	(67)
Nanopartículas de oro	Nanopartículas de oro	Enfermedades priónicas y contraste de tumores en cerebro	Preclínica	(68)
Nanopartículas de cerio	Nanopartículas de cerio	Tratamiento de esclerosis múltiple	Preclínica	(69)
Nanopartículas de platino	Nanopartículas de platino	Parkinson	Preclínica	(70)
Megace ES	Nanocristales con megestrol acetato	Cáncer de seno	Aprobado en 2005	(70)
Combidex	Nanopartículas de óxido de hierro	Imágenes de tumores	Fase clínica II	(70)
SGT-53	Liposomas con anticuerpo Tf y gen p53	Tumores sólidos	Fase clínica I	(70)
DaunoXome	Daunorrubicina en liposomas sin PEG	Liberación lenta de medicamento en sangre	Aprobada	(70)

Marquibo	Vincristina en liposomas sin PEG	De liberación prolongada en sangre	Aprobada	(71)
Opaxio™	Nanopartículas poliméricas activadas por enzimas	Tumores sólidos	Fase III	(61,71)
ThermoDox®	Liposomas termo-sensitivos	Tumores sólidos	Fase II/III	(72)
Ceram X Duo	Nanopartículas de cerámica	Sustituto de hueso	Aprobado en 2009	(73)
ON-Q Silver Soaker/SilvaGard™	Nanopartículas de plata anti-microbianas	Compositos dentales	Aprobado en 2005	(74)
Fresenius Polisulfona® Helixone®	Membranas nanoporosas	Filtros de diálisis	Aprobado en 1998	(75)
TiMESH	Cubiertas de titanio de 30 nm	Andamios moleculares de tejidos	Aprobado en 2004	(61)
NanoXray	Nanopartículas propietarias Inducción de emisión de electrones por rayos-X	Tratamiento de tumores sólidos	Fase I	(76)
NanoDX	Nanopartículas de óxido de hierro	Separación magnética de células in vitro	Para investigación	(77)
Actinium-225-HuM195	Nanopartículas con el anticuerpo HuM195	Leucemia	Fase I	(61)
Stratus CS	Dendrímeros	Dispositivo de recubrimiento	Aprobado 2003	(61)

El uso de estos sistemas para encapsular agentes quimioterapéuticos como por ejemplo la doxorubicina en liposomas legislados, ofrecen una mejor absorción por el organismo disminuyendo su toxicidad. La combinación de nanopartículas de albúmina-paclitaxel permite la administración de grandes dosis de paclitaxel a la vez que aprovecha las propiedades naturales de la albúmina de incrementar su extravasación en los tejidos. Otros productos limitan su efecto al activarse al alcanzar su blanco. El Opaxio™ es una nanopartícula polimérica que libera una forma de paclitaxel, el cual ejerce su efecto

terapéutico al ser activado por una enzima producida únicamente en el tumor. ThermoDox® emplea lípidos termosensibles que cambian de conformación, para secretar la doxorubicina cuando se aplica una fuente externa de calor (Tabla 1) (61,71).

El éxito de estas nanoplataformas ha impulsado el desarrollo de investigaciones en otras áreas. En la mejora de vacunas, los nanomateriales son utilizados como adyuvantes más eficientes y seguros que inducen una respuesta inmune óptima. Dado que el acarreador protege al antígeno hasta su liberación, además de ampliar su vía de administración (78). En la entrega de genes mejoran la eficiencia de transfección del DNA evitando el uso de vectores virales (79). Los nanotubos de carbón, se están probando como andamios moleculares para facilitar y direccionar el crecimiento de los axones de neuronas dañadas (80). En otros casos se propone emplear fullerenos que actúen como esponjas moleculares, que adsorban los radicales superóxido liberados durante una lesión cerebral (81). En la ingeniería de tejidos el diseño de andamios moleculares 2D y 3D que liberen factores de crecimiento que emulen la matriz extracelular y controlen el comportamiento de las células para llevar eventualmente a la regeneración, trasplante de tejidos y desarrollo de órganos (59).

Alrededor de los años sesenta, se propuso que las nanopartículas de óxido de hierro en combinación con el campo magnético ofrecían una interacción controlada para direccionar las terapias con fármacos. Esta visión no ha cambiado mucho y las nanopartículas magnéticas (MNPs), se están utilizando como nanoplataformas para la entrega sitio-específica de fármacos anticancerígenos denominados “*magnetic drug targeting*”, los cuales deben ser magnetizables sólo en presencia de un campo magnético externo, para ser dirigidas a un órgano blanco donde liberen el fármaco (45,81).

Las MNPs, son las candidatas ideales para las aplicaciones biomédicas, debido a su elevada acumulación en los tejidos blanco, baja toxicidad y naturaleza biofísica. Por su tamaño nanométrico, tienen una mayor superficie reactiva, bajo coeficiente de sedimentación, y mejor difusión tisular. Para su aplicación *in vivo* son recubiertos con polímeros biocompatibles durante o posterior a su síntesis para evitar su aglomeración y permitir la unión covalente de los diversos fármacos en la superficie de las nanopartículas.

Además de acarreadores de fármacos, también son utilizadas como sistemas de comunicación intracelular que amplifican el “*targeting*” (localización) a un tumor para activar las cascadas de coagulación sanguínea (82), se emplean como agentes de contraste para las imágenes por MRI (resonancia magnética nuclear) y para la tomografía computarizada (46). En otros casos para la inducción de la hipotermia magnética (temperaturas debajo del helio líquido) o como nanocalentadores en la hipertermia magnética (81–83).

El futuro como de ciencia ficción de la nanomedicina se ve optimista dada la extensa variedad, innovación de nanomateriales y tecnologías que se vislumbran en el futuro cercano. Las nuevas herramientas de la nanotecnología han permitido explorar el diseño teórico de nanorobots que mejorarán los tratamientos y optimizarán los sistemas biológicos. En este sentido están en desarrollo teórico sistemas biológicos artificiales (respirocitos, cromalocitos, microviboros, etc.), que responderán rápidamente a las necesidades del organismo (84). Así, por ejemplo, los respirocitos podrán transportar cientos de veces más moléculas de oxígeno, para permitirle a una persona contener la respiración en el agua por 4 horas, o hacer un esprint a velocidad olímpica por 12 minutos sin necesidad de tomar aire. En el área médica se podrán utilizar en víctimas de incendios que hayan sido envenenadas por monóxido de carbono. El microvíbora funcionará como un leucocito artificial, diseñado para absorber y asimilar agentes patógenos del torrente sanguíneo en minutos a horas en comparación con los leucocitos naturales que incluso ayudados por antibióticos, pueden tardar semanas o meses en limpiar las bacterias el torrente sanguíneo (84).

La mayoría de las enfermedades son consecuencia de cromosomas o expresión génica defectuosa. En muchos casos resultaría más eficaz extraer los cromosomas existentes de la célula enferma y reemplazarlos por otros nuevos para eliminar de forma permanente cualquier enfermedad. Este procedimiento se denomina “terapia de sustitución de cromosomas”. Los nanorobots llamados cromalocitos, portarán copias de los cromosomas modificados, se inyectarán en el cuerpo e irán hasta el tejido correspondiente para realizar el intercambio del material genético (Tabla 2) (58,85).

Tabla 2. Nanorobots teóricos que revolucionaran los tratamientos médicos (84).

Nanorobot	Tamaño	Función	Aplicaciones
Respirocito	18,000 millones de átomos (1 μm)	Bomba molecular que carga y descarga gases	En casos de envenenamiento por CO_2 . Sustitutos de tanques de buceo. Como reemplazo de sangre.
Microbívoro	3 μm x 2 μm	Fagocitar rápidamente (1000 veces más rápido que los leucocitos naturales), microbios de la sangre.	Para el control de septicemias
Cromalocitos	4.18 μm x 3,28 μm x 5 μm	Reemplazo de cromosomas dañados	Terapia de reemplazo de material genético

Así rápidamente la nanotecnología se está convirtiendo en la fuerza motriz detrás de los desarrollos científicos, que revolucionará los tratamientos médicos actuales.

2.2 Características de los sistemas funcionales magnéticos nanoestructurados.

Al reducir el tamaño de los materiales hacia la escala atómica (ejemplo: nanométrica), emergen los efectos mecánico-cuánticos que originan diversas propiedades fisicoquímicas novedosas. Esto hace posible obtener materiales ultra fuertes o ultraligeros, superconductores, superparamagnéticos, etc. Son estas propiedades únicas que permiten a la nanotecnología y nanomedicina proveer novedosas soluciones de tratamiento y diagnóstico (46).

Las propiedades en la nanoescala para el caso de los materiales magnéticos han provisto una poderosa herramienta en el área médica. Debido a los beneficios que aportan (Tabla 1), actualmente se busca un diseño multifuncional acorde a su aplicación. Para

direccionar este diseño y funcionalidad, diversas investigaciones se han enfocado en modificar las características individuales de las nanopartículas magnéticas (MNPs) como su geometría, tamaño, química de superficie, el tipo y densidad del ligando, entre otros (56). Además de estas características se deben considerar los principios físicos que rigen su comportamiento al interactuar con el campo magnético. Estos sistemas deben poseer un tamaño adecuado para responder óptimamente a la aplicación de un gradiente de campo magnético controlado. Este puede ser aplicado alrededor del sitio blanco para reposicionar remotamente las nanopartículas magnéticas en el órgano o tejido blanco. En el caso de utilizarlas como agentes de contraste para las imágenes obtenidas por MRI. Es conveniente maximizar el momento magnético de las MNPs, para perturbar la resonancia nuclear de los protones (^1H) del agua y generar contraste por magnetismo. Si se quiere emplearlos como nanocalentadores, la pérdida magnética de las MNPs para el calentamiento (hipertermia magnética), es el parámetro a optimizar (86).

Por todo lo anteriormente expuesto, a continuación, se describirán brevemente los principios físicos básicos subyacentes para la aplicación biomédica de las nanopartículas magnéticas.

2.2.1 Bases del magnetismo.

El magnetismo surge de las interacciones entre los orbitales y el spin de los electrones de los átomos, produciendo un momento magnético (dipolo) (87)(88). Las propiedades cuánticas de los electrones que determinan su comportamiento magnético son: a) el momento angular del spin S (análogo a la rotación de una esfera que gira sobre su propio eje), y b) el momento angular del orbital L (debido a la carga eléctrica de los electrones que se mueven en las órbitas). Estos electrones determinan la fuerza de la interacción entre los átomos del sólido, creando los distintos comportamientos macroscópicos (89).

La manera de identificar los distintos tipos de materiales magnéticos es por su respuesta al aplicar un campo magnético externo (H) en función de la temperatura, ya que al aplicar un campo magnético se mide la densidad de dipolos magnéticos generados (la

magnetización). La relación entre la magnitud del campo magnético aplicado y los dipolos generados se conoce como susceptibilidad magnética ($\chi=M/H$), donde: M es la magnetización y H el campo aplicado. Esta característica indica el grado de magnetización de un material en respuesta al campo magnético aplicado.

Debido a que al aplicar H en un material ocurre una perturbación electrónica en la configuración de sus átomos (87) y dependiendo de los átomos involucrados (la composición química del material), la respuesta al H será distinta. Esta respuesta se emplea para clasificar los materiales en diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, ferrimagnéticos y anti-ferromagnéticos.

Un material diamagnético o no magnético que tiene sus electrones apareados, los dipolos magnéticos no están presentes. En ausencia de campo magnético, estos electrones apareados tanto su spin como momento angular se cancelan uno con otro, resultando en un momento neto cero. Sin embargo, al aplicar un campo magnético se induce un momento magnético pequeño en dirección opuesta al campo aplicado (Figura 3).

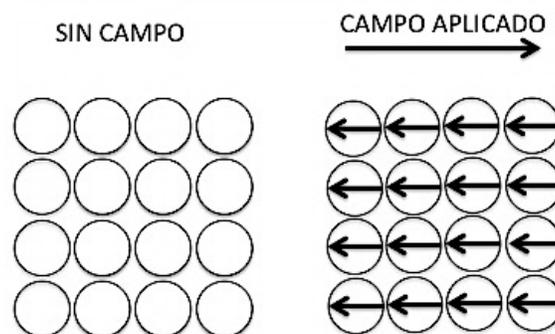


Figura 3. Material diamagnético (87).

En el diamagnetismo los átomos del sólido tienen momentos magnéticos negligible o muy débiles, y presentan una respuesta lineal al campo aplicado H (Figura 3 y 5A), donde se observa como una pendiente negativa, que corresponde a la susceptibilidad magnética ($\chi \sim -10^{-5}$ a 10^{-6}). Ejemplo de un material débilmente diamagnético son los tejidos, los cuales no atenúan o dispersan los campos magnéticos de bajas frecuencias, permitiendo utilizar

estrategias que emplean energía magnética para generar imágenes o utilizar terapias con materiales magnéticos (88).

En un sólido paramagnético en ausencia de un campo magnético, los momentos atómicos se encuentran en direcciones azarosas y se cancelan unos con otros, tal que la magnetización es cero (87). Pero dado que sus electrones están desapareados, presenta dipolos magnéticos los cuales se alinean en dirección paralela al campo magnético aplicado (Figura 4). Debido a que las interacciones magnéticas son débiles, la agitación térmica a temperatura ambiente hace que los momentos magnéticos giren azarosa y continuamente, tal que la medición del momento magnético ($\chi \sim 10^{-3}$ ó 10^{-6}) es muy pequeña positiva o cero (Figura 6B) (89). Ejemplos de sólidos paramagnéticos son: el aluminio, platino, manganeso.

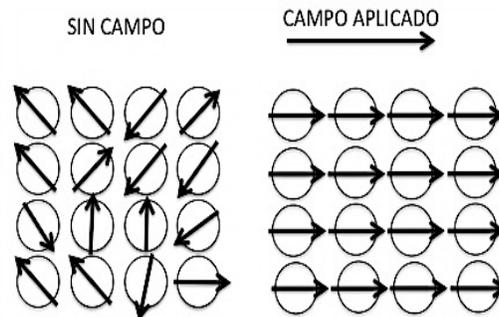


Figura 4. Material paramagnético (87).

Para las interacciones magnéticas fuertes (Figura 5), los átomos dentro del sólido pueden alinear los momentos magnéticos en una configuración paralela al campo (ferromagnetismo) o antiparalela (anti-ferromagnetismo) (Figura 5).

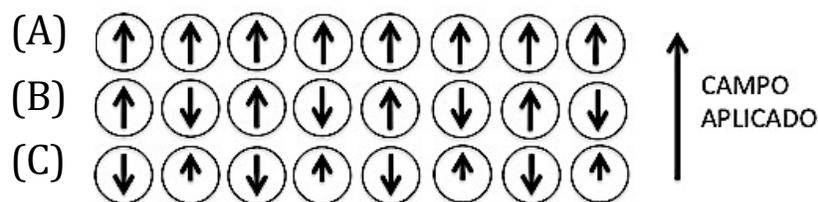


Figura 5. Materiales con interacciones magnéticas fuertes. (A) Ferromagnético, (B) anti-ferromagnético y (C) ferrimagnético (90).

En los materiales ferromagnéticos (Figura 5A), la alineación de los momentos de igual magnitud, les confiere una magnetización espontánea en ausencia de un campo

magnético, la cual depende de su temperatura de Curie (T_C). La T_C es el punto donde la energía térmica es suficiente para inhibir las interacciones de intercambio de los spines y un material ferromagnético se vuelve paramagnético. Estos poseen una magnetización neta de largo alcance ($X > 1,50-10,000$) (87,88). Por lo cual, también se denominan magnetos fuertes o materiales espontáneamente magnetizables (84,90). La magnetización de un ferromagneto no es muy homogénea, debido al desplazamiento de las paredes de dominio, lo cual se aprecia en la apertura de los lazos de histéresis (Figura 6C). Ejemplos de materiales ferromagnéticos son el Fe, Ni, Co, Gd.

Los materiales que tienen momentos atómicos magnéticos de igual magnitud que se disponen en una conformación antiparalela al campo aplicado se denominan anti-ferromagnetos (Figura 5B) (90). En esta configuración antiparalela se reduce el momento total a cero y el comportamiento es similar a un paramagneto (Figura 6B) (89). Ejemplos de materiales paramagnéticos son la troilita y el FeS.

El ferrimagnetismo es una propiedad que exhiben los materiales cuyos momentos magnéticos están alineados opuestamente y tienen diferentes magnitudes (Figura 5C), debido a que se componen de distintos iones (por ejemplo: Fe_3O_4 , $\gamma-Fe_2O_3$ y el Fe_3S_4). (89–91). Los momentos magnéticos antiparalelos con sus vecinos se mantienen debajo de la temperatura crítica de Néel (T_N). Por encima de la T_N , la energía térmica es suficiente para perturbar esta interacción y el material se comporta como un paramagneto (91).

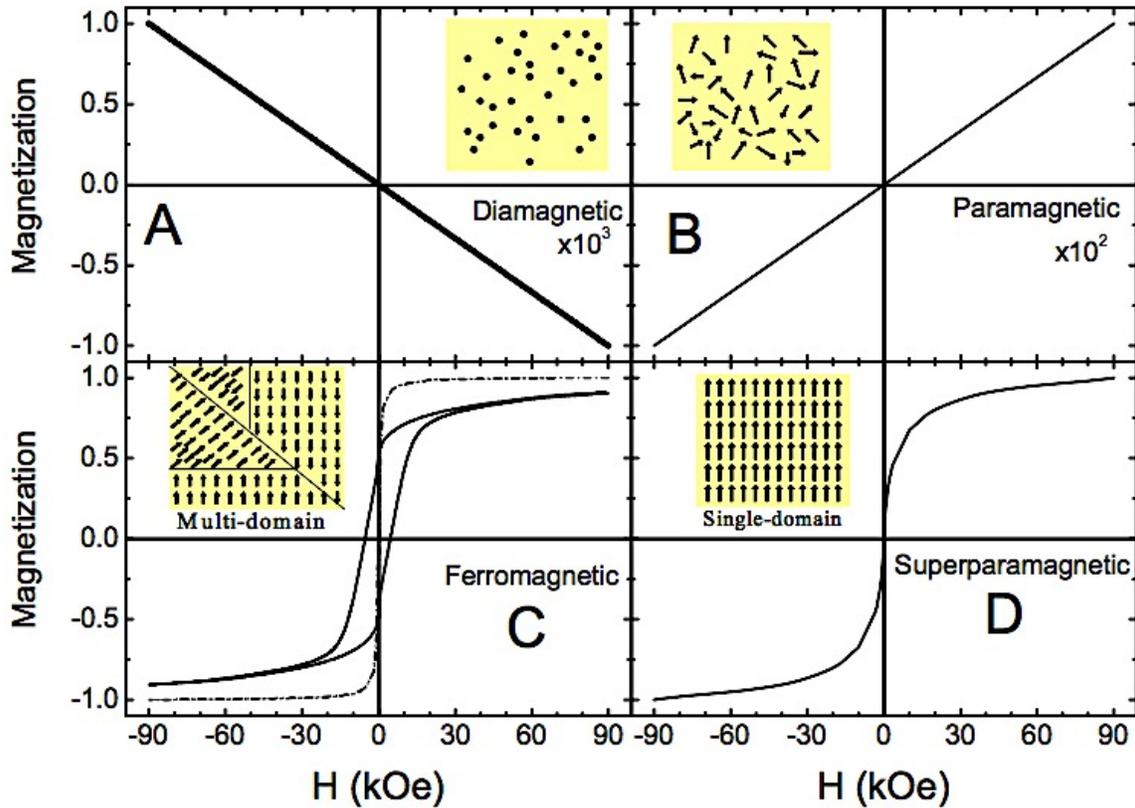


Figura 6. Comportamiento de los materiales magnéticos en función del campo aplicado (kOe). Se observa su magnetización (emu/g). La respuesta de los átomos del sólido al campo aplicado se esquematiza en el inserto por puntos o flechas. A) Material diamagnético su momento magnético es negligible. B) Sólido paramagnético donde sus átomos no están ordenados debido a la energía térmica C) Material ferromagnético el desplazamiento de las paredes de dominio da como resultado la apertura del lazo de histéresis. D) Materiales superparamagnéticos, de partículas monodominio (sin paredes de dominio). Como resultado todos los momentos magnéticos actúan como uno solo y cada partícula se direcciona en el mismo sentido (89).

Los materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos pueden retener la magnetización (“memoria magnética”) al remover el campo magnético. Este comportamiento se denomina histéresis (Figura 7). El ciclo de histéresis se obtiene graficando la magnetización vs el campo magnético alterno (AC). En el ciclo de histéresis se distinguen el momento magnético máximo conocido como saturación de la magnetización (M_s). Al remover el campo, se puede apreciar la magnetización que permanece o magnetización remanente (M_r). Su valor depende de la microestructura y composición del material. El campo en la dirección opuesta que debe aplicarse para remover esta remanencia se denomina campo coercitivo (H_c). El área del lazo de histéresis corresponde a densidad de energía liberada durante el proceso de

desmagnetización y re-magnetización. La respuesta de un material superparamagnético tiene un comportamiento sigmooidal pero no presenta histéresis. Debido a que la reversión de la magnetización de todos los momentos magnéticos ocurre coherentemente dentro de la nanopartícula (Figura 6D) (87).

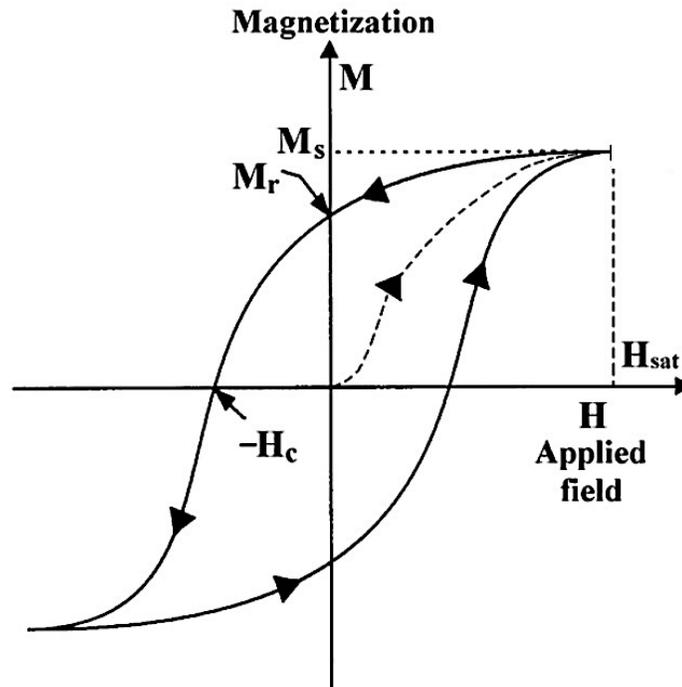


Figura 7. Ciclo de histéresis de un material ferromagnético. Al aplicar un campo magnético alterno, el material magnético alcanza su máxima saturación (M_s), cuando todos los dominios magnéticos están alineados en dirección al AC. Cuando el campo magnético decae a cero, el material retiene un grado considerable de magnetización, M_r (“recuerda” su estado previo de magnetización). Cuando $H = 0$ el material no está totalmente desmagnetizado y solo ocurre una reorientación parcial de los dominios. Para desmagnetizar el ferromagneto se aplica un AC fuerte en la dirección opuesta, denominado campo coercitivo H_c . La apertura del lazo indica la cantidad de energía liberada por el sistema (87,89).

2.2.2 Superparamagnetismo.

Los materiales ferro- y ferrimagnéticos tienen momentos dipolares netos en ausencia de un campo magnético externo, aunque deberían tener todos sus momentos magnéticos dirigidos hacia una misma dirección. Esta configuración no es posible dado que la energía magnetostática almacenada sería enorme. Debido a que tienden al estado de mínima energía, la forma de hacerlo es dividiéndose a si mismos en pequeñas regiones denominadas dominios magnéticos (Figura 8). Así en un dominio todos sus momentos magnéticos se alinean en una

dirección, mientras que, en otra en un dominio adyacente, tal que el momento magnético neto casi se cancela (Figura 6C). Esta situación genera interfaces entre dominios denominadas paredes de dominio (DWs) (Figura 8). Los momentos magnéticos adyacentes a las DWs, tienen una configuración no favorable. En consecuencia almacenan mucha energía, disminuyendo la magnetización total (energía total del material) al formar los dominios (91). Las paredes de dominio se desplazan al aplicar un campo magnético lo que genera imperfecciones estructurales del arreglo atómico del material (defectos, dislocaciones, vacancias). En las nanopartículas magnéticas el volumen puede ser menor que un dominio magnético. Entonces al disminuir el tamaño (volumen) de las partículas (tamaño crítico de dominio, D_C) (Figura 9A), la proximidad entre las DWs no es estable energéticamente y adoptan una configuración de monodominio (Figura 8). En esta configuración todos los momentos atómicos magnéticos se magnetizan en una misma dirección o uniformemente, comportándose como un solo momento magnético gigante o superparamagneto (Figura 6D). Cuando alcanzan el tamaño por debajo del D_C , la coercitividad disminuye drásticamente a cero (Figura 9A), debido a efectos térmicos, los cuales son lo suficientemente fuertes para desmagnetizar espontáneamente las nanopartículas saturadas.

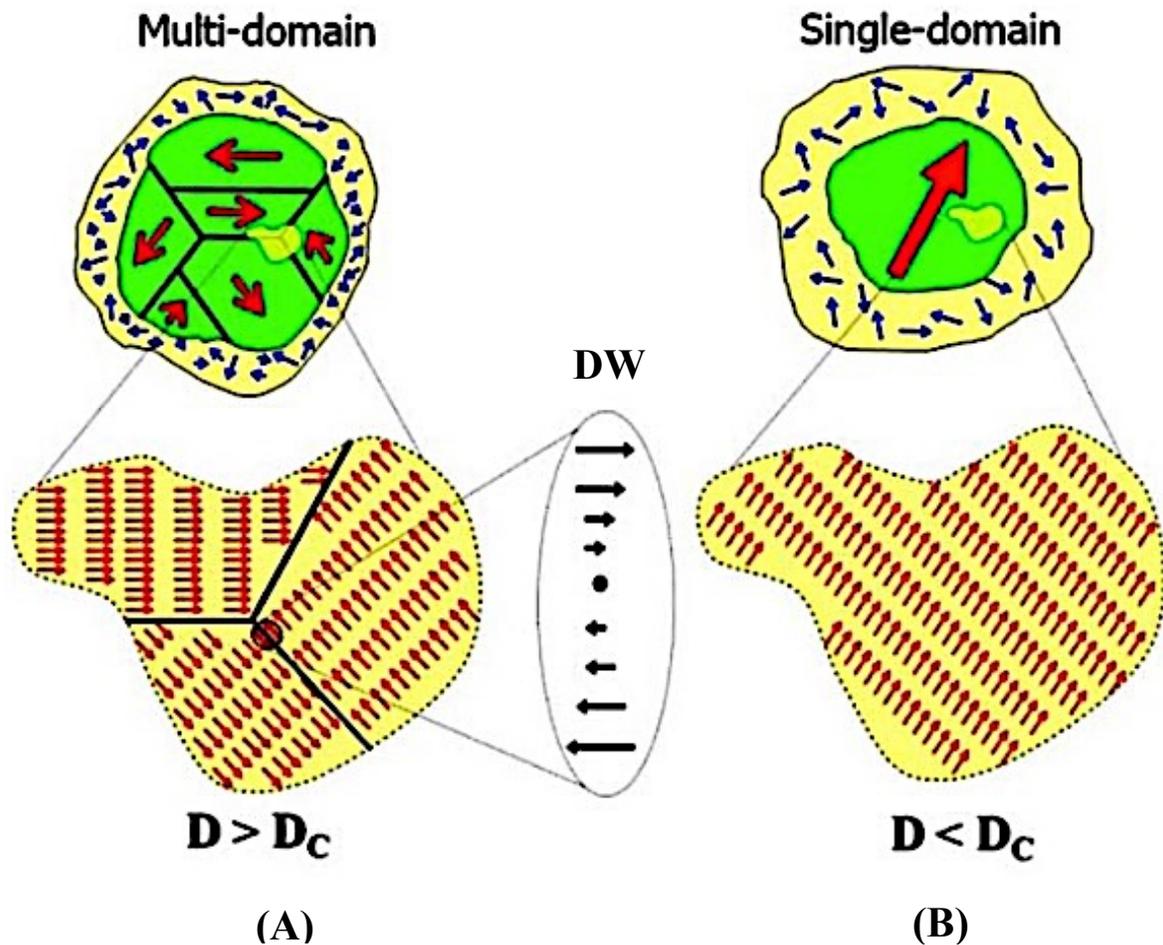


Figura 8. Dominios magnéticos en una partícula ferromagnética multidominio, (A) de diámetro mayor que el diámetro crítico $D > D_c$. El material se fragmenta en regiones con orientación magnética al azar. En la interface entre los dominios, los momentos magnéticos giran para acomodarse hacia la orientación en ambos lados de las paredes de dominio (DW). (B) Cuando $D < D_c$ y el material se vuelve monodominio. En ambos casos el desorden de los spines hacia la superficie de las partículas esta representado por las regiones anulares.(89)

La formación de múltiples dominios o de un solo dominio depende de las propiedades intrínsecas del material (composición química, anisotropía magnética, forma, etc.) (Figura 9B). El valor para el D_c , además de las propiedades intrínsecas, está determinado principalmente por la competencia entre la energía magnetostática (la saturación del momento magnético) y la anisotropía magnética del material (interacción entre los átomos).

Para el caso de los materiales con hierro el valor se estima alrededor del diámetro aproximado de 30 nm (Figura 9B) (89).

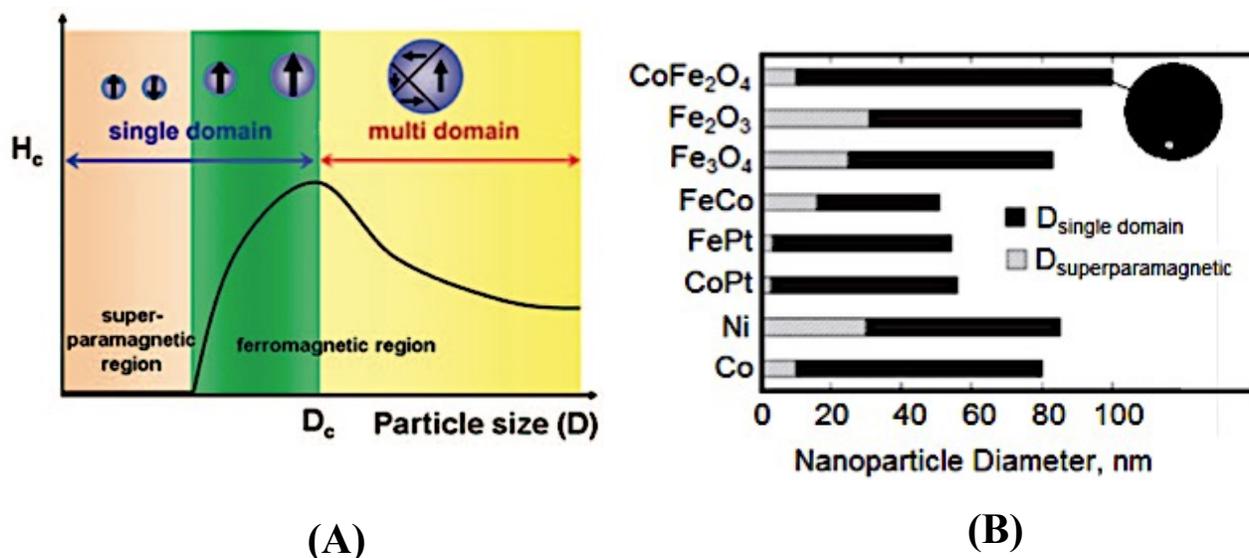


Figura 9. (A) Transición de multi- y monodominio al régimen superparamagnético. (B) Se ilustran los diámetros críticos de nanopartículas superparamagnéticas y monodominio dependiendo de su composición química (92).

El comportamiento superparamagnético es de especial importancia en aplicaciones médicas (acarreadores de fármacos, MRI e hipertermia magnética), dado que el superparamagnetismo significa que las MNPs son altamente magnetizables en presencia de un campo magnético externo, pero pierden su magnetización en su ausencia; gracias a que los monodominios son direccionables y las dimensiones nanométricas incrementan la fluctuación e interacción spin-spin. De esta forma, permiten un mejor control de la aplicación de las propiedades magnéticas, porque proveen una respuesta muy fuerte a un campo magnético externo para ser direccionadas a un órgano blanco. A la vez que se disminuye el riesgo de la formación de agregados y la consecuente inducción de trombosis (92).

2.2.3 Radiación electromagnética y su acoplamiento con las MNPs.

En el área médica la radiación electromagnética es una herramienta que se ha utilizado ampliamente en el diagnóstico (rayos-X, tomografía computarizada, emisión de positrones, resonancia magnética) y como herramienta de tratamiento (radioterapia con rayos gamma, hipertermia con microondas, etc.) para la destrucción de células tumorales. Esto se debe a las interacciones físicas entre las ondas electromagnéticas y los seres vivos, la cual es muy distinta dependiendo de la porción del espectro electromagnético que interactúe con ellos. Así, la materia orgánica compuesta de enlaces C-C, C=C, C-H, C-N, absorbe esta radiación a frecuencias específicas, por lo cual resultan peligrosas para los sistemas biológicos ya que ocasionan la ruptura de los enlaces covalentes a frecuencias de 10^{12} Hz ($\lambda = 300$ nm en el rango UV), lo que origina mutaciones en el DNA, destrucción de los sitios activos de las enzimas con la consecuente alteración de las rutas metabólicas, etc (89). Sin embargo, la energía incidente decae exponencialmente con la profundidad de penetración a cierta frecuencia, y esta penetración depende exponencialmente de la frecuencia. Los distintos tipos de radiación electromagnética son de utilidad para el diagnóstico o tratamiento dependiendo de la localización del tumor. Así por ejemplo, se emplea luz en el infrarrojo (IR) para tumores superficiales o microondas para tumores profundos (Figura 10).

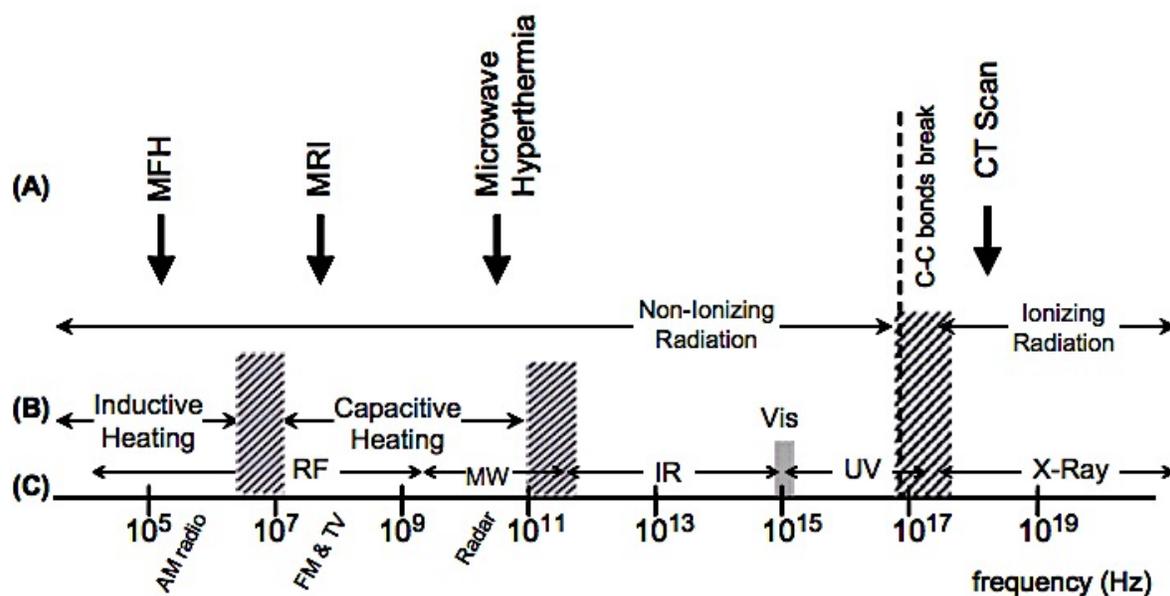


Figura 10. (A) Rangos de frecuencia de algunos de los equipos de diagnóstico o terapia médica (MFH= *magnetic fluid hipertermia*, MRI= *magnetic resonance imaging*). (B). Mecanismo físico que opera en cada rango de frecuencia. (C) Nomenclatura de las ondas electromagnéticas. RF=*radiofrequency*; MW= microondas, IR=infrarrojo; Vis=visible; UV= ultravioleta y rayos-X (89).

Estas terapias que emplean la radiación electromagnética dañan de forma general tanto tejidos sanos como malignos y en ocasiones la erradicación del tumor es incompleta. Para modular la respuesta y localizar la terapia en el tumor, los nanomateriales magnéticos como los óxidos de hierro (maghemita, γ -Fe₂O₃ y la magnetita, Fe₃O₄) de 5-20 nm de diámetro son prometedores (93), dado que pueden absorber la energía de distintas longitudes de onda del espectro electromagnético en radiofrecuencias bajas (100 kHz-1MHz) (Figura 10), para orientar sus monodominios magnéticos y liberar la energía en forma de calor durante el ciclo de histéresis (89). De esta manera, se puede generar y controlar el calor localizándolo sólo en los sitios blanco disminuyendo el daño a los tejidos adyacentes (94). Dado que estos materiales resultan de importancia para el control de la generación del calor en los seres vivos, se dará una breve descripción de su estructura cristalina donde se originan sus propiedades ferrimagnéticas.

2.2.4 Magnetita (Fe₃O₄) y maghemita (γ -Fe₂O₃).

La magnetita (Fe₃O₄) y la maghemita (γ -Fe₂O₃) son óxidos de hierro ferrimagnéticos con una estructura cristalina similar (95).

La estructura cristalina de la magnetita fue estudiada por Bragg y Nishikawa en 1915. Es uno de los óxidos de hierro más antiguo que se conoce. También denominado óxido de hierro negro, mineral de hierro magnético o magneto. La magnetita tiene la fórmula química Fe₃O₄ y exhibe el magnetismo más fuerte de las otras fases de óxido de hierro. Presenta dieciséis fases puras de óxido de hierro (óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos). De estos compuestos la mayoría tiene al hierro en su estado trivalente (Fe³⁺), el cual es poco soluble y de colores brillantes. La magnetita natural tiene una densidad de 5.2 g/cm³ y puede encontrarse como granos en las rocas sedimentarias con una dureza de 5.5 a 6.5 en la escala de Mohs (95).

La Fe₃O₄ tiene una estructura cúbica centrada en las caras *fcc*, grupo espacial *Fd3m* (227) y parámetro de red $a = 8.397 \text{ \AA}$. Esta celda unitaria consiste de 56 átomos, de los cuales 32 son de oxígeno, 16 de Fe⁺³ y 8 de Fe⁺². Distribuidos en una celda unidad con 32 sitios

octaédricos [B] y 64 sitios tetraédricos (A) (Figura 11a), donde los cationes de Fe^{2+} ocupan $\frac{1}{4}$ de los sitios octaédricos (8Fe^{2+}), mientras que los de Fe^{3+} ocupan $\frac{1}{4}$ de los sitios octaédricos (8Fe^{3+}) y $\frac{1}{8}$ de los sitios tetraédricos (8Fe^{3+}). Los iones Fe^{3+} tienen una coordinación con 4 iones de oxígeno y los iones Fe^{2+} con 8. Por esta razón la celda unitaria de la magnetita se representa como $(\text{Fe}^{3+})_8 [\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+}]_8 \text{O}_{32}$ (95,96). A esta configuración cristalográfica se le denomina espinela inversa y se mantiene hasta $T_V \sim 120 \text{ K}$ ($-153.15 \text{ }^\circ\text{C}$).

Al parecer la estructura de espinela inversa es la razón de su alta conductividad electrónica, que hace posible el intercambio continuo entre iones Fe^{3+} y Fe^{2+} (Figura 11a, flecha verde), debido a sus configuraciones electrónicas. Tanto para la Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, tenemos que la configuración del ion Fe^{3+} es $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^5$ y para el ion Fe^{2+} es $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^6$, siendo los electrones del orbital 3d del Fe los que determinan las propiedades magnéticas donde ocurre el intercambio continuo. Sus configuraciones electrónicas revelan que el Fe^{3+} tiene cinco electrones no apareados mientras que el Fe^{2+} tiene cuatro. Los iones Fe^{3+} y Fe^{2+} en coordinación octaédrica se acoplan ferromagnéticamente mediante un mecanismo de doble intercambio. Los electrones con spines opuestos se intercambian entre los dos sitios octaédricos. Por otro lado, los iones Fe^{3+} en los sitios tetraédricos y octaédricos se acoplan anti-ferromagnéticamente mediante un mecanismo de superintercambio. Esto significa que los spines del Fe^{3+} se cancelan unos con otros, y los spines desapareados del Fe^{2+} en los sitios octaédricos contribuyen a la magnetización. Es esta configuración de momento magnético la que origina el ferrimagnetismo en la magnetita (84,97).

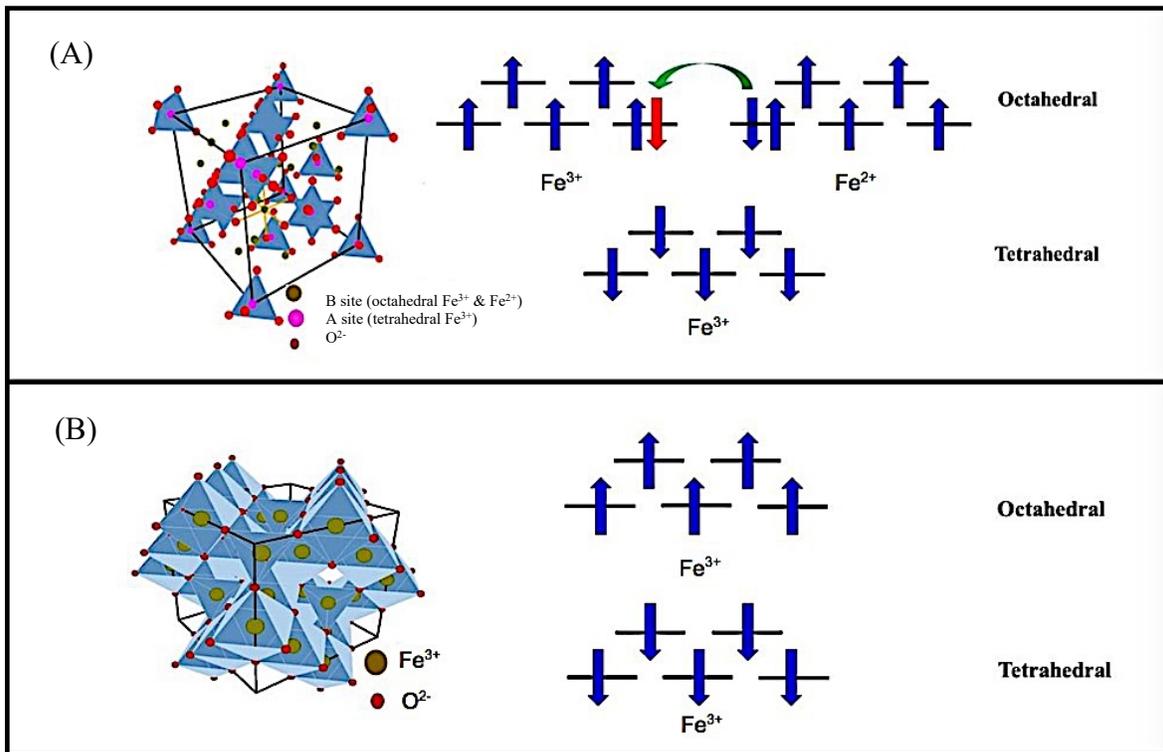


Figura 11. Estructuras cristalinas y configuración de su spin en (A) magnetita y (B) maghemita (96).

La sustitución parcial de los cationes en la estructura de la magnetita en un sitio u ambos ofrece la posibilidad de mejorar sus propiedades químicas y físicas, dado que se modifica su simetría cristalina, formándose espinelas deficientes de cationes, los cuales cambian las longitudes de la red, sus interacciones magnéticas, anisotropía magnética e influyen su saturación y coercitividad (98).

La maghemita cristaliza de forma similar en una estructura cúbica con una supercelda tetragonal con un $a = 8.336 \text{ \AA}$ (Figura 11B). Los valores del parámetro de red pueden variar dependiendo del contenido de Fe en $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ con 42.86% de Fe y $a = 8.37 \text{ \AA}$; y con 40% de Fe y $a = 8.30 \text{ \AA}$. La oxidación de la magnetita da origen a la maghemita. Cuando ocurre la oxidación de la magnetita la red de oxígeno se amplía por la adición de más átomos de oxígeno. El cual se añade en forma de nuevas capas empaquetadas compactamente. En consecuencia, hacia el interior migran los iones de Fe, lo que resulta en una disminución de su concentración en un volumen dado de la red de oxígeno. En la $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hay en promedio

21 1/3 de átomos de hierro oxidado (Fe^{3+}), distribuidos arbitrariamente en el mismo volumen (Fe_3O_4) en los 16 sitios octaédricos y en los 8 tetraédricos. La estructura de la maghemita puede obtenerse al crear 8/3 de vacancias fuera de los 24 sitios de Fe^{3+} de la celda cúbica de la magnetita. Las vacancias del catión Fe^{2+} se localizan en los sitios octaédricos y su arreglo en la estructura de la maghemita tiene un papel preponderante en su respuesta magnética. La estructura de la maghemita puede aproximarse a una celda cúbica de composición $(\text{Fe}^{3+})_8 [\text{Fe}^{3+}_{5/3} \text{®}_{1/3}]_8 \text{O}_{32}$, donde ® representa las vacancias. Dado que los spines en los sitios octaédricos y tetraédricos se orientan de forma antiparalela, la maghemita es ferrimagnética. (95,98)

Para las aplicaciones biomédicas como la hipertermia la magnetita y maghemita son los óxidos metálicos de transición más importantes. Puesto que han mostrado cubrir los requerimientos como conservar sus propiedades superparamagnéticas (debido a su $T_C=850$ K) a temperatura ambiente, presentan una elevada saturación magnética ($M_s \text{ Fe}_3\text{O}_4= 91.6$ emu/g y $M_s \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 = 84$ emu/g), coercitividad cercana a cero y tienen los niveles más bajos de toxicidad en estudios preclínicos (85,87).

2.3 La hipertermia como tratamiento.

Los beneficios del calor como agente terapéutico era conocido en varias culturas desde tiempos antiguos (3000 A.C.). Dado que el calor se asociaba con la “energía curativa” del sol, era común emplear fuentes naturales que lo producían como aguas termales y sus lodos, aire caliente, vapor de cuevas volcánicas, etc. Existen descripciones que indican que los egipcios utilizaban varas y navajas calientes para el tratamiento local de tumores de seno (99). En la antigua Grecia y Roma los médicos tenían la firme convicción que controlando la temperatura del cuerpo les permitiría curar diversas enfermedades. Esta idea fue difundida por el filósofo Parménides y posteriormente por Hipócrates, el cual afirmaba que una enfermedad resultaría incurable, sino era posible curarla con el calor (“*Lo que la medicina no cura, el hierro lo hará, lo que el hierro no cura el fuego lo hará, y lo que el fuego no cura debe considerarse incurable*”). Basándose en sus teorías del efecto curativo del calor, Hipócrates trató con éxito el cáncer de seno de acuerdo a los registros de la época (99–101).

Los romanos emplearon calor como tratamiento. Celsus en su tratado de medicina prescribe baños calientes para el tratamiento de diversas enfermedades (100).

El primer artículo sobre hipertermia fue publicado en 1866 por el cirujano alemán Carl D.W. Busch, donde describió que el incremento de temperatura ocasionado por erisipela tenía un efecto secundario en la regresión de un sarcoma. Este descubrimiento fue fundamental, ya que se convirtió en el primer caso reportado donde la elevación de la temperatura destruía selectivamente células cancerosas sin afectar la salud del paciente. Este descubrimiento llevó a prácticas médicas de inducir fiebres infecciosas en pacientes con cáncer, aplicando vendajes en heridas o sangre infectada con malaria (102).

Esta relación de inducción de la temperatura por pirógenos de un proceso infeccioso y la regresión del cáncer fue estudiada por William B. Coley. En 1891 utilizando inyecciones localizadas en los sitios tumorales con cultivos de cepas bacterianas *Streptococcus pyrogenes* y *Serratia marcescens*, que producían la respuesta pirógena típica de la erisipela indujo la elevación selectiva de la temperatura; para el tratamiento de diversos tumores malignos. Esta combinación de pirógenos bacterianos eventualmente se conoció como la toxina de Coley. Por esta aportación es considerado el padre de la hipertermia e inmunoterapia moderna contra el cáncer. Coley logró que pacientes con cánceres inoperables incrementarían su sobrevida de un 24% a un 64%, mostrando que a mayor temperatura inducida (40-40.5 °C) la probabilidad de sobrevida incrementaba. Sin embargo, debido a lo impredecible de la respuesta en cada paciente a las toxinas bacterianas este método fue abandonado en la búsqueda de metodologías más controlables (102).

Los intentos por generar temperaturas elevadas en el cuerpo siguieron con el desarrollo de metodologías como envolver a los pacientes en plástico y sumergirlos en cera caliente o colocarlos en cuartos o cajas calientes. Técnicas más sofisticadas consistían en extraer la sangre, entibiarla o templarla y reintroducirla. Estos tratamientos a menudo provocaban la muerte. Sin embargo, la hipertermia seguía recomendándose ampliamente para tratar enfermedades de transmisión sexual, artritis, desórdenes mentales (100).

La hipertermia local fue implementada por el médico sueco Franz J.E. Westermarck, quién trató exitosamente cánceres inoperables uterinos. Mediante la circulación de agua caliente (42-44 °C) en un serpentín metálico aplicado en la región del tumor (100,101).

El uso de electricidad para tratamiento del cáncer fue posible con la invención de la pila eléctrica (Luigi Galvani y Alessandro Volta, 1780 a 1800). Los tratamientos de la época consistían en aplicar directamente una corriente eléctrica con ayuda de agujas o alambres conectados a las celdas voltaicas para quemar los tumores. A lo que se denominó galvanocauterio o cuchillas eléctricas. Estas metodologías de cauterización fueron implementadas para el tratamiento de cánceres de útero, próstata y para disminuir el sangrado en procedimientos quirúrgicos.

Los avances en el campo del electromagnetismo por C. Maxwell, H. Hertz, N. Tesla entre otros, permitieron el desarrollo de dispositivos de corriente alterna para aplicaciones terapéuticas. Este último refirió los efectos terapéuticos del calor usando corriente alterna a cierta frecuencia, y en 1899 se curó de tuberculosis pulmonar aplicándose corrientes de alta frecuencia. Sin embargo, fue el fisiólogo y físico Jaques-Arsene d'Arsonval quién estableció las bases para el empleo de corrientes de alta frecuencia para el tratamiento de diversas enfermedades (103).

La posibilidad de generar calor en tejidos profundos fue introducida por K.F. Nagelschmidt y desarrollado independientemente por G. Schwartz y C. Müller (101). Dado que el primero demostró la posibilidad de calentar los tejidos con energías de alta frecuencia a lo que denominó diatermia. La cual tenía la finalidad de inducir un calentamiento (40-45 °C) que activase la circulación sanguínea sin la destrucción de los tejidos y en breve fue introducida en las prácticas clínicas.

El descubrimiento de la radiación ionizante (1895) por W. Röntgen, disminuyó el interés para tratar el cáncer por hipertermia. Esto aunado al desarrollo insuficiente de los dispositivos de generación de calor, así como las técnicas para su medición. Desde entonces los métodos tradicionales para el tratamiento del cáncer fueron la radioterapia y quimioterapia (99,103).

Sin embargo, en 1910 G. Schwartz y Müller encontraron que la hipertermia en combinación con la radioterapia ofrecía buenos resultados terapéuticos. Pero fue hasta 1962 que resurgió el interés por la investigación de los efectos terapéuticos de la hipertermia, gracias al descubrimiento del médico George W. Crile Jr., quién describió la eficacia de elevar la temperatura (42-50°C) por periodos prolongados en la región del tumor para su destrucción selectiva (99,101,103). A partir de estos resultados diversos investigadores se dedicaron a diseñar experimentos en células tumorales, para explorar los efectos de la exposición a la radiación, agentes quimioterapéuticos e hipertermia. A la par que se mejoraron las técnicas de perfusión y dispositivos para la aplicación de la hipertermia, en tumores aislados u órganos.

La revolución tecnológica ha aportado nuevos métodos de calentamiento local (radiación con microondas, electrodos, catéteres, implantes magnéticos, ultrasonido, láseres, etc.). Estos continúan en desarrollo para incrementar la eficiencia y especificidad del tratamiento. Algunos ejemplos de estas tecnologías como el empleo de microondas focalizadas en el área del tumor permiten elevar la temperatura localmente, sin calentar excesivamente la piel. Sin embargo, las microondas producen calor excesivo por lo cual no se emplea cuando la localización del tumor es cercano a órganos vitales (vejiga, bazo). Una alternativa es el uso combinado de la crioblación (-20 a -130 °C) con ciclos de calentamiento permitiendo tratamientos cortos de 10 minutos. El ultrasonido altamente focalizado (10-1000 veces) absorbe energía acústica intensa que se transforma en calor. Sin embargo, por el momento produce necrosis coagulativa rápidamente, aunque en la actualidad el tratamiento del cáncer se realiza con técnicas invasivas (quimioterapia) o locales (radioterapia). Los procedimientos experimentales no invasivos como la hipertermia magnética consisten en el empleo de nanopartículas direccionadas a los sitios blanco, para inducir calor controlado y producir citotoxicidad y electroporación irreversible, para la eliminación del tumor. Los avances en las ciencias biológicas comienzan a dilucidar los mecanismos moleculares detrás de la inducción de la elevación de temperatura, como lo es la activación de la cascada inmune (interleucinas, interferón y factores de necrosis tumoral) para producir inmunidad tumoral. Estos hallazgos han potenciado el empleo de la hipertermia magnética para el desarrollo de

la inmunoterapia contra el cáncer, lo que abre un nuevo camino hacia la aplicación de la hipertermia magnética (101,102).

2.3.1 Hipertermia magnética.

La hipertermia magnética o nanotermia emplea nanopartículas magnéticas como generadores de calor para inducir localmente la muerte celular. El uso de micro- y nanomateriales magnéticos para el desarrollo de la hipertermia magnética comenzó en 1957, con Gilchrist *et al.*, quienes introdujeron partículas magnéticas micrométricas para inducir el calentamiento local en linfonodos de perros (104). Posteriormente Gordon *et al.*, (1999) utilizaron nanopartículas magnéticas de 6 nm de diámetro recubiertas con dextrán (105,106). A estos experimentos les siguieron desarrollos rápidos como MNPs con la formación de cubiertas con liposomas catiónicos para mejorar su localización en tumores y absorción en células, y otras tecnologías como se ha descrito previamente (Tabla 1).

La hipertermia con fluidos magnéticos o termoterapia ha pasado los ensayos preclínicos para su aplicación en humanos y se considera una terapia clínica prometedora (3). Su aplicación clínica para el tratamiento del glioblastoma multiforme cerebral por compañías como *MagForce Nanotechnologies AG*, ha establecido su importancia en los tratamientos clínicos de frontera (107,108).

En la hipertermia clínica se distinguen dos tipos de tratamiento: (1) temperatura inducida en el rango de 42-45 °C por unas cuantas horas y que puede emplearse sola o en combinación con agentes tóxicos (radiación o quimioterapia) y, (2) temperatura con el objetivo de generar un exceso de calor (≥ 50 °C) con un efecto de termoablación, cuyo tiempo de exposición es limitado. Esta modalidad se realiza con reservas dado que un daño extenso sobre el tumor produce repentinamente grandes cantidades de material necrótico y una elevada respuesta inflamatoria que puede ocasionar el síndrome de shock.

En la práctica médica, la metodología a emplear debe considerar además los aspectos fisiológicos de la patología (tipo de tumor, tamaño, ubicación anatómica, profundidad, distribución del flujo sanguíneo, etc.). Dependiendo de la estrategia a utilizar, la hipertermia

en la clínica se clasifica en: 1) calentamiento local de tumores superficiales, 2) local en tumores profundos, 3) calentamiento regional y 4) sistémico (109).

Los primeros esfuerzos por inducir la hipertermia magnética por Gilchrist enfatizaron esta necesidad de identificar las condiciones apropiadas para depositar el calor de forma controlada y diferencial, así como la selección adecuada de los intervalos de frecuencia de las ondas electromagnéticas en su interacción con el material magnético, para proporcionar el efecto terapéutico deseado de acuerdo a la patología (104).

Sin embargo, la aplicación clínica de la hipertermia se ha limitado debido a los problemas aunados a su selectividad y control de la dosis de calor administrada en la región de interés. La hipertermia con nanopartículas magnéticas es una estrategia controlada que podría resolver estos problemas. Dado que se puede concentrar selectivamente el calor disminuyendo su efecto en las células y tejidos adyacentes sanos. Por lo cual se expondrán brevemente las propiedades y mecanismos que conducen al calentamiento de los materiales magnéticos nanoestructurados.

2.3.2 La absorción específica de potencia (SPA) de las MNPs.

El calor es un tipo de energía mecánica resultado del promedio de las energías (Q) de las moléculas en movimiento, que es medida por la temperatura (T), es decir, es energía cinética. La forma usual de medirla es con la relación termodinámica: $Q = C_S m_f \Delta T$. Donde C_S es el calor específico del fluido en (J/K g), m_f la masa del fluido (g) y ΔT el incremento de temperatura (K). Dado que el calor depende de la cantidad de muestra que se desea medir, es más preciso determinarlo por la absorción específica de potencia (SPA, *specific power absorption*), también conocido como razón específica de absorción (SAR, *specific absorption rate*) o pérdida específica de energía (SLP, *specific loss power*). Este parámetro provee una medición de la energía o potencia disipada por unidad de masa en watts por gramo (W/g).

Las MNPs en combinación con el campo magnético alterno (AMF, *alternating magnetic field*) convierten la energía electromagnética en calor. Esta capacidad de calentamiento de un material magnético se cuantifica mediante el SPA. Definido como la cantidad de energía del AMF transformada en calor por unidad de masa de material magnético en un tiempo determinado (ecuación 1) (89,110).

$$SPA = C_S \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right) \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde el término entre paréntesis $\Delta T/\Delta t$ es la razón de calentamiento de la muestra, que se evalúa como la pendiente máxima definida como el incremento de temperatura en un intervalo de tiempo determinado, y C_S es la capacidad calorífica ($C_{\text{agua}}=4.18 \text{ J/g}\cdot\text{K}$), que depende de la concentración promedio de la masa de material magnético, la cual se calcula a partir de (ecuación 2):

$$C_S = \frac{m_{NP} c_{NP} + m_l c_l}{m_{NP}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde c_l y c_{NP} son las capacidades caloríficas del solvente y de las MNPs. Mientras que m_l , m_{NP} son las masas del líquido y de las MNPs, respectivamente.

Si la concentración de MNPs es muy pequeña se puede aproximar a $m_l c_l + m_{NP} c_{NP} \approx m_l c_l$ tal que (ecuación 3):

$$SPA = \frac{c_l \delta_l}{\phi} \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{m_l c_l}{m_{NP}} \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 3}$$

δ_l es la densidad del líquido (ejemplo: agua) y $\phi = m_{NP}/V_l$ es la concentración en masa (en mg) de las MNPs que tiene la solución coloidal en un volumen (en ml) determinado. Por lo cual, la ecuación (1) puede expresarse como (ecuación 4):

$$SPA = \frac{\delta_l c_l}{\phi} \left(\frac{\Delta T}{\Delta t} \right)_{max} \quad \text{Ecuación 4}$$

En este trabajo, la ecuación (4) se empleó para obtener los valores del SPA por gramo de material magnético ($W/g_{Fe_3O_4}$) contenido en el coloide, medidos a partir de la pendiente máxima del ΔT vs Δt durante los primeros $\Delta t \approx 10-20$ segundos. Experimentalmente, la disipación continua de calor de la muestra se midió en un sistema adiabático, para determinar los mejores coloides magnéticos que incrementasen la temperatura y posteriormente emplearlos para la generación de la hipertermia magnética *in-vitro*. El diseño del sistema adiabático del equipo de hipertermia (DM1, nB Nanoscale biomagnetics, Spain) asegura que las determinaciones de temperatura sean las debidas únicamente a la generación de calor por el material de hierro (MNPs) en el sistema, el cual está aislado por un alto vacío (10^{-7} mbar), esto se describe en materiales y métodos.

En general, cuando se expone un material magnético a un campo magnético alterno, este puede generar calor a través de cuatro mecanismos posibles: histéresis, corrientes de Eddy (Foucault), la relajación de Néel y la rotación de Brown, pero sólo uno predomina. En el caso de los materiales superparamagnéticos, generan calor principalmente mediante los últimos dos mecanismos (88,111).

Al disminuir el tamaño de partícula, también se disminuye la barrera para la reversión de la magnetización y en consecuencia, las fluctuaciones térmicas conducen al fenómeno de relajación (111). Las MNPs monodominio dispersas en un medio acarreador pueden reorientar sus momentos magnéticos mediante dos mecanismos distintos:

A) La relajación de Brown, que es la rotación física de las MNPs en contra del fluido viscoso generando un torque en el medio circundante (gelatina, tejido, matriz extracelular).
B) La relajación de Néel, que se debe a la rotación de los momentos atómicos magnéticos dentro de la red del cristal en contra de la anisotropía magnética efectiva (energía requerida para cambiar la dirección de la magnetización con respecto a su estructura física) (Figura 12). Estos mecanismos están definidos por sus tiempos de relajación Browniana (τ_B) y de Néel (τ_N), donde τ es el tiempo de relajación de los momentos magnéticos.

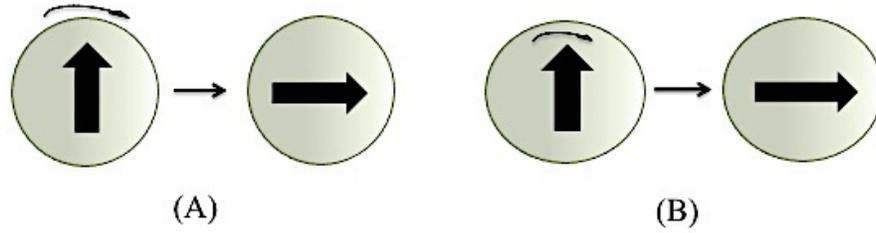


Figura 12. Esquema de los mecanismos de relajación del momento magnético en una nanopartícula monodominio. (A) Rotación Browniana y (B) Relajación de Néel (89,111).

Así, la relajación de Brown se describe por (ecuación 5):

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{\kappa_B T}$$

Ecuación 5

Mientras que la relajación de Néel, se describe como la fluctuación de la dirección del momento magnético a lo largo de la barrera de anisotropía, y su tiempo de relajación está dado por la razón de la energía de anisotropía (KV) y la energía térmica ($k_B T$) (ecuación 6):

$$\tau_N = \tau_0 \left(\frac{\sqrt{\pi}}{2}\right) \left(\sqrt{\frac{k_B T}{KV_M}}\right) e^{KV_M/k_B T} \quad (\tau_0 \sim 10^{-9} - 10^{-12} \text{s}) \quad \text{Ecuación 6}$$

Estas ecuaciones muestran la dependencia de los tiempos de relajación con respecto a la viscosidad del medio (η), el volumen hidrodinámico (V_H), la constante de Boltzmann ($k_B = 1.38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), la temperatura absoluta (T), la constante de anisotropía magnética (K) y el volumen del núcleo magnético (V_M).

Ambos mecanismos ocurren de forma simultánea, donde el mecanismo de relajación más rápido es el dominante y está dado por el tiempo efectivo de relajación (τ_{eff}) definido por (ecuación 7):

$$\tau_{eff} = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad \text{Ecuación 7}$$

Experimentalmente es difícil distinguir el proceso que predomina. En la relajación de Néel, el SPA tiene una dependencia exponencial con el volumen de la partícula. Ya que una partícula muy pequeña requerirá menor energía para la rotación de su momento magnético y en consecuencia este mecanismo de relajación se vuelve muy importante para la generación de calor. Mientras que el SPA es lineal en el mecanismo de Brown, el cual está estrechamente relacionado con el diámetro hidrodinámico y la viscosidad del medio. Debido a que una mayor viscosidad disminuirá la rotación de las partículas. En general, las pérdidas de calor mediante la relajación de Néel predomina en MNPs pequeñas mientras que el régimen de Brown domina en las MNPs grandes (112).

Así, para las aplicaciones en hipertermia es mejor utilizar MNPs que relajen mediante el mecanismo de Néel, ya que al ser internalizadas por las células ocurre una modificación en la viscosidad del medio acarreador (líquido) y su rotación libre en comparación con un medio de mayor viscosidad como el citoplasma, matriz extracelular etc., donde se verá impedida (Figura 13).

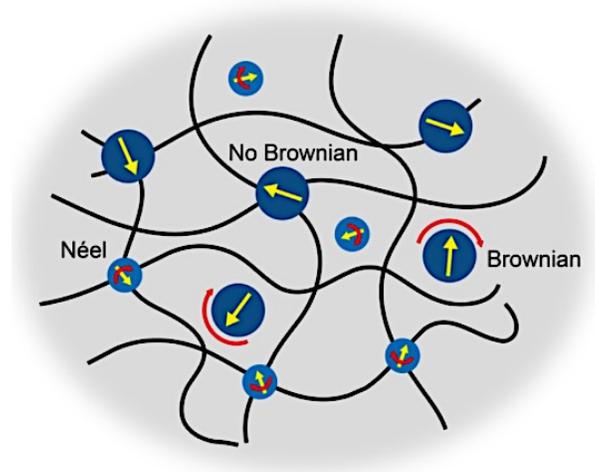


Figura 13. Esquema de las MNPs con distintos mecanismos de relajación en el ambiente celular como puede ser las adosadas a la matriz extracelular (fibras negras) y las libres en el espacio extracelular. Las MNPs que no se encuentran firmemente adosadas tendrán la capacidad de rotar, mientras que las embebidas en la matriz extracelular o el citoplasma con su momento magnético bloqueado solo relajan por Néel (113).

Una eficiencia de calentamiento elevada es crucial para el uso clínico de las MNPs, debido a que se requerirán inyectar cantidades menores. Así como su acoplamiento con el campo magnético alterno (AC ó AMF) aplicado para optimizar la respuesta del material magnético y asegurar su eficiencia termoterapéutica (94,110,114).

La aplicación del AC debe oscilar más rápido que el tiempo de relajación de las MNPs para inducir la generación de calor (P), de acuerdo con la ecuación de potencia (ecuación 8):

$$P = \mu_0 \chi'' f H^2 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde μ_0 es la permeabilidad en el vacío ($4\pi \times 10^{-7} \text{ J A}^{-2} \text{ m}^{-1}$), χ'' la susceptibilidad del AC, f la frecuencia del campo magnético aplicado y H es la fuerza del campo AC aplicado.

El marco teórico para comprender los mecanismos físicos involucrados en la eficiencia de calentamiento de las MNPs superparamagnéticas es mediante la teoría de la respuesta lineal (LRT, *linear response theory*) introducida por Rosensweig (115,116). Esta teoría relaciona la generación de calor (P) con el SPA (W g^{-1}) mediante el promedio de la densidad de la masa de las partículas ($\text{SPA} = P / \rho_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$) en relación al campo magnético aplicado (su magnitud y frecuencia), expresado como (ecuación 9) (88):

$$P = \pi \mu_0 \chi'' H_0^2 \cdot \frac{(2\pi f \tau_R)^2}{1 + (2\pi f \tau_R)^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

Dado que $\text{SPA} = P$, tenemos que (ecuación 10):

$$\text{SPA} = \pi \mu_0 \chi'' H_0^2 \cdot \frac{(2\pi f \tau_R)^2}{1 + (2\pi f \tau_R)^2} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde H_0 es la amplitud del campo magnético oscilante y τ_R es el tiempo de relajación de Brown-Néel para la reorientación de los momentos magnéticos. Está ecuación resume que la energía generada mediante la aplicación de un campo magnético alterno resulta en energía térmica, para una determinada masa de MNPs superparamagnéticas. De acuerdo

a esta teoría, el SAR incrementa linealmente con el volumen de las MNPs y su cantidad está en función del cuadrado de la fuerza del campo magnético aplicado, mientras que los otros factores permanecen constantes. Entonces, al modificar las propiedades del campo magnético (su amplitud y frecuencia), se puede optimizar el calentamiento de las MNPs. Así, para las MNPs superparamagnéticas, los valores de SPA incrementarán al aumentar la frecuencia y amplitud del AC. Sin embargo, para la aplicación segura de la hipertermia en pacientes se debe evitar el sobrecalentamiento inespecífico de los tejidos sanos producido por la generación de las corrientes de Eddy (máximo tolerable 25 mW ml^{-1}) y la estimulación de los nervios (117).

La penetración de las ondas electromagnéticas en función de la frecuencia fue estudiado por Hager y Cheung, quienes establecieron que a menor frecuencia se incrementa la penetración en los tejidos (118). Las bobinas (electroimanes) de campos magnéticos para mediciones biológicas del SPA están diseñados para trabajar en intervalos de frecuencia baja (100-800 kHz), evitando las frecuencias altas donde hay un acoplamiento eléctrico de las ondas electromagnéticas con los tejidos que causan un calentamiento dieléctrico como ocurre con las microondas. Se ha encontrado experimentalmente que el producto de la frecuencia y la amplitud del campo magnético (el factor Hf) debe ser menor a $5 \times 10^9 \text{ Am}^{-1}\text{s}^{-1}$ para la aplicación segura de la hipertermia magnética (119).

La validez de la LRT es en condiciones en donde la amplitud del campo aplicado es pequeño en comparación con la coercitividad del material (en partículas de anisotropía grande). Diversos trabajos han utilizado recientemente la dependencia cuadrática del SPA $\approx H^2$ para ajustar los datos experimentales y probar la validez de la LRT de acuerdo con la relación establecida (ecuación 11):

$$SPA = AH_0^\lambda \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde A es una constante que depende las propiedades de las nanopartículas (susceptibilidad magnética inicial, tamaño, forma, etc.) y λ es un parámetro que estima la validez de la LRT y cuyo valor está en el intervalo de 1-2 (110,120).

2.3.3 Anisotropía magnética.

Como se ha discutido para los materiales multi- y monodominio sujetos a un campo magnético de alta frecuencia la pérdida de calor se da a través de sus ciclos de histéresis, la relajación de Néel y Brown (121). Sin embargo, el efecto de calentamiento también depende fuertemente de otros factores como el tamaño y distribución de partícula, la saturación de la magnetización, la frecuencia y amplitud del campo aplicado, polímeros de recubrimiento y la anisotropía magnética (86,89).

Recientemente, la anisotropía magnética se ha explorado en detalle puesto que en la nanoescala tiene un papel preponderante en el fenómeno de generación de calor. Dado que en los materiales superparamagnéticos las pérdidas de calor por histéresis son negligible, su anisotropía magnética resulta interesante.

Los nanomateriales pueden generar un mejor control en energía que su contraparte macro (*bulk*) debido a la anisotropía de superficie que asiste a la energía total de anisotropía (KV). Físicamente, es la energía requerida para cambiar la magnetización de una dirección particular a otra con respecto a su estructura u orientación cristalina. La energía de anisotropía contribuye al calentamiento, ya que esta es sensible a las interacciones con el campo magnético mediante las interacciones colectivas con otros nanocristales magnéticos. Esta anisotropía aumentada en las MNPs contribuye a incrementar las pérdidas durante la histéresis cuando son sometidas a un AC (91).

Las fuentes de anisotropía son cuatro: 1) magnetocristalina, 2) forma, 3) superficie/interface y 4) coloidal (medio de interacción).

La anisotropía magnetocristalina es dictada por la estructura del cristal, la cual determina la orientación preferida de los momentos magnéticos en relación a los ejes cristalográficos. La anisotropía de forma ocurre cuando ésta (elipsoide, bastón, cubo, etc.) dirige la orientación del momento magnético con respecto a su eje mayor o menor. La anisotropía de superficie/interface es debida a las asimetrías estructurales, como los cambios

en composición en las interfaces o fronteras de los cristales. La anisotropía coloidal o colectiva surge a partir de las interacciones dipolares entre las MNPs en suspensión en un líquido que permite grados de desplazamiento translacional o rotacional, originando la formación de estructuras de mayor orden como cadenas (59).

La energía total de anisotropía incrementa al disminuir el tamaño de partícula (91). Esta anisotropía aumentada en las MNPs contribuye a intensificar la pérdida de calor cuando se someten a un campo AC, generando un SPA elevado. Por lo tanto este parámetro se vuelve crítico para el control de la generación de la hipertermia magnética (86,91,122).

En el ámbito biológico, la anisotropía coloidal tiene un papel importante, puesto que el SPA generalmente se determina en el fluido acarreador de las MNPs, mientras que las condiciones intracelulares (viscosidad, temperatura, biomoléculas adsorbidas, etc.) modifican el arreglo de las MNPs inmovilizándolas en este microambiente. El ambiente intracelular confina las MNPs modificando sus propiedades coloidales y sus interacciones magnéticas entre partículas, lo que minimiza la energía libre total del coloide cuando este es sometido a un AC y, en consecuencia, sus propiedades de calentamiento. La optimización del SPA, considerando la anisotropía de las MNPs se ha demostrado por pocos trabajos reportados por Gonzalez-Fernández et al. (86), Lima et al. (114,123) y Goya et al. (123). Donde además, se recalca la importancia de utilizar intervalos estrechos de tamaño de partícula y mantener la funcionalización de sus superficies al mínimo para las aplicaciones biomédicas de hipertermia (86,124).

2.3.4 Funcionalización de las MNPs.

Las MNPs no recubiertas tienden a aglomerarse debido a sus fuertes interacciones magnéticas, las fuerzas de van der Waals y a su elevada energía de superficie. Su recubrimiento no solo tiene la función de estabilizarlas en solución electrostáticamente, protegerlas contra la degradación y oxidación de la superficie; también provee sitios para su funcionalización con compuestos catalíticos, medicamentos, biomoléculas de reconocimiento antígeno-anticuerpo, grupos funcionales para la unión con otros metales, etc.

Los metales comúnmente empleados para la funcionalización son el Au, Ag. Estos protegen a las nanopartículas de la corrosión y les confieren propiedades ópticas. Las cubiertas con SiO₂ les brindan estabilidad coloidal y ofrecen una superficie para su bioconjugación con diversas moléculas. En combinación con Gd son utilizados como agentes de contraste de tejidos para MRI y nanocalentadores en la región del tumor. El recubrimiento o incorporación de las MNPs con polímeros también ofrece una superficie orgánica de protección y funcionalización. Los polímeros comúnmente empleados son muy diversos (dextrán, polietilén-glicol, óxido de polietileno, poli-N-isopropil acrilamida, etc.), y coadyuvan a la entrega de medicamentos controlando su liberación y prolongan su circulación en sangre. Las MNPs también se han recubierto directamente con moléculas pequeñas (fenoles) para disminuir su diámetro hidrodinámico y evitar las modificaciones de sus propiedades magnéticas (27). Las MNPs con tamaños hidrodinámicos alrededor de 50 nm tienen una extravasación limitada. Los liposomas se han desarrollado tanto para encapsular nanopartículas magnéticas con medicamentos (hidrofóbicos o hidrofílicos) y aumentar su concentración local. Esta estrategia ha resultado exitosa en el tratamiento de distintos tumores. Las cubiertas con carbón no son muy frecuentes dado que se requieren elevadas temperaturas que llevan a la oxidación del hierro. Sin embargo, estas cubiertas han resultado muy efectivas como sustrato para el crecimiento de células nerviosas y en aplicaciones de MRI e hipertermia (125).

Debido a la intención de utilizar los nanomateriales magnéticos para la generación de calor en la hipertermia magnética. Se deben considerar diversos aspectos en su funcionalización para su aplicación intratumoral exitosa y la óptima elevación de la temperatura en su destino final. La funcionalización hace a las MNPs más compatibles con los sistemas biológicos y esta debe considerar su vía de ingreso. Para su administración *in vivo*, se han visualizado dos estrategias para llevar las MNPs a su sitio de acción. La primera es la inyección directa intratumoral con el fin de incrementar localmente el contenido de material magnético para obtener un efecto terapéutico del calor generado. El éxito de esta estrategia depende de la dosis, el control posterior de la distribución de las nanopartículas y su ubicación espacial en el tumor, además de su acción sinérgica con tratamientos como quimio y radioterapias, como en la terapia intracraneal con MNPs (108). Aunque esta

metodología se ha aplicado con éxito en tumores sólidos, este procedimiento no puede emplearse en tumores primarios blandos o metástasis (tumores pequeños de ~ 3 mm) (107,126).

La segunda estrategia consiste en introducir por vía intravenosa o aérea una solución de MNPs que se acumulen exclusivamente en su sitio blanco. Esta representa el mayor reto dado que deben considerarse los mecanismos biológicos limitantes como: la dosis tolerable de hierro, toxicidad, viscosidad y barreras fisiológicas de defensa del organismo.

La dosis máxima de hierro vía oral tolerable por el cuerpo humano es de 5 mg por kg de peso y las cantidades terapéuticas inyectadas directamente en el área del tumor están en el intervalo de 1 M. De esta dosis la cantidad de nanopartículas internalizadas por una célula está en el orden de picogramos, lo que significa que una pequeña porción de MNPs son capaces de incrementar la temperatura intracelular (119,127). Además de poseer una óptima eficiencia en la generación de calor, se debe asegurar una elevada internalización celular en su destino final. También se debe evitar su degradación y excreción mediante el sistema retículo endotelial (RES) (119).

Por este motivo, la mayor parte de los trabajos con aplicaciones biomédicas en el área de la hipertermia magnética se han enfocado al desarrollo de MNPs con momento magnético grande (elevada anisotropía magnética), rotación en un eje fácil que depende de la anisotropía y energía magnetocrystalina, mientras que, los recubrimientos multifuncionales deben asegurar su estabilidad coloidal intracelular, direccionar su localización en órganos y tumores e incrementar su internalización celular.

En cuanto a su forma, diversos estudios han demostrado que las MNPs (esféricas, dímeros, nano cubos, nanoflores, liposomas con MNPs) al interactuar con el ambiente celular disminuyen su SPA. Esto ocurre independientemente de su forma, propiedades magnéticas y composición. Debido a su interacción con la membrana celular, internalización y degradación de las MNPs que modifican su mecanismo de relajación. El confinamiento celular tiene un efecto variable en las propiedades magnéticas. Las MNPs

superparamagnéticas son mínimamente afectadas por el ambiente intracelular mientras que las ubicadas cerca del régimen ferromagnético su movilidad por Brown se ve completamente inhibida (Figura 13) (128). Derivado de estos estudios, los esfuerzos se han enfocado a determinar la mejor funcionalización de las MNPs para su interacción con las células, ya sea que es más adecuado que no interactúen con la membrana celular y sólo ocupen el espacio intratumoral o que fucionalizadas con polímeros termosensibles acarren agentes quimioterapéuticos para aumentar la efectividad de los tratamientos actuales (124). Los ligandos orgánicos (polímeros) e inorgánicos (sílice) también modifican sus propiedades magnéticas. Modifican su anisotropía y momento magnético de los átomos ubicados hacia la superficie de las nanopartículas. Diversos estudios corroboran que disminuyen su momento magnético y en consecuencia su magnetización (129).

El SPA también se ve disminuido por el espesor de la cubierta y el peso molecular de los polímeros. La eficiencia de calentamiento decrece con cadenas poliméricas largas excepto en MNPs con un tamaño grande. La estabilidad coloidal baja también tiene un efecto en la disminución del SPA. Diversos polímeros (dextrán, PEG, etc.) se utilizan para disminuir las interacciones dipolares y aumentar su estabilidad, considerando una longitud de cadena óptima para su desempeño intracelular. Una vez estabilizado el coloide, y para incrementar la cantidad de MNPs internalizadas en las células, se ligan con moléculas con receptores de membrana sobrepresados en tumores (HER-2, folato, etc.), para facilitar su reconocimiento e internalización. También se unen con agentes quimioterapéuticos, donde la hipertermia magnética utilizada para la entrega de medicamentos no requiere valores elevados de SPA como en la hipertermia sola (126).

2.3.5 Influencia de la funcionalización de las MNPs y vías de internalización celular.

Las interacciones entre MNPs y las células es un proceso muy dinámico que depende de las características de las nanopartículas (tamaño, forma, carga de superficie), de las propiedades de la membrana celular (fluidez, tipo de receptores) y del tipo celular. Esto determinará su vía de entrada y destino intracelular entre los distintos compartimentos.

Durante la internalización, diversas vías pueden ocurrir simultáneamente, siendo las rutas comunes de internalización la pinocitosis (internalización del fluido extracelular), endocitosis mediada por clatrina (CME) o por receptores (formación de vesículas endocíticas ~100 nm recubiertas por clatrina) y endocitosis dependiente de caveolina (vesículas 50-100 nm formadas por lípidos catiónicos y grupos amino) (Figura 14).

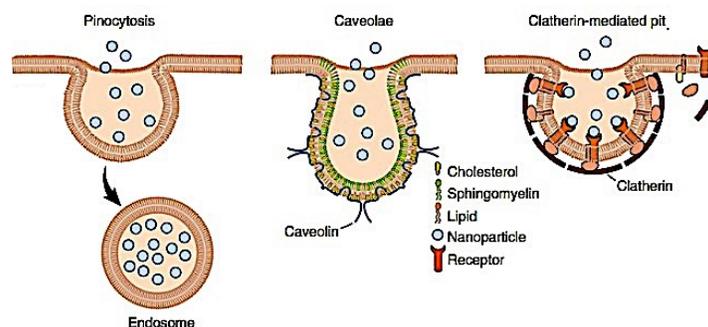


Figura 14. Esquema de las distintas rutas de internalización celular de las nanopartículas. Pinocitosis es el mecanismo de elección para MNPs de tamaño grande y micropartículas. La endocitosis mediada por caveolina es responsable de la internalización de nanopartículas aniónicas. Mientras que la endocitosis mediada por clatrina requiere de un ligando para su inducción (113).

El tamaño de las nanopartículas tiene influencia en la ruta de internalización celular. Así por ejemplo, MNPs con tamaños de 50 nm, además de tener la mayor tasa de internalización celular, son captadas más rápidamente por vesículas recubiertas con clatrina, que aquéllas con tamaños mayores (130). Se ha reportado que la formación de invaginaciones de membrana con clatrina (50-200 nm) son inducidas por el tamaño de las nanopartículas. Mientras que aquéllas de ~25 nm requieren de cantidades mayores de NPs aglomeradas para inducir la CME. Los mejores tamaños de NPs para la internalización están en el intervalo de 40 a 100nm, determinado por el tamaño de las vesículas de clatrina para la internalización.

La forma de las NPs también influye en la tasa y vía de internalización. Se ha encontrado que aquellas de formas que tienden a ser esféricas son más fácilmente internalizadas que las de formas alargadas (bastón, disco). A estas últimas le toma más tiempo a la célula rodearlas por la membrana celular (aún funcionalizadas), contrario a las

esféricas. Además se requiere un mayor número de NPs de formas alargadas para inducir la endocitosis (130).

La agregación de las MNPs también modifica la cinética de su internalización. Aunque se asume que las nanoformulaciones están estabilizadas para que las MNPs interactúen de forma individual con las células, éstas tienden a agregarse en presencia de proteínas (sangre, proteínas del medio de cultivo, etc.) del medio acarreador. A pesar de la efectividad de su funcionalización, esta se ve obstaculizada y es ineficiente al introducirse al medio biológico. Dado que su superficie se puede recubrir con opsoninas (que forman una biocorona) y en consecuencia se disminuye su internalización celular (131,132).

Las características de la carga de superficie de NPs catiónicas que interactúan con los fosfolípidos aniónicos que predominan en la membrana celular afectan su internalización, debido a que tienen una mayor superficie de contacto con las cargas negativas de la membrana y se induce su internalización mediante una rápida endocitosis. Sin embargo, los dominios en la membrana celular con lípidos catiónicos explican la internalización de NPs aniónicas. Este tipo de interacción con dominios catiónicos involucra una endocitosis mediada por caveolas y no la ruta clásica de CME (132).

A pesar de que una carga de superficie catiónica tendrá una mayor tasa de internalización, el uso de NPs catiónicas está limitado por su citotoxicidad, la cual se relaciona con su mecanismo de entrada y su vía de excreción (lisosomal). Este tipo de NPs ocasionan una ruptura más pronunciada de la membrana plasmática, mitocondrial y lisosomal en comparación con NPs aniónicas. Las NPs con carga neutra y zwitteriónica exhiben una disminución en su internalización y un menor daño estructural de la membrana celular (113).

La estructura molecular (polifenoles, glúcidos, etc.) también tiene un papel importante en la interacción con la célula aún más que la carga. Estudios recientes indican que modificaciones de la superficie de las NPs con diversos compuestos tienen una interacción de membrana distinta, la cual también varía con el tipo celular. Aquellos con más cadenas hidrofóbicas tienen una mejor interacción que aquellos con sólo una. Para aumentar

la especificidad e internalización celular se añaden a la superficie de las NPs, ligandos que se unen a receptores de membrana sobre expresados en células malignas. La eficiencia de este método depende del número de receptores y del tipo celular. Se ha demostrado que se obtiene una mayor internalización y efecto terapéutico (113).

Seguido a la internalización celular, otro aspecto importante es su localización intracelular donde finalmente ejercerán su efecto terapéutico. La funcionalización de la superficie de las MNPs también determina la vía de internalización. Después de su internalización generalmente se ubican en endosomas, los cuales tienen un pH ~5. Estos maduran a endosomas tardíos antes de fusionarse con lisosomas donde las MNPs son degradadas. Este proceso limita la entrega efectiva de sustancias terapéuticas o en el caso de aplicaciones de hipertermia magnética, afecta la agregación de las MNPs intracelularmente modificando su capacidad de calentamiento (113).

Algunas moléculas provenientes de aceites esenciales contienen compuestos de cadena pequeña como los terpenoides o fenoles que pueden permear fácilmente la membrana celular (32). Aunque se han reportado sus efectos como inhibidores del crecimiento microbiano debido a su efecto de disminución de gradiente de protones en la membrana celular, también tienen un efecto antioxidante de uso terapéutico en múltiples patologías como el cáncer, en enfermedades cardiovasculares y procesos neurodegenerativos (27). Evidencia reciente indica que tienen un efecto neuroprotector suprimiendo la neuroinflamación y promueven la plasticidad sináptica mejorando el desempeño neurocognitivo (133). Las propiedades medicinales anticancerígenas de los polifenoles está extensamente documentada (134–137). Se han reportado algunos trabajos donde emplean MNPs como acarreadores de polifenoles que tienen actividad antitumoral. Estos combinados con un AC tienen resultados prometedores para el tratamiento de cáncer de mama, próstata y gliomas (62,138–140).

2.3.6 Efectos biológicos de la hipertermia.

Debido a que la hipertermia no es mutagénica, ni mielosupresora y combinada con quimio o radioterapia tiene un efecto sinérgico, se ha empleado como adyuvante en la terapia contra el cáncer (89,141).

La evidencia de que las células cancerosas son más sensibles que las células sanas, a temperaturas por encima de 41°C, han llevado al uso de MNPs como mediadores o generadores de calor. La respuesta biológica del tumor depende tanto de sus características intrínsecas (tipo celular) como del medio que lo rodea. Se ha reportado que modificaciones de este microambiente (ejemplo, su vascularización) pueden aumentar o disminuir su respuesta al calor (142).

En general, una masa tumoral tiene un mayor volumen de agua que no puede disipar el calor debido a que la microvasculatura está desorganizada y no regula el flujo sanguíneo ocasionado una circulación deficiente (hipoxia). La distribución de la vasculatura de un tumor es muy caótica y depende del tipo de tumor y tamaño. El flujo sanguíneo disminuye a medida que crece el tumor, debido al deterioro progresivo de los vasos sanguíneos por la rápida proliferación celular sobre estos. En consecuencia la disipación del calor por el flujo escaso es lento en comparación con los tejidos normales, y por lo tanto, durante el calentamiento de los tejidos la temperatura aumenta más en el tumor que en los tejidos normales. La hipertermia puede inducir tanto la apoptosis como la necrosis, ésta susceptibilidad está en función del tipo celular (143), siendo la inducción de la muerte celular controlada (apoptosis), la que se desea controlar por hipertermia magnética con MNPs (144).

En intervalos de temperatura de 40-43 °C, la mayoría de las células cancerosas tienden a morir mientras que las sanas sobreviven y al incrementar la temperatura >43°C por tiempo prolongado el daño es irreversible (Figura 15). Los efectos de la hipertermia en la muerte celular se han probado en diversas líneas celulares en experimentos *in vitro* y modelos *in vivo* (126). En este aspecto es necesario aclarar que, cuando los experimentos de hipertermia se realizan en células en cultivo se denominan *in vitro*, para recalcar la diferencia donde se han utilizado modelos animales o pacientes, donde se considera que la hipertermia magnética se realizó *in vivo* (89). Esto debido a que los dispositivos y su configuración, para cuantificar las mediciones del incremento de la temperatura son distintos en ambos modelos de experimentación (89,107).

Los efectos de la hipertermia en las curvas de crecimiento celular en experimentos *in vitro* muestran que hay un proceso de dos etapas en la muerte celular (Figura 15). En temperaturas entre 41-43 °C el crecimiento celular no se ve disminuido y las curvas muestran un ligero descenso en la viabilidad celular. Indicando que estos rangos de temperatura no son letales (termotolerancia) y el crecimiento celular puede continuar con la fracción que sobrevive. Mientras que en rangos de temperatura >43 °C, el crecimiento celular tiene una tendencia lineal que decae rápidamente al inicio de la exposición al calor, lo que refleja un efecto irreversible debido a un daño letal seguido por una muerte exponencial. Aunque se puede inducir muerte celular a temperaturas menores a 43 °C, ésta es marcadamente menor en comparación con temperaturas por encima de 43 °C (145).

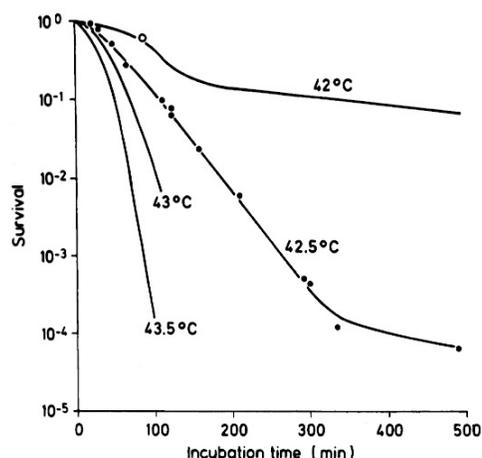


Figura 15. Curvas de crecimiento en fase exponencial de una línea celular cancerosa. El gráfico muestra la relación dosis-respuesta de la muerte celular por el efecto del tiempo de exposición a la temperatura. A 42 °C se distingue que el proceso de muerte celular ocurre en dos etapas, marcado por el detenimiento del crecimiento celular al inicio de la exposición al calor, reflejando un efecto reversible y no letal, que es seguido por una muerte celular exponencial. El efecto de muerte celular por hipertermia se incrementa en temperaturas >43 °C (145).

A partir de estos estudios, se ha derivado el concepto de dosis térmica (D), la cual se obtiene a partir del tiempo de exposición (t) a una temperatura determinada (T), definida como $D=tR^T$, con $R=2$ (≥ 43 °C) y $R=4$ (<43 °C). Las dosis térmicas requeridas para inducir la muerte celular por hipertermia varían en un factor de 10 en diversas líneas celulares. La energía térmica para inducir la muerte celular está muy relacionada con la requerida para

ocasionar la desnaturalización de las proteínas del orden de 140 kcal/mol (146). En la práctica médica y en experimentos *in vitro*, los efectos citotóxicos de la hipertermia se han observado por encima de la temperatura fisiológica normal de un adulto (35-37 °C), en intervalos de temperatura entre 40 a 46 °C, sin daño a los tejidos adyacentes (89,94). La aplicación del campo magnético en los experimentos de hipertermia *in vitro* debe considerar tanto la termotolerancia del tipo celular como la generación de la temperatura en el intervalo donde se han documentado sus efectos terapéuticos.

Las variaciones en la susceptibilidad al calor en los cultivos celulares también están de acuerdo con su fase del ciclo celular. En general, la mayor sensibilidad se ha observado en células en fases M y S, donde las células entran en un estado de muerte celular (apoptosis o necrosis) lenta después de aplicar la hipertermia. Mientras que las expuestas durante la fase G₁ siguen una muerte celular rápida (Figura 16). Estas variaciones de muerte celular entre las distintas etapas del ciclo indican la diversidad de mecanismos moleculares involucrados durante la aplicación de la hipertermia (147).

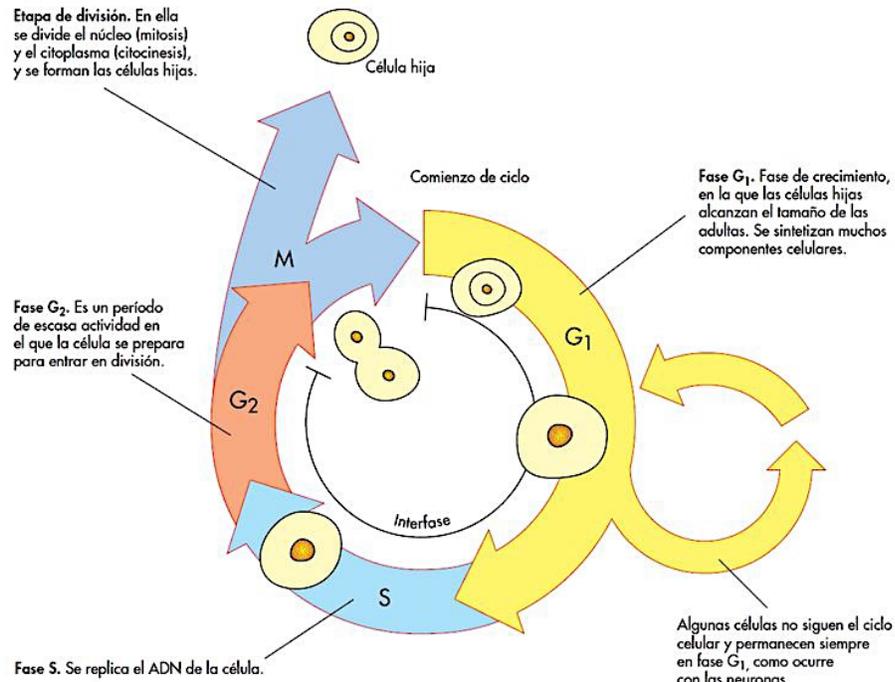


Figura 16. Fases del ciclo celular (148).

Los procesos bioquímicos afectados por el calor son diversos. Se inhibe la síntesis del DNA y RNA así como los mecanismos de reparación y respiración celular (144,149). La morfología de las membranas cambia, se tornan más fluidas y permeables debido a la agregación de proteínas e inhibición de los mecanismos de transporte, que morfológicamente corresponde con abultamientos en diversas regiones de la membrana (150). Se inhibe fuertemente la síntesis de las DNA polimerasas. Las mitocondrias disminuyen en número y tienen alteraciones en sus crestas lo que aumenta la síntesis de proteínas de estrés calórico (HSP) (151). A consecuencia de la síntesis aumentada de proteínas el nucléolo es muy evidente. Se alteran los procesos de reparación del citoesqueleto (150,152). El calor incrementa el flujo de los radicales de oxígeno lo que lleva en parte a una citotoxicidad. Estos fenómenos en conjunto aumentan la apoptosis en las células tumorales (93,144,153).

La apoptosis es un proceso de muerte celular balanceado presente en las células normales pero carente en las células tumorales. En estas, la apoptosis es reducida debido al

desbalance de proteínas pro- y anti-apoptóticas como Bcl-2, p53, caspasas y de los inhibidores de apoptosis (IAPs). La hipertermia tiene un efecto de inducir la apoptosis cambiando la expresión de estos genes. Por ejemplo, en células de melanoma la hipertermia tiene el efecto de activar caspasas no convencionales como las 3 y 7 (142).

Otro efecto biológico importante de la hipertermia es la capacidad de aumentar la presentación de antígenos a las células efectoras (macrófagos, células T, NK, neutrófilos) para la producción de proteínas HSP. El reclutamiento de estas células en el área del tumor lleva al estado de inmunosupresión. Por otra parte, la hipertermia también tiene la capacidad de aumentar la perfusión sanguínea y la oxigenación en el tumor disminuyendo el estado de inmunosupresión e incrementando la efectividad de la inmunoterapia que induce a una inmunidad adaptativa (142).

El intervalo de temperatura de 40-42 °C favorece la angiogénesis mejorado la perfusión y oxigenación de los tejidos y debido al efecto sensibilizante en las células tumorales, incrementa la respuesta celular en combinación con la radio y quimioterapia. La actividad de los medicamentos anticancerígenos con la hipertermia en la mayoría de los casos tiene un efecto aditivo. Estos aumentan su efectividad a temperaturas >42 °C mientras que, por debajo de esta la termo tolerancia induce la acumulación de proteínas HSP y la resistencia a los medicamentos (146).

2.4 Enfermedades neurodegenerativas, tumorales y su relación con las células microgliales.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de la estructura y función de las neuronas a menudo asociadas con la muerte neuronal. Algunos ejemplos de esto son el Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral, las enfermedades priónicas, derrame cerebral, trauma craneano, entre otras (49).

A través de los años el impacto de estas enfermedades en la salud a nivel mundial se han desestimado. En la actualidad, las innovaciones tecnológicas han resultado en un aumento de la calidad de vida con lo cual los seres humanos tienden a vivir más años. Estas poblaciones con un porcentaje mayor de adultos en la tercera edad manifiestan un incremento

de las enfermedades neurodegenerativas. En el caso de enfermedades como el Parkinson se manifiestan en etapas tempranas de la vida adulta inclusive antes de los 50 años.

Estas patologías reducen considerablemente la calidad de vida del adulto y constituyen el 12% de las muertes a nivel mundial, de las cuales, el 85 % corresponden a problemas cerebrovasculares, efecto secundario a una enfermedad neurodegenerativa. Se estima que estos desórdenes ocasionan un gasto económico mayor que los tratamientos para el cáncer (154).

Los estudios de los mecanismos moleculares y celulares que afectan los genes y las vías metabólicas que ocasionan la neurodegeneración están en progreso. La evidencia reciente indica que las células de la microglía tienen un papel central en los procesos inflamatorios dentro del sistema nervioso central y están asociadas con diversas enfermedades, tanto neurodegenerativas como en procesos de tumorigénesis (glioblastoma multiforme).

Las células de la microglía son células residentes del sistema nervioso central (CNS), que se pueden transformar a macrófagos para realizar funciones inmunológicas. Están involucradas en la respuesta inmune, en el mantenimiento de la integridad de las conexiones sinápticas y en la neurogénesis de lesiones sinápticas (155). Son extremadamente sensibles a los cambios patológicos del CNS y responden rápidamente adoptando una forma ameboidea. La microglía tiene distintos estados de activación de gran plasticidad similar a los macrófagos. El estado quiescente es una forma “inactiva” que realiza funciones de vigilancia. En esta forma se distinguen dos estados de activación, M1 y M2 (Figura 17). La M1 es la responsable de secretar moléculas inflamatorias (citocinas, óxido nítrico, etc.) que producen un daño neuronal. Mientras que la M2 es un estado parecido a un macrófago que bloquea los efectos de las M1 y promueve la reparación de los tejidos mediante la secreción de neurotrofinas. Una activación prolongada o excesiva puede desencadenar procesos neurodegenerativos y neoplásicos (156).

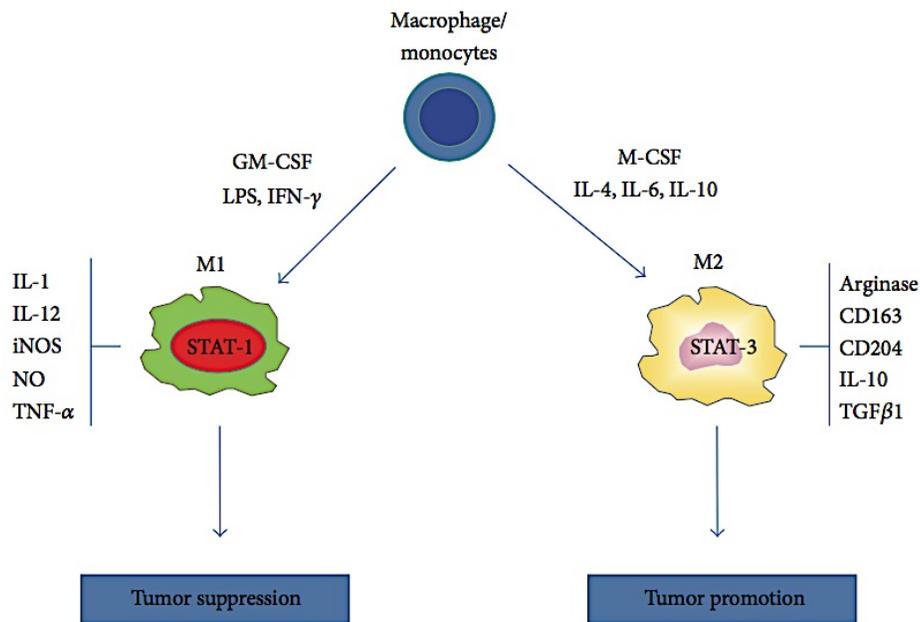


Figura 17. Célula de la microglía en el CNS. En presencia de factores estimuladores como el factor estimulante de colonias de macrófagos granulocitos (GM-CSF), interferón (IFN) y lipopolisacáridos (LPS), los monocitos se diferencian a macrófagos tipo 1. En presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucinas (IL-4,6,10) y moléculas inmunosupresoras (corticoesteroides, vitamina D3, prostaglandinas), los monocitos se diferencian a macrófagos tipo 2. Las células M1 tienen una elevada actividad antimicrobial, estimulan el sistema inmune y presentan citotoxicidad hacia los tumores. Estas activan la transcripción del gen *STAT-1* (*signal transducer and activator of transcription*). Las células M2 con una elevada capacidad de fagocitosis, promueven la reparación de los tejidos y la angiogénesis; pero favorecen el crecimiento del tumor y expresan el gen *STAT-3* (157).

Las células de la microglía tienen una participación activa en los depósitos de placas amiloides en la enfermedad de Alzheimer. En pacientes con VIH y demencia, la neurodegeneración progresiva es consecuencia de la activación de la microglía infectada con el virus. En la enfermedad de Parkinson, la sobreproducción de óxido nítrico por parte de la microglía ocasiona la muerte de las neuronas dopaminérgicas ocasionando su degeneración. En la esclerosis múltiple, la rápida destrucción de los oligodendrocitos es seguida por una invasión de células microgliales activadas, además de su papel en todos estos procesos neurodegenerativos relacionados con el envejecimiento. La activación de la microglía es

seguida a un trauma craneano, donde pueden ocasionar un daño neuronal secundario asociado a la pérdida de funciones cerebrales (158,159).

En las lesiones tumorales del CNS las células de la microglía (M1 y M2) constituyen de un 5-10 % de la población de la glía, y este número puede incrementarse a un 50% dentro de tumores malignos como el glioblastoma multiforme. El papel de estas células denominadas TMAs (*tumor associated macrophages*) no es del todo claro en este tipo de patología, si tienen una función para la supervivencia del tumor o antitumoral (Figura 16) (157,160).

Debido al papel de la microglía en los procesos de neurodegeneración y tumorales, su estudio es de interés en el área biomédica. Además, dada su ubicación cercana a las regiones tumorales o su infiltración directa, se ha propuesto utilizarlas como acarreadores autólogos o caballos de “Troya”, para la entrega de cantidades cuantiosas de medicamentos o nanopartículas (MNPs) en las regiones tumorales (Figura 18). Esta especificidad de los macrófagos por las áreas dañadas del CNS ya ha sido utilizada para localizar gliomas mediante MRI (160,161).

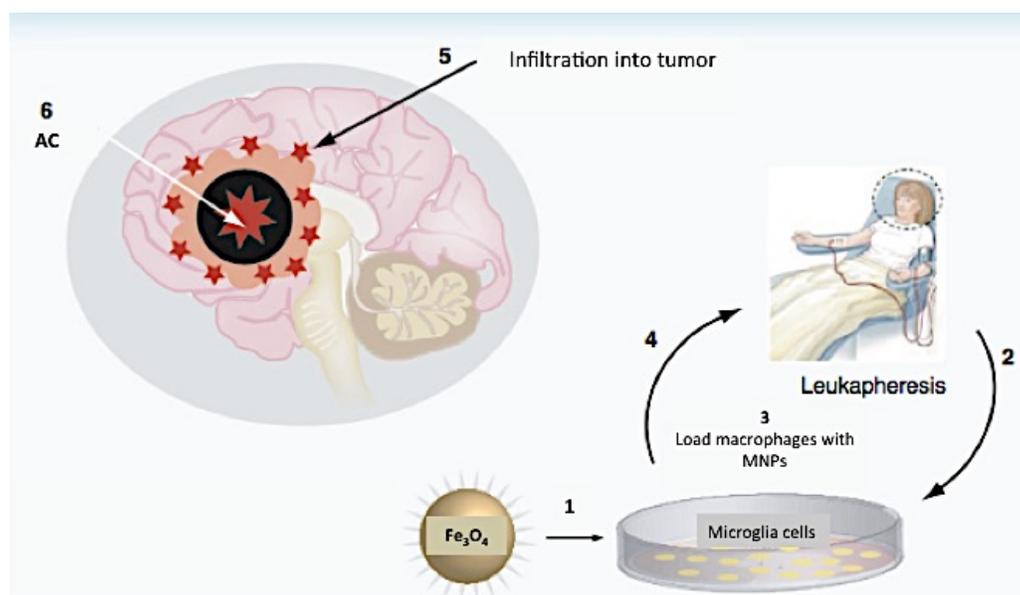


Figura 18. Esquema teórico de la hipertermia magnética mediada por la entrega de MNPs mediante macrófagos autólogos. (1) MNPs funcionalizadas. (2) Macrófagos aislados y cultivados (leucoferesis) a partir de sangre periférica del paciente. (3) Células de la microglía cocultivadas con MNPs y (4) reintroducidas al paciente. (5)

Infiltración de los macrófagos en la región del tumor. (6) Aplicación del AC para la generación de la hipertermia magnética intracraneal en la región del tumor (161).

Las estrategias para el diagnóstico y tratamiento temprano de las enfermedades neurodegenerativas y neoplasias poco invasivas aún están limitadas debido a las barreras biológicas del cerebro que limitan el acceso de la mayoría de los medicamentos y los agentes de contraste. Las MNPs *per se*, representan una innovación tecnológica atractiva en esta área debido a su versatilidad de atravesar la barrera hematoencefálica para incrementar la concentración de los medicamentos o agentes de contraste dentro del cerebro (49).

Los progresos en la nanotecnología ofrecen el desarrollo de tecnología que abre una nueva posibilidad de tratamiento y terapia para las enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, las MNPs son las candidatas que pueden emplearse como agentes multifuncionales debido a su habilidad única de guiarse por un AC y generar de forma altamente específica la hipertermia magnética intracraneal. Por lo que es determinante desarrollar diversos modelos de estudio *ex – vivo* para determinar la posibilidad de la terapia. Estos involucran líneas celulares de la microglía (160). Puesto que su proliferación es limitada, se requieren aislar en fresco a partir de 15-30 cerebros de ratón para obtener una cantidad considerable de células para experimentación. El estudio de los factores que modulan su activación deben seguirse desarrollando en modelos de cultivo *in vitro*. Una forma de obtener células con tasas de reproducción elevadas y con poblaciones homogéneas, de bajo costo es inmortalizando genéticamente líneas primarias de microglía. En la actualidad, hay varios modelos de líneas celulares para examinar el fenómeno de neuroinflamación. Estos incluyen cultivos primarios de microglía (derivadas de la corteza de rata o ratón) y líneas celulares inmortalizadas (BV-2, N-9, HMO6, EOC, HAPI) (156).

En este trabajo nos enfocamos en el efecto de la hipertermia magnética *in vitro* con MNPs provenientes de síntesis biológicas (extractos de canela y vainilla) en la línea celular BV-2, por lo cual se describirá brevemente su biología.

2.4.1 Modelo *in-vitro* de estudio: células de la microglía BV-2.

Las células BV-2 son una línea celular derivada de un cultivo primario de microglía de la médula ósea de murino, la cual se ha inmortalizado infectándola con el retrovirus J2 (*v-raf/v-myc*). Esta línea celular tiene funciones similares a la microglía primaria. Retiene en cultivo la mayoría de las funciones morfológicas y fenotípicas de células de la microglía aisladas directamente de los murinos (162).

2.4.2 Tasa de crecimiento de las células BV-2.

La internalización de las MNPs depende de las características fisicoquímicas de la superficie de las nanopartículas. Esto determina la cantidad que es internalizada y la ruta que seguirán intracelularmente (endosomal, lisosomal). La internalización también depende del tipo celular, estado metabólico y fase del ciclo celular, debido a que el tiempo que transcurre entre cada fase varía dentro del tipo celular (Figura 16) y se afecta significativamente la concentración de nanopartículas llevando a su disminución intracelular con cada ciclo de duplicación. Así, previo a la incubación de las células BV-2 con MNPs es necesario considerar el tiempo requerido de la población celular duplicar su número, es decir su tiempo de duplicación (T_D). Después de varios ciclos de duplicación se diluye la concentración intracelular de MNPs y en consecuencia afectará la elevación intracelular de la temperatura al aplicar el AC. Entonces, el tiempo de duplicación provee una medida del tiempo requerido para que la línea celular produzca su siguiente generación (g) y mantener una concentración intracelular estable de MNPs para los experimentos de hipertermia.

El T_D se define como el número de generaciones que han transcurrido durante un intervalo de tiempo t/t_D , por lo cual $g=t/t_D$. El número total de células (N) es exponencial con respecto del tiempo (163) (ecuación 12):

$$N = N_0 \cdot 2^g \quad \text{Ecuación 12}$$

Para obtener la relación lineal entre el tiempo y el número de células tenemos que (ecuación 13):

$$N = N_0 \cdot 10^{kt} \quad \text{Ecuación 13}$$

Donde k es la constante específica de crecimiento de cada tipo de cultivo (células BV-2) calculada experimentalmente y se relaciona del siguiente modo (ecuación 14):

$$k = \frac{\log_{10} 2}{T_D} \quad \text{Ecuación 14}$$

donde la pendiente de la representación gráfica y el T_D están estrechamente relacionados. A partir del ajuste de los datos experimentales se determinó que el T_D fue de 31.4 horas (Figura 19). Los datos del proveedor indican un $T_D = 48$ horas, la diferencia obtenida se debe a la variación en la formulación del medio de crecimiento del laboratorio, pH, oxígeno disuelto y condiciones ambientales. En este caso, para tiempos >32 horas se observó el estado en confluencia de la línea celular. Donde la densidad celular lleva a una disminución del crecimiento poblacional por la acumulación de metabolitos secundarios. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la fase exponencial del crecimiento con un tiempo límite de 72 horas.

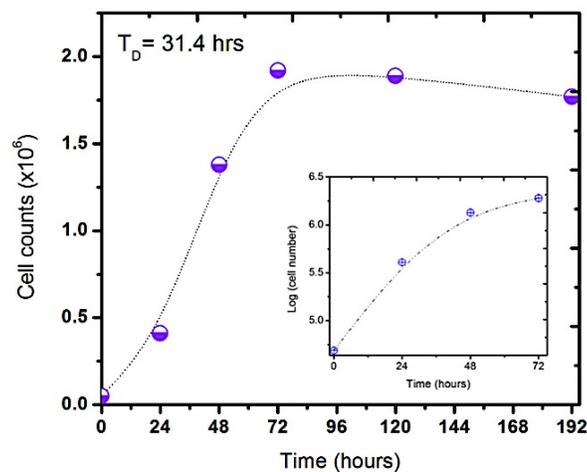


Figura 19. Curva de crecimiento para las células BV-2. En el inserto el ajuste $\log N$ dentro de la fase de crecimiento exponencial del cultivo celular con un $T_D = 31.4$ horas.

2.5 Síntesis de las MNPs.

Como se ha expuesto en la sección 2.1, debido a su alta versatilidad y actividad catalítica los nanomateriales de hierro son empleados extensamente en diversos campos de la industria. Estos tienen aplicaciones en área de la alimentación, médica, sensado molecular, en la degradación de contaminantes ambientales, etc. La mayoría se sintetizan por dos vías a partir del material en la macroescala (*top-down*) o de su ensamble molecular (*bottom-up*). En el primero, el material (*bulk*) es fraccionado hasta su escala nanométrica, mientras que en la segunda los átomos o moléculas son ensamblados para formar estructuras en la nanoescala. Basándose en estas metodologías, diversas estrategias se han utilizado para la síntesis de las NPs de hierro, las cuales incluyen métodos químicos, físicos y biológicos o síntesis verdes (Figura 20) (164).

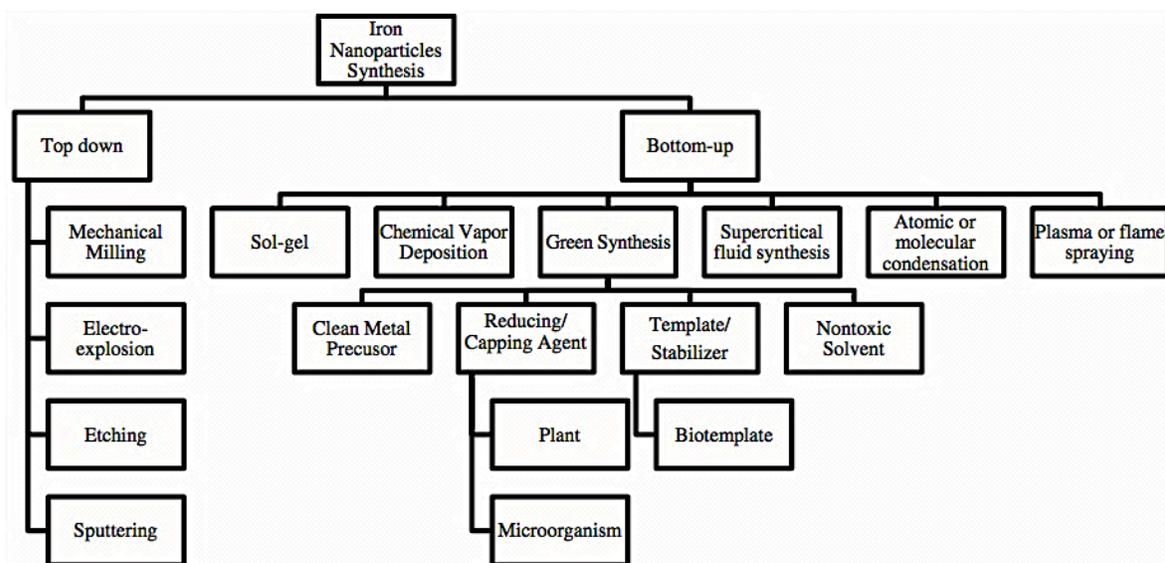


Figura 20. Metodologías de síntesis de NPs de hierro (164).

Sin embargo, las metodologías actuales de síntesis química y física involucran inevitablemente algunas desventajas como un costo elevado por requerir equipo especializado y la generación de contaminación ambiental debido a la producción de compuestos químicos secundarios derivados del proceso. Ejemplo son los agentes reductores neurotóxicos (borohidruro de sodio, hidracina hidrato, etc.), de recubrimiento y solventes

orgánicos generalmente utilizados considerados peligrosos, dado que suponen un riesgo para la salud, al ambiente y representan un riesgo biológico. Algunos de estos métodos populares de síntesis emplean precursores tóxicos como el pentocarbonilo de hierro, que requieren de la remoción de su superficie del exceso de los reductores tóxicos de las NPs y necesitan grandes cantidades de agua durante su preparación. Adicionalmente, estas metodologías (sol-gel, sonoquímica, electroquímica) generalmente producen NPs con superficies hidrofóbicas no aptas para aplicaciones biomédicas (109).

Dado que los nanomateriales se incorporan cada vez más a la vida cotidiana del ser humano aumentando su exposición a estos (Figura 21), es necesario reducir su toxicidad así como buscar vías alternativas de producción escalable amigables con el ambiente.

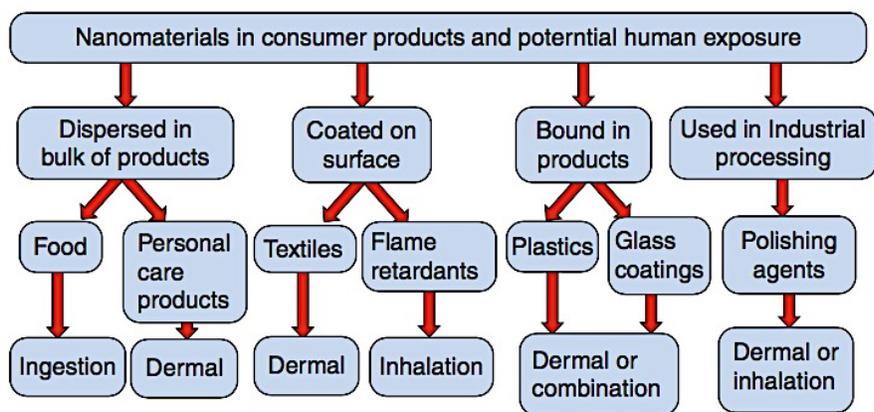


Figura 21. Nanomateriales en productos de uso común y sus vías de exposición con el humano (113).

En la actualidad se ha estudiado la producción alternativa de nanomateriales de hierro mediante las metodologías de síntesis o química verde para obtener nanomateriales novedosos, amigables con el ambiente, seguros para el consumo humano y comercialmente sustentables. La química verde se define como una disciplina emergente que busca alcanzar el desarrollo sustentable, respetando el ambiente, con un beneficio social y competitividad en el mercado. Ésta pretende mejorar el aprovechamiento de los recursos naturales para las generaciones presentes y futuras. Los principios por los que se rige la química verde son: prevenir de la generación de residuos (es mejor evitar su producción que tratarlos posteriormente), eficiencia atómica o aprovechamiento al máximo de todos los materiales

utilizados en el proceso (medir su rendimiento, evaluando el grado de incorporación de los reactivos en el producto final), desarrollar síntesis no-peligrosas, diseño seguro, disolventes y auxiliares seguros (las sustancias químicas deben ser de baja toxicidad y garantizar la función específica), diseño de eficiencia energética, uso de materiales renovables, control de derivados o subproductos, catalizadores seguros, diseño de sustancias para un tiempo de vida media corto (productos de fácil degradación que no persistan en el ambiente), prevención de contaminantes, química segura y prevención de accidentes (165,166). De forma general, la química verde busca diseñar procesos que minimicen o eliminen la generación de residuos y el riesgo del diseño de un proceso químico.

En este contexto, dentro de los principios de la química verde se considera como nanomaterial obtenido por vía verde aquel donde se disminuye o no se utilizan agentes reductores tóxicos, se reemplaza algún componente como agente de recubrimiento o solvente por uno de menor toxicidad y cuya producción de compuestos secundarios derivados de las reacciones químicas es mínimo (167).

Así, las metodologías de síntesis de nanomateriales por química verde están encaminadas a la investigación y desarrollo, de metodologías alternativas a las síntesis químicas orgánicas que comúnmente emplean compuestos derivados del sector petroquímico, catalizadores, polímeros, etc., para la obtención de MNPs. Los cuales durante su procesamiento ocasionan problemas de salud para quién trabaja con estos reactivos y generan contaminación ambiental por sus residuos tóxicos industriales. Dentro de la química verde se distinguen diversas metodologías (Figura 20), como se ha mencionado previamente, están las que utilizan reactivos químicos de baja toxicidad al ambiente, las que reemplazan los solventes orgánicos tóxicos por aquellos de menor riesgo y las que emplean materiales renovables provenientes de fuentes naturales (microorganismos, plantas, etc.), para el crecimiento, biorreducción o recubrimiento de las sales metálicas en solución (164) comúnmente denominada biosíntesis (168).

El desarrollo de metodologías de síntesis de nanomateriales amigables con el ambiente, sustentables y de bajo costo son de gran valor, dado que disminuirán el impacto

ambiental de los residuos tóxicos y no comprometerán la capacidad de futuras generaciones para satisfacer sus necesidades.

Considerando estos conceptos de la química verde, en este trabajo, se utilizó una vía amigable con el ambiente para favorecer la biorreducción, crecimiento y recubrimiento de MNPs, utilizando en parte extractos acuosos vegetales de canela y vainilla, por lo cual, se describirán las generalidades de la biosíntesis en diversos sistemas biológicos y el de nuestro interés con extractos vegetales en disolvente acuoso.

2.5.1 Biosíntesis de las nanopartículas metálicas.

Una metodología de síntesis de nanopartículas considerada como química verde es la biosíntesis o biorreducción (Figura 20), la cual se basa en el uso del organismo completo, su biomasa, extractos o biomoléculas de origen biológico para la reducción de sales metálicas para la producción de nanomateriales o nanopartículas metálicas (Au, Ag, Pt, Zr, Pd, Fe, Cd, TiO₂, ZnO₂, etc.). La biosíntesis de nanopartículas se ha observado en numerosos sistemas biológicos como virus, bacterias (169), hongos (170), insectos, peces, aves (171), algas, plantas (20,172), mamíferos (173) y líneas celulares heterotróficas humanas (172). La ventaja de su obtención mediante sistemas biológicos es una producción controlada a nivel molecular. Así, las nanopartículas obtenidas por biosíntesis presentan estructuras altamente definidas, con morfologías sofisticadas y estrecha distribución de tamaño (Tabla 3).

La complejidad de estos sistemas impide establecer la naturaleza exacta de los mecanismos involucrados en el proceso de biosíntesis, por lo cual se han aislado los diversos componentes celulares para entender el proceso subyacente de expresión para la reducción de los metales.

Tabla 3. Lista de algunos organismos o sus biomoléculas bioreductoras para la síntesis de NPs (169,172,174,175).

Organismo	Nanopartícula (s)	Localización /morfología/ biomolécula reductora	Tamaño (nm)
<i>Bacillus subtilis 168</i>	Au, Fe ₃ O ₄	Octaédros dentro de la pared celular Esferas	5-25 60-80
<i>Lactobacillus sp.</i>	Au, Ag, Au-Ag	Hexagonales, en la periferia de la membrana celular	20-50
<i>Magnetotactic bacterium</i>	Fe ₃ O ₄	Octaédros, cubo-octaédros. Interior de la célula	7.5
<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	Fe ₃ O ₄	Cubo-octaédros, dentro de la célula. Proteína Mms6	50
<i>Actinobacter spp.</i>	γ-Fe ₂ O ₃	Esferas, extracelular por la enzima hierro reductasa	10-40
<i>Themophilic bacteria</i>	Fe ₃ O ₄	Octaédros	<12
<i>Aspergillus flavus</i>	Ag	Pared celular	8.92
<i>Verticillium sp.</i>	Au	Esféricas y quasi-hexagonales, en la pared celular y citoplasma	20 ± 8
<i>Trichothecium sp.</i>	Au	Triangulares, hexagonales, extracelulares	5-200
<i>Fusarium oxysporum</i>	Au	Esféricas y triangulares, extracelulares	20-40
<i>Verticillium sp.</i>	Fe ₃ O ₄	Cubo-octaédros, extracelulares	100-400
<i>Rhodobacter capsulatus</i>	Au	Carotenoides y NADPH	<100
<i>Verticillium sp.</i>	Fe ₃ O ₄	Proteína de 55 y 13 kDa	20-50
<i>Schizosaccharomyces cerevisiae</i>	Sb ₂ O ₃	Quinona unida a la membrana celular y oxidoreductasa citosólica	3-12
Virus del mosaico del tabaco (TMV)	SiO ₂ , CdS, PbS y Fe ₃ O ₄	Glutamato y aspartato	ND
<i>Sargassum wightii</i>	Au	Extracelular	8-12
<i>Sargassum muticum</i>	Fe ₃ O ₄	Cúbicas, extracelulares producidas con polisacáridos sulfatados del extracto	18 ± 4
<i>Chlorococcum sp.</i>	Fe ₃ O ₄	Esféricas, en la membrana celular producidas por polisacáridos aminados y con grupos carbonilo y glicoproteínas	20-50
<i>Conodiscus granii</i>	SiO ₂	Esféricas, en la pared celular	100-200
<i>Cinnamomum camphora</i>	Au, Ag	Extracelular	55-80
Línea celular de riñón HEK-293	Au	Citoplasma	20-100

Vitamina B2	Au, Pt	Esferas, nano-bastones, nano-alambres	5-12
<i>Apis mellifera</i>	Fe ₃ O ₄ , Fe ₂ O ₃	Antenas, cabeza, tórax, abdomen	20-100
<i>Oncorhynchus nerka</i>	Fe ₃ O ₄	Tejido etmoideo	48
<i>Columba liva</i>	Fe ₃ O ₄	Pico superior	1-5
<i>Miniopterus fuliginosus</i>	Fe ₃ O ₄	Cerebro	ND

ND – No determinado

La síntesis de NPs por biorreducción es un proceso ampliamente distribuido en todos los seres vivos. Aunque se ha relacionado con los organismos (bacterias, hongos, levaduras, algas y plantas) capaces de absorber y retener metales de suelos y aguas contaminadas para su descontaminación o biorremediación. También es importante para la producción de nanopartículas de órganos involucrados en la magnetorecepción del campo magnético terrestre, en la formación de estructuras como exoesqueletos de sílice, en la coloración iridiscente del plumaje en aves, etc. Todos estos sistemas biológicos capaces de sintetizar nanomateriales para sus necesidades específicas son de interés para la química verde. Dado que estas síntesis ocurren en condiciones de pH neutro a temperatura y presión ambiente. Es posible adaptar estos mecanismos bioquímicos y moleculares en el laboratorio para la obtención fácil y a gran escala de nanomateriales amigables con el ambiente (176,177).

La síntesis verde que emplea extractos de plantas se ha utilizado como una alternativa amigable con el ambiente. Los extractos vegetales actúan como agentes reductores de sales metálicas para generar nanopartículas. Se ha reportado la síntesis exitosa de nanopartículas metálicas y MNPs empleando biomasa de alfalfa, extractos de hojas de té, sorgo, geranio entre otros (Tabla 4) (169,172,178).

En particular la biosíntesis de nanopartículas metálicas como la magnetita se ha explorado en bacterias, hongos y plantas, de las cuales, las plantas como los autótrofos fotosintéticos terrestres predominantes, representan una fuente inagotable, sostenible y renovable para la síntesis de NPs, siendo los extractos vegetales los que tienen la mayor ventaja que el resto de los organismos, ya que no requieren de metodologías costosas para su mantenimiento como los cultivos microbianos, de tejidos vegetales, etc. Los extractos vegetales en comparación con los microorganismos reducen en menor tiempo los iones

metálicos (minutos a horas), lo cual depende de la especie de planta y concentración de los fitoquímicos (170,172).

Tabla 4. Biosíntesis de nanopartículas metálicas y MNPs de Fe₃O₄ por algunos organismos del reino vegetal (172,175,178).

Nombre botánico	Nombre trivial	Bioacumulación en el organismo / extracto	NPs	Morfología y localización	Tamaño (nm)
Acumulación intracelular					
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Brotes, raíz	Ag	Icosaedros	2-4
<i>Sesbania drummondii</i>	Frijoles silvestres	Brotes y raíz	Au	Esféricas, citoplasma	6-20
<i>Phragmites australis</i>	Carrizo	Raíz	Cu	Esféricas, cubo-octaédros	1-1.5
<i>Glycine max</i>	Soya	Brotes	Fe ₃ O ₄	Esféricas	8
Síntesis extracelular					
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Biomasa	Au Ir	Icosaedros, Decaedros	~100
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	Biomasa	Au	Tetraédros, decaédros hexagonal, Icosaédros	10-30
<i>Pelargonium graveolens</i>	Geranio	Tallo, hoja, raíz	Au, Ag	Decaedros, icosaédros, esféricas, triángulos	11-40
<i>Tamarindus indica</i>	Tamarindo	Hojas	Au Ag	Triángulos planos, hexágonos	20-40
<i>Aloe barbadensis</i>	Aloe vera	Hojas	Au, In ₂ O ₃	Esféricas, triángulos	50-350
<i>Cinnamomum camphora</i>	Alcanfor	Hojas	Au, Ag	Triángulos planos	55-80

<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	Hojas	Au	Nano-prismas, esféricas	25
<i>Musa paradisiaca</i>	Plátano	Cáscara	Au, Ag	Micro-cubos, micro-alambres	300
<i>Jatropha curcas</i>	Jatropha	Látex	Ag	Esféricas	20-40
<i>Camelia sinensis</i>	Planta del te	Hojas	Ag	Nano-triángulos	~ 40
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	Hojas	Ag	ND	ND
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Callo	Ag	Esféricas	60-80
<i>Mentha piperita</i>	Menta	Hojas	Ag	Triangulares, esféricas, elipsoidales	5-30
<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate	Fruto	PbWO ₄	Esféricas, fusiformes	45-55
Síntesis de NPs a partir de la biomasa					
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Biomasa	Fe ₃ O ₄	Nano-bastones	1-10
<i>Pinus sp.</i>	Pino	Biomasa de la viruta	Fe ₃ O ₄	Esféricas	100
<i>Citrus sinensis</i>	Naranja	Biomasa de la cáscara de naranja	Fe ₃ O ₄	Bastones	20-40
Síntesis extracelular de NPs bimetálicas con extractos vegetales					
<i>Medicago sativa</i>	Alfalfa	Planta	Eu-Au	Cúmulos de estructuras tubulares	2-20
<i>Anacardium occidentale</i>	Nuez de la india	Hojas	Au-Ag	Esféricas	<10
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Hierba de limón	Hojas	Au-Ag	Nano-triángulos	~ 214
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto rojo	Hojas	Au- Fe ₃ O ₄	ND	6-20
<i>Gardenia jasminoides</i>	Gardenia	Fruto	Pd	Bastones	3-5
<i>Cinammomun zeylanicum</i>	Canela	Madera	Pd	Cuasi-esféricas	15-20
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alga verde	Talo	Au	Nano-platos	ND
<i>Porphyra vietnamensis</i>	Alga roja	Talo	Ag	Esféricas	13 ± 3

<i>Sargassum wightii</i>	Alga roja marina	Talo	Au	Planares delgadas	8-12
<i>Spirulina platensis</i>	Alga verde-azul	Talos secos	Au, Ag Au-Ag	Esféricas	7-25
<i>Syzygium cumini</i>	Jambolán	Extracto de semilla	Fe ₃ O ₄	Esféricas	9-20
<i>Vitis vinifera</i>	Vid	Extracto de tallos	Fe ₃ O ₄ - Ag	Quasi-esféricas	< 50
<i>Euphorbia condylocarpa</i> <i>M. bieb</i>	Lechearena	Extracto de raíz	Fe ₃ O ₄ - Pd	Granulares	< 39
<i>Terminalia chebula</i>	Mirabolano índico	Extracto del fruto	Fe ₃ O ₄ - Pd	Amorfos, cúbicos	80-100
<i>Punica granatum</i>	Granada	Extracto de cáscara	Fe ₃ O ₄	Nano-bastones	40 x 200
<i>Solanum tuberosum</i>	Papa	Extracto de papa (almidón)	α-Fe ₂ O ₃	Esféricas	29-40
<i>Camellia sinensis</i>	Te verde	Extracto de hojas	Fe ₃ O ₄	Esféricas	40-50
<i>Camelia sp.</i>	Te negro	Extracto de hojas	Fe ₃ O ₄	Quasi-esféricas	20-40
<i>Sorghum spp.</i>	Sorgo	Extracto de salvado	Fe ₃ O ₄	Esféricas	40-50
<i>Eucaliptus tereticornis</i>	Eucalipto	Extracto de hojas	Fe ₃ O ₄	Esféricas, cúbicas	20-80
<i>Punica granatum</i>	Granada	Fruto	Fe ₃ O ₄	ND	100-200
<i>Musa paradisiaca</i>	Plátano	Cáscara	Fe ₃ O ₄	Esféricas	< 50
<i>Dodonaea viscosa</i>	Olivo de la arena	Extracto de hojas	Fe ₃ O ₄	Esféricas	50-60
<i>Tridax procumbens</i>	Romerillo	Extracto de hojas	Fe ₃ O ₄	Esféricas irregulares	80-100
<i>Rubus ulmifolius</i>	Moras	Frutos	Fe ₃ O ₄	Esféricas	10-30
<i>Vitis vinifera</i>	Vid	Hojas	Fe ₃ O ₄	ND	15-45
<i>Melaleuca nesophila</i>	Mirto de la miel	Hojas	Fe ₃ O ₄	Agregados como racimo de uvas	40-60
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Hojas	Fe ₃ O ₄	Agregados esféricos	40-60
Síntesis de NPs con extractos y el método hidrotermal					
<i>Aloe vera</i>	Sábila	Sabia	Fe ₃ O ₄	Depende de la temperatura de	6-30

				reacción y tiempo	
<i>Camellia sinensis</i>	Té verde	Hojas	Fe ₃ O ₄	Esféricas	40-80
<i>Glycine max</i>	Soya	Brotes	Fe ₃ O ₄	Cubos y piramidal	5-25

ND – No determinado

El mecanismo de síntesis de las MNPs por los seres vivos no está del todo claro. Esto se debe a las diversas reacciones bioquímicas, biomoléculas y mecanismos involucrados en el proceso de biorreducción. En el caso de los microorganismos, estos emplean distintas rutas de síntesis de NPs, los cuales incluyen la alteración de la solubilidad y toxicidad de las sales metálicas mediante la oxidación o reducción, la bioabsorción, el acomplejamiento u precipitación extracelular, la bioacumulación, como un mecanismo de defensa ante ambientes tóxicos y para la producción de energía (quimiolitotrofia). En estas condiciones, las bacterias reducen los iones metálicos del agua o su medio ambiente a complejos insolubles desarrollando la resistencia a los ambientes contaminados (33,179).

Diversos organismos producen nanomateriales ya sea de forma intra o extracelular y en estas rutas, el mecanismo es distinto, así como los agentes biológicos involucrados. En el caso de los microorganismos donde se sintetizan extracelularmente, las enzimas (nitrato reductasa, hierro reductasa, etc.) de la pared celular reducen los iones a NPs y estas difunden hacia el exterior. En otras bacterias ocurre un proceso de nucleación intracelular de los iones para la posterior formación de las NPs. En organismos como los hongos, el mecanismo de biosíntesis intracelular involucra la internalización de los iones, su biorreducción y recubrimiento. Mientras que en otros la síntesis de las NPs ocurre en la superficie del micelio a lo largo de la membrana plasmática. La resistencia a los metales por algunos organismos (*Pseudomonas stutzeri*) lleva a la producción de NPs (Ag) mediante su deposición en vacuolas en el periplasma. En comparación con las bacterias, los hongos producen mayores cantidades de NPs ya que secretan más proteínas para la biorreducción de sales metálicas. Las células sometidas a procesos de secado y posterior fraccionamiento abundantes en compuestos con grupos carboxilo, residuos de aminoácidos y grupos reductores como

aldehídos y cetonas al interactuar con iones metálicos son capaces de asociarse con estos para su biorreducción a NPs (174,180).

La forma, tamaño y composición de las NPs también puede controlarse mediante el uso de organismos. Por ejemplo, en bacterias y algas, al acidificar el pH del medio de cultivo, se controla la morfología de las NPs producidas para favorecer la síntesis de nanoplatos más que esferas (174).

En general, en organismos como bacterias, algas y hongos la biorreducción para la formación de NPs, se observa como un proceso para superar los efectos tóxicos de los metales pesados o de aquellos que no tienen ninguna relevancia biológica (Hg, Pb, Cd) en la función de la célula dependiendo de la especie. Donde los mecanismos involucrados son procesos mediados por enzimas (oxidación-reducción), su absorción en las paredes celulares, donde son quelados mediante péptidos extracelulares (metalotioneínas) o polisacáridos que controlan su flujo hacia las células (170,174). Sin embargo, en estos organismos la síntesis de NPs es un proceso lento (horas, días o semanas), y los nanomateriales son poco monodispersos, por lo que aún se debe optimizar el proceso para que sea comparable a los métodos físicos y químicos.

La obtención de NPs utilizando los fitoquímicos de la rica diversidad del reino vegetal se ha explorado ampliamente. Las plantas también son capaces de reducir una gran variedad de metales pesados (Tabla 4), debido a que los absorben del agua o suelo y los acumulan en sus tejidos en forma de nanoestructuras, utilizando rutas metabólicas o grupos funcionales de sus biomoléculas (33,170). La especie más utilizada para demostrar la biorreducción *in situ* y *ex situ* en plantas es *Medicago sativa* (alfalfa), ya sea con el organismo completo en condiciones de cultivo controladas y su biomasa o extracto se han obtenido diversas nanoestructuras metálicas (Tabla 4) (22,168,181,182).

A partir de estos estudios se han explorado otras especies vegetales y sus tejidos (hojas, tallos, raíz, frutos, etc.) para la síntesis exitosa de diversas nanopartículas metálicas. Las NPs que se obtienen con mayor frecuencia con extractos vegetales son de Ag y Au, las cuales se producen al incubar los iones metálicos con la biomasa de la planta o su extracto

en condiciones ambientales. Esta metodología permite la obtención de una diversidad de formas y tamaños fácilmente, con una considerable disminución en los agentes tóxicos comúnmente empleados en las síntesis químicas o físicas (182–184).

El tamaño, forma y polidispersidad de las NPs obtenidas están influenciados por el tiempo de incubación, temperatura, especie vegetal, pH, concentración y la relación volumen de sal metálica-extracto (33).

La combinación de los compuestos bioactivos en los extractos con las NPs han llevado a la obtención de nanomateriales de mayor efectividad como agentes antibacteriales, nanopartículas metálicas cero valentes para la remoción de contaminantes orgánicos en aguas residuales, para tratamientos contra parásitos hematófagos, para el desarrollo de fibras, tratamiento de la diabetes, agentes citotóxicos para células cancerosas y MNPs que logran un mejor contraste en MRI que las obtenidas por síntesis químicas (140,185–189).

Estudios recientes indican que las MNPs provenientes de síntesis verdes tienen una excelente biocompatibilidad, disminuyendo los niveles de toxicidad en comparación con las obtenidas por síntesis química o física (184,190).

Al igual que en los microorganismos, los agentes reductores son las biomoléculas o su combinación provenientes de los extractos. Herrera-Becerra et al., (2009) demostraron que tanto la biomasa como agentes biorreductores de alta pureza provenientes de síntesis química tipo polifenol (ácido gálico, tánico) son capaces de ligar otros iones (Cu, Ni, Cd, Pb, Zn, Au, Fe) en solución acuosa, para la síntesis de NPs, lo que indica que la unión de los iones metálicos se lleva a cabo por los grupos funcionales contenidos en la paredes celulares de las plantas y no necesariamente por procesos biológicos activos (168). Reportes posteriores han demostrado que diversas biomoléculas como residuos de aminoácidos (L-Cys, L-glutamina, L-arginina, L-lisina), proteínas (hemoglobina, mioglobina), enzimas (α -amilasa), vitaminas (vitamina-C), grupos tiol, glúcidos (D-glucosa, azúcares derivados de la madera), polifenoles (ácido, tánico, gálico, flavonoides etc.), biopolímeros (almidón, alginato

de sodio), etc., tienen afinidad por distintos iones metálicos para la síntesis de NPs (Au, Ag, Fe, Cd) de una gran variedad de formas y tamaños (170).

En particular, la biosíntesis de MNPs con extractos vegetales se realiza por dos metodologías: 1) Se mezcla el extracto con las sales metálicas a temperatura y presión ambiente para obtener las NPs por coprecipitación y 2) se combina con la síntesis hidrotermal donde se mezcla el extracto con la solución de sales metálicas. En este trabajo se empleó la metodología 1 que se describirá en la sección de Materiales y Métodos. En ambas metodologías, los polifenoles tienen un papel primordial, dado que son los responsables de la biorreducción de los iones metálicos y aportan el recubrimiento de las NPs para disminuir su oxidación durante el proceso.

2.5.3 Mecanismo de síntesis de MNPs por biorreducción.

Los polifenoles o fenoles son sustancias que consisten al menos de un anillo aromático unido a uno o más grupos hidroxilo (-OH) cuyo número y posición es variable (Figura 22). Son los metabolitos secundarios más abundantes de las plantas sintetizados por la vía del ácido shikímico. Los polifenoles les confieren sus características deseables como indeseables, tienen un papel importante en el color, cualidades sensoriales, nutricionales y antioxidantes. Investigaciones recientes confirman su papel en la prevención de enfermedades como el cáncer, cardiovasculares, en inflamaciones crónicas y neurodegenerativas; adicionalmente, modulan vías de señalización intracelular. Estos antioxidantes potentes complementan el papel de las vitaminas y enzimas como mecanismos de defensa contra el deterioro de las funciones del organismo debido al estrés oxidativo ocasionado por el exceso de las especies reactivas de oxígeno. Los neutralizan (son menos reactivos) al donar un electrón o átomo de hidrógeno (191).

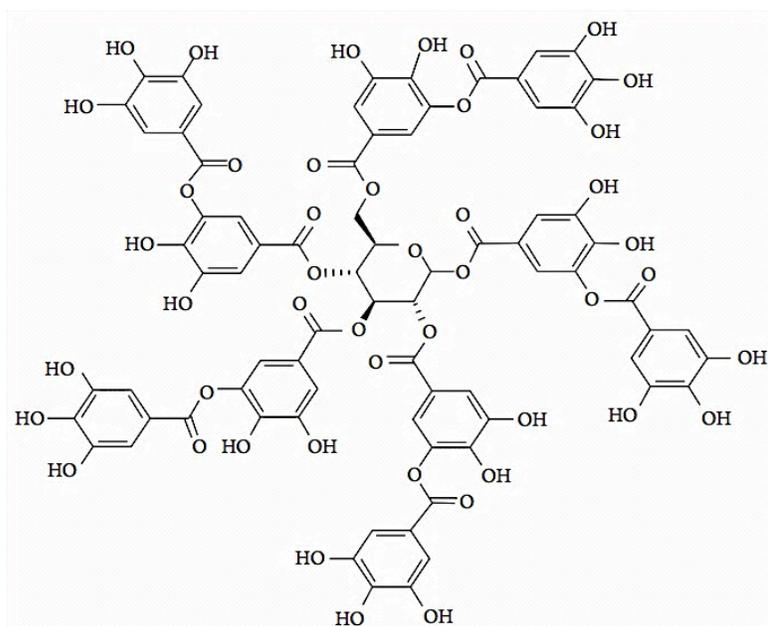


Figura 22. Estructura molecular de un polifenol (ácido tánico) con numerosos grupos fenol (anillo aromático y sus grupos -OH) (192).

Los polifenoles constituyen uno de los grupos más numerosos, diversos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se clasifican en flavonoides y no flavonoides o ácidos fenólicos. De estos, los flavonoides son el grupo más grande poseen 15 átomos de carbono con dos anillos aromáticos unidos por un enlace triple. En plantas se han descrito más de 5000 flavonoides naturales y en función de su estructura, se han clasificado en varios subgrupos: antocianinas (pigmentos responsables de la coloración roja y azul de las frutas, jugos, vinos, flores); catequinas, flavanonas, flavanonas glicosídicas (encontradas en cítricos y miel); flavonas, flavonoles y flavanol (glicósidos del té, frutas, vegetales y miel).

Los no flavonoides son una clase de compuestos heterogéneos, que se dividen en tres categorías principales con base en su esqueleto de carbono: los derivados del ácido benzoico (ácido gálico, vanílico, *p*-hidroxi-benzoico, etc.), los derivados del ácido cinámico (clorogénico, caféico, ferúlico, *p*-coumárico), y los derivados del estilbena (resveratrol). Los polifenoles son naturalmente hidrofílicos y por lo tanto pueden extraerse fácilmente con solventes polares (agua) y orgánicos (metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y sus mezclas con agua) (191).

El mecanismo de reacción sugerido para la biorreducción de las sales metálicas por los fitoquímicos de los extractos ha sido dilucidado mediante el estudio de polifenoles en estado puro provenientes de síntesis químicas como el ácido tánico y gálico (Figura 22). Dado que en los extractos de alfalfa, los taninos (ácido tánico, gálico) son el componente predominante (168).

En el mecanismo propuesto, los grupos fenol de los polifenoles a partir de sus numerosos grupos $-OH$ son excelentes donadores de hidrógeno a un radical libre. Al estar unidos a un anillo bencénico, los grupos $-OH$ pueden actuar como donadores de un átomo de hidrógeno o un electrón. La donación de $-OH$ de los grupos fenol que participan en las reacciones redox, ocurre al formar quinonas las cuales donan sus electrones. Los electrones donados reducen los iones metálicos oxidados hacia sales metálicas para formar las NPs correspondientes (Figura 23).

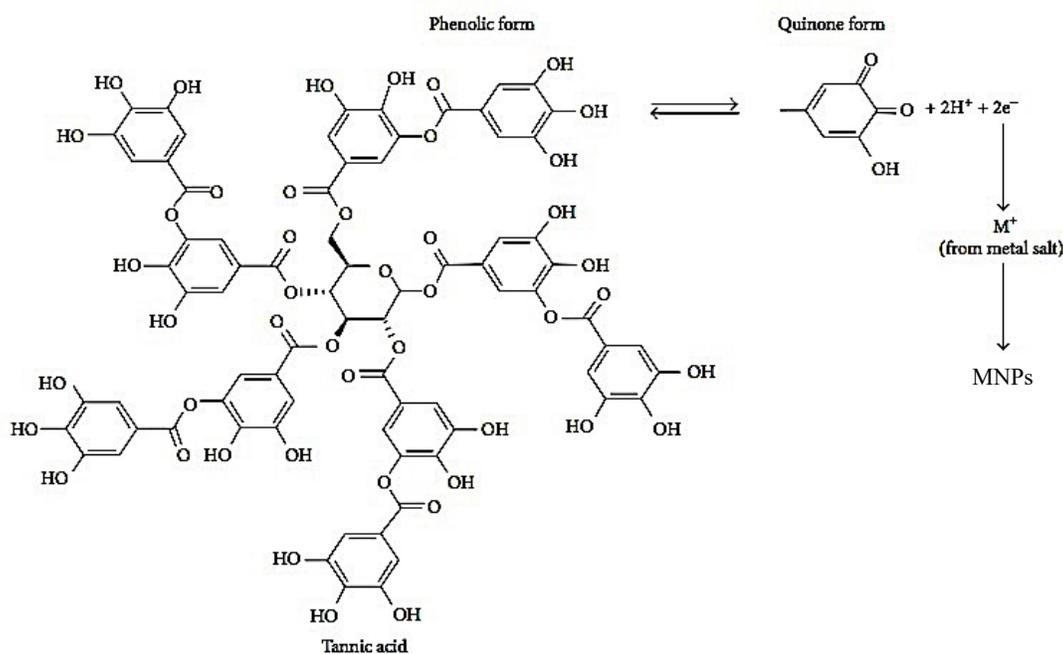


Figura 23. Mecanismo de reacción de la reducción de las sales metálicas por un polifenol (ácido tánico). Los grupos fenol en el ácido tánico son oxidados a quinonas con la consiguiente liberación de electrones los cuales reducen los iones metálicos. La estructura de la molécula de 5 brazos del ácido tánico actúa como un agente quelante, donde la reorganización atómica ocurre dentro del complejo facilitando la nucleación de las MNPs (192).

Adicionalmente, sus anillos aromáticos en condiciones de acidez tienen una reactividad elevada y su ionización genera un grupo $-O^-$ el cual libera más electrones que el $-OH$. Algunos polifenoles con grupos carboxilo ($COOH$) en su estructura, pierden su hidrógeno para volverse un anión carboxilato (COO^-) durante el proceso de reducción. El COO^- formado se une a la superficie de las NPs metálicas en formación o iones metálicos de carga positiva (M^+) y actúa como reductor y surfactante para estabilizarlas electrostáticamente. La reducción inicial de los iones metálicos lleva a la formación de centros de nucleación los cuales secuestran iones adicionales y los incorporan a los sitios vecinos de nucleación para eventualmente formar las NPs (192).

Los polifenoles, además, pueden actuar como antioxidantes mediante su unión con metales (quelación) catiónicos (Au, Ag, Fe, Cu, etc.), esta reacción evita la formación de radicales libres (Figura 24). El hierro se une a los polifenoles vía ortho-dihidroxilo (catecol) o trihidroxibenceno (galloil) (168).

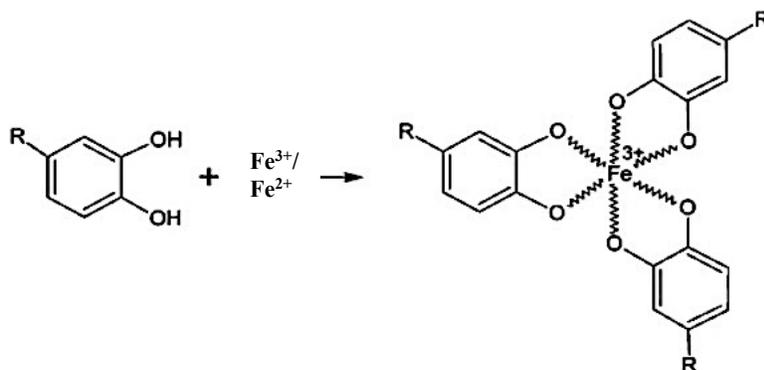


Figura 24. Estructura química propuesta para la formación de Fe-NPs, donde los iones $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ son quelados por los grupos $-\text{OH}$ de los polifenoles. R.- representa la estructura química del polifenol (168).

Un gran número de plantas aromáticas (usadas como condimento) y medicinales son fuente de compuestos químicos que presentan propiedades antioxidantes. Estos antioxidantes naturales son generalmente compuestos fenólicos que provienen de distintas regiones de la planta (frutos, raíces, hojas, corteza, semillas, etc.). En este trabajo se exploró la síntesis de MNPs utilizando como fitoquímicos polifenoles y ácidos orgánicos provenientes de extractos acuosos de *Cinnamomun verum* y *Vanilla planifolia*.

2.5.4 Caracterización fitoquímica de *Cinnamomun verum* y *Vanilla planifolia*.

El género *Cinnamomun* (familia: Lauraceae) consiste de 250 especies de árboles y arbustos distribuidos en el Sureste de Asia, China y Australia. *C. verum* es una especie nativa de Sri Lanka. La canela es un árbol pequeño perennifolio de 10-15 m de altura. Su madera se utiliza ampliamente como especia o condimento para la preservación de alimentos, tiene un valor agregado dado que se han demostrado sus propiedades antioxidantes y para el tratamiento de diabetes. La madera seca contiene aceites volátiles como proantocianidinas, taninos, proteínas, pentosanos, almidón, oxalato de calcio, minerales, eugenol y compuestos fenólicos principalmente cinnamaldehído y ácido hidroxicinámico. (193) El contenido de estos componentes varía considerablemente de acuerdo a su localización geográfica, edad del árbol, condiciones climáticas, de cosecha y tiempo de almacenamiento. (194) Algunos miembros del género *Cinnamomun* (*C. zeylanicum*) se han utilizado para la reducción de Ag,

Pd y Au (Tablas 3 y 4). (195,196) La reducción se ha atribuido a compuestos fenólicos como eugenol, terpenoides, polisacáridos y flavonas del extracto (Tabla 5) (197).

Tabla 5. Caracterización fitoquímica por GC/MS de los compuestos volátiles del aceite esencial de *Cinnamomun sp.* (193,194,198).

Compuesto/parte anatómica	Rendimiento (% v/v)
Hojas	
Cinnamaldehído	1-5
Eugenol	70-95
Tallos leñosos de la raíz	
Camphor	60
Frutos	
Acetato <i>trans</i> -cinámico	42-54
Carofileno	9-14
Brotes	
Terpenos	78
α -bergamoteno	27.38
α -copaeno	23.05
Terpenoides oxigenados	9
Flores	
(E)-cinnamil acetato	41.98
<i>Trans</i> - α -bergamoteno	7.97
Óxido de cariofileno	7.20
Madera (varas)	
<i>trans</i> -Cinnamaldehído	65-97.96
Eugenol	5-10
α -pineno	1.3
Camfeno	0.3
β -pineno	0.25
Limoneno	0.2
1:8-cineole	0.5
<i>p</i> -cimeno	0.8
Linalool	1
β -carofileno	2.5

α -terpineole	0.3
Safrol	2
Alcohol cinámico	1.4
Bencil benzoato	4
Benzaldehído	1.04
Alcohol fenil-etilo	1.14
Benceno propanal	0.52
<i>cis</i> -cinnamaldehído	1.33
2-metoxi-benzaldehído	0.89
a-cubeneno (sequiterpenoides)	0.59
2-nitro-1-fenil-propano	0.63
O-metoxi-cinamaldehído	8.79

El eugenol abundante en el té verde y extractos de eucalipto, se ha utilizado para la síntesis de nanopartículas de hierro (20). Nanopartículas de Fe_3O_4 se han funcionalizado con cinnamaldehído sintético para mejorar el tratamiento de cáncer de mama por hipertermia magnética (185). Este compuesto también se ha utilizado para aumentar la eficiencia antimicrobiana de nanofibras de quitosana y óxido de polietileno utilizadas para tratar

infecciones ocasionadas por *Pseudomonas sp.* (32). Los compuestos químicos principales de *Cinnamomun verum* se resumen en la figura 25.

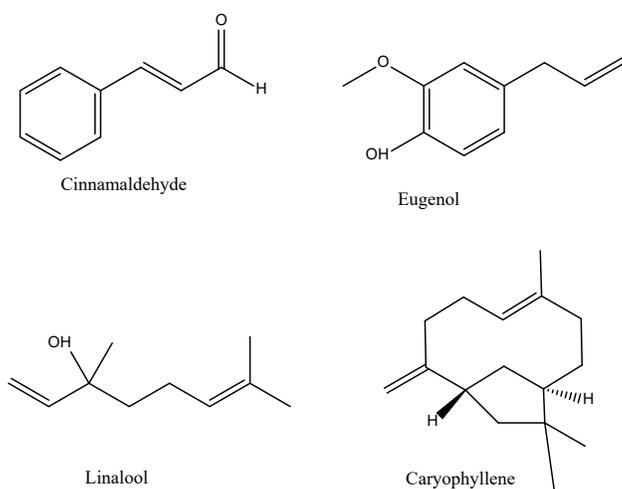


Figura 25. Fórmulas estructurales de los principales compuestos del extracto de canela (198).

De acuerdo a Ooi et al. (198) y Thomas et al. (194), el *E*-cinnamaldehído es el compuesto predominante en *Cinnamomun verum* (85-98%), seguido por el eugenol y el ácido *trans*-cinámico (5-10%).

La vainilla es una vaina conocida desde la época de los Aztecas, donde tenía una connotación para las bebidas de la realeza como el chocolate elaborado a base de cocoa, maíz, miel y vainilla. El género se compone de ~110 especies y se ubica dentro de la familia de las orquídeas. Esta planta perennifolia crece en las regiones tropicales y subtropicales de América, Asia, Nueva Guinea, Australia y el Oeste de África (199,200). La especie principal de vainilla es *Vanilla planifolia*, nativa de México que actualmente es cultivada ampliamente en los trópicos. La planta requiere de años para su maduración y de 6-9 meses para producir las vainas de vainilla, cuyas flores deben ser polinizadas a mano y estas solo permanecen abiertas pocas horas. Una vez cultivadas las vainas verdes, son sometidas a un proceso de curado intenso, rápido y cuidadoso con el objetivo de producir la mayor cantidad de vainas gourmet. En ocasiones requieren de periodos prolongados de hasta 3 años para el desarrollo de una mayor cantidad de compuestos aromáticos característicos de su sabor y aroma (200).

El contenido principal de polifenoles en las vainas sometidas a un proceso de curado en *V. planifolia* es la vainilla o vanilina (4-hidroxi-3-metoxi-benzaldehído, 85%), el ácido vanílico y el ácido 4-hidroxibenzaldehído de los más de 300 compuestos químicos identificados (Tabla 6) (Figura 26) (200–202). Debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (inhibe la oxidación de lípidos y proteínas) la vainilla se utiliza como conservador de alimentos, para la síntesis de L-dopa para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (135,201). Se ha reportado que asiste la síntesis de nanopartículas de Ag (203).

Tabla 6. Caracterización fitoquímica por cromatografía de gases de algunos compuestos volátiles del extracto de vainas de vainilla. El contenido en partes por millón (ppm) está en función de las horas de curado de las vainas (200–202).

Compuestos volátiles	ppm
Vanilina o vainilla	19118
Ácido vanílico	1315
<i>p</i> -hidroxibenzaldehído	873
<i>p</i> -ácido hidroxibenzóico	255
Guaiacol	9.3
4-metilguaiacol	3.8
<i>p</i> -cresol	2.6
4-vinilguaiacol	1.2
4-vinilfenol	1.8
Acetovanilona	13.7
Vanillil alcohol	83.8
Alcohol <i>p</i> -hidroxibencilo	65.1
Ácido acético	124
Ácido isobutírico	1.7
Ácido butírico	<1
Ácido isovalérico	3.8
Ácido valérico	1.5
2,3-butanediol	8.0
Alcohol anisílico	2.4
2-heptenal	2.1

(E)-2-decenal	1.8
(E,Z)-2,4-decadienal	1.4
(E,E)-2,4-decadienal	1.2
Salicilato de metilo	<1
Cinnamato de metilo	1.1
Linolenato de etilo	13.5
3-hidroxi-2-butanona	14.6
Desconocido /similar a vainilla	6.2

Debido al costo de su producción artesanal, fórmulas sintéticas de vainilla son obtenidas en gran cantidad por síntesis química (vainilla comercial) a menor precio. Estas formulaciones se producen utilizando una porción de vainas curadas o a partir de lignina, eugenol, guaiacol y derivados del petróleo. Posteriormente, la vainilla sintética es disuelta en alcohol, propilén-glicol, glicerina y coumarina para aumentar e imitar el sabor de la vainilla natural. Estas fórmulas son ampliamente utilizadas en la industria culinaria (repostería, bebidas), productos farmacéuticos, perfumería, en la elaboración de juguetes de plástico y alimento de mascotas para enmascarar su olor (204).

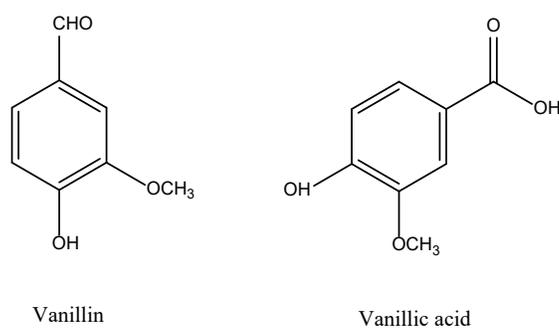
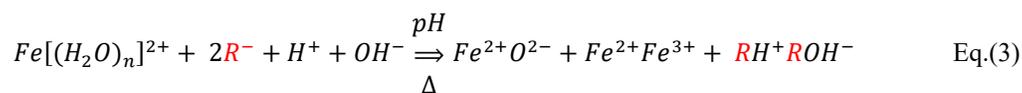
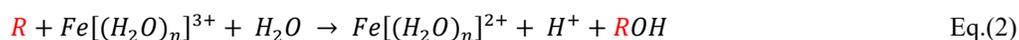


Figura 26. Fórmula estructural de los polifenoles de las vainas de vainilla (201).

En ambas especies sus extractos con fitoquímicos abundantes en polifenoles el mecanismo de biorreducción involucrará los grupos $-OH$ y ortodihidroxifenil que, en pH básico, se oxidan a quinonas para donar sus electrones de sus radicales $-OH$ para acomplejarse con los cationes metálicos Fe^{2+}/Fe^{3+} en fase acuosa y reducir los iones para la producción de NPs de $Fe_3O_4@Fe_2O_3$. Los electrones deslocalizados en los anillos aromáticos potencian la reacción de reducción donando sus electrones, mientras que los ácidos

orgánicos, sus grupos $-\text{COOH}$ pierden sus átomos de hidrógeno ($-\text{COO}^-$) durante el proceso de reducción. Este mecanismo estabiliza electrostéricamente la superficie de las NPs en formación mediante las cadenas de los ácidos orgánicos, disminuyendo su agregación y oxidación (17). La estabilización electrostérica corresponde a una estabilización en parte electrostática (por la repulsión de Coulomb entre partículas, por las cargas eléctricas de los iones adsorbidos en la superficie de las MNPs, que forman una capa eléctrica, donde, si su potencial es elevado evita la aglomeración en disolventes con constantes dieléctricas altas) y parte estérica debida a las cadenas orgánicas de las biomoléculas adsorbidas en la superficie de las MNPs, que evitan o disminuyen la interacción de los centros metálicos de las MNPs (205). La reacción de biorreducción que ocurre utilizando estos extractos puede representarse de la siguiente manera:



Donde R representa las cadenas orgánicas de los polifenoles con sus grupos $-\text{OH}$ involucrados principalmente en la biorreducción de los átomos de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ (Figura 27).

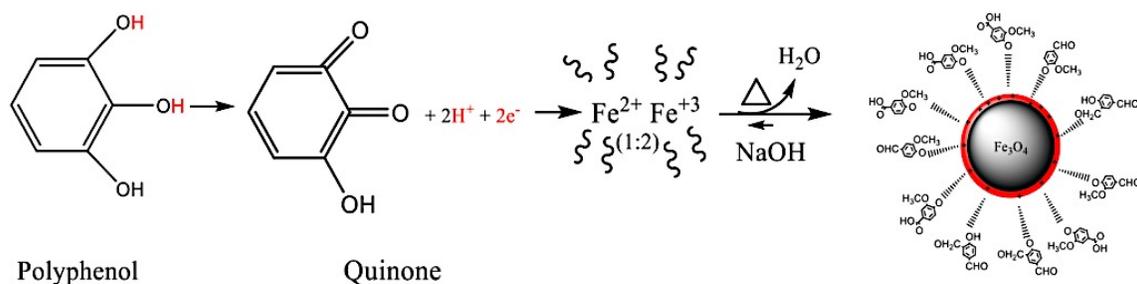


Figura 27. Esquema de los eventos químicos que ocurren durante la síntesis verde de las MNPs. Los polifenoles participan en el recubrimiento y biorreducción de los cationes de hierro. Esto resulta en la obtención de NPs con un núcleo de Fe_3O_4 y con superficie oxidada de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (rojo), confinadas por los polifenoles de los extractos acuosos. La posterior adición de la base acelera la reacción termodinámica favoreciendo la precipitación homogénea de las MNPs (206).

El cinamaldehído es un agente reductor más suave ($E^0=588$ mV) en comparación con la vainilla ($E^0=670-750$ mV), en la transferencia de electrones de sus grupos –OH durante la biorreducción (201,207).

En este trabajo *C. verum* y *V. planifolia* (extracto natural y sintético) asistieron la formación y estabilización de las MNPs de $Fe_3O_4 @ \gamma-Fe_2O_3$ durante su síntesis por coprecipitación. Estas MNPs se probaron para la generación de la hipertermia magnética en células en cultivo *in vitro* BV-2, las cuales son un modelo de investigación de las enfermedades neurodegenerativas (156) .

2.5.5 Biosíntesis MNPs con extractos vegetales para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

La síntesis de nanopartículas con estos extractos acuosos (canela y vainilla) promueven una tecnología amigable con el ambiente y el uso de reactivos de baja toxicidad. En años recientes un gran número de metabolitos novedosos con potentes propiedades farmacológicas se han aislado de los vegetales. Así las plantas medicinales se han convertido en una fuente invaluable de agentes bioactivos como la curcumina, vinblastina, vincristina, paclitaxel, cinnamaldehído, capsaicina, vanilina, wogonina, berberina etc., que han mostrado suprimir o prevenir enfermedades neurodegenerativas y cáncer. A diferencia de los medicamentos sintéticos los compuestos naturales tienen la capacidad de atacar condiciones patológicas de origen multifactorial como el cáncer, por múltiples vías metabólicas (Figura 28), tienen una mayor interacción con receptores membranales para su internalización celular y en consecuencia un efecto terapéutico superior de menor toxicidad al organismo. Estos representan una opción de tratamiento preventivo y complementario a múltiples padecimientos (208).

Los compuestos bioactivos del extracto en canela además de su uso como especia se ha reportado que tienen propiedades farmacológicas como: antioxidantes, antiinflamatorias, antidiabéticas, antimicrobianas, anticarcinogénicas, disminuye el contenido de lípidos en sangre y óxido nítrico por lo cual principios activos aislados, se han utilizado para tratar desórdenes neurológicos como el Parkinson y el Alzheimer (202,209).

Algunos de sus compuestos polifenólicos como el cinnamaldehído, eugenol y linalool han mostrado una elevada actividad antioxidante de lípidos y ácidos grasos. Así como la disminución en la producción de óxido nítrico en un 81%. Los flavonoides y el 2-hidroxycinnamaldehído tienen un efecto antiinflamatorio además de inhibir la producción de óxido nítrico al activar el factor kappa en células (NF- κ B) del CNS; por lo cual se han considerado como una fuente para el tratamiento terapéutico de enfermedades neurodegenerativas mediadas por procesos inflamatorios crónicos. La cinnamofilina confiere protección contra daños producidos por isquemia por lo que se ha propuesto emplearla para disminuir daños neuronales por traumatismos. El benzoato de sodio regula la expresión de la proteína PARK7 y la neurotrofina-3 involucradas en la neuroprotección del estrés oxidativo. Esta molécula aislada de los extractos de canela puede incorporarse como tratamiento terapéutico en la prevención del Parkinson (209,210).

En cuanto a su efecto anticancerígeno se ha demostrado que los cinnamaldehídos inhiben la angiogénesis involucrada en procesos cancerosos. El *trans*-cinnamaldehído induce la muerte celular por apoptosis. Los aceites esenciales de canela también inhiben la hormona estimulante de melanocitos suprimiendo el estrés oxidativo *in vitro* en células murinas de melanoma (209,210). Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con cinnamaldehído de origen sintético se han utilizado para inducir apoptosis en células de cáncer de mama mediante hipertermia magnética a 41.6 °C (138).

La vanilina tiene efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, citostáticos (200,201). El extracto es rico en vitaminas-B (niacina, ácido pantoténico, tiamina, riboflavina) y minerales (calcio, potasio, manganeso, zinc). Sus polifenoles son potentes antibacterianos y antioxidantes. En los desórdenes mentales disminuye el estrés y es útil en los tratamientos contra la depresión y ansiedad. Hay evidencia que la vanilina tiene un efecto antimutagénico, al suprimir el daño cromosomal inducido en cultivos *in vitro* por sustancias como el metotrexate y la formación de micronúcleos inducidos por mitomicina C en células de la médula ósea de ratón (201,202,211). Puede prevenir algunos tipos de cánceres; diversos reportes indican que tiene un efecto antimutagénico, ya que está involucrada en la replicación y reparación del DNA. Reduce la frecuencia de mutaciones en células del colon en un 64%

disminuyendo la posibilidad de desarrollar este tipo de cáncer (136). La vanilina administrada *in vivo* e *in vitro* inhibe el crecimiento de células de adenocarcinoma mamario y suprime la dispersión de las células cancerosas (metástasis), por lo cual es de interés para el desarrollo de medicamentos que interrumpan la metástasis. Además de su actividad antioxidante aumenta la sensibilidad de células cancerosas al cisplatino (137). Inhibe las reacciones que conducen a la producción de óxido nítrico, tanto en células tumorales como en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y Parkinson (212).

En oncología los productos derivados de vías naturales como los polifenoles tienen una larga historia en su aplicación clínica contra enfermedades como el cáncer. Aunque un protocolo basado exclusivamente en el empleo de estos no es del todo viable se ha propuesto utilizarlos en combinación con terapias establecidas como la quimio y radioterapia para su acción sinérgica terapéutica. El uso de la medicina natural basándose en los principios activos extraídos de las plantas minimizan los efectos asociados con las terapias convencionales de cáncer. Sin embargo, la mayoría de estos compuestos tienen baja estabilidad y su farmacocinética no es favorable, lo que disminuye su asimilación por el organismo. Esto puede superarse al conjugar estas sustancias bioactivas con acarreadores que incrementen su eficacia terapéutica como las NPs. Diversos trabajos demuestran que conjugando los principios bioactivos de los extractos vegetales con nanoacarreadores incrementan su solubilidad en el organismo y biodisponibilidad en células cancerosas hasta en un 50% e inducen su muerte celular por apoptosis. Se han conjugado MNPs con curcumina, quercetina, té verde (epigallocatequinas), y diversos polifenoles que tienen efectos antitumorales (27,139,208). En modelos *in vitro* e *in vivo* (*xenografts*), han mostrado una farmacocinética favorable. Estas formulaciones exhiben una mayor biodisponibilidad y reducida toxicidad en comparación con las NPs obtenidas por síntesis químicas. Estos nanomateriales han resultado efectivos para el tratamiento *in vitro* e *in vivo* del cáncer de páncreas, colon y gliomas (27,139,188,213). Los efectos anticancerígenos se han obtenido a concentraciones micromolares (μM), que para lograr éstas concentraciones solo en las regiones tumorales las MNPs resultan muy útiles.

Los polifenoles son los compuestos naturales por excelencia con efectos potentes de protección contra el cáncer y procesos neurodegenerativos a distintos niveles celulares (Figura 28). Estudios recientes comienzan a dilucidar dos rutas de señalización que controlan los eventos de muerte celular por apoptosis: vía de las MAPKs cinasas (*mitogen-activated protein kinases*) y la familia de proteasas ICE/Ced-3 (caspasas), las cuales son estimuladas por compuestos fenólicos naturales y sintéticos. Los efectos biológicos a bajas concentraciones (~50-150 μM) de los polifenoles es la activación de la vía de las MAPK cinasas que llevan a la expresión de genes con funciones de sobrevivencia (c-Fos, c-Jun) y de defensa (enzimas detoxificantes, GST, QR), ejerciendo un mecanismo de protección. Las concentraciones elevadas (~250-500 μM) conducen a la activación de la vía de las caspasas para inducir la apoptosis (Figura 28), lo cual depende del tipo celular. Estos mecanismos de activación de sobrevivencia o de muerte celular resultan benéficos si se inducen en células preneoplásicas o tumorales (214).

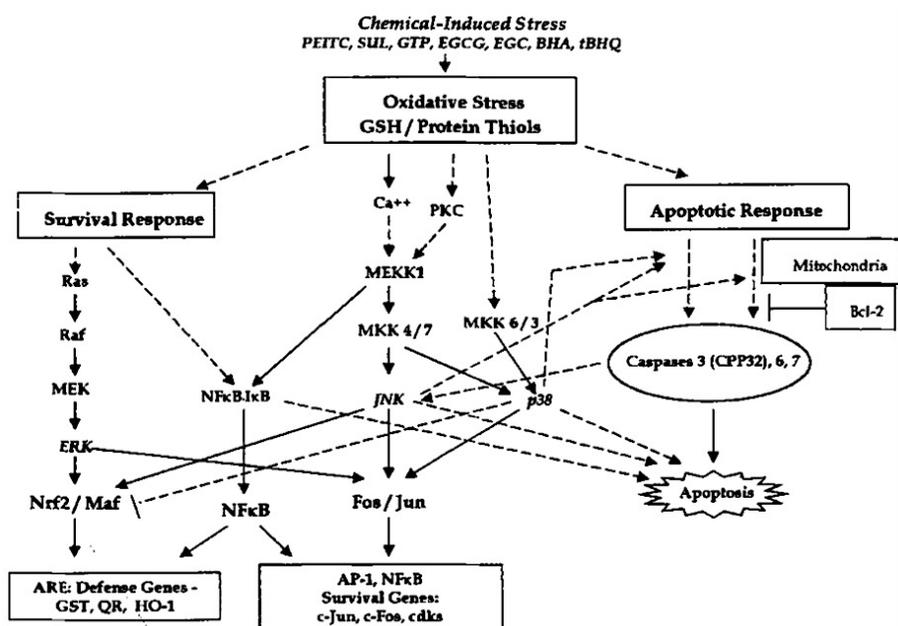


Figura 28. Esquema donde se ha inducido el estrés oxidativo que lleva a la activación de la vía de las MAPKs que resulta en la expresión de genes de sobrevivencia o en la activación de las caspasas mediante ICE/Ced-3 que conduce a la muerte celular por apoptosis. Los flavonoides (GTP, EGCG, ECG) isotiocianatos sintéticos (PEITC, SUL) y antioxidantes (BHA, tBHQ) a bajas concentraciones activan la vía de las MAPKs (ERK2, JNK1, p38) y por lo tanto factores de sobrevivencia y protección celular. Cantidades mayores inducen la vía de las caspasas (ICE/Ced-3) con la consiguiente apoptosis (214).

Como se ha mencionado previamente, existen pocos trabajos sobre el uso de NPs como acarreadores de polifenoles (27,30,139) y debido a que la canela y vainilla se emplean en la dieta cotidiana sin efectos secundarios nocivos, además de sus múltiples propiedades farmacológicas naturales; en este trabajo se exploró una vía de síntesis verde para obtener MNPs-polifenoles (Figura 29), para su potencial aplicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer.

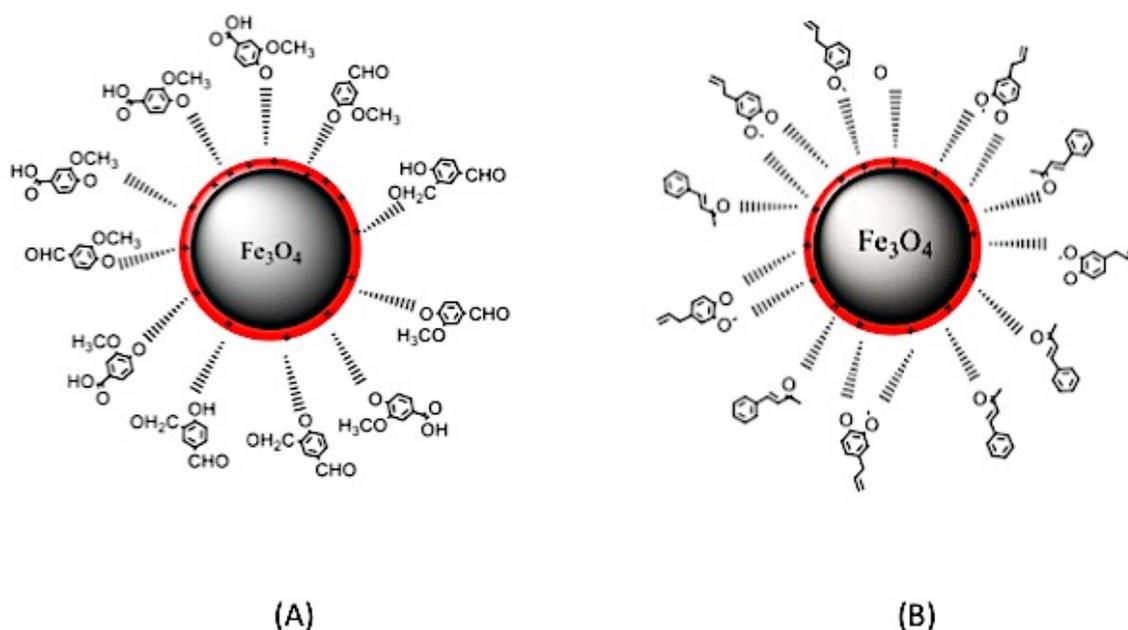


Figura 29. Esquema de la estructura química de las MNPs obtenidas por biosíntesis de un solo paso con el extracto de (A) vainas de vainilla (VP-MNPs) y (B) canela (C-MNPs). Los polifenoles en su superficie representan los compuestos más abundantes de los extractos.

Éstas MNPs multifuncionales obtenidas por biorreducción con extractos de vainas de vainilla (VP-MNPs) y canela (C-MNPs), en combinación con los principios bioactivos de los extractos naturales potenciarán su internalización celular más que las obtenidas por síntesis química (A-MNPs) y de un extracto comercial “natural” (SV-MNPs), para generar la hipertermia magnética mediante la aplicación de un AMF, lo que abre la posibilidad de la aplicación clínica de los polifenoles naturales usando como acarreadores a las MNPs.

2.6 HIPÓTESIS.

Los compuestos polifenólicos (-OH, -COO-, anillos aromáticos) de fuentes vegetales son agentes reductores naturales capaces de bioeducir sales metálicas en solución. Adicionalmente, tienen receptores específicos en membranas celulares de mamíferos, por lo cual, combinando ambas propiedades será posible sintetizar nanopartículas magnéticas en un solo paso. Se puede aprovechar la capacidad de reducción de estas biomoléculas mediante una vía amigable con el ambiente, de menor toxicidad que serán fácilmente asimilables en células en cultivo (BV-2), para generar la hipertermia magnética *in vitro*.

2.7 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método de síntesis alterna (biosíntesis) de nanopartículas de óxido de hierro amigable con el ambiente, a partir de extractos de canela y vainilla, y analizar sus propiedades para la generación de la hipertermia magnética como terapia para enfermedades neurodegenerativas y cáncer en un modelo *in vitro* (células BV-2).

2.7.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Controlar los parámetros de síntesis de las MNPs por biorreducción utilizando compuestos polifenólicos de extractos de *Cinnamomun verum* y *Vanilla planifolia* como bases orgánicas para la formación y funcionalización de las MNPs de Fe₃O₄.
2. Caracterizar las propiedades de las MNPs obtenidas en función de su estructura, tamaño de partícula, superficie y respuesta superparamagnética para la generación de la hipertermia magnética (MHT).
3. Determinar la toxicidad de las MNPs obtenidas por biorreducción a concentraciones máximas de 100 µg ml⁻¹ en células BV-2.
4. Medir la respuesta de calentamiento (SPA) de las MNPs obtenidas por biorreducción en solución coloidal e *in vitro* en células BV-2.

5. Determinar la internalización *in vitro* de las MNPs con valores elevados de SPA por las células BV-2.
6. Analizar el efecto de la hipertermia magnética por pruebas *in vitro* en células BV-2 al aplicar campos magnéticos de $f = 571$ kHz, 23.9 kA m⁻¹ a una temperatura de hipertermia de 46 °C.
7. Determinar la viabilidad celular en las células BV-2 después de aplicar la MHT.
8. Analizar el efecto de muerte celular inducido en las células tratadas con MHT, mediante el estudio de los cambios ultraestructurales por SEM-FIB y TEM.

CAPÍTULO 3.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Materiales.

Los reactivos utilizados para la biosíntesis fueron cloruro de hierro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$) (grado reactivo, $\geq 98\%$), cloruro de hierro tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \bullet 4\text{H}_2\text{O}$) (pureza, p.a., $\geq 99\%$) e hidróxido de sodio (NaOH) (grado reactivo, $\geq 98\%$) de Sigma Aldrich Co., todos los reactivos se utilizaron sin mayor purificación.

Las varas de corteza de *Cinnamomum verum* (Sri Lanka) y las vainas curadas de *Vanilla planifolia* se obtuvieron de un mercado local en México. El extracto comercial concentrado de vainilla (SV) se obtuvo del proveedor “La Reyna” de la región de José Acateno y Papantla Ver., México. En todos los experimentos se utilizó agua desionizada (resistividad = 18 $\text{M}\Omega \bullet \text{cm}$).

3.2 Preparación de los extractos naturales de canela y vainilla.

Se ha reportado que el secado previo de la materia vegetal concentra los antioxidantes, polifenoles etc., beneficiando el proceso de extracción para la producción de extractos de mejor calidad; por lo cual, se emplearon varas secas de canela y vainas curadas de vainilla (215,216). Para la extracción se seleccionó una metodología amigable con el ambiente y el solvente de extracción empleado fue agua desionizada, la cual posee una elevada capacidad para extraer los polifenoles de forma segura (134). Las varas de corteza de canela se pulverizaron (50 g), y se mezcló el polvo resultante con 200 ml de agua desionizada para su destilación por arrastre de vapor a 80 °C por 3 horas. Las condiciones óptimas de extracción de los compuestos polifenólicos deseados, se establecieron de acuerdo a determinaciones previas de su concentración en los extractos, realizadas por el método de Folin-Ciocalteu (217). El extracto de canela (C) obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente fue filtrado (Nylon 0.22 μm) para remover los residuos celulares y finalmente almacenado a 4 °C para su uso posterior.

Para la preparación del extracto de vainas de vainilla (VP) se utilizaron 10 g de vainas curadas de *Vanilla planifolia* y se realizó mediante el mismo procedimiento de la canela. La

extracción se llevó a cabo hasta que el color de la solución acuosa se tornó ligeramente amarilla. El extracto se filtró y almacenó de la misma forma que para la canela.

3.3 Determinación de fenoles totales en los extractos.

La concentración de los fenoles totales se midió por espectrofotometría UV-Vis con un equipo Shimadzu UV-1601, basándose en la reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstofosfato y molibdato) (217), el cual permite el análisis de compuestos orgánicos que presenten anillos aromáticos hidroxilados (polifenoles, ácido tánico, taninos). El método es bastante sensible y permite medir contenidos de compuestos fenólicos comprendidos entre 1-50 mg/ml. Los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de determinación espectrofotométrica a 765 nm. La curva de calibración se elaboró con una solución de ácido gálico (0.1 mg/ml) (217).

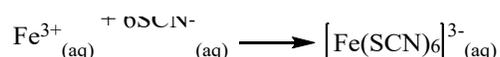
3.4 Síntesis de las MNPs de Fe₃O₄.

Distintas condiciones de síntesis se exploraron hasta encontrar las ideales, lo que se reporta a continuación. Las MNPs de Fe₃O₄ fueron sintetizadas por un método de coprecipitación de síntesis verde con algunas modificaciones (218). Las soluciones de 0.02 M de FeCl₃•6H₂O y 0.01 M de FeCl₂•4H₂O se disolvieron por separado en agua desionizada por 30 minutos. Posteriormente ½ Fe⁺²:Fe⁺³ (w/v) de cada solución se mezclaron y se aforó en matraz a un volumen de 100 ml con agua desionizada. La mezcla se calentó a 80 °C en una atmósfera inerte burbujeando N₂ y se mantuvo en agitación constante. Después de alcanzada la temperatura se adicionaron 5 ó 10 ml del extracto gota a gota, hasta que el color de la solución se tornó rojiza-café. Después de 30 a 60 minutos de incubación se adicionaron continuamente 1.5 M de NaOH para permitir la precipitación uniforme de MNPs color negro. La mezcla se enfrió rápidamente con hielo y las MNPs se obtuvieron por decantación magnética. Las MNPs obtenidas, ya sea con el extracto de canela (C-MNPs), vainas de vainilla (VP-MNPs) o el extracto comercial sintético de vainilla (SV-MNPs) se lavaron tres veces con agua desionizada hasta obtener un pH 7. El contenido de hierro de todas las muestras se determinó mediante el ensayo de tiocianatos. Para comparar el desempeño de las

diversas pruebas de síntesis verdes se obtuvieron MNPs por síntesis química empleando hidróxido de tetraetilamonio (A-MNPs) como base para la reacción.

3.5 Determinación del contenido de hierro en los coloides magnéticos.

La concentración de Fe se determinó por espectrofotometría UV-Vis mediante la reacción de acomplejamiento de iones:



Las MNPs se disolvieron en HCl 6 M-HNO₃ (65%) a 50 °C por 2 horas hasta la oxidación completa de los iones de Fe⁺² a Fe⁺³. Posteriormente se adicionó 1.5 M de tiocianato de potasio a la solución de Fe⁺³ para la formación del complejo hierro-tiocianato, el cual tiene su máxima absorbancia a 478 nm. La concentración se determinó al comparar la absorbancia de las muestras con una curva de calibración de hierro (132).

3.6 Caracterización de propiedades físicas de MNPs.

Los lazos de histéresis se midieron en todas las muestras a temperatura ambiente con un magnetómetro de muestra vibrante (VSM, Lake Shore 7400 Series). Los lazos de histéresis M (emu/g) vs H (Oe), se adquirieron con campos aplicados de -12,000 ≤ H ≤ +12,000 Oe.

La topografía y el análisis de la superficie de los dominios magnéticos se realizó con el microscopio de barrido por sonda (SPM) JEOL-JSPM-5200 en modo de fuerza magnética (AFM-MFM). Las muestras en polvo se confinaron en una cinta adhesiva de carbón. La punta magnética NSC14, Co-Cr/15 Micromash se magnetizó previamente. Los dominios magnéticos se obtuvieron a una $f = 180$ KHz, con una separación de la punta a la muestra de 0-18.605 nm de distancia y un voltaje de salida de 0.025 Amp/V. Los perfiles en 2D y 3D de la interacción de dominios se procesaron con el software WinSPM Process 2.0 JEOL Ltd.

Los patrones de difracción del polvo de MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fe}_2\text{O}_3$ se obtuvieron en un difractómetro Rigaku (Rigaku-Smart Lab) equipado con un filamento de $\text{CuK}\alpha$ con una longitud de onda de 1.54 \AA operando a 35 kV de aceleración y corriente de 25 mA. Los datos se colectaron con un ángulo de Bragg de 2θ en el rango de $10^\circ - 80^\circ$ con un paso de $0.02^\circ/\text{s}$. Los patrones de difracción se compararon con la base de datos del centro internacional de datos de difracción (*International Center for Diffraction Data*, ICDD) (219). Los datos obtenidos correspondieron a la carta cristalográfica JCPDS-PDF-19-0629. El promedio del tamaño de cristalito se estimó usando la ecuación de Debye-Scherrer ($d=0.9 \lambda / \beta \cos \theta$), donde d es el tamaño del cristal, λ es la longitud de onda para el $\text{CuK}\alpha$, k es la constante de forma (0.89) y β es la anchura a media altura del pico máximo de difracción (FWHM). El software PowderCell 2.0 se utilizó para comparar los datos experimentales y teóricos para el cálculo de los valores d , y los cambios en los parámetros de red de las muestras obtenidas.

3.7 Medición de la absorción específica de potencia (SPA).

La determinación del SPA de los coloides magnéticos obtenidos se midió por triplicado en un aplicador comercial de AC (DM1, nB nanoscale Biomagnetics, Spain), con amplitudes de campo H_0 en el rango de $3.97 \text{ k Am}^{-1} \leq H_0 \leq 23.9 \text{ k Am}^{-1}$ ($1 \text{ Oe} = 79.5775 \text{ Am}^{-1}$) a una frecuencia fija de $f = 570 \text{ kHz}$ (Figura 30A).

Los experimentos *in vitro* se realizaron en células BV-2 a una frecuencia fija $f = 570 \text{ kHz}$, y programando el dispositivo una temperatura constante de inducción de la hipertermia a $T = 46 \text{ }^\circ\text{C}$, que se logra mediante un mecanismo de retroalimentación que controla la intensidad del campo H_0 . Las muestras se acondicionaron en un espacio quasi-adiabático con un pequeño volumen ($\sim 0.5 \text{ ml}$) formando pastillas o botones celulares compactos de $2-8 \times 10^6$ células (Figura 30B). La potencia liberada por el coloide magnético por unidad de masa de contenido de hierro está dada por la absorción específica de potencia (SPA) expresada en $\text{W/g}_{\text{Fe}_3\text{O}_4}$, el cuál fue calculado con la ecuación 4.

3.8 Condiciones de cultivo de células BV-2.

La línea celular de cerebro murino inmortalizada BV-2 (ATCC®CRL-2467) se cultivó en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM L-glutamina. Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con humedad saturada conteniendo 95% de aire y 5% de CO₂.

3.9 Ensayos de viabilidad o toxicidad celular.

Para los ensayos de viabilidad se sembraron 3×10^5 células en fase exponencial de crecimiento en placas de 6 pozos y se incubaron por 24 horas como se ha descrito previamente. Los experimentos se realizaron por triplicado. El medio de cultivo se adicionó a concentraciones cada vez mayores de MNPs (25, 50 y 100 µg ml⁻¹) y se incubó nuevamente por 24 h. Después de 48 h las células fueron cosechadas y sometidas al ensayo de exclusión de azul de tripano, para estimar el número de células vivas (no-teñidas) y muertas (color azul). En el ensayo 30 µl de la muestra de células se diluyeron (1:1) en una solución al 2% del colorante azul de tripano. La viabilidad celular se estimó utilizando la cámara de Neubauer (Blau Brand Germany, 718605). La densidad y viabilidad se calculó de acuerdo a Calatayud et al, 2014 (220). Las células adheridas en la placa de cultivo y las del sobrenadante se consideraron en los cálculos.

3.10 Determinación de las MNPs internalizadas por las células BV2.

Para evaluar la tasa de internalización de las MNPs por las células BV-2, se sembraron por triplicado 3×10^5 células en placas de 6 pozos. Después de 24 h de incubación se reemplazó el medio y las células fueron incubadas con concentraciones crecientes de MNPs (0, 25, 50 y 100 µg ml⁻¹). A las 48 h, las células fueron cultivadas y lavadas con PBS (3 veces con 2 ml), tripsinizadas y sometidas al ensayo azul de tripano (solo células adheridas). Posteriormente el botón celular se lavó con agua MilliQ y se centrifugó a 1200 RPM (279 x g) para remover completamente el medio de cultivo. El botón celular se digirió con una solución de HCl 6 M-HNO₃ (65%) para el ensayo de tiocianatos y la cantidad de MNPs internalizadas (incorporadas o fuertemente adosadas a la membrana celular) por las células

BV-2 se cuantificó por espectroscopia de absorción UV-Vis. El tiempo de duplicación (T_D) de las células BV-2 se determinó para establecer los tiempos de incubación óptimos con las MNPs (221).

3.11 Mediciones con AMF (*Alternating Magnetic Field*).

Para los experimentos de hipertermia *in vitro* se crecieron las células BV-2 en confluencia en cajas de cultivo celular de 75 cm². Las células se cultivaron toda la noche a 37 °C con 100 µg ml⁻¹ de MNPs. Al día siguiente las células se lavaron con PBS (3 veces con 5 ml), se tripsinizaron, centrifugaron y resuspendieron en un tubo de PCR con 150 µl de medio DMEM suplementado. Cada muestra consistió de $\geq 1.8 \times 10^7$ células. Para tener un control preciso del calor suministrado durante los experimentos de hipertermia se probaron previamente 3×10^6 células con una concentración de 100 µg ml⁻¹ de MNPs. Los botones celulares fueron sometidos al AMF con un aplicador comercial (modelo DM100 de nanoscale Biomagnetics SL, Spain) (Figura 30A) trabajando a una $f = 570$ kHz fija y una amplitud de campo de 300 Gauss (23.9 kAm⁻¹) con una temperatura blanco constante de 46 °C por 30 minutos (Figura 30B). Esta temperatura se seleccionó debido a que en el intervalo comprendido de 43 a 45±1 °C ocurre el estrés celular, donde se ha reportado un efecto terapéutico de la hipertermia magnética *in vivo*, como se ha expuesto en la sección 2.3.6. (89,101). Además en experimentos previos en esta línea celular, se ha inducido la muerte celular por apoptosis con MNPs provenientes de síntesis químicas (144). La temperatura se mantuvo mediante un mecanismo de retroalimentación que modula la amplitud del campo. El aplicador está equipado con un espacio adiabático (~0.5 ml) para mediciones en fase líquida, aislado en un Dewar conectado a una bomba de vacío (10⁻⁷ mBar). La temperatura se midió utilizando un termómetro de fibra óptica el cual se colocó al centro del botón celular (Figura 30B). Después de las pruebas de AMF, las células fueron sub-cultivadas por 6 horas. La viabilidad celular se determinó por el ensayo de azul de tripano. Finalmente, la concentración de hierro se determinó mediante el ensayo de tiocianatos por UV-Vis.

El diseño del equipo de aplicación del AMF son propiedad intelectual del INA-España por lo cual solo se esquematiza un diagrama que representa las condiciones eléctricas

para la generación del campo AC (figura 30A). Este campo tiene una amplitud de 0.1 T en el punto de referencia (P), cada color en la barra representa una reducción del 5% del campo magnético. El vial se colocó al centro del punto de referencia (Figura 30B).

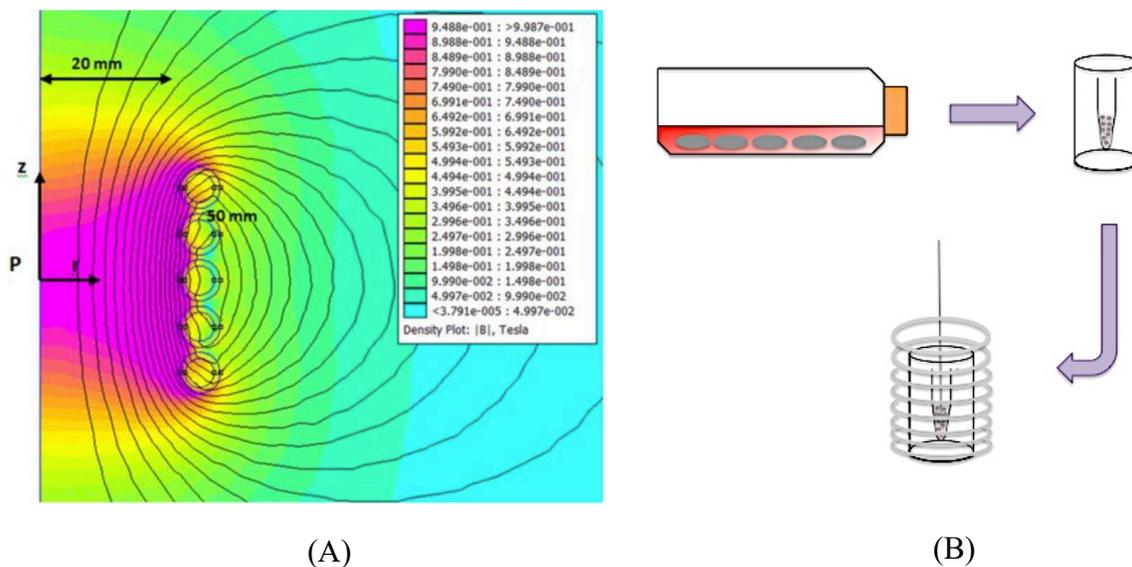


Figura 30. (A) Esquema de la bobina y distribución del área de campo magnético de aplicación. (B) Esquema de la hipertermia magnética *in vitro*.

3.12 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y barrido de haz de iones (FIB-SEM).

Las muestras de magnetita se diluyeron en etanol al 70% y fueron sonicadas 15 minutos. Unas gotas se colocaron en rejillas de cobre con cubierta de formvar-carbón y fueron observadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL, JEM2010, LaB₆, a 200 keV del CINVESTAV-IPN y en un FEI Tecnai T20, a 200 keV en el INA-UNIZAR. El promedio del tamaño de partícula se determinó midiendo grupos de alrededor de 200 partículas y su distribución se ajustó a una función Gaussiana normal. Se obtuvieron los patrones de difracción por área selecta de electrones (SAED), los cuales demostraron la presencia de la estructura FCC en espinela inversa de la magnetita Fe₃O₄ en las MNPs. La indexación de los anillos de difracción (*hkl*) se obtuvo a partir de la relación $d = \lambda L / r$. Donde d es la distancia interplanar, r el radio del anillo en cm, L la distancia de cámara (20 cm) y λ la longitud de onda ($\lambda = 0.0027$ nm) al voltaje de aceleración de trabajo. Las distancias

interplanares obtenidas en SAED se compararon con las obtenidas por difracción de rayos-X y las analizadas con el software MATCH! 2.2 y POWDER CELL.

Para estudiar la internalización, distribución intracelular y los efectos de la aplicación de la MHT en las células BV-2 incubadas con MNPs, éstas fueron sometidas a un proceso de preparación química para su observación y corte *in situ* en el SEM-FIB. Las células sometidas al experimento de hipertermia (sección 3.11) se fijaron con glutaraldehído al 4% a 4°C por 2 h. Posteriormente fueron lavadas con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M, pH = 7.2 y resuspendidas en glutaraldehído al 2% a 4°C por 4 horas. Seguidamente se postfijaron 1 h con tetraóxido de osmio al 2% conteniendo 2.5% de ferrocianuro de potasio. Las muestras fueron lavadas con amortiguador de cacodilato de sodio y gradualmente deshidratadas en acetona (30-100%). La tinción se realizó durante la deshidratación con acetato de uranilo empobrecido en acetona al 50% y finalmente se incluyeron en resina Epóxica. Los cortes ultrafinos (70 nm) se colocaron en rejillas de cobre de 200 mesh y fueron contrastadas con citrato de plomo antes de su observación con el microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai T20 a 200 kV. Para las observaciones en el microscopio electrónico de barrido con haz de iones (FIB-SEM) una gota de las muestras deshidratadas se colocó en un cubreobjetos y fueron recubiertas con oro-platino. Las imágenes se obtuvieron a 5 y 30 kV usando la columna del FEG. Una combinación del haz de electrones y de iones de Ga a 30 kV (0.4 nA) se utilizaron para realizar los cortes de cada célula (Figura 4.12). La espectrometría por EDS-X permitió la ubicación e identificación del contenido de hierro intracelular (Figura 4.13).

CAPÍTULO 4.

RESULTADOS, DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

4. RESULTADOS.

Las MNPs obtenidas por este método de síntesis con extractos acuosos de canela (C-MNPs) y vainilla (VP-MNPS, SV-MNPs), se utilizaron como una alternativa amigable con el ambiente a los agentes reductores químicos tóxicos comunes de las síntesis orgánicas (A-

MNPs). La ventaja de estas síntesis verdes es el uso de compuestos naturales como el cinnamaldehído, vanillina, etc., abundantes en estos extractos, empleados como agentes para la formación de centros de nucleación, crecimiento, recubrimiento y biorreducción de las sales metálicas de los iones $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{2+}$ en disolvente acuoso (agua desionizada). Adicionalmente, éstas MNPs también pueden utilizarse como acarreadores de compuestos polifenólicos con aplicaciones diversas en el área médica para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y cáncer. Para su potencial aplicación médica es de interés conocer las propiedades de las MNPs obtenidas por esta metodología, por lo cual, en ésta sección se presenta la caracterización de sus propiedades físicas de cristalinidad, distribución de tamaño, estabilidad coloidal, saturación de la magnetización a temperatura ambiente, oxidación de su superficie y su capacidad de calentamiento (SPA) en medio acuoso y en células *in vitro*. Así mismo, se evaluó su toxicidad en células en cultivo *in vivo*, corroborando que estas MNPs crecidas con los extractos naturales, son bien toleradas por las células a concentraciones de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, donde las MNPs de síntesis químicas comienzan a inducir efectos de citotoxicidad. Esto aunado a la oxidación de sus superficies a maghemita, contribuye positivamente a disminuir el efecto citotóxico comúnmente reportado para las MNPs de magnetita. Finalmente, se determinó su capacidad de calentamiento *in vitro* en un modelo de estudio de enfermedades neurodegenerativas y tumorales (células BV-2) con AC ($H_0 = 23.9 \text{ kA m}^{-1}$ y $f = 570 \text{ kHz}$) a la concentración mencionada y se cuantificó el efecto de la MHT *in vitro* en la viabilidad celular, así como, sus efectos citotóxicos en los cambios morfológicos ultraestructurales por SEM-FIB y TEM.

4.1 Análisis de propiedades físicas de las MNPs.

Los análisis por XRD de todas las muestras (C-MNPs, VP-MNPs y SV-MNPs) mostraron los picos principales de difracción de la magnetita (A-MNPs) en (2θ) a 30° (220), 35.19° (311), 43° (400), 53° (422), 57° (333, 511) y 62° (440) (Figura 4.1-a). Estos picos se

encontraron ligeramente desplazados (Figura 4.1b) hacia la maghemita (222) debido a la oxidación de su superficie durante su síntesis (Figura 4.1c).

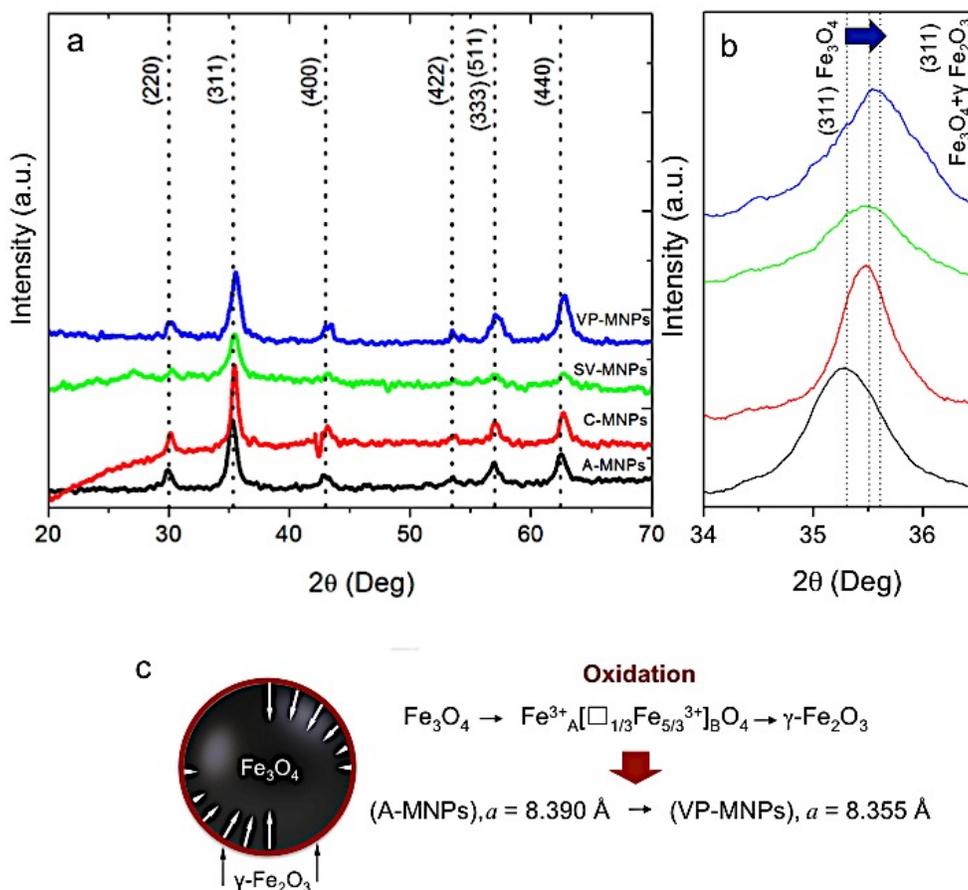


Figura 4.1. (a) Patrón de XRD de las MNPs Fe₃O₄@Fe₂O₃ de los extractos acuosos de *C. verum* (C-MNPs); vainas de *V. planifolia* (VP-MNPs) y vainilla sintética (SV-MNPs). (b) Amplificación de la región 2θ ≈ 35.5° que muestra los picos de difracción de los planos cristalográficos en (220), (311), (400), (422), (511) y (400) esperados para Fe₃O₄ en A-MNPs (no oxidadas) a γ-Fe₂O₃ y las MNPs recubiertas por fenoles. (c) Representación esquemática de la oxidación de la superficie de VP-MNPs.

El proceso de oxidación presumiblemente ocurre de la superficie hacia el interior de las MNPs, dado que ésta reacciona con la forma oxidante de las moléculas de agua de los extractos y sus polifenoles (-OH) creando una capa de maghemita. Esto ocurre sin alteración de la estructura de la espinela inversa, puesto que las MNPs pueden ser recuperadas fácilmente por decantación magnética durante los lavados. Se ha demostrado experimentalmente que la concentración de los cationes de Fe²⁺ disminuye del centro hacia

la superficie de las nanopartículas a medida que transcurre la oxidación, debido a la difusión de los cationes de hierro, lo que aumenta con el tiempo el espesor de la envoltura externa de maghemita disminuyendo el radio del núcleo magnético y en consecuencia la saturación de su magnetización (223). Las constantes de red también se ven afectadas por este proceso de oxidación y como se ha reportado (223) éste disminuye a medida que el agente oxidante es más agresivo, por lo cual estas síntesis con antioxidantes en la mezcla del extracto ejercen un efecto protector al ataque de la superficie de las MNPs por las moléculas de agua.

La orientación cristalina del plano principal de crecimiento fue (311). Una pendiente no lineal en la línea base de los patrones de difracción pudo apreciarse, lo cual corresponde a contribuciones no cristalinas remanentes de las biomoléculas en las muestras debido a su unión covalente entre los iones de hierro y los polifenoles durante la reducción, crecimiento y recubrimiento de las MNPs (Figura 6.1a y 29). La media del tamaño de cristalito $\langle d \rangle$, se estimó a partir de la anchura a media altura del pico principal de difracción del análisis (FDHW), donde $\langle d \rangle = 14$ nm para C-MNPs (*C. verum*) y $\langle d \rangle = 12$ nm para SV-MNPs y VP-MNPs (*V. planifolia*) extracto sintético y de vainas, respectivamente.

Una característica específica de este método de síntesis es que las biomoléculas (polifenoles) de los extractos naturales utilizados produjeron MNPs de magnetita con superficies oxidadas, con una estructura core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. La oxidación de las MNPs es de esperarse, normalmente se origina durante su procesamiento y manipulación al exponerse al oxígeno del medio ambiente y la naturaleza de los polifenoles en la biomasa, lo cual es consistente con los pequeños cambios en el promedio de los parámetros de la celda unitaria $a = 8.355$ Å en VP-MNPs, y $a = 8.366$ Å en C-MNPs (Tabla 4.1). Estos cambios con respecto a los parámetros de Fe_3O_4 son consistentes con las vacancias de Fe^{2+} de la estructura $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de la superficie de las MNPs. Esta oxidación se debe a que la concentración del extracto utilizada durante la síntesis puede oxidar la superficie de las MNPs y producir vacancias durante el procesamiento. A consecuencia de esta capa oxidada de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, la superficie de las MNPs tiene una mayor estabilidad tanto en tiempo y a los ataques químicos, una clara ventaja para las aplicaciones biomédicas (224).

Tabla 4.1. Parámetros físicos de las MNPs Fe₃O₄@Fe₂O₃.

Sample	Plant extract	Base	XRD particle size (nm)	TEM particle size (nm)	XRD cell parameter (Å)	TEM cell parameter (Å)	MFM domain size (nm)	H _c (Oe)	M _s (emu/g)	SPA (W/g Fe ₃ O ₄)
A-MNPs	No	(CH ₃ CH ₂) ₄ NOH	13	13.3 ± 1.4	8.390	8.374	4.0	8.66	68.16	195.0 ^a
C-MNPs	Canela (C)	NaOH	14	14.4 ± 1.7	8.366	8.382	5-6	62.81	70.84	335.69
SV-MNPs	Vainilla Sintética (SV)	NaOH	12	14.0 ± 3.1	8.365	8.387	2-3	37.54	60.80	78.93
VP-MNPs	Vainas de vainilla (VP)	NaOH	12	10.2 ± 2.7	8.355	8.372	3.5	13.71	59.45	234.0

* (225)

El espectro de FT-IR (Figura 4.2) muestra los modos vibracionales del enlace Fe-O a 572 cm⁻¹ característico de la formación de la fase de magnetita (Fe₃O₄) (226). La banda ancha de absorción a 3400 cm⁻¹ se debe a las vibraciones de los enlaces O-H. Los picos asociados a 1531 cm⁻¹, indican que el compuesto químico se compone grupos hidroxilo simples (fenol). Las vibraciones de C-H (3000 cm⁻¹) se traslapan con las vibraciones de O-H. El grupo de bandas a bajas frecuencias en el rango de 1536-1060 cm⁻¹, son consistentes con enlaces no saturados (C=C) de compuestos aromáticos, debido a los grupos fenol o quinonas. Estos compuestos son los donadores de electrones durante el proceso de biorreducción (227). Entre este grupo también se ubican las señales de grupos aldehído (C-H torsión) a 1380 cm⁻¹ y ácidos carboxílicos (COO-) a 1460-1265 cm⁻¹. La banda a 1640 cm⁻¹ está asociada a grupos carbonilo de la base orgánica empleada para la síntesis química (A-MNPs). La oxidación de la superficie de las VP-MNPs y SV-MNPs se favorece en las síntesis con los extractos de SV y VP como se aprecia por la separación y desplazamiento de 572 a 642 cm⁻¹ en VP-MNPs y 696 cm⁻¹ en SV-MNPs. Mientras que en A-MNPs y C-MNPs permanece a 572 cm⁻¹ lo que significa que el extracto natural de C tuvo un mejor efecto de protección contra la oxidación de la superficie de las MNPs.

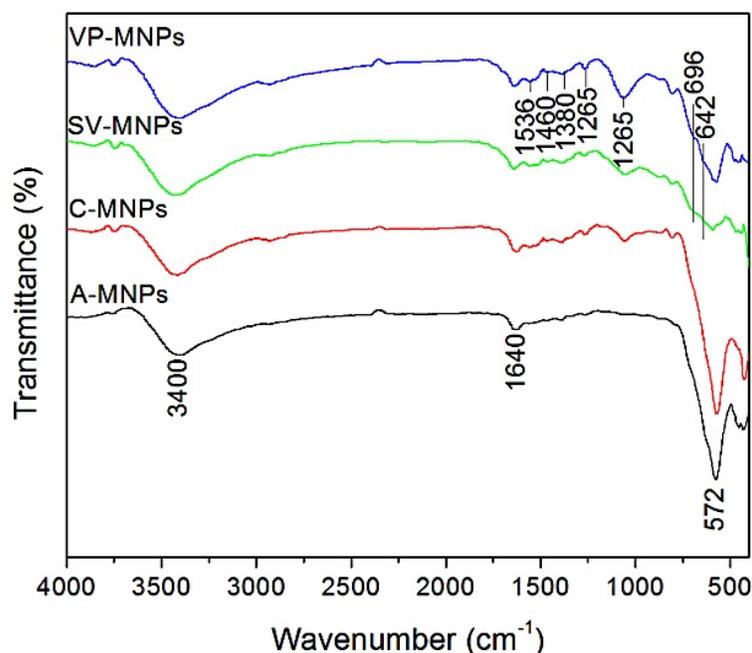


Figura 4.2. Espectro FT-IR de las MNPs sintetizadas con extractos de C y VP. Las bandas a 1536-1060 cm^{-1} indican la presencia de compuestos aromáticos en la superficie de las MNPs.

La morfología y tamaño de todas las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ observadas por TEM fueron de tipo quasi-esféricas (esferas con bordes irregulares). Para las C-MNPs, SV-MNPs y VP-MNPs se observó una capa amorfa de un espesor (t) $t \approx 5-9$ nm (flechas amarillas en las figuras 4.3 b-d) correspondientes a los polifenoles de los extractos acuosos vegetales, lo cual se confirma con lo observado en los espectros de FT-IR (Figura 4.3).

La capa de polímero alrededor de los núcleos magnéticos en las C-MNPs tuvo un espesor menor ($t= 3.45$ nm) que en VP-MNPs ($t= 5.98-8.54$ nm). La media del tamaño de cristal se calculó a partir del ajuste de los histogramas los cuales fueron 14.39 ± 1.7 nm en C-MNPs (del extracto del canela), 14.01 ± 3.0 nm en SV-MNPs (del extracto sintético de vainilla) y 10.15 ± 2.7 nm en VP-MNPs (del extracto de vainas de vainilla), todas dentro del intervalo del tamaño de cristal de la síntesis química donde se utilizó hidróxido de tetraetilamonio (A-MNPs) como agente reductor (Tabla 4.1). La estrecha distribución de tamaño de cristalito se obtuvo con el extracto comercial de vainilla, posiblemente debido a una elevada concentración de polifenoles sintéticos o aditivos comúnmente utilizados en los productos comerciales de vainilla (204). Esta distribución de tamaño fue similar a la síntesis química de nanopartículas (A-MNPs), donde se utilizan compuestos altamente purificados,

mientras que en los extractos de C y VP se obtuvieron distribuciones más amplias de tamaño de cristal. Este efecto puede asociarse a la forma y longitud de las cadenas de las biomoléculas (polifenoles, azúcares reductores, etc.) comunes en los extractos acuosos (23,228,229). Estas, también permiten la formación de diversas formas de nanopartículas como se ha reportado en otras metodologías de biosíntesis que utilizan otros extractos acuosos (24,172). El poder reductor de la mezcla de polifenoles en los iones de Fe tuvo un efecto en el parámetro de red de las MNPs formadas, en comparación con el parámetro de red de A-MNPS ($d = 4.848 \text{ \AA}$). Así las distancias interplanares fueron $d = 4.792 \text{ \AA}$ en C-MNPs, $d = 4.848 \text{ \AA}$ en SV-MNPs y $d = 4.798 \text{ \AA}$ en VP-MNPs, todas asociadas con el plano (111). Los patrones de difracción en SAED correspondieron con el análisis en XRD con los planos (220), (311), (400), (422), (511) y (400) (Figura 4.3). Los polifenoles de origen sintético del extracto comercial favorecieron el crecimiento de fases cristalinas cercanas a la estructura de la magnetita; mientras que aquellos de los extractos naturales oxidaron la superficie produciendo MNPs de magnetita-maghemita, debido a las moléculas de agua adicionales del extracto.

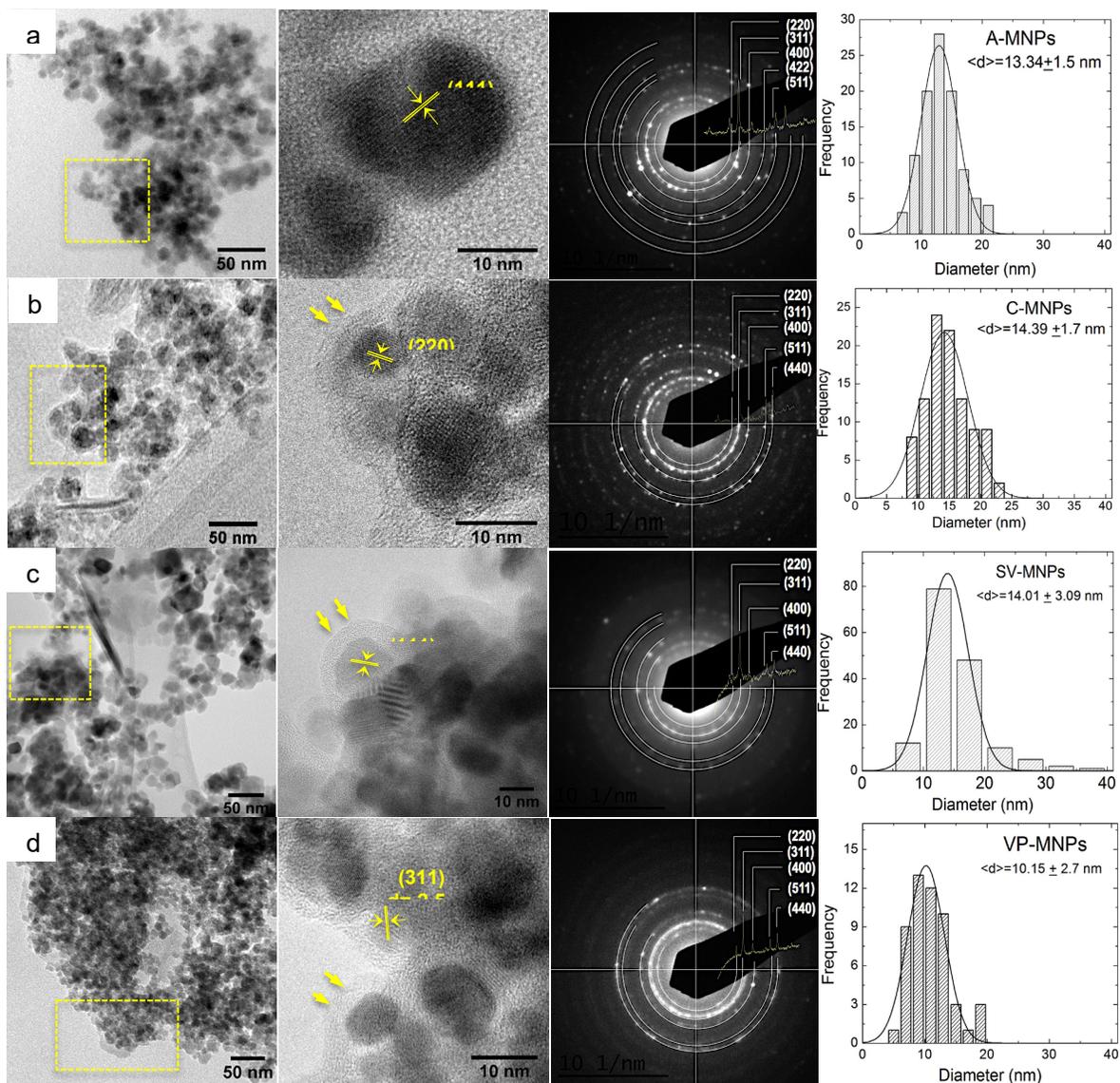


Figura 4.3. Micrografías de TEM de las MNPs sintetizadas con (a) hidróxido de tetraetilamonio (b) Extracto acuoso de C (c) extracto de SV y (d) extracto de VP. En todas las síntesis con extractos las partículas están rodeadas de una cubierta orgánica (flechas, del acercamiento de las imágenes), lo cual disminuye ligeramente su agregación. Los patrones de difracción en SAED corresponden con el análisis en XRD con los planos (220), (311), (400), (422), (511) y (400). Los histogramas y el tamaño promedio de partícula se ajustaron a la función Gaussiana.

Las curvas de histéresis M_S (emu g^{-1}) versus H (Oe) a temperatura ambiente (Figura 4.4) de todas las muestras mostraron un estado superparamagnético de las MNPs, como es de esperarse para las configuraciones de monodominio en estos rangos de tamaño. Una

contribución pequeña del campo coercitivo H_C (ver tabla 4.1) se pudo apreciar, y esta puede originarse a partir de una anisotropía de momento magnético de largo alcance y/o de la contribución de partículas de mayores dimensiones dentro de la distribución de tamaño de partícula.

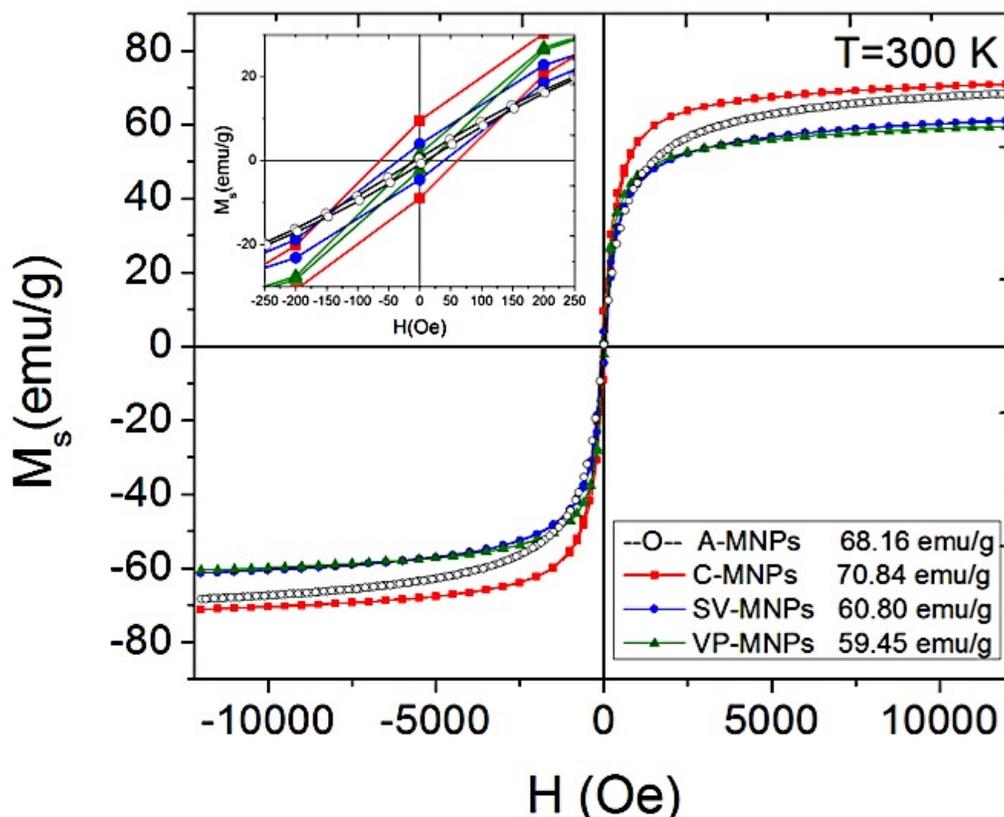


Figura 4.4. Curvas de histéresis de las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Fe}_2\text{O}_3$ medidas a 300 K. El inserto de la izquierda: acercamiento del campo coercitivo de cada síntesis.

Los valores de la saturación de la magnetización M_S de las curvas también se aprecian en la tabla 4.1. Los valores mayores se obtuvieron en la muestra de C-MNPs (extracto de *C. verum*, $M_S = 70.84 \text{ emu g}^{-1}$), lo cual es consistente con la observación de una estructura cristalina más ordenada del núcleo magnético observado en las imágenes de HRTEM. En VP-MNPs (vainas de vainilla), la muestra tuvo el tamaño promedio de partícula más pequeño, con una saturación de $M_S = 59.45 \text{ emu g}^{-1}$, lo cual es muy probable que se relacione con efectos de superficie. Lo que pudimos apreciar es que, dado que el promedio del tamaño de partícula está alrededor de 15 nm, es posible que las distintas capas de los diversos

compuestos fenólicos en las muestras influyan en el ordenamiento de los momentos magnéticos de $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Estos efectos del recubrimiento por los materiales en el ordenamiento del spin se ha reportado para diversas MNPs con cubiertas de sílice, dextrán y almidón. (230) Considerando todos estos valores la M_S se comparó con otros datos reportados de MNPs obtenidas por biosíntesis: $M_S = 55.4 \text{ emu g}^{-1}$ usando extracto de *Mimosa pudica* (231); $M_S = 22.1 \text{ emu g}^{-1}$ de *Sargassum muticum* (232); $M_S = 13.2 \text{ emu g}^{-1}$ con *Passiflora tripartite var.* (233); $M_S = 37.1 \text{ emu g}^{-1}$ con brotes de soya (234); $M_S = 68 \text{ emu g}^{-1}$ de *Aspergillus niger* (235); $M_S = 15.8 \text{ emu g}^{-1}$ con cáscara de plátano (236); $M_S = 13.6 \text{ emu g}^{-1}$ *Syzygium cumini* (237) y $M_S = 48.77 \text{ emu g}^{-1}$ de la bacteria marina *Shewanella sp.* (238). De hecho, hasta donde conocemos, las C-MNPs obtenidas de esta reacción de un sólo paso con extracto de *Cinnamomun verum* tiene los valores de $M_S = 70.84 \text{ emu g}^{-1}$ más altos reportados.

Las propiedades magnéticas de las muestras se evaluaron con mediciones en AFM-MFM para observar en tiempo real la orientación de los dominios magnéticos de las MNPs monodominio bajo una señal magnética AC (Figura 4.5). El promedio de la señal de los dominios magnéticos mostró la precesión esperada bajo los campos de AC, lo cual se reflejó en los perfiles topográficos (Figura 4.5 d), y la naturaleza uniaxial de los dominios magnéticos cambió de acuerdo a la respuesta en las fuerzas de atracción o repulsión en las condiciones de separación muestra-punta magnética del MFM. Esto puede observarse en los cambios de distribución en las MNPs que dependen de la magnetización de la punta (cantilever), reflejando la dependencia de la interacción de las MNPs en su tamaño y topografía. Las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-}@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ monodominio pueden alinearse por un campo magnético externo y regresar a sus condiciones iniciales.

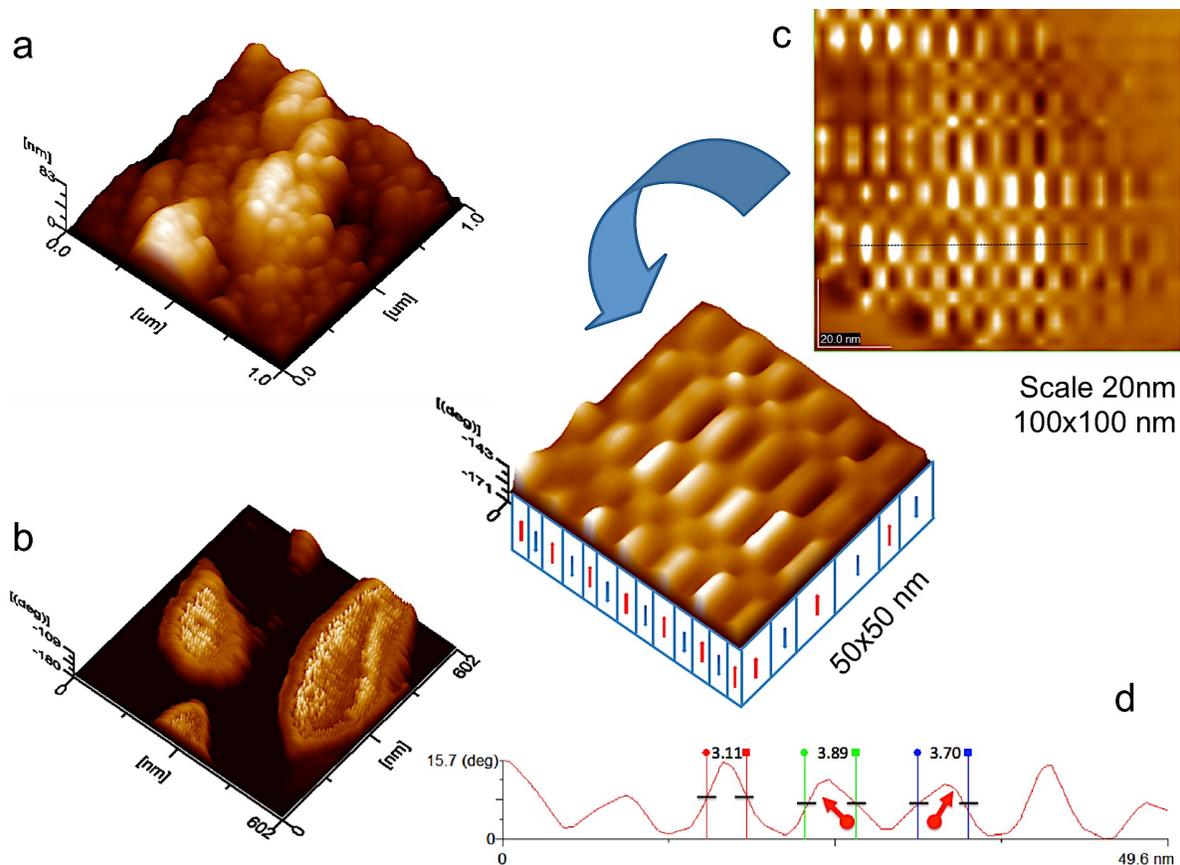


Figura 4.5. Dominios magnéticos en VP-MNPs. (a) topografía de las nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fe}_2\text{O}_3$; (b) MNPs individuales totalmente saturadas; (c) dominios magnéticos en la región del núcleo y su orientación en respuesta al AC (flechas), e interacción de las zonas de atracción (regiones brillantes) o de repulsión (regiones oscuras); (c) la línea punteada indica la proyección de los dominios seleccionados y sus dimensiones (d) en perfil.

Figura 4.5.1 se muestran las interacciones de los dominios magnéticos y su orientación esperada (inserto de la figura 4.5.1) siguiendo el campo magnético. Los perfiles de los dominios magnéticos mostraron un promedio de tamaño de dominio de 6 nm para las C-MNPs, y cerca de 3 nm en SV-MNPs y VP-MNPs. Todos los dominios presentaron un comportamiento uniaxial como se aprecia en las figuras 4.5.1 (a3) y (b3). La topografía exhibió una aglomeración de las MNPs (figura 4.5a) con una interface entre los dominios (figuras 4.5.1 a2 y b-3). El campo AC $H \geq 12,000$ Oe se aplicó hasta que las MNPs manifestaron un estado completamente saturado (figura 4.5.2).

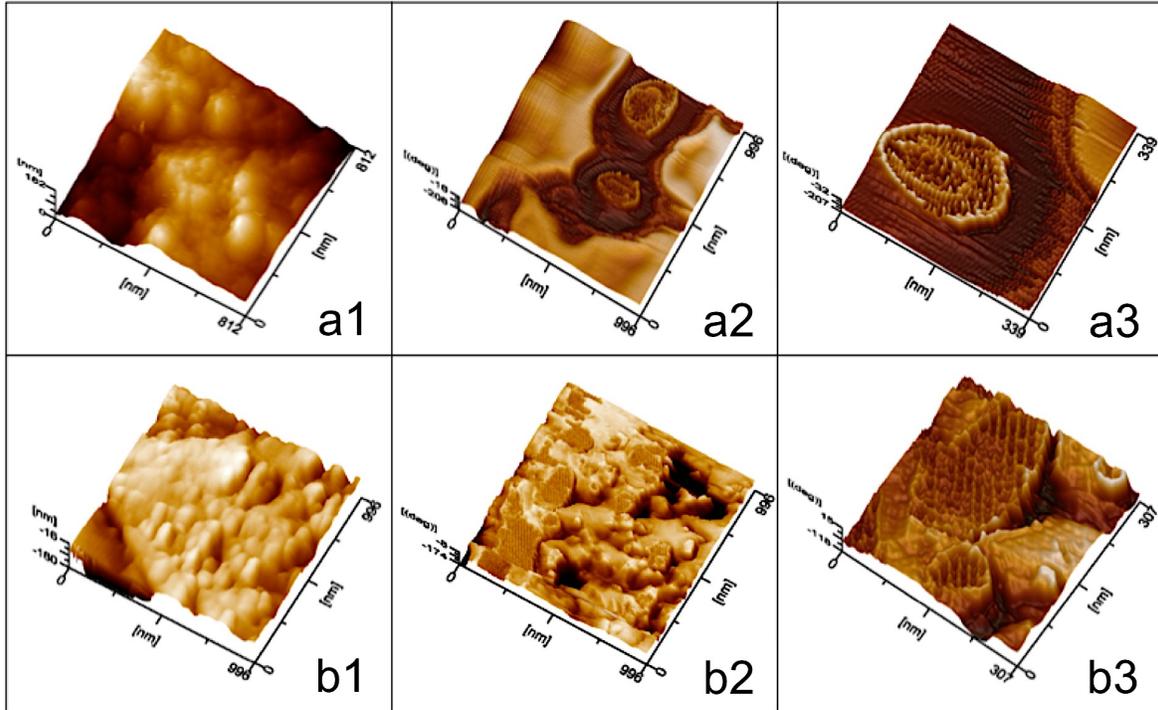


Figura 4.5.1. Imágenes por AFM *tapping* y MFM de las nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Fe}_2\text{O}_3$, muestras de (a) extracto de vainas de vainilla y (b) canela. Topografía por AFM de la superficie (a1 y b1), exhibe un grupo de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{Fe}_2\text{O}_3$ sintetizadas por biorreducción. En el modo MFM se apreciaron los dominios magnéticos (a2, b2). En el acercamiento los dominios magnéticos (a3, b3) cambian su respuesta a la magnetización de la punta. Se observa el promedio de las interacciones positivas (zonas brillantes) y negativas (zonas oscuras) de los espines. Los cambios en la densidad de energía se observan del centro hacia la periferia (a3). Los dominios magnéticos pueden orientarse por el campo magnético aplicado en un arreglo paralelo (b3). En ambas muestras la orientación de la magnetización exhibe monodominios magnéticos debido a la reducción del tamaño de cristal.

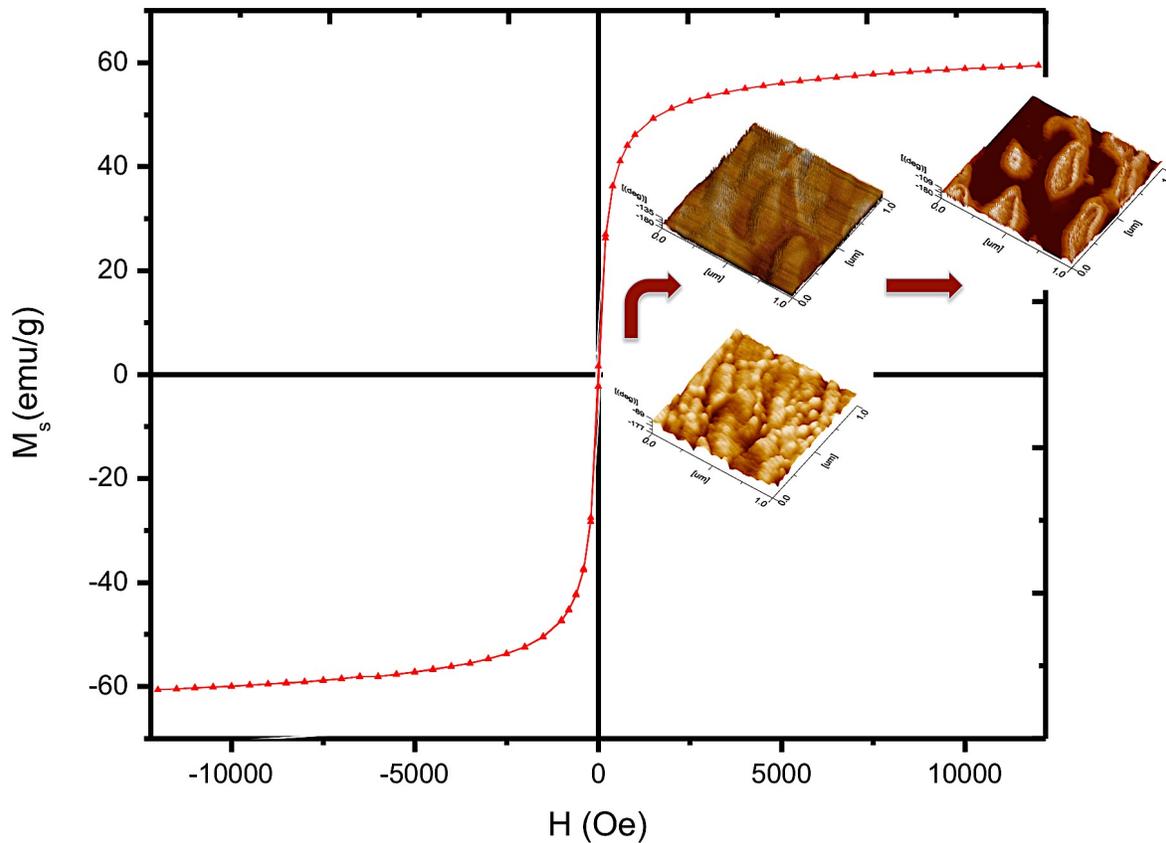


Figura 4.5.2 Curva de histéresis de VP-MNPs y en los insertos, imágenes de AFM-MFM de la secuencia de magnetización de los dominios magnéticos. Estas imágenes ilustran el comportamiento de los dominios magnéticos a escala atómica en las MNPs cuando se aplica el AC. Primero en las imágenes de arriba de derecha a izquierda en el estado saturado de las MNPs, se observa la orientación uniaxial al aplicar el AC. Posteriormente a medida que el campo magnético disminuye, también lo hace la respuesta de los dominios magnéticos. Finalmente, al quitar la magnetización no hay respuesta o magnetización de los dominios magnéticos en la superficie de las MNPs y la energía del AC se libera como calor. Finalmente, el campo es aplicado nuevamente y la respuesta de las MNPs sigue la dirección de la curva de magnetización en un ciclo de retroalimentación. Área escaneada $1 \mu\text{m}^2$.

4.2 Mediciones de la absorción de potencia.

El estudio sistemático de la dependencia del SPA con el campo aplicado H_0 se realizó para determinar la mayor eficiencia de calentamiento de las MNPs en agua (Tabla 6.1). Los datos se ajustaron de acuerdo con la dependencia del campo $\text{SPA} = AH_0^\lambda$, donde A es la constante que depende de la susceptibilidad magnética inicial de las MNPs y λ es el parámetro que permite estimar la validez de la teoría de la respuesta lineal (110). El mejor

ajuste produjo valores de $\lambda = 2.5 \pm 0.5$ para SV-MNPs, $\lambda = 2.7 \pm 0.4$ para VP-MNPs y $\lambda = 2.4 \pm 0.4$ para C-MNPs, valores cercanos al esperado $\lambda = 2$ dentro del rango de validez para la respuesta lineal (Figura 4.6). Los valores más elevados de SPA con $f = 570$ kHz y $H_0 = 23.9$ kA m⁻¹ se encontraron para las C-MNPs (SPA = 335.69 W g⁻¹), las cuales también tienen los valores más altos de M_S y H_C (tabla 4.1). Para VP-MNPs, con una distribución más amplia de tamaño de cristal, los valores fueron consistentes con la disminución del SPA (233.96 W g⁻¹), y los valores más bajos de SPA fueron observados para SV-MNPs (78.93 W g⁻¹). Dado que el SPA depende de efectos concurrentes de distribución de tamaño de partícula y anisotropía magnética, es difícil establecer el origen del bajo SPA en SV-MNPs sin un análisis sistemático de la configuración magnética en esta muestra.

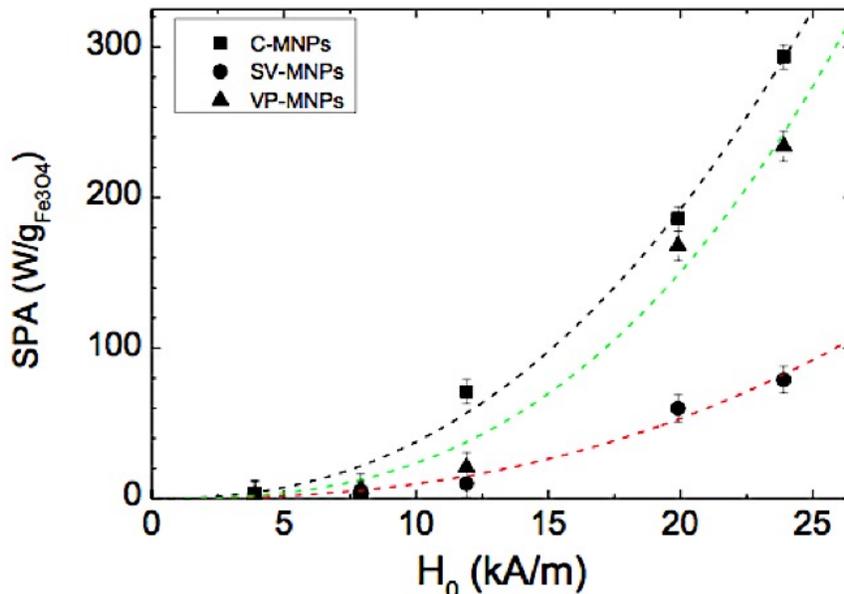


Figura 4.6. Dependencia del SPA con el campo magnético aplicado H_0 ($f = 570$ kHz) para las muestras C-MNPs, SV-MNPs y VP-MNPs en agua. Las líneas punteadas son el mejor ajuste usando $SPA = AH_0^\lambda$ para las tres muestras.

4.3 Experimentos *in vitro* de toxicidad, internalización y poder de absorción.

En experimentos previos con MNPs provenientes de síntesis químicas, se ha incubado la línea celular BV-2 a concentraciones máximas de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, a ésta concentración las

células BV-2 tienen su máximo tolerable y su viabilidad celular comienza a disminuir (144). Considerando estos datos y que nuestras MNPs provenientes de una ruta de síntesis acuosa con extractos vegetales naturales serían de menor toxicidad, se decidió incubar la misma línea celular partiendo de esta concentración. La toxicidad de todas las MNPs en las células BV-2, se evaluaron a una concentración de hasta $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de MNPs, mostrando que aún a esta concentración todas las MNPs son marcadamente inocuas para la línea celular, en todos los casos la viabilidad celular se mantuvo mayor al 94% en comparación con las células control (Figura 4.7). Estos resultados sugieren que los fenoles en la superficie de las MNPs constituyen un camuflaje natural que disminuye la toxicidad en comparación con las MNPs de Fe_3O_4 no recubiertas.

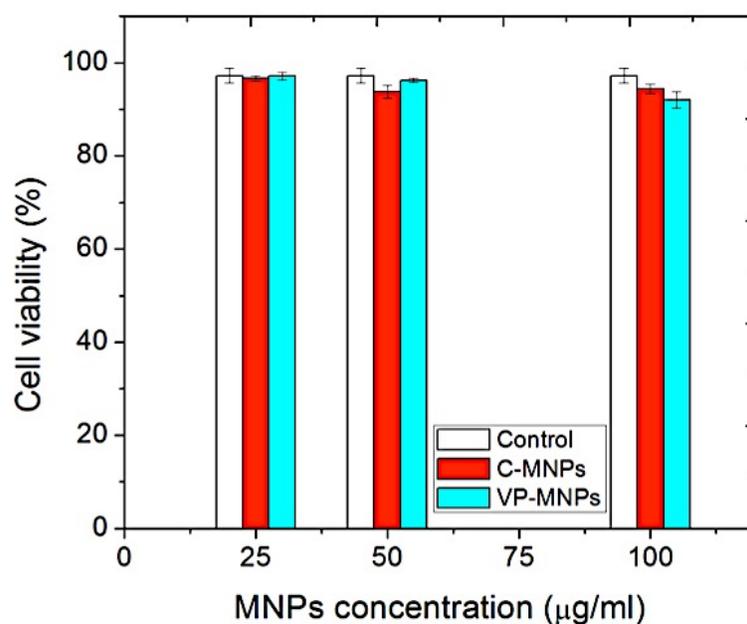


Figura 4.7 Evaluación de la toxicidad de las MNPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Fe}_2\text{O}_3$ en las células BV-2. Células control (sin MNPs): barras vacías; extracto de canela C-MNPs (barras rojas); Extracto de vainas de vainilla VP-MNPs (barras cian). Las mediciones se realizaron por triplicado y las barras de error representan la desviación estándar.

La internalización de ambas C-MNPs y VP-MNPs por las células BV-2 después de su incubación durante toda la noche se cuantificó en función de la concentración de MNPs añadidas al medio (Figura 4.8).

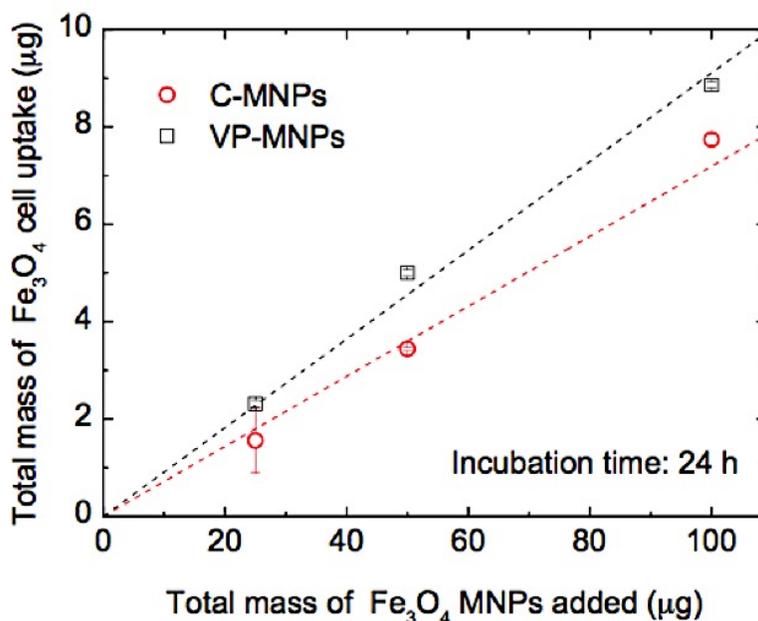


Figura 4.8 Internalización celular vs la masa total añadida de MNPs de Fe₃O₄@Fe₂O₃ (C-MNPs y VP-MNPs) a las 24 horas de incubación.

Para ambas C-MNPs y VP-MNPs se encontró un incremento lineal de la internalización de la masa en relación con la concentración añadida (Figura 4.8). El resultado de la internalización de MNPs fue sistemáticamente mayor para VP-MNPs que C-MNPs. El ajuste lineal de los datos usando la función lineal $y = ax + b$ (con $b = 0$) produjo valores de $a = 0.091$ y $a = 0.071$ para VP- y C-MNPs, respectivamente. Esta tasa de internalización del 9% y 7% reflejan la similitud en sus cubiertas en ambos casos. El mecanismo de interacción de las MNPs con la membrana celular puede relacionarse con los componentes principales en los extractos de cinnamaldehído y vanilina, los cuales añaden una cubierta con cargas negativas por la ionización de sus grupos carboxilo (COO-) expuestos en VP-MNPs y parcialmente una superficie hidrofóbica en C-MNPs debido a los terpenoides (Figura 29). Su tamaño de partícula y cubierta natural orgánica aumentan su razón de difusión a través de la membrana celular con ayuda de los polifenoles y terpenoides que permean fácilmente (239,240).

Las mediciones por DLS indicaron la formación de agregados con diámetros hidrodinámicos (d_H) de 274 nm ($\sigma= 11.7$) en VP-MNPs y de aglomerados de $d_H=828$ nm a 1.08 μm ($\sigma=26.9$) en C-MNPs. Estos aglomerados pueden ser internalizados por las células BV-2 ya que muestran un mecanismo de internalización activo en MNPs no agregadas y aglomeradas.

La distribución intracelular de MNPs se discutirá en la sección de TEM. La figura 4.9a confirmó la formación de grandes agregados intracelulares. Adicionalmente, pequeños aglomerados se observaron adosados a la periferia de la membrana celular, lo cual puede deberse a la activación de receptores específicos de unión a polifenoles (flechas en la figura 4.9b), constituyendo el primer paso para la activación de la vía de endocitosis (130,240). Al interior de las vesículas intracelulares se apreciaron algunas MNPs formando un arreglo en cadenas (Figura 4.9c y d) y no aglomeradas, como se ha reportado que ocurre en MNPs funcionalizadas por métodos químicos (124).

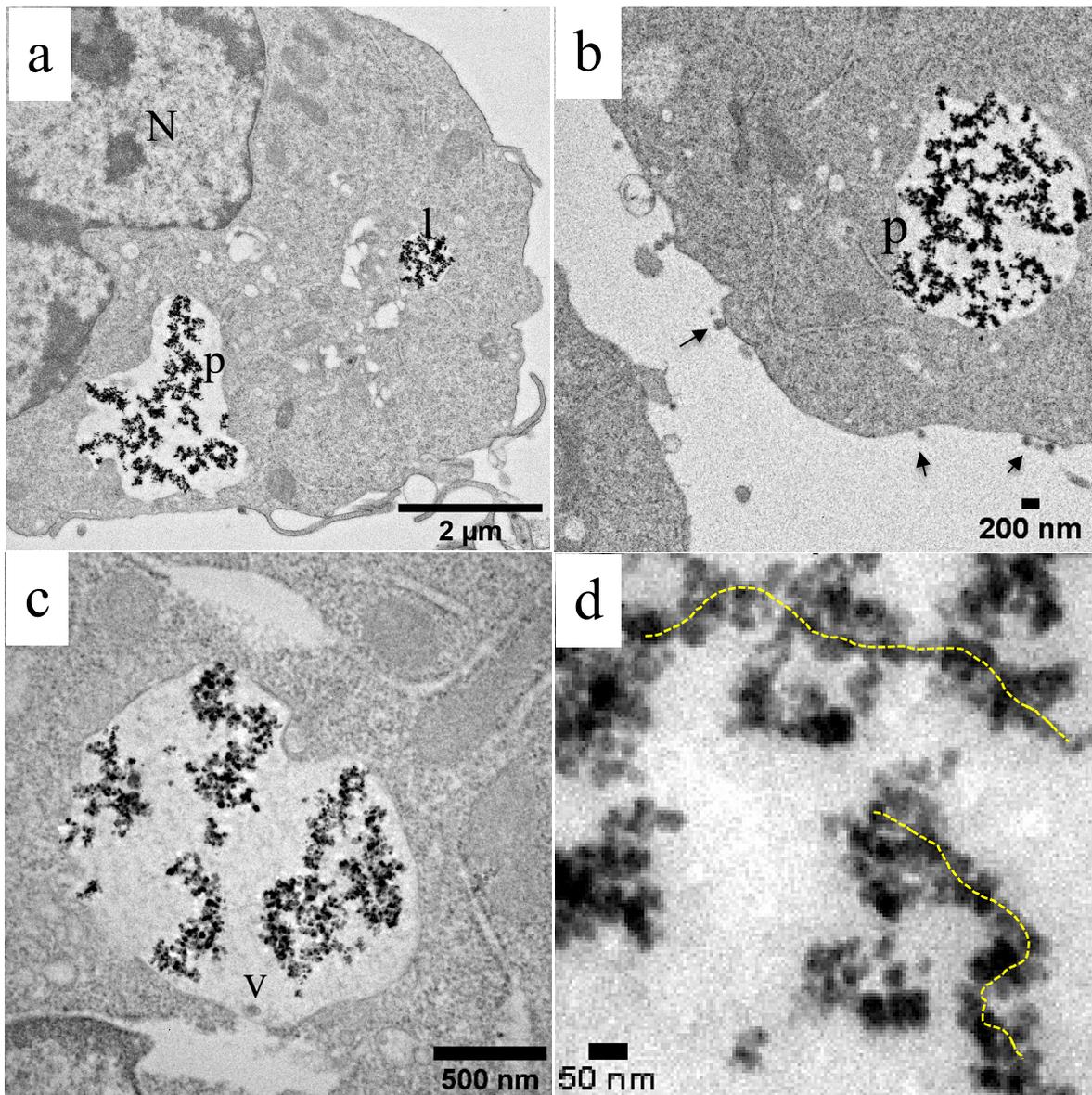


Figura 4.9 De acuerdo a la morfología característica de las vesículas intracelulares como son su tamaño, ubicación cercana a la membrana y degradación parcial de las MNPs, se sugiere la (a) distribución intracelular de agregados de VP-MNPs en un fagosoma (p), endosoma (e) y lisosoma (l) en las células BV-2. (b) Aglomerados pequeños de MNPs se observaron adosados a la membrana celular (flechas). (c) Amplificación de una vesícula intracelular donde las VP-MNPs se disponen formando cadenas y (d) un acercamiento donde se aprecia su ordenamiento (línea punteada). Núcleo celular (N).

4.4 Determinación del SPA en *pellets* de células BV-2.

Evidencia reciente indica que el medio fisiológico (DMEM, viscosidad de las células) modifica el diámetro de las NPs debido a su interacción con las proteínas y factores de crecimiento del medio de cultivo que forman una bio-corona en la superficie de las MNPs. Estas proteínas adosadas a la superficie incrementan el radio hidrodinámico y cambian las propiedades mecánicas de las NPs. Para determinar la capacidad de calentamiento de las MNPs obtenidas con extractos de canela y vainilla dentro del citoplasma, se realizaron experimentos preliminares en pastillas celulares conteniendo $\approx 1.5 \times 10^7$ células. La temperatura obtenida *versus* los perfiles de calentamiento (Figura 4.10) mostró que para $f = 570$ kHz y $H_0 = 23.9$ kA m⁻¹ las células con VP-MNPs la temperatura se incrementó rápidamente por encima de los valores de hipertermia dentro de los primeros segundos (>43 °C después de 65 s), los cuales proveen de energía calorífica suficiente para realizar los experimentos finales de hipertermia magnética (MHT). Por otro lado, usando el mismo número de células con C-MNPs el umbral de temperatura de hipertermia (43 °C) se alcanzó después de 430 s, con un valor máximo de 53 °C después de 25 minutos. Esto es consistente con los valores de SPA obtenidos *in vitro* con SPA = 237 W g⁻¹ y 118 W g⁻¹ para VP-MNPs y C-MNPs, respectivamente. Basándose en estos resultados las VP-MNPs fueron seleccionadas como los sistemas más eficientes para realizar los experimentos de MHT *in vitro* que se describirán a continuación.

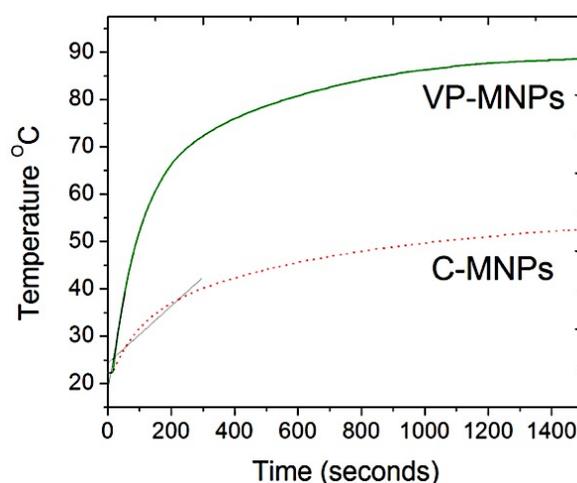


Figura 4.10 Curvas de calentamiento (temperatura vs tiempo) de C-MNPs y VP-MNPs (100 µg/ml) en células BV-2. Para calcular los valores de SPA se tomaron los valores de la pendiente máxima $\Delta T/\Delta t$ en los primeros segundos después de aplicado el campo magnético.

4.5 Hipertermia magnética (MHT) *in vitro*.

Para realizar los experimentos de MHT la línea celular BV-2 se cultivó hasta aproximadamente el 80% de confluencia, se adicionaron $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de VP-MNPs y se incubaron las células por 24 h. Es de notar que el tiempo de incubación fue menor al $T_D = 31.4 \text{ h}$ determinado para esta línea celular, ya que este hecho asegura que la concentración intracelular no cambiará debido a la duplicación celular (221). Después de la incubación, las pastillas conteniendo 1.8×10^7 células se suspendieron en $150 \mu\text{l}$ de medio de cultivo completo. Se seleccionó la temperatura blanco en el equipo de hipertermia de $T = 46 \text{ }^\circ\text{C}$ y se mantuvo durante 30 minutos ($f = 570 \text{ kHz}$ y $H_0 = 23.9 \text{ kA m}^{-1}$) mediante un mecanismo de retroalimentación que controla la intensidad del campo magnético. Las condiciones de control de MHT se establecieron de la siguiente manera: (a) Células BV-2 sin MNPs, (b) células incubadas sin MNPs y no expuestas al AMF, (c) células sin MNPs y tratadas con el AMF, (d) células incubadas con MNPs y expuestas al AMF por 30 min (Figura 4.11 A y B).

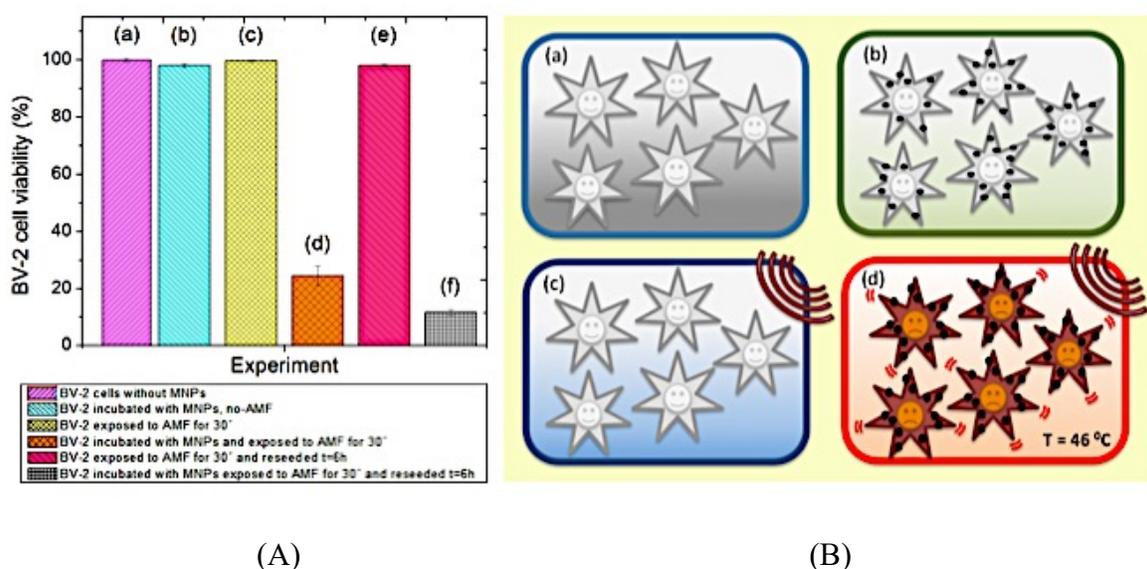


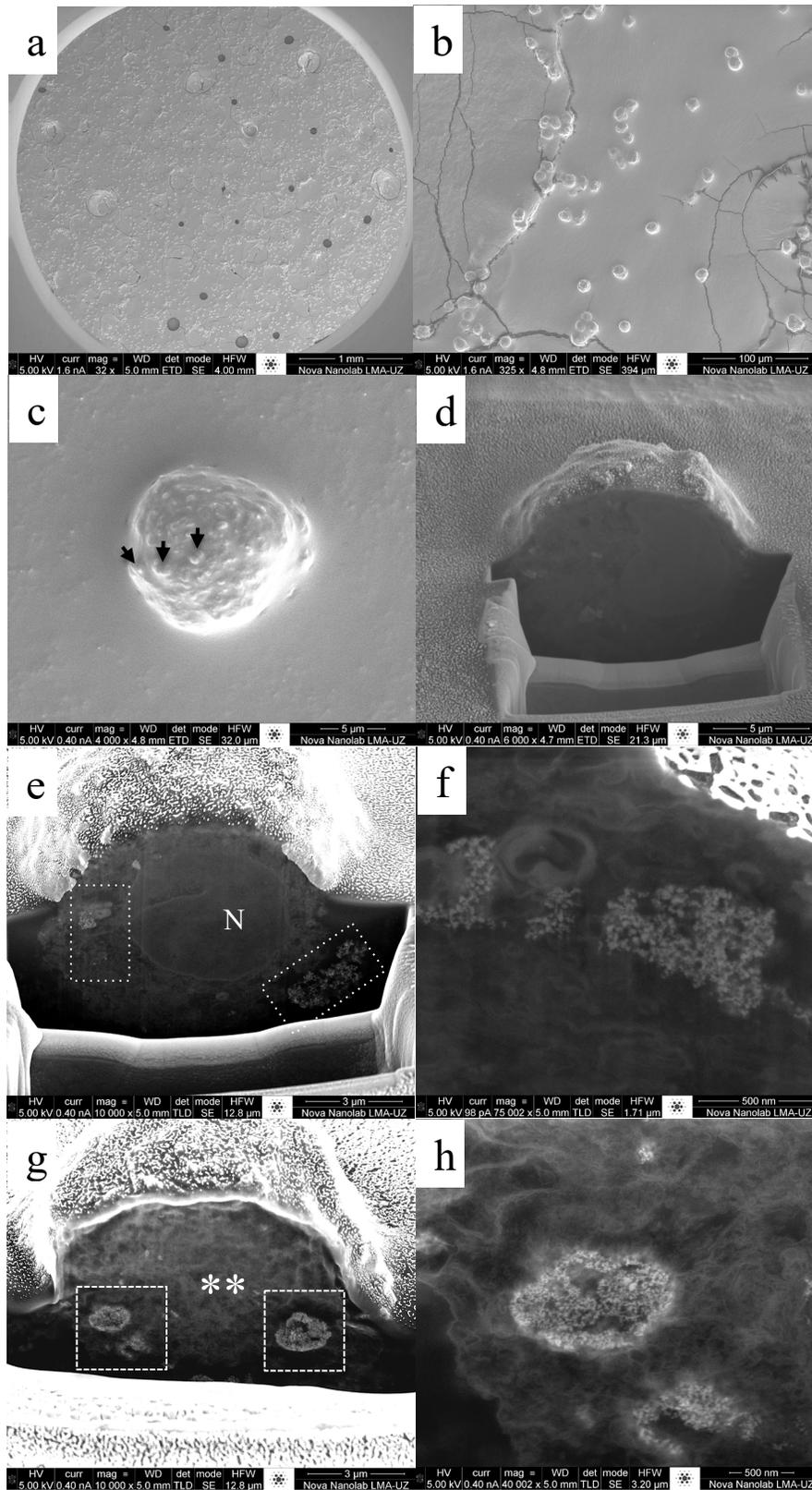
Figura 4.11 (A) Hipertermia magnética en células BV-2. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con VP-MNPs ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) a $f = 570 \text{ kHz}$, $H_0 = 23.9 \text{ kA m}^{-1}$ y a una temperatura blanco $T = 46 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 minutos. Las barras de error son la media de la S.D. (B) Esquema del experimento de MHT (a) células control BV-2 (b) células incubadas con VP-MNPs sin AC (c) células expuestas sólo al AC (d) experimento de hipertermia magnética.

La viabilidad celular se determinó inmediatamente después de la aplicación de AMF (≈ 5 min) y después de transcurridas 6 h ($t = 6$ h) de la resiembra de las células tratadas. Los resultados mostraron que la viabilidad celular examinada inmediatamente después de los experimentos de MHT disminuyó hasta un 20 % en comparación con las muestras control. En las células resembradas, el análisis su viabilidad celular después de 6 h fue aun menor (12 %) reflejando el grado de daño celular inducido por MHT en procesos como: la división celular, rutas metabólicas de los organelos, desnaturalización de las proteínas, entre otros (Figura 4.11A). Esto último también se intuye por las observaciones en las imágenes por TEM y SEM-FIB (Figuras 4.12, 4.13 y 4.14) y como se ha señalado es un efecto citotóxico inducido por el calor generado durante la MHT (94,126,144), como lo indican los estudios tratados en la sección 2.3.6. Estos hallazgos concuerdan con resultados recientes (160) observados en células BV-2 después de ser sometidas a MHT con tiempos de resiembra de 4 horas. Más aún, se ha sugerido que estos efectos pueden estar relacionados con un efecto de exposición no directa (“*bystander effect*”) donde se produce la muerte celular en las células vecinas por el calor generado y biomoléculas secretadas al medio de cultivo en respuesta al estrés celular, que induce la muerte celular por hipertermia magnética en células con MNPs internalizadas (241). En todos los casos los controles celulares mantuvieron su viabilidad celular por encima del 98-99%, asegurando que tanto las MNPs o el AMF solos, no tienen un efecto en la viabilidad celular (Figura 4.11B).

En las células tratadas con MHT y resembradas, se realizó la ubicación y distribución al interior de la célula de las MNPs, primero cortando las células *in situ* en el SEM-FIB y posteriormente identificando el hierro por EDS-X. El procedimiento desde la selección de la célula, corte *in situ* e identificación de los agregados de hierro intracelular (VP-MNPs), se esquematiza en la Figura 4.12. Es de notar el efecto citotóxico o el daño intracelular que ocasiona el tratamiento por MHT ($f = 570$ kHz y $H_0 = 23.9$ kA m⁻¹) es extenso, puesto que componentes celulares como organelos, presentan discontinuidad en sus membranas (Figuras 4.12c, 4.12e-h) con la pérdida de su morfología. Las membranas plasmáticas presentan abultamientos, también resultado de la desorganización membranal (Figura 4.12c, flechas). El citoplasma se aprecia con escasos organelos y parece coagular (Figura 4.12g). En la Figura 4.13a, se aprecia por SEM-FIB una célula tratada por MHT, donde se ubican grandes

agregados de MNPs al interior de una estructura que sugiere un fagosoma, una amplificación muestra que en éstas vesículas las MNPs están parcialmente digeridas formando aglomerados de 15 a 20 nm, este proceso es favorable ya que disminuye sus interacciones dipolares. Las figuras 4.13 y 4.14 muestran la secuencia de los experimentos en las células BV-2 tratadas con MHT. En éstas imágenes se apreciaron las VP-MNPs al interior de las células, cuyo contenido de hierro fue la huella química para su identificación mediante el análisis por EDS-X (figura 4.13d). El efecto citotóxico producido por el tratamiento con MHT también es evidente en éstas imágenes y los cambios morfológicos ultraestructurales expuestos, son consistentes con los reportados en experimentos *in vitro* donde se ha inducido la hipertermia magnética (150).

El proceso de los experimentos desde las células control hasta la muerte celular inducida por MHT se observó en las imágenes obtenidas por TEM (Figura 4.14). La figura 4.14a muestra las células no tratadas con la morfología normal. En la figura 4.14b, las células BV-2 fueron incubadas con VP-MNPs y no expuestas al AMF. Las imágenes por TEM revelaron la formación de grandes vesículas cuyas dimensiones sugieren son fagocíticas y agregados de MNPs en el citoplasma con una distribución casi homogénea. Las células BV-2 después del tratamiento por MHT (figuras 4.14c-i), se observaron con MNPs dispuestas en grandes agregados o cúmulos (como en la figura 4.13a) y otras dispersas en el citoplasma (figuras 4.14 c y f). La figura 4.13b corresponde a imágenes obtenidas por SEM-FIB, donde los agregados de MNPs (15-25 nm) se ubican dentro de vesículas probablemente lisosomas, debido a que se aprecian parcialmente digeridas. Esto disminuye su aglomeración y en consecuencia sus interacciones dipolares. En otros agregados de MNPs se observa su tránsito hacia el citoplasma y se disponen a lo largo de la membrana celular (flechas en la figura 4.13a) y otras adosadas en la superficie de la célula (Figura 4.13a, flechas) contribuyeron a la generación de calor como ocurre en un medio de mayor viscosidad (mediante la fuerza de torque). El SPA en las pastillas con $\geq 1.8 \times 10^7$ células tuvieron una eficiencia de calentamiento de 800 W. Este resultado de la inducción de la MHT lo que incrementa el proceso desnaturalización en las membranas celulares y organelos como se observó en los cambios morfológicos ultraestructurales, en múltiples células en imágenes por TEM (Figura 4.14b).



Figura

Imágenes

FIB de las células BV-2 tratadas con MHT. (a) Campo con diversas células, (b) ampliación, (c) topografía de una célula BV-2, en su superficie se aprecian múltiples protuberancias de membrana (flecha), por efecto del

4.12

en SEM-

calentamiento de las MNPs. (d) Corte longitudinal con el haz de iones Ga sobre la célula, (e) a medida que se devana la célula con el haz de iones, aparecen distintos organelos celulares así como las MNPs distribuidas en cúmulos en el citoplasma y por debajo de la membrana celular (recuadros). (f) Amplificación de los cúmulos de MNPs internalizadas, (g) células donde se aprecia la pérdida de la morfología interna (***) por efecto del calor liberado y (h) la amplificación del daño celular en las regiones cercanas a las MNPs. (N) núcleo celular.

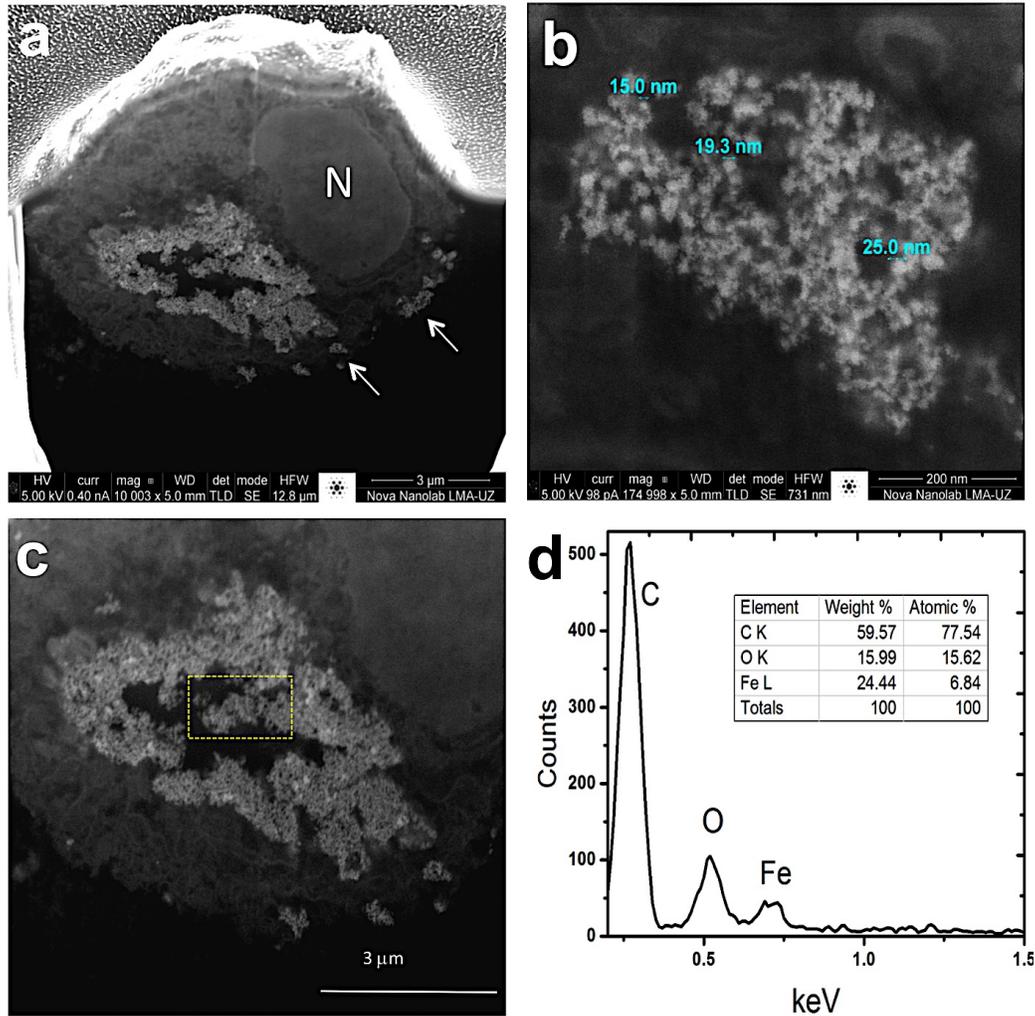


Figura 4.13 Imágenes de SEM-FIB de las células BV-2 (a) después de la aplicación de la MHT a 46°C ($f= 570$ kHz, 23.9 kA m^{-1}) por 30 min, con VP-MNPs ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). El núcleo celular (N) es visible. (a) Las flechas indican MNPs en tránsito de la membrana celular hacia el interior celular. (b) Amplificación de un aglomerado intracelular de MNPs marcado en (c) y su espectro de EDS-X (d) muestra el pico de absorción del hierro de las MNPs.

4.6 Análisis de los cambios morfológicos ultraestructurales del daño celular después del tratamiento por MHT.

La ultraestructura de las células BV-2 incubadas con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de VP-MNPs, sometidas a $f = 570 \text{ kHz}$, $H_0 = 23.9 \text{ kA m}^{-1}$, y posteriormente sembradas por 6 h fueron analizadas por TEM. Las células control sin MNPs añadidas mostraron la ultraestructura normal de las células BV-2 (figura 4.14a). Estas exhibieron numerosas prolongaciones membranales (filopodios), característica común de estas células macrófagos del sistema inmune del cerebro. La ultraestructura de los organelos se observó intacta. Su núcleo ocupa la mayor parte del citoplasma con la cromatina densamente empaquetada (heterocromatina) rodeando la membrana nuclear interna. La heterocromatina está conectada con los sitios muy activos de transcripción del DNA de menor electrodensidad (eucromatina). La ultraestructura altamente organizada del nucléolo con morfología característica se observó como una región prominente y electrodensa. Las células control donde se adicionaron MNPs y no tratadas con MHT (figura 4.14b), exhibieron invaginaciones de membrana prominentes resultado del proceso activo de fagocitosis durante la internalización de las MNPs. Estas invaginaciones en el citoplasma se observaron en posibles lisosomas y grandes vesículas fagocíticas con numerosas MNPs. El nucléolo celular se apreció con un tamaño prominente resultado de la activación de la maquinaria molecular para la síntesis de biomoléculas y maquinaria molecular (pre-rRNAs, subunidades ribosomales) que traducen las enzimas (lisozimas), proteínas etc., requeridas para la digestión de las MNPs y de las cascadas de señalización de la fagocitosis, endocitosis, etc.

Las células incubadas con MNPs y expuestas al AMF (figuras 4.14c-i) presentaron extensas áreas desnaturalizadas en el citoplasma, en donde se apreciaron organelos con ultraestructura muy alterada y sus remanentes rodeados por agregados de MNPs. Las células no presentaron filopodios, debido a la desnaturalización de las proteínas del citoesqueleto durante el calentamiento ocasionado por las MNPs, lo que corresponde a cambios en la organización de éste que alteran la forma de la célula, sus prolongaciones celulares, el aparato mitótico, etc. La inducción de estos cambios morfológicos por efecto citotóxico de la hipertermia, han sido demostradas en diversas líneas celulares (160,242,243) como se ha descrito en la sección 2.3.6. En algunas células la integridad de la membrana celular se perdió

cambiando la osmolaridad de la célula, como resultado el aumento en la permeabilidad de la membrana ocasionó el hinchamiento y formación de protuberancias de la membrana celular (flechas en la figura 4.14e) lo que es consistente con las observaciones por SEM-FIB (Figura 4.12c). Debido a esto las células tienen una apariencia de estallamiento parecido a un proceso de necrosis, pero sin liberación de su contenido citoplasmático al medio extracelular. Dentro de estas células se observaron cuerpos apoptóticos (recuadros en la figura 4.14c).

En la etapa tardía de apoptosis el núcleo celular se encoge y finalmente es fragmentado, llevando a la formación de “cuerpos apoptóticos” (núcleos picnóticos). Algunos se observaron entre las áreas extensamente desnaturalizadas o con escasa organización morfológica en sus organelos celulares, en etapas finales de apoptosis (Figura 4.14d), en comparación con las células control (Figura 4.14a).

Otras células se observaron reducidas en tamaño con citoplasma muy vacuolado, núcleos pequeños y sin filopodios en la periferia de la membrana celular con la formación de fragmentos rodeados por membrana (figura 4.14i). Todos estos cambios morfológicos son consistentes con la muerte celular por apoptosis (244). En otras células se observó la cromatina altamente condensada y con disminución del volumen celular, corroborando este proceso de muerte celular.

En respuesta al aumento de temperatura intracelular se incrementa la síntesis de proteínas de estrés calórico (HSP) (151) y la actividad metabólica celular, refiriéndose éste término al nivel de transcripción de los genes contenidos en estructuras como el nucléolo y la cromatina nuclear, lo cual varía respecto a la fase de la célula (por ejemplo, durante la división celular, la mitosis, en respuesta al estrés, etc.) y se manifiesta morfológicamente en el grado de condensación del material genético (148).

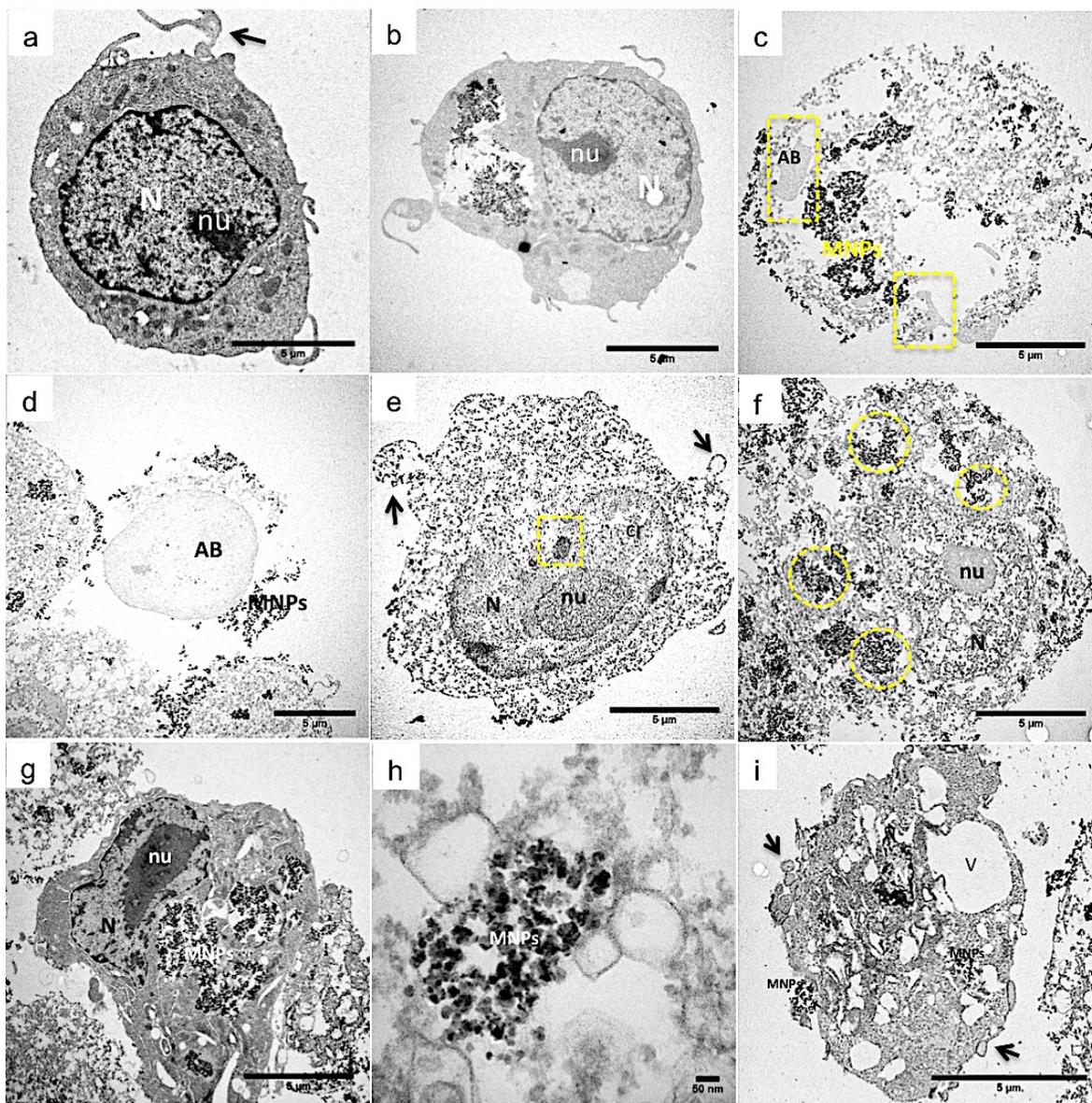


Figura 4.14 Imágenes de TEM de las células BV-2. (a) Célula control (b) incubada con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de VP-MNPs y (c)-(i) experimentos con MHT a 46°C , 30 min, $f = 570 \text{ kHz}$ y 23.9 kA m^{-1} . (h) muestra un acercamiento para mostrar las MNPs. Nomenclatura: Núcleo celular (N), nucléolo (nu), cromatina (cr), cuerpos apoptóticos (AB), vacuolas (V). Nanopartículas magnéticas (MNPs) rodeadas por remanentes de organelos desnaturalizados. Ver descripción en el texto.

Estos cambios pueden monitorearse mediante la condensación y descondensación de la cromatina nuclear (recuadro en la figura 4.14e) así como en la morfología nucleolar. En respuesta al estrés calórico el nivel constitutivo de transcripción del genoma disminuye y como resultado la cromatina se empaqueta en regiones cada vez más densas (152). El

nucléolo se vuelve transcripcionalmente activo y aumenta de tamaño debido a la mayor síntesis de la maquinaria molecular (genes ribosomales pre-rRNA y subunidades del ribosoma) para la traducción de las HSP. Este aumento en tamaño (figuras 4.14 e-g) está asociado con la muerte celular por hipertermia (152,244).

Dentro de la población celular algunas se apreciaron “no dañadas” (figura 4.14g) o con escaso daño en su organización celular como se ha descrito previamente, pero una cuidadosa inspección reveló que el nucléolo presentaba una actividad metabólica aumentada (muy grandes) presumiblemente, por los cambios morfológicos previamente expuestos. Las MNPs internalizadas por las células se apreciaron parcialmente digeridas dentro de los organelos, los cuales también mostraron alteraciones en su ultraestructura. Estas condujeron posiblemente a una disminución en la capacidad de las células para restablecer sus funciones metabólicas y en consecuencia mermaron su supervivencia (figura 4.14f) después del tratamiento por MHT. (160) El nivel de daño depende de la distribución de las MNPs en el citoplasma y del tamaño de los agregados formados, ya sean pequeños (figura 4.14f) o aglomerados grandes (figura 4.14g). Aquellos distribuidos extensamente en el citoplasma mostraron áreas de mayor desnaturalización, mientras que aquellos agregados en una zona prominente no ejercieron un daño intracelular tan extenso, pero se aprecian algunas características morfológicas que indican la estimulación de muerte celular por apoptosis. Estos cambios ultraestructurales sugieren que se induce en unas y otras células tanto la apoptosis y necrosis como mecanismos de muerte celular.

4.7 DISCUSION.

Las síntesis verdes son una alternativa amigable con el ambiente a las síntesis químicas, las cuales son escasamente exploradas para las aplicaciones en hipertermia. Se ha reportado que las nanopartículas de origen biogénico como las de magnetobacterias. Estas presentan diversas propiedades muy útiles para las aplicaciones biomédicas, pero su inmunogenicidad por las proteínas que las recubren durante su formación en estos microorganismos, constituyen su mayor desventaja, la cual debe ser superada antes de su aplicación segura en humanos (184,245). De la misma forma, los métodos de síntesis basados

en el empleo de solventes orgánicos también pueden producir MNPs con excelentes características de calentamiento (94,246). Sin embargo, los productos generados de sus reacciones químicas son a menudo tóxicos peligrosos; por lo cual se debe tener control sobre su producción para evitar el impacto ambiental de estas metodologías.

Aplicando los conceptos de la química verde se han tratado de desarrollar metodologías sustentables, que optimicen el uso de los recursos naturales, a la vez que se promueva la preservación del ambiente mediante la disminución en la producción de residuos tóxicos. En este sentido, este trabajo aporta el desarrollo una síntesis amigable con el ambiente, aprovechando las propiedades de productos de valor agregado como la canela y endémicos de México como la vainilla. Se contribuyó con la extracción de sus compuestos polifenólicos, para la biorreducción de las sales metálicas para la obtención de MNPs de menor toxicidad a los seres vivos y con su potencial aplicación para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y tumorales.

Las nanopartículas sintetizadas con extractos acuosos de plantas ofrecen una ventaja experimental para explorar metodologías de obtención de NPs de menor toxicidad de estos materiales. Destacan sobre otras por la gran abundancia de biomoléculas que naturaleza ofrece para que las células lleven a cabo reacciones complejas con un control preciso de oxidación-reducción.

Entre éstas biomoléculas, los polifenoles se han utilizado para explorar la biosíntesis de nanopartículas metálicas (Au, Ag, Pt, Fe). Estas han demostrado ser metodologías simplificadas con un alto rendimiento de nanopartículas. A la vez que en algunos casos disminuyen o reemplazan el uso de solventes orgánicos tóxicos o agentes reductores neurotóxicos que asisten durante la formación de las NPs, y evitan un procesamiento posterior para su aplicación biomédica (184,247). En el presente trabajo, se exploró ésta opción y se probaron los extractos acuosos de canela (*Cinnamomum verum*), de vainas de vainilla (*Vanilla planifolia*) y un extracto comercial de vainilla de origen sintético para la síntesis de MNPs. Estos extractos en medio acuoso se utilizaron debido a su alto contenido en polifenoles como el cinamaldehído y la vanilina, que asisten durante la biorreducción de

los iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, crecimiento y recubrimiento de las MNPs. El recubrimiento con estas biomoléculas de origen natural añaden un efecto farmacológico favorable debido a las múltiples propiedades reportadas de neuroprotección, anticancerígenas e inmunoprotectoras mencionadas que ejercen a distintos niveles moleculares en las células y que pueden actuar sinérgicamente con las MNPs.

En este caso se sintetizaron usando como disolvente agua desionizada y extractos acuosos, nanopartículas con un núcleo de Fe_3O_4 rodeadas por una capa de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La caracterización estructural global por XRD confirmó la fase obtenida con pequeños cambios en los parámetros de red debido a las vacancias en la superficie de Fe^{2+} , las cuales están rodeadas por una capa de biomoléculas de naturaleza polifenólica como lo indicaron los análisis por FT-IR y las imágenes de TEM. Las determinaciones de los parámetros de red por XRD y TEM y su disminución, indicaron que este proceso de síntesis en medio acuoso favorece en parte la oxidación de la superficie hacia la formación de maghemita. Este proceso también se inhibe por los compuestos de naturaleza antioxidante de los extractos, que ejercen un efecto protector. Lo cual se deduce, puesto que, se mantuvo una elevada la magnetización en las C-MNPs crecidas con extracto de canela. En este tipo de síntesis, la oxidación de la superficie puede estar impedida por los compuestos polifenólicos adsorbidos en la superficie de las MNPs, que aminora la interacción con las moléculas oxidantes del aire o agua. Sin embargo, la formación de la capa de maghemita hacia la superficie, indica que el proceso no es del todo eficiente, pero esto añade una ventaja para su aplicación biomédica ya que se debilita su efecto citotóxico como se ha reportado ampliamente (223,248). En nuestro caso, esto aunado al recubrimiento con polifenoles naturales en las C-MNPs y VP-MNPs, permitió obtener un crecimiento en la viabilidad celular por encima del 90% de la línea celular BV-2, a concentraciones de $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ sin efectos citotóxicos.

Cabe señalar que los oxidantes leves como pueden ser los ácidos orgánicos presentes en los extractos, también inducen una oxidación leve de la superficie, que puede llevar a la formación de la capa de maghemita. Existen reportes donde se han utilizado agentes químicos oxidantes suaves (calor) y fuertes (HNO_3) para inducir la formación de maghemita en

nanopartículas de hierro (magnetita) y así obtener MNPs útiles para aplicaciones biomédicas. Mediante el uso de procesos de oxidación con ácidos fuertes y peligrosos se han reportado valores de $M_S = 54 \text{ emu g}^{-1}$ (223). En nuestro caso ésta metodología amigable con el ambiente permitió la obtención, en un solo paso de síntesis de MNPs con superficies oxidadas, por un proceso natural y eficiente que preserva una buena saturación de la magnetización de $M_S = 70.84 \text{ emu g}^{-1}$ (C-MNPs), $M_S = 60.80 \text{ emu g}^{-1}$ (SV-MNPs) y $M_S = 59.45 \text{ emu g}^{-1}$ (VP-MNPs). Adicionalmente, la cubierta de polifenoles aísla el núcleo magnético y rezaga la oxidación que ocurre naturalmente con el tiempo y aunque la síntesis transcurrió a temperatura a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, no se apreció una rápida oxidación como ocurre en las síntesis químicas, donde a temperaturas de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ se ha observado que la M_S disminuye rápidamente por la oxidación de la superficie dentro de las primeras 24 h (223).

Los valores de FT-IR a 572 cm^{-1} de las MNPs sintetizadas, están de acuerdo con los obtenidos por Herrera-Becerra quienes reportaron una absorción máxima a 572 y 544 cm^{-1} para nanopartículas sintetizadas con ácido gálico y ácido tánico, respectivamente (168). Sin embargo, no debe olvidarse que otros fitoquímicos en el extracto (por ejemplo, de vainas de vainilla), están involucrados durante el proceso de biorreducción. Reportes de la mezcla compleja de estos extractos sugieren una composición elemental de azúcares reductores como β -D-glucósidos (135). La reducción parcial de los iones de FeCl_3 para obtener nanopartículas de Fe_3O_4 se ha reportado usando agentes reductores del extracto de *Tridax procumbens* el cual es abundante en carbohidratos (249). En nuestro caso, la rica mezcla del extracto requiere una caracterización más detallada, para definir con mayor precisión los componentes que participan en el proceso de biorreducción.

Los tamaños de cristal obtenidos por este método de síntesis se encuentran en el intervalo de 10-14 nm. Estas nanopartículas exhibieron una superficie parcialmente oxidada. Ambas características reportadas dentro del tamaño (para la magnetita) como buenos nanocalentadores en medios líquidos y viscosos (248) y con una superficie oxidada a maghemita que les confiere mayor estabilidad y alta biocompatibilidad (115) para las aplicaciones médicas. En nuestro caso el método de síntesis ofrece un tamaño de cristal en el intervalo reportado con buenas características de calentamiento (248) y una superficie

bioactiva para las células. El efecto de la concentración del extracto en el tamaño, forma final y estabilidad coloidal de las nanopartículas ha sido reportado en las síntesis verdes que emplean agentes biorreductores provenientes de fuentes vegetales (175,184,228). En nuestro caso una estimación del contenido de fenoles totales se realizó para ajustar la cantidad de extracto (5 ó 10 ml) adicionada durante la síntesis, que permitiera la obtención de nanopartículas entre 10-14 nm. Las concentraciones óptimas para el control del tamaño se encontraron en función de la cantidad de biomasa utilizada para la elaboración del extracto, las cuales se ubicaron en un intervalo de (0.5 a 1.7 mg/ml). Sin embargo, no debe olvidarse que el proceso de oxidación-reducción, depende de los potenciales de reducción (E^0) de los reactivos. En éste contexto, el potencial de reducción para la solución de Fe^{+3}/Fe^{+2} es de $E^0 = 770$ mV (250). En las síntesis asistidas de extractos acuosos con numerosos grupos $-OH$ etc., el proceso de biorreducción, sera variable entre especies vegetales, puesto que estos presentan distintos E^0 . En nuestro caso, las especies empleadas los extractos de vainas de vainilla con $E^0 = 670-750$ mV asistieron de forma más eficiente la óxido-reducción durante la formación de las MNPs, con lo cual el tamaño de cristal fue ligeramente menor que con los extractos de canela ($E^0 = 588$ mV), porque rápidamente se unen estos polifenoles a los cationes en solución y se limita el crecimiento de las MNPs. En comparación con el extracto de canela que tarda en realizar el proceso de óxido-reducción y en consecuencia el tamaño de cristalito es mayor pero con elevada M_S . De éstas biosíntesis se puede inferir que los extractos con E^0 alejados del E^0 de F^{3+}/Fe^{2+} favorecerán la obtención de nanopartículas de mayor M_S que aquellas con potenciales de E^0 cercanos a la mezcla de cationes de hierro. Existen numerosos reportes que indican que los compuestos con potenciales de oxidación bajos tienen actividad antioxidante, mientras que, aquellos con valores elevados actúan como pro-oxidantes (134,201,251). Éstas observaciones son consistentes con los resultados obtenidos en el tamaño y M_S de las MNPs sintetizadas con extractos de canela y vainilla.

Los análisis por VSM de los lazos de histéresis indicaron que las nanopartículas sintetizadas están cerca del régimen superparamagnético. En comparación con metodologías similares de síntesis reportadas (231–238) que emplean agentes reductores provenientes de extractos acuosos vegetales para la obtención de MNPs. Las NPs obtenidas con cinnamaldehído mostraron los valores de saturación más elevados (70.84 emu g^{-1}). Estos

polifenoles actúan como una cubierta efectiva lo que añade una evidencia de su capacidad como antioxidante (134). Las observaciones por TEM sugieren que esta cubierta no es tan gruesa como ocurre con las sintetizadas con el extracto de vainilla, lo cual es consistente con la disminución en su valor de saturación (60 emu g^{-1}). El descenso en la saturación magnética en función del espesor del recubrimiento orgánico se ha reportado ampliamente (124). En nuestro caso, también influyó el comportamiento del coloide como lo mostraron los datos por DLS, donde se observó la formación de aglomerados grandes en las C-MNPs ($d_H = 828 \text{ nm}$ - 1.08 um) *versus* el diámetro hidrodinámico de las V-MNPs ($d_H = 274 \text{ nm}$). La síntesis de formas grandes ovoides se observaron por TEM en las NPs obtenidas con el extracto de canela las cuales también pudieron contribuir al incremento en la M_S (89). Estos polifenoles de origen natural a bajas concentraciones permiten obtener cubiertas que no disminuyen los valores de saturación, como ocurre con polímeros químicos de cadenas de alto peso molecular o cubiertas de sílice (129).

Las superficies decoradas con polifenoles constituyeron un recubrimiento efectivo que mejoró la biocompatibilidad de las MNPs, como se infirió a partir de los ensayos de citotoxicidad. La distribución intracelular y algunos agregados de MNPs adosadas a la membrana celular son consistentes con las distintas etapas del proceso activo de internalización. Es notable que tanto la difusión facilitada y las vías de endocitosis como la fagocitosis parecen estar activas dado que la fracción de MNPs en el citoplasma se encontraron dispersas no rodeadas por membranas como ocurre en el mecanismo por fagocitosis; mientras que otra fracción permanecieron como aglomerados dentro de grandes vesículas fagocíticas, consistentes con un mecanismo de endocitosis (130).

Aunque las distribuciones de tamaño podrían mejorarse para obtener más control de los valores de SPA en los coloides, en estos materiales magnéticos la aglomeración durante la internalización es probablemente el efecto principal a evitar, ya que su formación puede influenciar grandemente el SPA mediante las interacciones dipolo-dipolo. Sin embargo, existe en parte la formación de estructuras semejantes a cadenas en algunas vesículas intracelulares, lo que sugiere que los polifenoles adosados a la superficie de las NPs ofrecen cierta estabilidad en el medio intracelular y pueden permanecer con cierto grado de

monodispersidad dentro de las células. Mediante este ordenamiento en cadenas, pueden estar contribuyendo a un aumento en la anisotropía magnética, lo que mejora la respuesta a la aplicación del AC durante la generación de la MHT (252). El tipo de distribución intracelular de estos agregados de MNPs, si es fractal o azarosa y su efecto en el calentamiento aún deben explorarse para lograr un mejor control en los parámetros de síntesis con el uso de fracciones de mayor pureza de los compuestos del extracto.

Las concentraciones del extracto utilizadas durante la biorreducción no evitaron del todo la coalescencia entre MNPs, dado que algunas se apreciaron aglomeradas como se observó en imágenes por TEM y por mediciones por DLS que mostraron la formación de agregados de hasta 1 μm . Esto indica que el efecto del $\text{pH} = 5$ de los extractos vegetales, no favorece completamente la separación total entre las MNPs, como ocurre con extractos que utilizan $\text{pH} = 3.7$ que producen NPs altamente estables (253). Sin embargo, su estabilidad moderada no fue un impedimento para su internalización en las células BV-2.

Existe un consenso general que la viscosidad y el medio fisiológico afecta el SPA al bloquear el mecanismo de relajación de Brown en las partículas magnéticas (128,254). La rotación física de las MNPs puede bloquearse, ya sea por aglomeración o por cambios en el tamaño de su diámetro hidrodinámico debido a la absorción de proteínas en su superficie. Además, la magnitud de este bloqueo depende de la anisotropía magnética de las MNPs (144). La fuerte dependencia del SPA con el tamaño del cristal se ajustó al modelo de la LRT ($H_0 < H_k$), con $H_k = -11 \text{ kJ/m}^3$ (constante de anisotropía del *bulk* de Fe_3O_4). Los mecanismos de relajación Néel–Browniana de las MNPs explican las bases físicas del calentamiento cuando el medio tiende a una mayor viscosidad (89,123). Al comparar los experimentos con $\geq 1.5 \times 10^7$ células incubadas con C-MNPs y VP-MNPs y los coloides magnéticos en agua desionizada, se observó este efecto. En medio líquido (agua desionizada) los valores SPA fueron elevados para éstas muestras y en el caso de las C-MNPs al cambiar a un medio de mayor viscosidad (células), el valor del SPA cae abruptamente de $\text{SPA} = 335.69 \text{ W g}^{-1}$ a $\text{SPA} = 118 \text{ W g}^{-1}$. El tamaño de cristal (Tabla 1) indica claramente que es éste en parte es el factor que impide la relajación por rotación de las MNPs en el medio intracelular. Mientras que para las VP-MNPs con tamaños menores este cambio de viscosidad no afecta en la misma

magnitud y su SPA = 238 W g⁻¹ se mantiene elevado (Tabla 1). El aumento rápido de la eficiencia de calentamiento en los botones celulares *in vitro* con éstas VP-MNPs, se comporta como en las MNPs monodominio, que en medios de mayor viscosidad relajan por el mecanismo de Néel. Este efecto no solo se observó al comparar de un medio líquido al viscoso, sino también entre las C-MNPs y VP-MNPs en medio viscoso (con células) corroborando el mecanismo de relajación y generación de calor intracelular. Esto es consistente con experimentos reportados utilizando MNPs de síntesis químicas (248).

Diversos estudios han demostrado que para la generación eficiente de la MHT es necesaria la internalización de una cantidad considerable de MNPs, para facilitar este proceso se recurre a la funcionalización de su superficies por métodos químicos laboriosos y tóxicos (119) que en ocasiones disminuyen la viabilidad celular (160). En nuestro caso, con tasas de internalización del 9% a las 24 h de incubación a una concentración de 100 µg ml⁻¹ de VP-MNPs, en pastillas celulares con $\geq 1.8 \times 10^7$ células y AC de $f = 570$ kHz, $H_0 = 23.9$ kAm⁻¹, se obtuvieron valores de SPA = 800 W g⁻¹, donde cabe mencionar se mantuvo la viabilidad celular del 98-99%. El aumento del valor de SPA con respecto a los experimentos control previos con $\geq 1.5 \times 10^7$ células con un SPA = 237 W g⁻¹, indican que no sólo el tamaño y anisotropía de las MNPs influye en el aumento del SPA, sino que el número de células es un factor importante para la elevación de la temperatura. Así mismo, su estado metabólico (etapa del ciclo celular) influye en la tasa de internalización de las MNPs, como se ha señalado en la sección 2.3.5. En el caso de éstas MNPs a diferencia de las obtenidas por síntesis químicas, éstas requieren un mayor número de células para generar valores cercanos de SPA = 1000 W g⁻¹ ($f = 410$ kHz, $H_0 = 10$ kAm⁻¹), como los reportados para magnetobacterias (119,245).

El uso de células microgliales para la internalización de MNPs, parece una metodología prometedora, para direccionar grandes cantidades de material magnético en sitios específicos y de difícil acceso como tumores profundos (144,161), evitando los problemas de agregación y formación de trombos *in vivo* por coloides funcionalizados de MNPs, con la ventaja de calentamiento selectivo en sólo en las regiones del tumor o zonas donde exista una proliferación excesiva y agregación de placas β -amiloides que inducen procesos neurodegenerativos. Los *phantoms* de células microgliales BV-2 incubadas con

MNPs de síntesis químicas han mostrado valores de SPA = 98-279 W/g ($f = 560$ kHz y $H_0 = 23.9$ k Am⁻¹) (160), por lo cual la síntesis con el extracto de vainilla amigable con el ambiente reportada en éste trabajo es una opción prometedora. Aunque cabe señalar que deberá optimizarse para funcionar óptimamente en campos de aplicación tolerables para los humanos ($f = 100$ kHz y $H_0 = 8$ a 18 k A m⁻¹) (160,255).

Recientemente, se ha reportado que no únicamente la cantidad de MNPs internalizadas, su tamaño, forma y anisotropía magnética son parámetros relevantes para generar eficientemente calor intracelular que inducen la muerte celular por apoptosis. Sino también la localización final de las MNPs en la célula (144,252). Por este motivo, se estudiaron junto con los cambios morfológicos ultraestructurales la distribución y localización de las VP-MNPs en las células BV-2 sometidas a MHT. La distribución observada, indicó la presencia de agregados sobre las membranas celulares, otras ubicadas en regiones puntuales de la membrana que sugiere se localizan en una región con un sitio receptor y gran parte en aglomerados en vesículas de diversos diámetros (fagosomas, lisosomas, endosomas). Las MNPs dispersas a lo largo del citoplasma, mostraron un daño muy extenso parecido a la necrosis, mientras que las agregadas en grandes vesículas preservaron la ultraestructura de la célula. Hacia la periferia de éstas células, sus membranas presentaron una morfología discontinua, indicativo del inicio de un proceso de muerte celular por apoptosis. Debido a que la línea entre la clasificación de los procesos de muerte celular de apoptosis y necrosis es cada vez más estrecha, es necesario considerar el tipo de muerte celular por hipertermia magnética con las características que sólo documentan directamente el resultado del proceso y hacer referencia para comparar con las características sobresaliente de cada evento. En este caso a diferencia de las síntesis químicas (93,144), los cambios morfológicos ultraestructurales indican que el efecto citotóxico de estas VP-MNPs para inducir la muerte celular, aún no es del todo controlada en la población celular, dado que se induce tanto apoptosis como necrosis y se requiere evaluar el efecto a una escala mayor con metodologías como la citometría de flujo.

Estas biomoléculas de origen natural son una alternativa prometedora para explorar el efecto sinérgico del daño ocasionado por la hipertermia sugerido en algunos reportes (140).

La síntesis de las MNPs para hipertermia con cinamaldehído sintético se ha realizado para mejorar su biodisponibilidad en células de cáncer de mama. Mediante ésta conjugación se sensibilizan las células para la internalización de las nanopartículas y se induce la muerte celular por apoptosis (256). En nuestro caso, el uso de la vainilla natural como una molécula bioactiva para la internalización celular de las MNPs hasta donde sabemos no se ha reportado. En el presente trabajo se exploró ésta posibilidad, los resultados sugieren que es viable utilizarla junto con la MHT para el tratamiento de células reactivas BV-2 y en consecuencia en procesos malignos o neurodegenerativos.

4.8 CONCLUSIONES.

En este trabajo se exploró la síntesis amigable con el ambiente para obtener MNPs para su aplicación potencial en generación de hipertermia. La ventaja principal de este método es que se pueden obtener MNPs en un solo paso, en medio acuoso con tamaños de aproximadamente 10-14 nm y superficies estabilizadas debido a la oxidación parcial de γ -Fe₂O₃ (maghemita). Las C-MNPs sintetizadas mostraron los valores de saturación más grandes reportados hasta el momento dentro de este tipo de síntesis verdes, con la ventaja adicional de la oxidación parcial a γ -Fe₂O₃ en su superficie inducida por polifenoles de origen natural. Además, favorecieron la estabilidad de la superficie de las nanopartículas. Los valores de SPA *in vitro* de los coloides magnéticos mostraron una excelente capacidad de calentamiento en medio acuoso. En las condiciones de cultivo *in vitro* que simula un modelo tumoral (pastillas o botones celulares) *in vivo*, las VP-MNPs presentaron el mejor desempeño para alcanzar la temperatura de hipertermia de 46 °C, durante los primeros 65s. A la concentración de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de VP-MNPs adicionadas al medio de cultivo, la internalización de las MNPs a las 24 h e incubación fue favorable, algunas se observaron adosadas a la superficie celular como distribuidas a lo largo del citoplasma, lo cual junto con la distribución de tamaño estrecho y la anisotropía de los cristales, contribuyeron a la generación de un SPA eficiente para ocasionar un efecto citotóxico en la línea celular BV-2, que indujo la muerte celular en un 88% con 30 minutos de aplicación del AFM. Los daños morfológicos ultraestructurales sugieren que ambos procesos de muerte celular: apoptosis y necrosis, pueden desencadenarse por la MHT a 46 °C, $f = 570 \text{ kHz}$ y $H_0 = 23.9 \text{ kA m}^{-1}$, por

lo que el proceso no es aún controlable. Por este motivo, es necesario indagar mediante marcadores moleculares de muerte celular por apoptosis y necrosis, el porcentaje de células que mueren por estos mecanismos así como ajustar los campos aplicados y las concentraciones de las VP-MNPs para controlar la muerte celular con éstas MNPs de una ruta de síntesis amigable con el ambiente.

Aunque esta síntesis utiliza fuentes naturales como moléculas bioactivas, mejoras en los materiales de síntesis (por ejemplo: fracciones de extractos acuosos altamente purificados) pueden facilitar el control de los parámetros de la síntesis y por lo tanto, su desempeño de calentamiento. Estos resultados constituyen un primer paso prometedor para las metodologías amigables con el ambiente, de bajo costo, que evitan el uso de agentes oxidantes altamente tóxicos e inspirados en los sistemas biológicos. La funcionalización de sus superficies con compuestos polifenólicos con propiedades farmacológicas demostradas para combatir procesos neurodegenerativos y cancerígenos añaden una gran ventaja a la bondad de estas síntesis limpias. Las MNPs obtenidas resultan seguras para los seres vivos, efectivas para aplicaciones biomédicas y de producción amigable con el medio ambiente.

La nanotecnología en aplicaciones biológicas puede tener un gran impacto en el futuro, pero se debe tener un gran sentido humano y de ética, para considerar muy bien los propósitos, efectos, toxicidad, contaminación ambiental, etc. Así como la unión de los conceptos de nanotecnología con la medicina, su regulación y los aspectos socioeconómicos. Los resultados de la nanotecnología para su aplicación segura en el área médica aún requieren de colaboración, análisis y entendimiento de sus efectos para aproximarse a la fase de pruebas clínicas.

4.9 PERSPECTIVAS.

Debido a la gran diversidad de biomoléculas del reino vegetal la biosíntesis con extractos vegetales puede explorarse hacia la obtención de MNPs completamente verdes. Es

decir, reemplazando en su totalidad las bases orgánicas tóxicas para la reducción de las sales de hierro y de esta forma disminuir la toxicidad de las MNPs, así como, la de los productos de las reacciones.

A futuro se plantea mejorar el control de la síntesis, mediante el uso de extractos naturales de mayor pureza mediante el fraccionamiento de sus componentes. El uso de compuestos de alta pureza de origen natural durante la biorreducción permitirá un mayor control en la distribución de tamaños y formas de las MNPs. Esto será de utilidad para modificar los parámetros de aplicación de campo y frecuencia para optimizar la generación de la hipertermia magnética mediante MNPs de origen “natural”. Debido a la disminución en la toxicidad de estas MNPs, se plantea estudiar sus efectos a concentraciones mayores a las generalmente probadas en MNPs provenientes de síntesis químicas, para examinar sus efectos durante la internalización, mecanismos de muerte celular y generación de la hipertermia. Estudiar su estabilidad coloidal en el tiempo es necesaria para optimizar las soluciones coloidales y llevar su aplicación *in vivo*.

Para esclarecer el efecto de la MHT en la inducción de la muerte celular en esta línea celular. Es necesario realizar un estudio más detallado mediante técnicas como citometría de flujo, para determinar el porcentaje dentro de la población celular donde hay inducción de apoptosis o necrosis, con ayuda de marcadores fluorescentes de los eventos tempranos de muerte celular por apoptosis (Annexina V-FITC), de etapas tardías (Mitoprobe JC-1, DRAQ-7, Annexina V-IP) y de la activación de cascadas de señalización (Calceína-Eth-1, marcadores de caspasas). Así como, estudiar estos mecanismos en relación a la concentración de MNPs adicionadas al medio de cultivo, su internalización y aplicación de distintos campos y temperatura en intervalos de 45-46 °C.

Puesto que la MHT es capaz de inducir tanto muerte celular por apoptosis y necrosis, el efecto de la hipertermia magnética por éstas MNPs en las células BV-2, requiere estudiarse por metodologías de biología molecular. Las cuales permitirán analizar los niveles de expresión de proteínas en condiciones de estrés calórico como, la HSP 27 y 70 involucradas en mecanismos moleculares de supervivencia (termotolerancia) y de estimular eventos letales pro-apoptóticos. Debido a que recientemente se ha reportado el papel de la termotolerancia en la inducción de la inmunidad adaptativa y su relación con los niveles de expresión de las

HSP, por estas metodologías resultaría interesante explorar, para determinar las dosis térmicas efectivas que induzcan sólo la muerte celular por apoptosis.

Debido a que estas MNPs presentan superficies decoradas con una mezcla de polifenoles de origen natural, también es necesario indagar las vías de señalización intracelular que intervienen y su posible efecto terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. Estas MNPs pueden funcionar como plataformas de entrega de compuestos naturales terapéuticos que sinérgicamente incrementen el efecto terapéutico. Estos polifenoles que permean fácilmente la membrana celular, a diferencia de las MNPs catiónicas, tienen la ventaja de disminuir el daño a ésta, por lo cual, en estudios posteriores se plantea optimizar su contenido en la superficie de las MNPs, para una internalización más eficiente. Adicionalmente, para calcular la cantidad de materia orgánica (polifenoles) adsorbida en la superficie de las MNPs, será necesario realizar un análisis termogravimétrico (TGA), para determinar la estabilidad térmica del material.

Es necesario realizar un estudio más detallado de la estabilidad a la oxidación de la superficie de estas MNPs, por técnicas de espectroscopia como Mössbauer o XPS, lo que ayudará a establecer los tiempos óptimos para su aplicación en sistemas vivos.

En resumen, continuar este trabajo indagando la posibilidad de utilizar MNPs obtenidas con extractos naturales como una alternativa amigable con el ambiente para la generación de la hipertermia magnética. Así como, explorar la posibilidad terapéutica en el tratamiento local del cáncer y en enfermedades neurodegenerativas acoplando otros grupos funcionales para incrementar su especificidad a los órganos blanco.

5. ANEXO

Principios básicos de las técnicas de caracterización.

5. ANEXO. Principios básicos de las técnicas de caracterización.

A1. UV-Vis (Espectroscopia Ultravioleta)

Las moléculas pueden absorber distintas longitudes de onda. Si su absorción se ubica en la región ultravioleta (200-400 nm ó 50,000-25,000 cm^{-1}) visible (400-800 nm ó 25,000-12,500 cm^{-1}) del espectro electromagnético, es posible determinar las longitudes de onda que son absorbidas por el compuesto con un espectrofotómetro UV-Vis. Este instrumento emite distintas longitudes de onda y mide la absorción de la luz de la muestra. La cual es colocada entre la fuente de luz y su detector (Figura A1.1). Una rejilla ayuda a enfocar la luz monocromática cuya intensidad (I_0) alcanza la muestra. Está absorbe cierta cantidad de luz en función de su concentración y la luz remanente (I), es transmitida a un detector para su medición. Mediante la relación I_0/I denominada absorbancia (A), es posible conocer la concentración de la muestra. Al graficar la absorbancia vs longitud de onda se obtiene el espectro de absorción de un determinado compuesto (257).

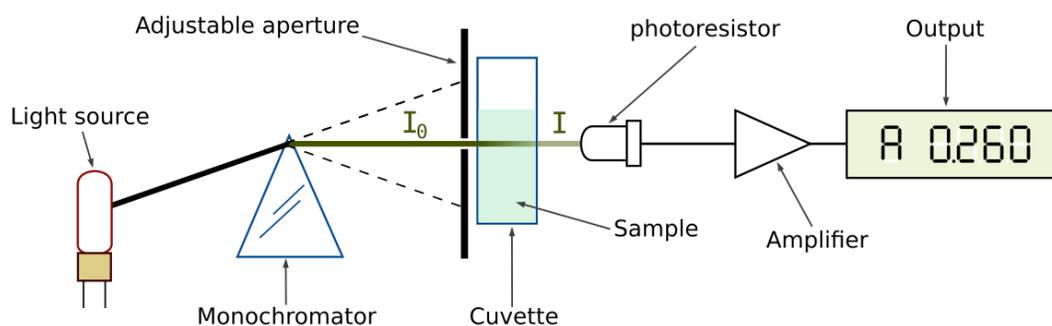


Figura A1.1 Configuración básica de un espectrofotómetro UV-Vis.

A2. FT-IR (*Fourier Infrared Spectroscopy*)

El espectro vibracional de una molécula es una propiedad física única, la oscilación armónica característica de cada molécula tal que su espectro infrarrojo puede emplearse como su huella digital.

Esto se basa en el hecho que en una molécula los átomos no ocupan posiciones fijas, sino que vibran dentro de un espacio determinado. Estos cambios de posición requieren de la absorción de energía (luz infrarroja). Cada modo de vibración tiene asignada una frecuencia que corresponde a una banda de absorción en el infrarrojo (Figura A2.1).

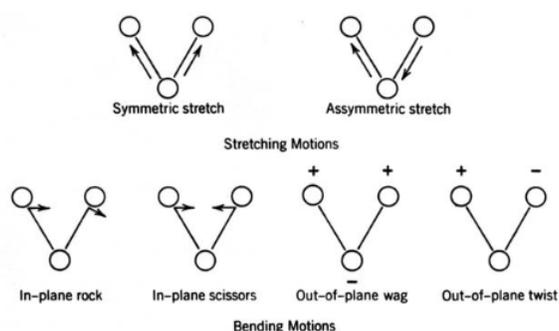


Figura A2.1 Modos de vibración de los átomos de una molécula.

Las características estructurales de la molécula y sus grupos funcionales tienen una absorción reproducible en el rango de la radiación infrarroja. Permite determinar si la estructura de la molécula es lineal, ramificada, presenta insaturaciones, anillos aromáticos, grupos funcionales, cambios en el estado de oxidación etc.

A determinada absorción asignada a un grupo funcional característico, incrementa proporcionalmente con el número de veces que este ocurre dentro de la molécula. Así las bandas de energía en las que ocurre la absorción se utilizan para identificar los distintos grupos funcionales. Para esto se emplea la frecuencia de vibración a la que se ubican (o posición del pico de energía), el cual se expresa en número de onda (cm^{-1}). El rango de absorción está determinado por la óptica del instrumento (basado en el KBr), y generalmente es de 4000 a 400 cm^{-1} , por lo cual por convención la región del espectro se anota de izquierda a derecha. Este grupo de frecuencias puede visualizarse de forma cualitativa (transmitancia) o cuantitativa (absorbancia). El porcentaje de transmitancia tiene una relación logarítmica

(log₁₀) mientras que la absorbancia refleja la concentración lineal. El formato más utilizado es el de transmitancia ya que provee el mejor rango dinámico para las bandas débiles e intensas. En este caso los picos máximos en realidad representan un mínimo y son el punto de menor transmitancia para una banda en particular.

La técnica consiste en analizar la radiación infrarroja que es absorbida al atravesar un compuesto, tal que el espectro registra la radiación transmitida. El requisito fundamental para que se absorba la radiación infrarroja es que debe existir un cambio en el momento dipolar de la molécula o grupo funcional durante su vibración. Dado que se basa en el modelo de un oscilador armónico. La frecuencia de la fuerza de las vibraciones se obtiene mediante la ley de Hooke:

$$\nu = \left(\frac{1}{2\pi c}\right) \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Donde ν es la frecuencia de vibración (cm⁻¹), μ la masa reducida de los átomos (g) y k la constante de fuerza del enlace. La masa reducida $\mu = m_1m_2/(m_1+m_2)$, donde m_1 y m_2 son las masas que componen los enlaces químicos en consideración. Ésta ecuación une la fuerza de oscilación entre los enlaces covalentes de dos átomos, su masa y la frecuencia de vibración.

El espectro IR proporciona información relativa de la sustancia estudiada y la frecuencia a la que aparecen las bandas es característica de los diversos modos de vibración de las moléculas o sus enlaces de la sustancia. Para su interpretación se deben considerar aspectos como la forma del pico (ancho, agudo, subdivisiones, etc.), su ubicación dentro de las regiones del espectro, y comparar la distribución de las bandas con espectros patrones vibracionales del compuesto (258).

Un espectrómetro por transformada de Fourier consta de tres elementos básicos: fuente luminosa, interferómetro y un detector (Figura A2.2).

es medido por el equipo DLS. Las fluctuaciones de intensidad luminosa proveen información del estado de agregación. Las cuales están relacionadas al tamaño de partícula y velocidad del movimiento Browniano. Entre más pequeñas se mueven con mayor velocidad en el solvente que las más grandes. Las partículas más pequeñas y veloces ocasionan un decaimiento rápido en comparación con las más grandes (o agregados) que muestran distintas intensidades luminosas.

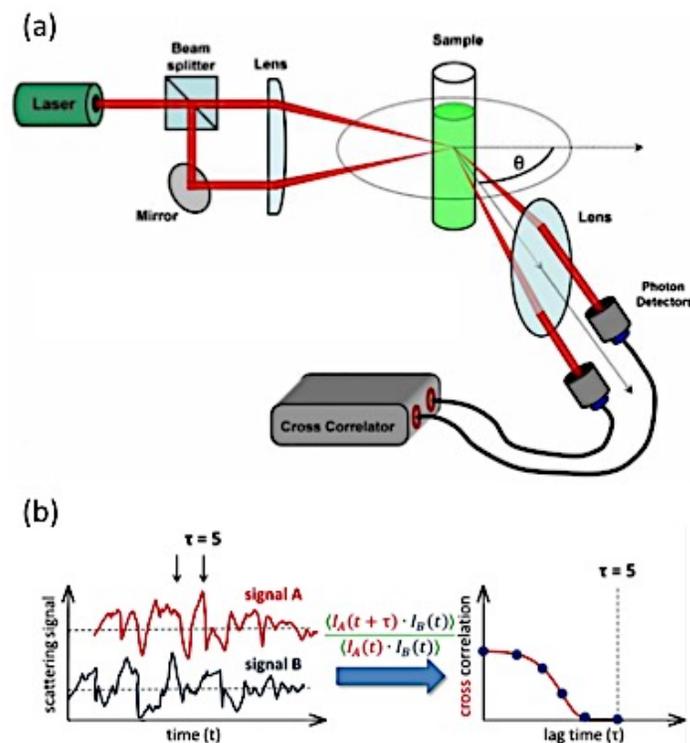


Figura A3.1. (a) Esquema del equipo DLS. (b) Aplicación de la función de correlación, permite calcular el tamaño y distribución de partícula al eliminar el efecto de dispersión múltiple. Provee una medición directa de los cambios en número y tamaño de partículas. Es posible diferenciar entre la aglomeración y sedimentación.

Las fluctuaciones en la intensidad de la luz se normalizan con la función de correlación $C(t)$, donde t es el tiempo de rezago (Figura A3.1.b). Su análisis provee el coeficiente de difusión (D) de las partículas. El cual está relacionado con el radio de las partículas mediante la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{\kappa_B T}{6\pi\eta R}$$

Donde κ_B es la constante de Boltzmann, T temperatura y η la viscosidad. De acuerdo a esta ecuación las velocidades de difusión son inversamente proporcionales al tamaño de las partículas. La definición del coeficiente de difusión sirve para obtener el radio hidrodinámico de la partícula (d_H). Este coeficiente no solo depende de las dimensiones del núcleo de las partículas sino también de lo que se ubique en su superficie, por lo cual con esta técnica los diámetros hidrodinámicos obtenidos son generalmente mayores que los medidos por TEM.

El equipo permite determinar la polidispersidad de la muestra, la cual no tiene unidades y se calcula:

$$\text{Polidispersidad} = \frac{\mu_2}{\tau^2}$$

La intensidad de la dispersión de la luz es proporcional al número de partículas (N), la masa (M) y el diámetro efectivo, se pueden obtener tres distribuciones distintas basándose en la intensidad, volumen y número (Figura A3.2):

Donde el número se relaciona con el tamaño de las partículas (su distribución en una población), el volumen con el diámetro (d^3) y la intensidad es el d^6 .

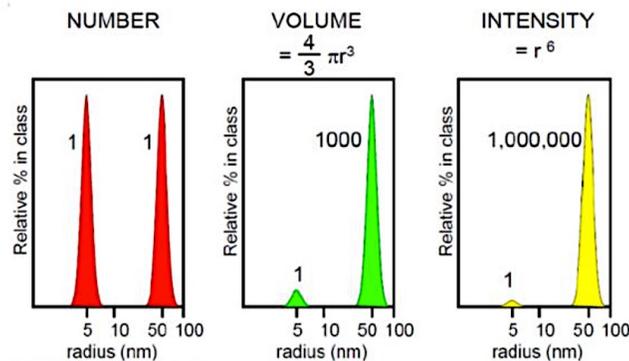


Figura A3.2. Distribución de una mezcla de partículas de diámetros de 5 y 50 nm, en función de su número, volumen e intensidad.

A4. VSM (*Vibrating Sample Magnetometer*)

El magnetómetro de muestra vibrante es un instrumento que opera de acuerdo a la ley de inducción electromagnética de Faraday. La cual establece que un cambio en un campo magnético produce un flujo de corriente eléctrica (voltaje). Este último puede medirse y dar información sobre los cambios en el campo magnético. El VSM es utilizado para medir el comportamiento magnético de los materiales cuantificando la fuerza o dirección magnética de la muestra, cuyo comportamiento queda descrito en su curva de magnetización en función del campo magnético (M vs H), o lazo de histéresis (Figura 7).

El VSM consiste de dos piezas polares electromagnéticas que generan un campo magnético uniforme. La muestra es colocada al centro de estas piezas y es magnetizada por el campo formado, lo que ocasiona que la muestra (si es magnética) genere su propio campo magnético. La muestra oscila en su eje vertical (z) lo que induce una corriente eléctrica en las bobinas de detección (*pick up coils*) de las piezas polares. El momento magnético de la muestra es entonces medido al determinar la corriente eléctrica inducida en las bobinas de detección (Figura A4.1).

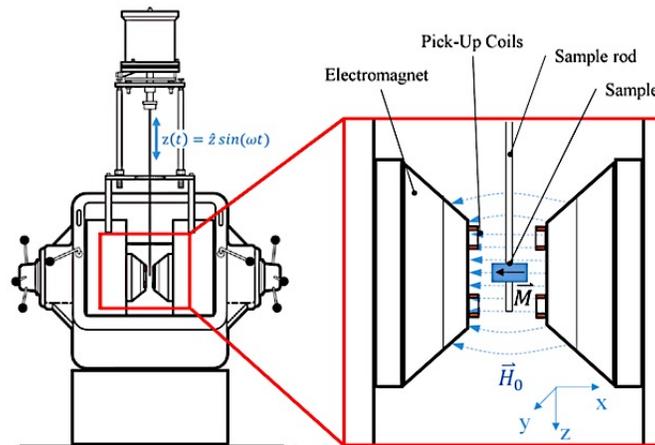


Figura A4.1 Representación esquemática de un VSM.

Entre más intenso sea el campo magnético la magnetización de la muestra será mayor. Además de determinar la magnetización también es posible medir la susceptibilidad magnética, ya que es proporcional al campo magnético aplicado. Los campos aplicados por

los VSM son generalmente >3.1 T con una amplia capacidad de rangos de temperatura de medición ($-269 - 1000$ °C).

A5. XRD (*X-Rays Diffraction*)

La difracción de rayos-X (XRD) es una herramienta muy útil para determinar la cristalinidad, confirmar la fase y medir el tamaño promedio del cristalito de un material. Se basa en la ley de difracción de Bragg, la cual describe la condición para que ocurra la difracción en un material cristalino:

$$n\lambda_x = 2d_{(hkl)}\sin\theta_B$$

Donde λ_x es la longitud de onda del haz de rayos-X ($0.5-2.4$ Å), $d_{(hkl)}$ es el espacio interplanar de la red cristalina, θ_B es el ángulo del haz con respecto al plano de la red cristalina o ángulo de Bragg, y n es el número entero que describe el orden de la difracción. Esta ecuación indica que la difracción únicamente se produce en aquellos planos que forman un ángulo igual al ángulo de Bragg con el haz incidente (Figura A5.1). Es decir, que cuando un haz de rayos-X incide con cierto ángulo y es difractado por los diversos planos del cristal y esta difracción es coherente; estos haces difractados se refuerzan mutuamente para producir un pico de señal.

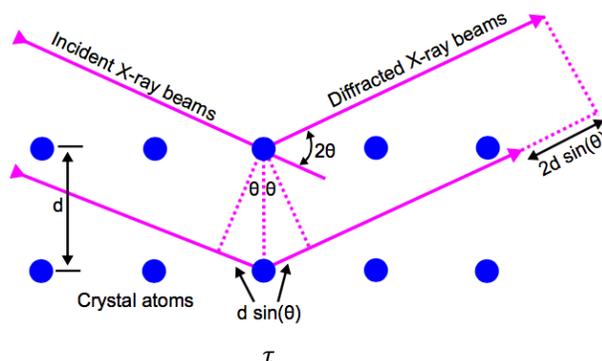


Figura A5.1. Ilustración de la ley de Bragg para la difracción de rayos-X, generada por los planos cristalinos de sus espacios interplanares d . Los rayos dispersados estarán completamente en fase si esa diferencia de fase (τ) es igual a un número entero (n) de longitudes de onda (λ).

El equipo de difracción de rayos-X consiste básicamente de una fuente generadora de rayos-X de alta potencia y un detector. El difractómetro de polvo usa un detector de rayos-X con un contador Geiger o de centelleo. La geometría del difractómetro la fuente de rayos-X monocromática y el detector se colocan a igual distancia y ángulo de la superficie de la muestra. El ángulo 2θ se varía de forma continua (Figura A5.2).

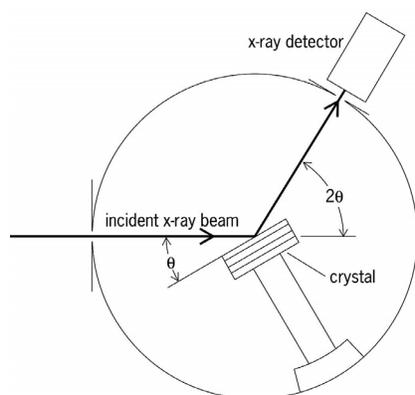


Figura A5.2 Esquema de un difractómetro de rayos-X.

Los difractogramas obtenidos recogen la información de la intensidad de los rayos-X en función del ángulo de difracción para obtener una serie de picos. Las posiciones o patrones de cada pico dependen del sistema cristalino (o fase). Las direcciones a las que el haz se difracta están en función de la forma (sistema cristalino) y tamaño de la celda unidad (parámetro de red). La anchura y forma de los picos resultan de factores del instrumento (divergencia del haz) y de la microestructura de la muestra (tamaño y tensiones). La disminución en tamaño del cristalito ocasiona un ensanchamiento en los picos de difracción, dado que no hay suficientes planos para producir la interferencia destructiva completa. Para calcular el tamaño promedio de cristalito a partir de los picos de difracción, es mediante la ecuación de Debye-Scherrer:

$$T = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Donde K es el factor de forma ($\sim 0.89-1.39$), T es el tamaño promedio de cristalito, λ es la longitud de onda de la fuente de rayos-X ($\text{CuK}\alpha_1 = 0.15405 \text{ nm}$), θ es el ángulo de Bragg, y β es la anchura a media altura (FDWH) del pico en radianes. El refinamiento de la

estructura se puede realizar por el método de Rietveld en el cual se minimiza la diferencia entre la intensidad calculada y la medida experimentalmente (260).

A6. AFM-MFM (*Atomic Force Microscopy in Magnetic Force Mode*)

El microscopio de fuerza atómica (AFM), es un instrumento capaz de examinar la superficie de las muestras tanto en alto vacío como en condiciones ambientales, en tiempo real con una alta resolución en escalas de micras a sub-nanométricas. Dado que es una técnica de caracterización muy versátil y útil, su uso se ha extendido en la nanociencia y nanotecnología.

El principio de operación del AFM, se basa en la interacción de una fuerza mecánica de una punta muy fina (montada en un cantiléver) sobre la superficie de una muestra. El nivel de esta interacción está controlada con alta precisión, por un sistema que sensa los desplazamientos de la punta y la muestra.

En este sistema un haz láser incide sobre el cantiléver, el cual es deflectado hacia un foto detector dividido en cuatro cuadrantes donde cada uno sensa la intensidad de las deflexiones normales y laterales de la luz. Esta deflexión óptica permite medir las interacciones de fuerza entre la punta y la muestra (Figura A6.1), para determinar la posición del cantiléver y por lo tanto de la punta. La información es enviada a un controlador, el cual mediante un sistema de retroalimentación registra la deflexión del cantiléver y controla el desplazamiento de la muestra para que la deflexión permanezca constante. El desplazamiento se controla con exactitud mediante la aplicación de un voltaje en los cristales piezoeléctricos o piezo-escañeros ubicados en el soporte de la muestra y del cantilever, los cuales se deforman con precisión para ajustar los desplazamientos. Esta información es procesada por el sistema electrónico para la formación de la imagen de la superficie. La cual es el resultado de la detección de las fuerzas de la punta sobre los distintos puntos de la superficie de la muestra. En las imágenes las partes más elevadas de la topografía generalmente se asignan con colores brillantes mientras que las zonas de menor intensidad corresponden a regiones profundas del relieve (261).

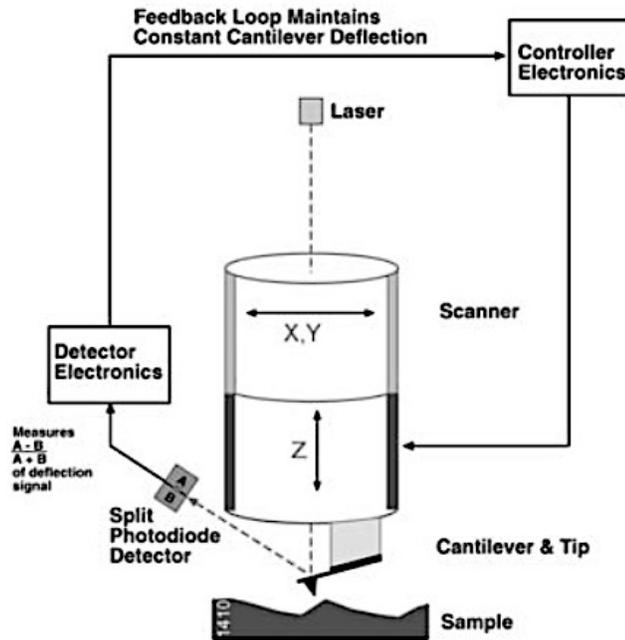


Figura A6.1. Esquema que muestra los componentes del microscopio de fuerza atómica (la punta, el sistema óptico de detección, piezo-escaneres y la electrónica para el manejo del escaneo y adquisición de datos). La punta es montada en el cantiléver sobre la cual incide un láser, la luz deflectada alcanza el fotodiodo el cual envía la información a un detector y este a un controlador electrónico para retroalimentar al escáner (cristales piezoeléctricos) y ajustar los desplazamientos de la punta o la muestra para mantenerlos constantes.

Los componentes del microscopio se ensamblan sobre soportes que aíslan de vibraciones mecánicas, acústicas, ruido electrónico y térmico; para disminuir las perturbaciones que se incrementan substancialmente a estas escalas de barrido.

El AFM tiene tres modos de operación principales: modo de contacto, no-contacto y *tapping* o intermitente.

En el modo de contacto la punta está en contacto permanente con la superficie de la muestra. En el modo de no contacto, la punta se mantiene ligeramente alejada de la superficie de la muestra durante el barrido. En el modo de *tapping* el cantiléver toca de forma intermitente la superficie disminuyendo el daño por las fuerzas de cizalla y aumentando la resolución. Modulando la frecuencia y utilizando puntas ultra-finas de carbón ha sido posible obtener imágenes de 3-5 Å de resolución e inclusive de planos atómicos observados por TEM.

El MFM (*magnetic force microscopy*) se introdujo poco después del AFM (Martin y Wickramasinghe, 1987). En esta técnica se utiliza una punta magnética (Co/Cr), adosada a un cantiléver flexible. La cual se aproxima a la muestra (μm a nm) e interactúa con las líneas del campo magnético cercanas a la superficie de la muestra. La fuerza de las interacciones locales magnetostáticas determinan el movimiento vertical de la punta a medida que esta escanea la superficie.

Durante las mediciones del MFM, hay dos fuerzas que actúan en la punta, las magnéticas y de Van der Waals. La señal en MFM contiene ambas la información de la superficie (señal Topo) y de la superficie magnética (señal MFM) generadas por las fuerzas de Van der Waals (de corto alcance) y magnéticas (de largo alcance), respectivamente. La fuerza dominante depende de la distancia entre la punta y la muestra. A medida que se incrementa la separación entre la punta y la muestra, los efectos magnéticos se vuelven más evidentes y es posible separarlo de la topografía (Figura A6.2).

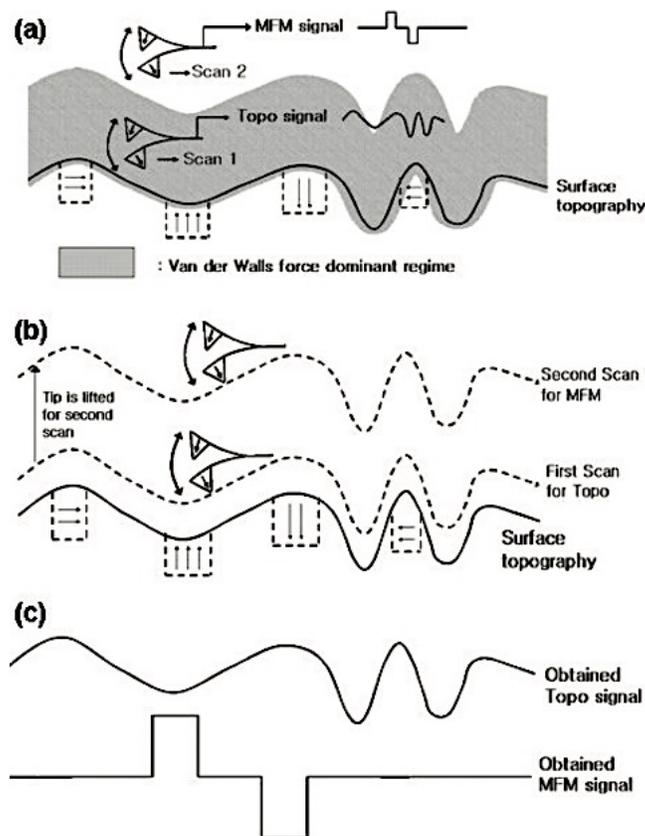


Figura A6.2. Modo AFM-MFM, la muestra se escanea dos veces para separar las señales. (a) La superficie de la muestra y las fuerzas de corto (Van der Waals) y largo alcance (magnéticas). (b) En el primer escaneo se

obtiene la topografía de la superficie. En un segundo escaneo (modo MFM) la distancia se incrementa para obtener el primer escaneo. (c) El único cambio que afecta la señal en la punta es solo la fuerza magnética y como resultado se obtiene la imagen de fuerza magnética.

En la técnica primero se escanea la superficie de la muestra con una alta resolución (modo *tapping*) donde las fuerzas de Van der Waals son dominantes (Figura A6.2a). Posteriormente se varía la distancia a una altura constante para colocar la punta en la región donde la fuerza magnética es dominante y se escanea para obtener la señal de MFM (Figura A6.2b) (262).

El MFM puede utilizarse para obtener imágenes de las estructuras de dominios de los nanomateriales magnéticos, evaluar dispositivos (memorias magnéticas, discos duros, CDs, películas delgadas, etc.) y localizar o mapear los defectos magnéticos.

A7. TEM (*Transmission Electron Microscopy*)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) es un instrumento versátil que permite analizar el tamaño de partícula, morfología, estructura cristalina, caracterizar los defectos de la muestra etc., a escala nanométrica y atómica.

El TEM utiliza una fuente termoiónica para generar un haz de electrones (e^-) acelerado (haz primario) que interactúa con la materia. El haz es una forma de radiación ionizante muy energética capaz de remover e^- de capas internas de los núcleos atómicos de la muestra, para producir una amplia gama de señales secundarias del espécimen. Estas señales de diversas energías, son muy útiles para el análisis estructural y composicional. Al interactuar con la muestra algunos electrones del haz primario son absorbidos en función del espesor y composición, mientras que otros son dispersados. Esto resulta en una distribución de electrones no uniforme que emerge de la muestra (Figura A7.1).

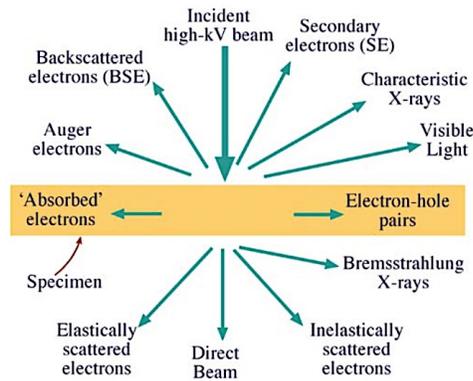


Figura A7.1. Señales generadas por el bombardeo del haz electrónico con un espécimen delgado. La mayoría pueden detectarse en distintos tipos de configuraciones de TEM. Las direcciones de cada señal no siempre representan su dirección física, pero indican de manera relativa el lugar de mayor intensidad.

Al incidir el haz de e^- con la muestra ocurren dos tipos de dispersiones elásticas e inelásticas. Los primeros solo la trayectoria cambia mientras que la energía cinética y velocidad permanecen constantes. Mientras que, en la dispersión inelástica, solo algunos electrones incidentes chocaran y desplazarán los electrones de sus órbitas tornando a los átomos inestables. Estas dispersiones en el modo transmitido llevan información de la estructura interna de la muestra y forman las imágenes en campo claro y oscuro. Los e^- que son dispersados en ángulos pequeños forman imágenes de contraste de fases. Si el material es cristalino los e^- se dispersan en múltiples direcciones y producen una imagen de difracción. Los electrones secundarios (SE), de baja energía (<50 eV) se generan por la interacción de los e^- del haz primario con los de átomos de la muestra. Los cuales son eyectados mediante las colisiones elásticas e inelásticas en la muestra, hasta que escapan a la superficie llevando información del relieve. Los electrones retrodispersados (BSE) también se generan como los secundarios, pero a diferencia de estos tienen más energía (>50 eV). Los e^- del haz primario interactúan con el núcleo del átomo de la muestra sin pérdida de energía. Se dispersan en ángulos grandes y su producción varía directamente con el número atómico. Esto ocasiona que elementos de mayor número atómico produzcan más BSE y aparecen como zonas brillantes a diferencia de los elementos de menor número atómico. Los rayos-X característicos se originan por la inestabilidad del átomo ocasionada por la eyección de un electrón, que al regresar a su estado basal emite un fotón de rayos-X a una longitud de onda

característica del elemento. Los electrones Auger se generan cuando se ioniza el átomo por la absorción de un fotón de rayos-X, electrón, ión o positrón. El exceso de energía induce a la liberación de un e^- Auger y fluorescencia secundaria. La información que provee es de las capas más superficiales de la muestra (20-100 Å nm). Su energía cinética permite identificar los elementos y estado electrónico. Los e^- absorbidos cargan la muestra por lo cual son dirigidos a tierra para reducir su calentamiento e inestabilidad térmica que interfiere durante la observación de la muestra.

Para estudiar cada una de estas señales el TEM tiene distintas configuraciones (detectores, lentes, aperturas, etc.) que se seleccionan para filtrar la información proveniente de la muestra (Figura A7.2 b y c). El TEM moderno se compone de un sistema de vacío, la fuente de electrones (termoiónica, FEG etc.), lentes electromagnéticas (bobinas de deflexión y estigmadores), sistema de lentes condensadoras, lente objetiva, sistema de proyección, detectores (pantalla fluorescente, CCD, espectrómetros) y sistema de refrigeración (Figura A7.2a).

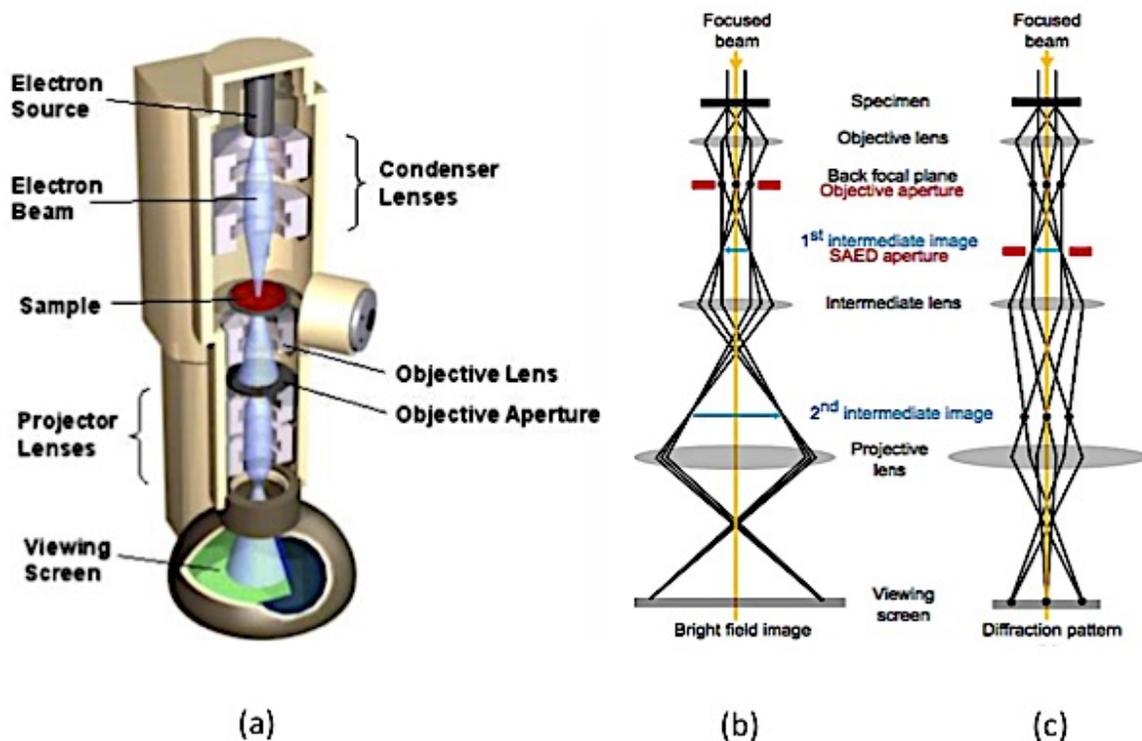


Figura A7.2 (a) Componentes de un TEM y su configuración (b) en modo imagen y (c) difracción.

En el TEM la longitud de onda (λ) de la radiación electrónica que utiliza está relacionada con su voltaje de aceleración de acuerdo a la ecuación de Broglie ($\lambda = \frac{1.22}{E^{1/2}}$), donde E es en electrón volts (eV). A 100 keV, $\lambda \approx 0.004$ nm, lo cual es mucho más pequeño que el diámetro de un átomo ($H_2 = 0.01$ nm). Los TEM actuales tienen una resolución de $\lambda e^- = 2 \text{ \AA}$ y en combinación con correctores de aberraciones la resolución de las imágenes pueden alcanzar 1 \AA , con estas mejoras es posible obtener imágenes de las columnas atómicas en los nanomateriales. El sistema de vacío es mantenido por bombas rotatorias, difusoras, iónicas y compuertas en distintas regiones de la columna del TEM, para mantener presiones de $\sim 2.5 \times 10^{-5}$ Pa, disminuyendo a cero la posibilidad de colisión de un e^- con una molécula de gas. El haz de electrones es enfocado por una serie de lentes electromagnéticas que generan campos magnéticos muy fuertes para este fin. El TEM es un microscopio compuesto cuyo arreglo es similar al de un microscopio de luz que tiene la proyección de la imagen invertida. El sistema de iluminación es controlado por lentes condensadoras en la parte superior de la columna. La lente objetiva ubicada a la altura del espécimen forma la imagen y esta es amplificada por lentes proyectoras en una pantalla fluorescente o detector electrónico (cámara CCD, monitor). La manipulación de este sistema permite la selección de los haces o energías provenientes de la muestra y la técnica de estudio, para la formación de distintos patrones en campo claro, oscuro, difracción, espectros, etc. (Figura A7.2. b y c) (263).

A8. SEM-FIB (*Scanning Electron Microscopy-Focused Ion Beam o Dual Beam*)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que focaliza un haz de electrones en el vacío sobre la superficie de un espécimen escaneándolo. La columna del SEM consiste de un sistema óptico, de vacío y electrónico. Es de menor tamaño ya que solo tiene tres lentes que enfocan los e^- del haz. El cual pasa a través de las bobinas de escaneo y una lente objetiva que deflecan el haz horizontal y verticalmente tal que este escanea línea por línea la superficie de la muestra. La cámara del espécimen es mayor que en el TEM por lo cual se pueden observar muestras grandes (Figura A8.1).

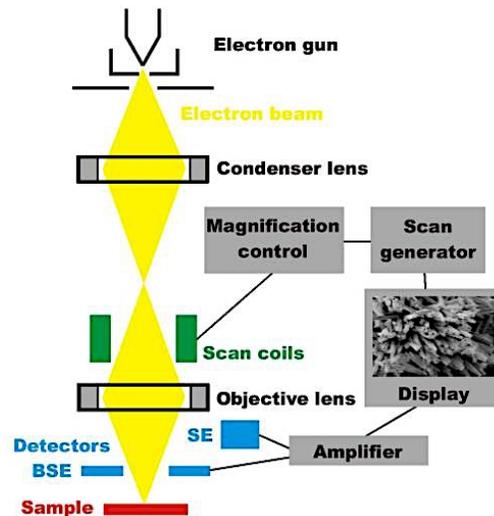


Figura A8.1 Esquema de la columna en un SEM: haz de electrones, lentes electromagnéticas, bobinas de escaneo y detectores.

A medida que los e^- penetran la superficie de la muestra, se generan numerosas interacciones lo que resulta en la emisión de electrones y fotones como se ilustra en la parte superior de la Figura A7.1. Estos son colectados por los detectores ubicados con respecto ángulo de emisión. Las señales más estudiadas son de SE (topografía), BSE (imágenes de difracción o EBSD) y análisis por rayos-X característicos (EDS o EDX). Por lo cual este instrumento se emplea generalmente para estudios de la topografía, morfología y composición química de la muestra. Para que los e^- fluyan sobre la superficie de la muestra, esta se hace conductora mediante una cubierta delgada con metales evaporados (Au, Pt). El

SEM trabaja a voltajes menores entre 2-50 kV (con una resolución a 5 kV de ~ 0.6 nm) dado que no tiene que atravesar la muestra. El diámetro de escaneo del haz de 4 nm-2 μ m, depende de la fuente de emisión de electrones (W, FEG etc.).

El microscopio de haz de iones enfocados (FIB) o de doble haz (DF-FIB), está incorporado a una columna de un SEM, y combina las ventajas de ambos mejorando su capacidad de desempeño. Este instrumento consiste de un sistema de vacío, una fuente de iones de un metal líquido (Ga), la columna de iones, columna de electrones, cámara del espécimen, platina motorizada, detectores, inyectores de gas y computadora (Figura A8.2a).

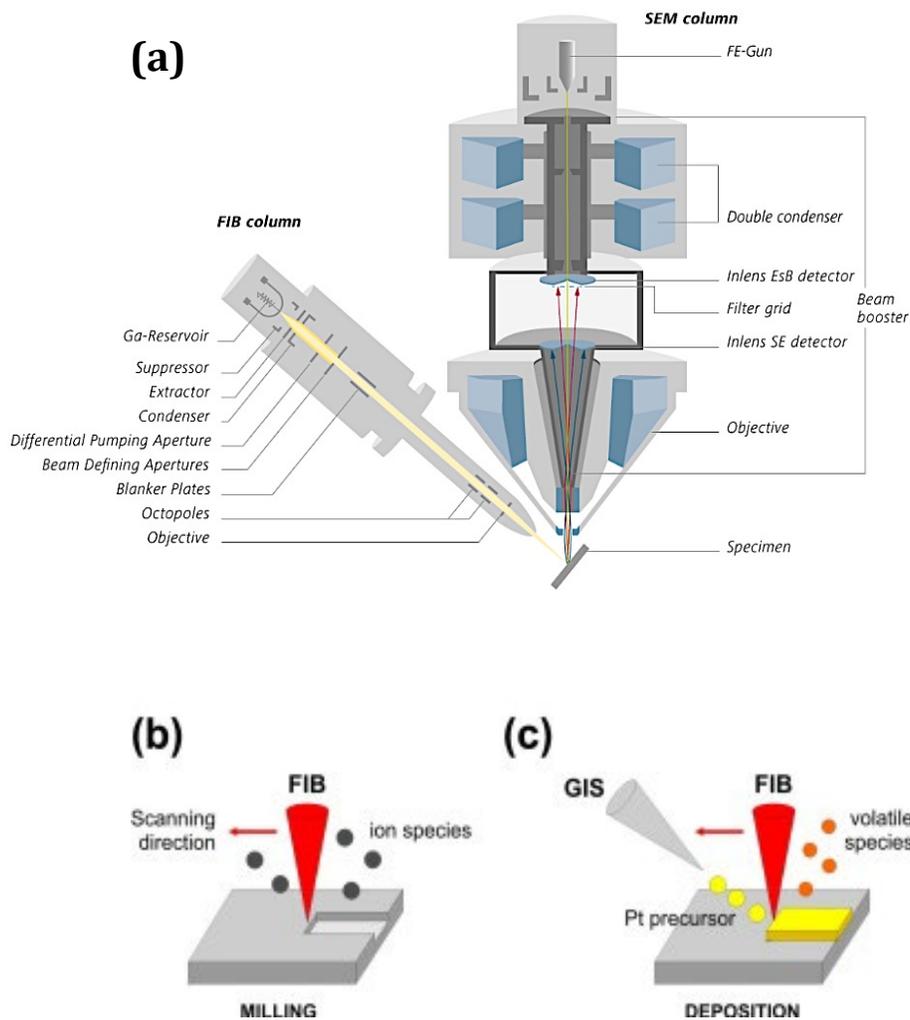


Figura A8.2 (a) Esquema de los componentes de un SEM-FIB. (b) El haz de iones enfocado remueve material de la muestra (*milling*) (c) deposición de material asistida por el haz de iones y gases (GIS) en la superficie del espécimen (264).

La fuente de iones provee un haz finamente enfocado (2-5 nm) que hace posible tanto una alta resolución lateral como la remoción del material (Figura A8.2b). La platina con desplazamiento en cinco ejes (X,Y,Z, rotación e inclinación) puede moverse fácilmente y permite el depósito a varios ángulos del espécimen. La inyección de otros gases (W, Pt) junto con el haz de iones, se utilizan para realizar el depósito específico (CVD) de metales o aisladores y para incrementar la capacidad de barrido del haz (Figura A8.2c). Puesto que las moléculas de gas se adsorben en la superficie y se descomponen al interactuar con el haz de iones. Este proceso de absorción y descomposición repetido resulta en el crecimiento de un material de la región escaneada.

En el FIB-SEM la columna de iones (Ga) tiene un voltaje de aceleración de 5-50 keV y se ubica a un ángulo de 52° con respecto a la de electrones del SEM. Tiene dos lentes la condensadora (forma la sonda) y objetiva (enfoca el haz de iones). Una serie de aperturas ayudan a disminuir más el diámetro del haz de iones. Es posible obtener corrientes de unos cuantos pA a 30 nA. Lentes octupolos son utilizadas para funciones múltiples como: deflectores del haz, alineamiento, y corrección del astigmatismo. Los iones de mayor masa que los electrones cavan directamente la superficie de la muestra con precisión submicrométrica. Mientras que los electrones secundarios se utilizan para formar la imagen y realizar los análisis composicionales. Así al tener un SEM y un haz de iones como parte del mismo instrumento es posible observar el punto de impacto del haz de iones y controlar el proceso mediante su observación no destructiva.

Mediante el FIB-SEM es posible elaborar películas delgadas, remover material de semiconductores y exponer sus defectos, formar lamelas de diversos materiales para su estudio en HRTEM, depositar material para ensamblar circuitos, micromáquinas, pulir puntas del AFM, analizar la composición química de la muestra e inclusive realizar cortes de estructuras biológicas cavando nanómetros de su superficie para ensamblar su estructura 3D, etc. Los modelos recientes cuentan con la automatización para el ensamble de obleas robóticas funcionando como cuartos limpios (265).

6. PRODUCTOS GENERADOS Y LISTA DE PARTICIPACIONES.

PAPER

A L Ramirez-Nuñez, L F Jimenez-Garcia, G F Goya, B Sanz and J Santoyo-Salazar. *In vitro* magnetic hyperthermia using polyphenol-coated $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ nanoparticles from *Cinnamomun verum* and *Vanilla planifolia*: the concert of green synthesis and therapeutic possibilities. *Nanotechnology* **29** (2018) 074001 (18 pp).

Durante la elaboración de este trabajo fue posible participar en diversos congresos y seminarios:

- A. Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales A.C. VII International Conference on Surfaces, Materials and Vacuum. October 6-10, 2014. Ensenada Baja California.
- B. 4to. Workshop on Advanced Electron Microscopy. UTSA. February 11-13, 2015. The University of Texas at San Antonio.
- C. International Materials Research Society Congress (MRS). November 29- December 4, 2015. Boston, Massachusetts.
- D. 34 th Annual Meeting of the Society for Thermal Medicine Systemic Treatment with Local Therapy. April 29-May 2, 2017. Cancún, México.
- E. Programa de Doctorado en Nanociencias y Nanotecnología. Seminarios del programa Abril 20, 2017. CINVESTAV-IPN, México.
- F. Seminarios del Grupo de Estado Sólido. Departamento de Física. Junio 20, 2017. CINVESTAV-IPN, México.

7. REFERENCIAS.

1. Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Rémy JS, Krötz F, et al. The magnetofection method: Using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem.* 2003;384(5):737–47.
2. Tong L, Zhao M, Zhu S, Chen J. Synthesis and application of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in targeted therapy and imaging of cancer. 2011;5(4):379–87.
3. Asín L, Ibarra MR, Tres A, Goya GF. Controlled cell death by magnetic hyperthermia: Effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration. *Pharm Res.* 2012;29(5):1319–27.
4. Hasany SF, Ahmed I, Rajan J, Rehman A. Systematic Review of the Preparation Techniques of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol.* 2012;2(6):148–58.
5. Andrés Vergés M, Costo R, Roca AG, Marco JF, Goya GF, Serna CJ, et al. Uniform and water stable magnetite nanoparticles with diameters around the monodomain–multidomain limit. *J Phys D Appl Phys.* 2008;41(13):134003.
6. Swihart MT. Vapor-phase synthesis of nanoparticles. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2003;8:127–33.
7. Tadić M, Kusigerski V, Marković D, Panjan M, Milošević I, Spasojević V. Highly crystalline superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) in a silica matrix. *J Alloys Compd.* 2012;525:28–33.
8. Arruebo M, Fernández-Pacheco R, Irusta S, Arbiol J, Ibarra MR, Santamaría J. Sustained release of doxorubicin from zeolite – magnetite nanocomposites prepared by mechanical activation. *Nanotechnology.* 2006;17:4057–64.
9. Tronc E, Jolivet R MR. Defect spinel structure in iron oxide colloids. *Mater Res Bull.* 1982;17:1365–9.
10. Kanitz A, Hoppius JS, del Mar Sanz M, Maicas M, Ostendorf A, Gurevich EL. Synthesis of Magnetic Nanoparticles by Ultrashort Pulsed Laser Ablation of Iron in Different Liquids. *ChemPhysChem.* 2017;18(9):1155–64.
11. Chen J, Wang F, Huang K, Liu Y, Liu S. Preparation of Fe₃O₄ nanoparticles with adjustable morphology. *J Alloys Compd.* 2009;475(1–2):898–902.
12. Mizukoshi Y, Shuto T, Masahashi N, Tanabe S. Preparation of superparamagnetic magnetite nanoparticles by reverse precipitation method: Contribution of sonochemically generated oxidants. *Ultrason Sonochem.* 2009;16(4):525–31.
13. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(2):257–62.
14. Jamuna KS, Banu S, Brindha P, Kurian GA. Nano-scale preparation of Titanium dioxide by *Desmodium gangeticum* root aqueous extract. *Ceram Int.* 2014;40(8 PART A):11933–40.
15. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):346–56.
16. Gardea-Torresdey JL, Tiemann KJ, Gonzalez JH, Henning JA, Townsend MS. Ability of silica-immobilized *Medicago sativa* (alfalfa) to remove copper ions from solution. *J Hazard Mater.* 1996;48(1–3):181–90.
17. Zorrilla RHJLRC. Tannin biosynthesis of iron oxide nanoparticles. *Appl Phys A*

- Mater Sci Process. 2010;100:453–9.
18. Park Y, Hong YN, Weyers A, Kim YS, Linhardt RJ. Polysaccharides and phytochemicals: a natural reservoir for the green synthesis of gold and silver nanoparticles. IET Nanobiotechnology. 2011;5(3):69.
 19. Marchiol L. Synthesis of metal nanoparticles in living plants. Ital J Agron. 2012;7(3):274–82.
 20. Wang T, Jin X, Chen Z, Megharaj M, Naidu R. Green synthesis of Fe nanoparticles using eucalyptus leaf extracts for treatment of eutrophic wastewater. Sci Total Environ. 2014;466–467:210–3.
 21. Machado S, Pinto SL, Grosso JP, Nouws HPA, Albergaria JT, Delerue-Matos C. Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. Sci Total Environ. 2013;445–446:1–8.
 22. Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Peralta-Videa JR, Parsons JG, Troiani H, Jose-Yacaman M. Alfalfa sprouts: a natural source for the synthesis of silver nanoparticles. Langmuir. 2003;19:1357–61.
 23. Njagi EC, Huang H, Stafford L, Genuino H, Galindo HM, Collins JB, et al. Biosynthesis of Iron and Silver Nanoparticles at Room Temperature Using Aqueous Sorghum Bran Extracts. 2011;27(17):264–71.
 24. Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, et al. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. Nanotechnology. 2007;18(10):105104.
 25. Darroudi M, Hakimi M, Goodarzi E, Kazemi Oskuee R. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Green preparation, characterization and their cytotoxicity effects. Ceram Int. 2014;40(9 PART B):14641–5.
 26. Narayanan S, Sathy BN, Mony U, Koyakutty M, Nair S V., Menon D. Biocompatible magnetite/gold nanohybrid contrast agents via green chemistry for MRI and CT bioimaging. ACS Appl Mater Interfaces. 2012;4(1):251–60.
 27. Vittorio O, Curcio M, Cojoc M, Goya GF, Iemma F, Dubrovskaya A, et al. Polyphenols delivery by polymeric materials: challenges in cancer treatment. Drug Deliv. 2017;24(1):162–80.
 28. Baptista FI, Henriques AG, Silva AMS, Wiltfang J, Da Cruz E Silva OAB. Flavonoids as therapeutic compounds targeting key proteins involved in Alzheimer's disease. ACS Chem Neurosci. 2014;5(2):83–92.
 29. Zanforlin E, Zagotto G, Ribaud G. The Medicinal Chemistry of Natural and Semi-Synthetic Compounds Against Parkinson's and Huntington's Diseases The Medicinal Chemistry of Natural and Semi-Synthetic Compounds Against Parkinson's and Huntington's Diseases. ACS Chem Neurosci. 2017;8(11):2356–68.
 30. Balasubramanian S, Girija AR, Nagaoka Y, Iwai S, Suzuki M, Kizhikkil V, et al. folate- and transferrin-decorated polymeric magnetic nanoformulation: a synergistic cancer therapeutic approach, accelerated by magnetic hyperthermia. 2014;437–59.
 31. Herlekar M, Barve S, Kumar R. Review Article Plant-Mediated Green Synthesis of Iron Nanoparticles. 2014;2014.
 32. Rieger KA, Schiffman JD. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. Carbohydr Polym. 2014;113:561–8.
 33. Kharissova O V., Dias HVR, Kharisov BI, Pérez BO, Pérez VMJ. The greener synthesis of nanoparticles. Trends Biotechnol. 2013;31(4):240–8.

34. Takeuchi N. *Nanociencia y nanotecnología*. México: La ciencia para todos; 2013. 142 p.
35. Duan X, Huang Y, Cui Y, Wang J. Indium phosphide nanowires as building blocks for nanoscale electronic and optoelectronic devices. *2001;409(1):1999–2002*.
36. Mark R. *A gentle introduction to the Next Big Idea*. upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall; 2003.
37. Wan Y, Sha J, Chen B, Fang Y, Wang Z, Wang Y. Nanodevices Based on Silicon Nanowires. *Recent Pat Nanotechnol*. 2009;3:1–9.
38. Lee B, Sarin L, Johnson NC, Hurt RH. A nano-selenium reactive barrier approach for managing mercury over the life-cycle of compact fluorescent lamps. *Environ Sci Technol*. 2009;43(15):5915–20.
39. Sozer N, Kokini JL. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends Biotechnol*. 2009;27(2):82–9.
40. Rana S, Vleugels J, Huang S, Vanmeensel K, Blank D. Manipulating microstructure and mechanical properties of CuO doped 3y-tzp nanoceramics using spark plasma sintering. *J Eur Ceram Soc*. 2010;30:899–904.
41. Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. *Biomagn Res Technol*. 2004;17:1–17.
42. Duncan T V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety : Barrier materials , antimicrobials and sensors. *J Colloid Interface Sci*. 2011;363(1):1–24.
43. Sharma S, Madou M. A new approach to gas sensing with nanotechnology. *Philos Trans R Soc A*. 2012;370:2448–73.
44. Theron J, Walker JA, Cloete TE. Nanotechnology and Water Treatment : Applications and Emerging Opportunities. *Crit Rev Microbiol*. 2008;34:43–69.
45. Wahajuddin, Arora S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:3445–71.
46. Sakamoto JH, van de Ven AL, Godin B, Blanco E, Serda RE, Grattoni A, et al. Enabling individualized therapy through nanotechnology. *Pharmacol Res*. 2010;62(2):57–89.
47. Wadghiri YZ, Li J, Wang J, Hoang DM, Sun Y, Xu H, et al. Detection of Amyloid Plaques Targeted by Bifunctional USPIO in Alzheimer ' s Disease Transgenic Mice Using Magnetic Resonance Microimaging. *PLoS One*. 2013;8(2):1–10.
48. Scheinberg DA, Villa CH, Escorcía FE, Mcdevitt MR. Conscripts of the infinite armada: systemic cancer therapy using nanomaterials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7(5):266–76.
49. Re F, Gregori M, Masserini M. Maturitas Nanotechnology for neurodegenerative disorders. *Maturitas*. 2012;73(1):45–51.
50. Alivisatos A. Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots. *Science (80-)*. 1996;2:933–7.
51. Voura EB, Jaiswal JK, Mattoussi H, Simon SM. Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy. *Nat Med Tech Reports*. 2004;10(9):993–8.
52. Stroh M, Zimmer JP, Duda DG, Levchenko TS, Cohen KS, Brown EB, et al. Quantum dots spectrally distinguish multiple species within the tumor milieu in vivo. *Nat Med*. 2005;11(6):678–82.
53. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Andre E, et al. Multifunctional

- inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. *ACS Nano*. 2008;2(5):889–96.
54. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. *Chem Soc Rev*. 2009;38(6):1759–82.
 55. Patri AK, Kukowska-latallo JF, Jr JRB. Targeted drug delivery with dendrimers : Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex B. *Advanced Drug Deliv Rev*. 2005;57:2203–14.
 56. Nam J, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-Bar-Code-Based DNA Detection with PCR-like Sensitivity. *J Am Chem Soc*. 2004;126:5932–3.
 57. Santini JT, Richards AC, Scheidt R, Cima MJ, Langer R. Microchips as Controlled Drug-Delivery Devices. *Angew Chemie - Int Ed*. 2000;39:2396–407.
 58. Whitesides GM, Ostuni E, Jiang X, Ingber DE. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu Rev Biomed Eng*. 2001;3:335–73.
 59. Shi J, Votruba AR, Farokhzad OC, Langer R. Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications. *Nano Lett*. 2010;10(9):3223–30.
 60. Debbage P. Targeted Drugs and Nanomedicine : Present and Future. *Curr Pharmacol Des*. 2009;15:153–72.
 61. Etheridge ML, Campbell SA, Erdman AG, Haynes CL, Wolf SM, McCullough J. The big picture on small medicine: the state of nanomedicine products approved for use or in clinical trials. *Nanomedicine*. 2013;9(1):1–14.
 62. Lun H, Yu X, Bendayan R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(7):686–700.
 63. Praetorius NP, Mandal TK. Engineered Nanoparticles in Cancer Therapy. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007;1:37–51.
 64. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol*. 2007;2:751–60.
 65. Ibrahim NK, Desai N, Legha S, Soon-shiong P, Theriault RL, Rivera E, et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of ABI-007 , a Cremophor-free , Protein-stabilized , Nanoparticle Formulation of Paclitaxel 1. *Clin Cancer Res*. 2002;8(May):1038–44.
 66. Chen N, Shao C, Li S, Wang Z, Qu Y, Gu W, et al. Cy5.5 Conjugated MnO Nanoparticles for Magnetic Resonance / Near-infrared Fluorescence Dual-modal Imaging of Brain Gliomas. *J Colloid Interface Sci*. 2015;
 67. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Neurobiology of Disease Structure and function of the blood – brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):13–25.
 68. Wiley DT, Webster P, Gale A, Davis ME. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *PNAS*. 2013;110(21):8662–7.
 69. Heckman KL, Decoteau W, Estevez A, Reed KJ, Costanzo W, Sanford D, et al. Custom Cerium Oxide Nanoparticles Protect Against a Free Radical Mediated Autoimmune Degenerative Disease in the Brain. *ACS Nano*. 2013;
 70. Nowacek A, Zhang G, McMillan J, Kiyota T, Batrakova E, Gendelman HE. Nanomedicine in Neurodegenerative Disorders. In: Hunter RJ, Preedy VR, editors. *Nanomedicine in Health and Disease*. Boca Raton: CRC Press; 2012. p. 423.
 71. Dawidczyk CM, Kim C, Park JH, Russell LM, Lee KH, Pomper MG, et al. State-of-the-Art in design rules for drug delivery platforms: lessons from FDA-approved nanomedicines. *J Control Release*. 2014;187(410):133–44.

72. Lindner LH, Hossann M, Vogeser M, Teichert N, Wachholz K, Eibl H, et al. Dual role of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in thermosensitive liposomes : Active ingredient and mediator of drug release. *J Control Release*. 2008;125:112–20.
73. Clinical, Prenton Technologies L. Nano-Bond: nano particulate reinforced adhesive system. 2008.
74. Veridex, LLC a Johnson Company in vitro diagnostics oncology.
75. www.freseniusmedicalcare.com.
76. www.nanobiotix.com.
77. Cui Y, Hong C, Zhou Y, Li Y, Gao X, Zhang X. Talanta Synthesis of orientedly bioconjugated core / shell Fe₃O₄ @ Au magnetic nanoparticles for cell separation. 2011;85:1246–52.
78. Akagi T, Baba M, Akashi M. Biodegradable Nanoparticles as Vaccine Adjuvants and Delivery Systems : Regulation of Immune Responses by Nanoparticle-Based Vaccine. *Adv Polym Sci*. 2012;247:31–64.
79. Kurosaki T, Kitahara T, Fumoto S, Nishida K, Nakamura J. Biomaterials acid for gene delivery systems. *Biomaterials*. 2009;30(14):2846–53.
80. Jin G, Kim M, Sang U, Kim H. Neuroscience Letters Neurite outgrowth of dorsal root ganglia neurons is enhanced on aligned nanofibrous biopolymer scaffold with carbon nanotube coating. *Neurosci Lett*. 2011;501(1):10–4.
81. Cho Y, Ben R. Polymer and nano-technology applications for repair and reconstruction of the central nervous system. *Exp Neurol*. 2012;233(1):126–44.
82. von Maltzahn G, Park J-H, Lin KY, Singh N, Schwöppe C, Mesters R, et al. Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting. *Nat Mater*. 2011;10(7):545–52.
83. Lyer S, Tietze R, Unterweger H, Singh R, Matuszak J, Friedrich RP, et al. Nanomedical innovation : the SEON- concept for an improved cancer therapy with magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2015;10(21):3287–304.
84. Freitas Jr RA. The Ideal Gene Delivery Vector : Chromalloyocytes , Cell Repair Nanorobots for Chromosome Replacement Therapy. *J Evol &Technology*. 2007;16(1):1–95.
85. Morup S. Studies of superparamagnetism in samples of ultrafine particles. In: Hernando A, editor. *Nanomagnetism NATO ASI Series*. Springer, Dordrecht; 1993.
86. Gonzalez-Fernandez MA, Torres TE, Andrés-Vergés M, Costo R, de la Presa P, Serna CJ, et al. Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties. *J Solid State Chem*. 2009;182(10):2779–84.
87. Cullity B. *Introduction to magnetic materials*. 1972.
88. Dennis CL, Ivkov R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperth*. 2013;29(8):715–29.
89. Goya GF, Grazú V, Ibarra MR. Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Curr Nanosci*. 2008;4:1–16.
90. Rios A, Zougagh M, Bouri M. Magnetic nanomaterials as an useful tool for sample preparation in analytical methods. A review. *Anal Methods*. 2013;1–16.
91. Dennis CL, Ivkov R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int J Hyperth*. 2013;29(8):715–29.
92. Gautier J, Allard-Vannier E, Hervé-Aubert K, Soucé M, Chourpa I. Design strategies of hybrid metallic nanoparticles for theragnostic applications. *Nanotechnology*. 2013;24(43):432002.

93. Sanz B, Calatayud MP, Torres TE, Fanarraga ML, Ibarra MR, Goya GF. Magnetic hyperthermia enhances cell toxicity with respect to exogenous heating. *Biomaterials*. 2017;114:62–70.
94. Marcos-Campos I, Asín L, Torres TE, Marquina C, Tres A, Ibarra MR, et al. Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells. *Nanotechnology*. 2011;22(20):205101.
95. Schwertmann U, Cornell M. *Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2000.
96. Phan M-H, Alonso J, Khurshid H, Lampen-Kelley P, Chandra S, Stojak Repa K, et al. Exchange Bias Effects in Iron Oxide-Based Nanoparticle Systems. *Nanomaterials*. 2016;6(11):221.
97. Goya GF, Berquó TS, Fonseca FC, Morales MP. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. *J Appl Phys*. 2003;94(5):3520–8.
98. Cvejic Z, Antic B, Kremenovic A, Rakic S, Goya GF, Rechenberg HR, et al. Influence of heavy rare earth ions substitution on microstructure and magnetism of nanocrystalline magnetite. *J Alloys Compd*. 2009;472(1–2):571–5.
99. Bast R, Kufe D, Pollock R, Weichselbaum R, Holland J, Frei E. *Cancer Medicine*. Hamilton Decker; 2000.
100. Watmough D, Ross W. *Hyperthermia: clinical and scientific aspects*. Blackie and Son; 1986.
101. Glazer ES, Curley SA. The ongoing history of thermal therapy for cancer. *IMAJ*. 2012;20(2):229–35.
102. Bickels J, Kollender Y, Merinsky O, Meller I. Coley's toxin: Historical perspective. *Med Archaeol*. 2002;4:471–2.
103. Krawczyk A, Lada-Tondyra E. The first experiments in magnetic stimulation a history of discoveries within two parallel lives. *Electr Rev*. 2010;12:202–5.
104. Gilchrist R, Medal R, Shorey D, Hanselman R, Parrot J, Taylor C. Selective inductive heating of lymph nodes. *Ann Surg*. 1957;146(4):596–606.
105. Jordan A, Wust P, Fähling H, John W, Hinz A, Felix R. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids : Physical evaluation of their potential for hyperthermia. *International J Hyperth*. 2009;25(7):499–511.
106. Jordan A, Scholz R, Wust P, Schirra H, Schiestel T, Schmidt H, et al. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells. *J Magn Magn Mater*. 1999;194:185–96.
107. Maier-Hauff K, Rothe R, Scholz R, Gneveckow U, Wust P, Thiesen B, et al. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. *J Neurooncol*. 2007;81(1):53–60.
108. www.magforce.de.
109. Franconi C. *Hyperthermia Heating Technology and Devices*. Franconi C, editor. Springer, Dordrecht; 1987.
110. Sanz B, Calatayud MP, Cassinelli N, Ibarra MR, Goya GF. Long-Term Stability and Reproducibility of Magnetic Colloids Are Key Issues for Steady Values of Specific Power Absorption over Time. *Eur J Inorg Chem*. 2015;2015(27):4524–31.
111. Hergt R, Dutz S, Müller R, Zeisberger M. Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *J Phys*

- Condens Matter. 2006;18(38):S2919–34.
112. Hervault A, Thi Kim N. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*. 2015;6:11553–73.
 113. Capco DG, Chen Y. *Nanomaterial Impacts on Cell Biology and Medicine*. Capco DG, Chen Y, editors. Springer US; 2014. 277 p.
 114. Lima E, De Biasi E, Zysler RD, Vasquez Mansilla M, Mojica-Pisciotti ML, Torres TE, et al. Relaxation time diagram for identifying heat generation mechanisms in magnetic fluid hyperthermia. *J Nanoparticle Res*. 2014;16(12):1–11.
 115. De La Presa P, Luengo Y, Multigner M, Costo R, Morales MP, Rivero G, et al. Study of heating efficiency as a function of concentration, size, and applied field in g-Fe₂O₃ nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2012;116(48):25602–10.
 116. Rosensweig RE. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. *J Magn Magn Mater*. 2002;252:370–4.
 117. Ivkov R, Denardo SJ, Daum W, Foreman AR, Goldstein RC, Nemkov VS, et al. Application of High Amplitude Alternating Magnetic Fields for Heat Induction of Nanoparticles Localized in Cancer. 2005;11:7093–104.
 118. Cheung A, Neyzari A. Deep local hyperthermia for cancer therapy: external electromagnetic and ultrasound techniques. *Cancer Res*. 1984;44:4736s–4744s.
 119. Di Corato R, Espinosa A, Lartigue L, Tharaud M, Chat S, Pellegrino T, et al. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*. 2014;35(24):6400–11.
 120. Chen S, Chiang C, Hsieh S. Simulating physiological conditions to evaluate nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia (MFH) therapy applications. *J Magn Magn Mater*. 2010;322(2):247–52.
 121. Shah R, Davis TP, Glover AL, Nikles DE, Brazel CS. Impact of magnetic field parameters and iron oxide nanoparticle properties on heat generation for use in magnetic hyperthermia. *J Magn Magn Mater*. 2015;1(387):96–106.
 122. Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary tumour therapy. *J Magn Magn Mater*. 2007;311(1 SPEC. ISS.):187–92.
 123. Goya GF, Lima E, Arelaro AD, Torres T, Rechenberg HR, Rossi L, et al. Particle Size on Energy Absorption . 2008;44(11):1–4.
 124. Di Corato R, Espinosa A, Lartigue L, Tharaud M, Chat S, Pellegrino T, et al. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. *Biomaterials*. 2014;35(24):6400–11.
 125. Sun S-N, Wei C, Zhu Z-Z, Hou Y-L, Venkatraman SS, Xu Z-C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chinese Phys B*. 2014;23(3):37503.
 126. Datta NR, Ordóñez SG, Gaipal US, Paulides MM, Crezee H, Gellermann J, et al. Local hyperthermia combined with radiotherapy and/or chemotherapy: Recent advances and promises for the future. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(9):742–53.
 127. Périgo E, Hemery G, Sandre O, Ortega D, Garaio E, Plazaola F, et al. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. *Appl Phys Rev*. 2015;41302:1–104.
 128. Chalopin Y, Bacri J-C, Gazeau F, Devaud M. Nanoscale Brownian heating by interacting magnetic dipolar particles. *Sci Rep*. 2017;7(1):1656.
 129. Lu AH, Salabas EL, Schüth F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew Chemie - Int Ed*. 2007;46(8):1222–44.
 130. Adjei I, Sharma B, Labhasetwar V. Nanoparticles: cellular uptake and cytotoxicity. In:

- Capco D, Chen Y, editors. *Nanomaterial Impacts on Cell Biology*. New York: ed G; 2014. p. 277.
131. Wilhelm C, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Bacri JC. Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization. *Langmuir*. 2002;18(21):8148–55.
 132. Calatayud MP, Sanz B, Raffa V, Riggio C, Ibarra MR, Goya GF. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomaterials*. 2014;35(24):6389–99.
 133. Spencer JPE. The interactions of flavonoids within neuronal signalling pathways. *Genes Nutr*. 2007;2:257–73.
 134. Kong KW, Mat-Junit S, Aminudin N, Ismail A, Abdul-Aziz A. Antioxidant activities and polyphenolics from the shoots of *Barringtonia racemosa* (L.) Spreng in a polar to apolar medium system. *Food Chem*. 2012;134(1):324–32.
 135. Burri J, Graf M, Lambelet P, Loliger J. Vanillin - More Than A Flavoring Agent - A Potent Antioxidant. *J Sci Food Agric*. 1989;48(1):49–56.
 136. King AA, Shaughnessy DT, Mure K, Leszczynska J, Ward WO, Umbach DM, et al. Antimutagenicity of cinnamaldehyde and vanillin in human cells: Global gene expression and possible role of DNA damage and repair. 2007;616:60–9.
 137. Lirdprapamongkol K, Sakurai H, Kawasaki N, Choo M. Vanillin suppresses in vitro invasion and in vivo metastasis of mouse breast cancer cells. *Eur J Pharm Sci*. 2005;25:57–65.
 138. Wani KD, Kadu BS, Mansara P, Gupta P, Deore A V., Chikate RC, et al. Synthesis, characterization and in vitro study of biocompatible cinnamaldehyde functionalized magnetite nanoparticles (CPGF Nps) for hyperthermia and drug delivery applications in breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(9).
 139. Yallapu MM, Ebeling MC, Khan S, Sundram V, Chauhan N, Gupta BK, et al. Novel curcumin loaded magnetic nanoparticles for pancreatic cancer treatment. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(8):1471–80.
 140. Ahmed AS, Wani KD, Kitture R, Ahmed A, Choudhari AS. Synthesis , Characterization and In Vitro Study of Curcumin-Functionalized Citric Acid- Capped Magnetic (CCF) Nanoparticles as Drug Delivery Agents in Cancer. *J Bionanoscience*. 2011;5(1):59–65.
 141. Salunkhe AB, Khot VM, Pawar SH. Magnetic Hyperthermia with Magnetic Nanoparticles: A Status Review. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(5):572–94.
 142. Baronzio G, Parmar G, Ballerini M, Szasz A, Baronzio M, Cassutti V. Integrative Oncology A Brief Overview of Hyperthermia in Cancer Treatment. 2014;3(1):1–10.
 143. Song CW. Effect of Local Hyperthermia on BloodFlow and Microenvironment: 1984;(October).
 144. Calatayud MP, Soler E, Torres TE, Campos-Gonzalez E, Junquera C, Ibarra MR, et al. Cell damage produced by magnetic fluid hyperthermia on microglial BV2 cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):8627.
 145. Wust P, Rau B, Gellermann J. Radiochemotherapy and hypertermia in the treatment of rectal cancer. *Rec Res Cancer Res*. 1998;146:175–91.
 146. Steeves RA, Ph D. Hyperthermia in cancer therapy: where are we today and where are we going? *Bull N Y Acad Med*. 2016;68(2):341–50.
 147. Westra A, Dewey W. Variation in sensitivity to heat shock during the cell-cycle of Chinese hamster cells in vitro. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*.

- 1971;19(5):467–77.
148. B, Alberts, D, Bray, J, Lewis, M, Raff, K, Roberts JDW. *Biología molecular de la célula*. Tercera ed. Barcelona, España: Omega; 1996.
 149. Mahmoudi M, Simchi A, Imani M, Shokrgozar MA, Milani AS, Häfeli UO, et al. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;75(1):300–9.
 150. Gagat M, Krolikowska K, Klimaszewska A, Grzanka A. The effect of mild hyperthermia on morphology, ultrastructure and F-actin organization in HL-60 cell line. *Med Biol Sci*. 2013;27(2):19–25.
 151. Ito A, Matsuoka F, Honda H, Kobayashi T. Heat shock protein 70 gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Cancer Gene Ther*. 2003;10(12):918–25.
 152. Salucci S, Burattini S, Falcieri E, Gobbi P. Three-dimensional apoptotic nuclear behavior analyzed by means of Field Emission in Lens Scanning Electron Microscope. *Eur J Histochem*. 2015;59(3).
 153. Arriortua OK, Garaio E, Herrero de la Parte B, Insausti M, Lezama L, Plazaola F, et al. Antitumor magnetic hyperthermia induced by RGD-functionalized Fe₃O₄ nanoparticles, in an experimental model of colorectal liver metastases. *Beilstein J Nanotechnol*. 2016;7:1532–42.
 154. Dua T, Janca A, Muscetta A. *Neurological Disorders Public Health Challenges*. World Heal Organ. 2004;232.
 155. Graeber MB. Changing Face of Microglia. *Science* (80-). 2010;330(6005):783–8.
 156. Stansley B, Post J, Hensley K. A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2012;9(1):577.
 157. Wei J, Gabrusiewicz K, Heimberger AB. Review Article The Controversial Role of Microglia in Malignant Gliomas. *Clin Dev Immunol*. 2013;2013.
 158. Nakamura Y. Regulating Factors for Microglial Activation. *Biol Pharm Bull*. 2002;25(8):945–53.
 159. Giulian D. Microglia and the Immune Pathology of Alzheimer Disease. *Am J Hum Genet*. 1999;65:13–8.
 160. Calatayud MP, Soler E, Torres TE, Campos-Gonzalez E, Junquera C, Ibarra MR, et al. Cell damage produced by magnetic fluid hyperthermia on microglial BV2 cells. *Sci Rep*. 2017;7(1):8627.
 161. Christie C, Madsen SJ, Peng Q, Hirschberg H. Macrophages as nanoparticle delivery vectors for photothermal therapy of brain tumors. *Ther Deliv*. 2015;6(3):371–84.
 162. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v- myc carrying retrovirus. *JNeuroimmunol*. 1990;27:229–37.
 163. Chasin LM. *Exponential growth*. New York: Department of Biological Sciences, Columbia University; 2000.
 164. Genuino HC, Mazrui N, Seraji MS, Luo Z, Hoag GE. Green Synthesis of Iron Nanomaterials for Oxidative Catalysis of Organic Environmental Pollutants. *New and Future Developments in Catalysis: Catalysis for Remediation and Environmental Concerns*. Elsevier B.V.; 2013. 41-61 p.
 165. Ávila-Zárraga, JG, Gavilán-García, IC, Cano-Díaz G. *Teoría y experimentos de química orgánica con un enfoque de química verde*. México, Distrito Federal:

- Universidad Nacional Autónoma de México; 2015. 125 p.
166. Zimmerman, JB, Anastas P. Peer reviewed: design through the 12 principles of green engineering. *Environ Sci Technol.* 2003;37(5):94A–101A.
 167. Anastas P, Warner J. *Green Chemistry: theory and practice.* New York: Oxford University Press; 1998.
 168. Herrera-Becerra R, Rius JL, Zorrilla C. Tannin biosynthesis of iron oxide nanoparticles. *Appl Phys A Mater Sci Process.* 2010;100(2):453–9.
 169. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2010;156(1–2):1–13.
 170. Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron.* 2013;54–55:1–27.
 171. Sealy C. Birds' feathers inspire colorful nanoparticles. *Nano Today.* 2015;1.
 172. Narayanan KB, Sakthivel N. Green synthesis of biogenic metal nanoparticles by terrestrial and aquatic phototrophic and heterotrophic eukaryotes and biocompatible agents. *Adv Colloid Interface Sci.* 2011;169(2):59–79.
 173. Shaw J, Boyd A, House M, Woodward R, Mathes F, Cowin G, et al. Magnetic particle-mediated magnetoreception. *J R Soc Interface.* 2015;12(20150499):2–15.
 174. Hulkoti NI, Taranath TC. Biosynthesis of nanoparticles using microbes-A review. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2014;121:474–83.
 175. Quester K, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron.* 2013;54–55:1–27.
 176. Thakkar KN, Mhatre SS, Parikh RY. Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2010;6(2):257–62.
 177. Amemiya Y, Arakaki A, Staniland SS, Tanaka T, Matsunaga T. Controlled formation of magnetite crystal by partial oxidation of ferrous hydroxide in the presence of recombinant magnetotactic bacterial protein Mms6. 2007;28:5381–9.
 178. Herlekar M, Barve S, Kumar R. Plant-Mediated Green Synthesis of Iron Nanoparticles. *J Nanoparticles.* 2014;2014:1–9.
 179. Kharisov B, Kharissova O, Yacaman M, M. U. State of the Art of the Bi- and Trimetallic Nanoparticles on the Basis of Gold and Iron. *Recent Pat Nanotechnol.* 2009;3(2):81–98.
 180. Narayanan KB, Sakthivel N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2010;156(1–2):1–13.
 181. Herrera-Becerra R, Zorrilla C, Ascencio JA. Production of iron oxide nanoparticles by a biosynthesis method: An environmentally friendly route. *J Phys Chem C.* 2007;111(44):16147–53.
 182. Gardea-Torresdey JL, Parson JG, Gomez E, Peralta-Videa J, Troiani HE, Santiago P, et al. Formation and Growth of Au Nanoparticles in live side Live Alfalfa Plants. *Nano Lett.* 2002;2:397–401.
 183. Gardea-Torresdey JL, Gomez E, Peralta-Videa JR, Parsons JG, Troiani H, Jose-Yacaman M. Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir.* 2003;19(4):1357–61.
 184. Herlekar M, Barve S, Kumar R. Plant-Mediated Green Synthesis of Iron Nanoparticles. *J Nanoparticles.* 2014;2014:1–9.
 185. Wani KD, Kadu BS, Mansara P, Gupta P, Deore A V, Chikate RC, et al. Synthesis , Characterization and In Vitro Study of Biocompatible Cinnamaldehyde Functionalized Magnetite Nanoparticles (CPGF Nps) For Hyperthermia and Drug

- Delivery Applications in Breast Cancer. PLoS One. 2014;9(9):1–13.
186. Li J, Chang X, Chen X, Gu Z, Zhao F, Chai Z, et al. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. *Biotechnol Adv.* 2014;32(4):727–43.
 187. Xin H, Yang X, Liu X, Tang X, Weng L, Han Y. Biosynthesis of Iron Nanoparticles Using Tie Guanyin Tea Extract for Degradation of Bromothymol Blue. *J Nanotechnol.* 2016;2016.
 188. Xiao L, Mertens M, Wortmann L, Kremer S, Valldor M, Lammers T, et al. Enhanced In Vitro and In Vivo Cellular Imaging with Green Tea Coated Water-Soluble Iron Oxide Nanocrystals. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;
 189. Zheng C, Chen P, Bao S, Xia J, Sun X. Environmentally Compatible Synthesis of Superparamagnetic Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles with Prehydrolysate from Corn Stover. 2014;9:589–601.
 190. Martin JE, Herzing A, Yan W, Li X, Koel BE, Kiely CJ, et al. Determination of the oxide layer thickness in core-shell zerovalent iron nanoparticles. *Langmuir.* 2008;24(8):4329–34.
 191. Tsao R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients.* 2010;2:1231–46.
 192. Ahmad T. Review Article Reviewing the Tannic Acid Mediated Synthesis of Metal Nanoparticles. *J Nanotechnol.* 2014;2014:1–11.
 193. Cheng DM, Kuhn P, Poulev A, Rojo LE, Lila MA, Raskin I. In vivo and in vitro antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. *Food Chem.* 2012;135(4):2994–3002.
 194. Thomas JDP. Handbook of herbs and spices. Peter KV., editor. New York: Woodhead Published Limited, CRC Press.; 2000. 1-311 p.
 195. Sathishkumar M, Sneha K, Won SW, Cho CW, Kim S, Yun YS. Cinnamon zeylanicum bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2009;73(2):332–8.
 196. Sathishkumar M, Sneha K, Kwak IS, Mao J, Tripathy SJ, Yun YS. Phyto-crystallization of palladium through reduction process using *Cinnamom zeylanicum* bark extract. *J Hazard Mater.* 2009;171(1–3):400–4.
 197. Mohan Kumar K, Mandal BK, Siva Kumar K, Sreedhara Reddy P, Sreedhar B. Biobased green method to synthesise palladium and iron nanoparticles using *Terminalia chebula* aqueous extract. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2013;102:128–33.
 198. Ooi LS, Li Y, Kam S-L, Wang H, Wong EY, Ooi VE. Antimicrobial Activities of Cinnamon Oil and Cinnamaldehyde from the Chinese Medicinal Herb *Cinnamomum cassia Blume*. *Am J Chin Med.* 2006;34(3):511–22.
 199. Elke A. Authenticity of Vanilla and Vanilla Extracts: Part 1: Comprehensive survey of the literature. *Eur Com Environ institute, Food Drug unit - Jt Res Cent.* 1993;83.
 200. Havkin-Frenkel D, Belanger FC. Handbook of Vanilla Science and Technology. *Handbook of Vanilla Science and Technology.* 2010.
 201. Walton NJ, Mayer MJ, Narbad A. Vanillin. *Phytochemistry.* 2003;63(5):505–15.
 202. Parthasarathy VA, Chempakam B, Zachariah T. Chemistry of Spices. CAB International. 2008.
 203. Aswathy B, Avadhani GS, Sumithra IS, Suji S, Sony G. Microwave assisted synthesis and UV-Vis spectroscopic studies of silver nanoparticles synthesized using vanillin as

- a reducing agent. *J Mol Liq.* 2011;159(2):165–9.
204. de Jager LS, Perfetti GA, Diachenko GW. Determination of coumarin, vanillin, and ethyl vanillin in vanilla extract products: liquid chromatography mass spectrometry method development and validation studies. *J Chromatogr A.* 2007;1145(1–2):83–8.
 205. Faraday M. Experimental Relations of Gold and other metals to light. *Philos Trans R Soc London.* 1857;147:145–53.
 206. Ramirez-Nuñez, AL, Jiménez-García, LF, Goya, GF, Sanz, B, Santoyo-Salazar J. In vitro magnetic hyperthermia using polyphenol-coated Fe₃O₄@g-Fe₂O₃ nanoparticles from *Cinnamomum verum* and *Vanilla planifolia*: the concert of green synthesis and therapeutic possibilities. *Nanotechnology.* 2018;29(74001):18pp.
 207. Arteaga JF, Ruiz-Montoya M, Palma A, Alonso-Garrido G, Pintado S, Rodríguez-Mellad JM. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules.* 2012;17(5):5126–38.
 208. Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin Nanomedicine: A road to cancer therapeutics. *Curr Pharm Des.* 2013;19(11):1994–2010.
 209. Rao PV, Gan SH. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2014;2014.
 210. Jayaprakasha GK, Negi PS, Jena BS, Jagan Mohan Rao L. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. *J Food Compos Anal.* 2007;20(3–4):330–6.
 211. Keshava C, Kesava N, Whong W, Nath J, Ong T. Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1998;17:313–26.
 212. Liu J, Mori A. Antioxidant and pro-oxidant activities of p-hydroxybenzyl alcohol and vanillin: effects on free radicals, brain peroxidation and degradation of benzoate, deoxyribose, amino acids and DNA. *Neuropharmacology.* 1993;32(7):659–69.
 213. Kumar Basniwal R, Singh Buttar H, Jain VK, Jain N. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. *J Agric Food Chem.* 2011;59:2056–61.
 214. Kong AT, Yu R, Chen C, Mandlekar S, Primiano T. Signal Transduction Events Elicited by Natural Products : Role of MAPK and Caspase Pathways in Homeostatic Response and Induction of Apoptosis. *Arch Pharm Res.* 2000;23(1):1–16.
 215. Machado S, Pinto SL, Grosso JP, Nouws HPA, Albergaria JT. Science of the Total Environment Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Sci Total Environ.* 2013;445–446:1–8.
 216. Silva GL, Lee I-S, Kinghorn a. D. Special problem with the extraction of Plants. *Methods Biotechnol Vol 4 Nat Prod Isolation.* 1998;4:343–63.
 217. Singleton, V.L., Rossi JA. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144–58.
 218. M. Awwad A, M. Salem N. A Green and Facile Approach for Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Nanosci Nanotechnol.* 2013;2(6):208–13.
 219. www.icdd.com.
 220. Calatayud MP, Sanz B, Raffa V, Riggio C, Ibarra MR, Goya GF. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. *Biomaterials.* 2014;35(24):6389–99.
 221. Kim JA, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Role of cell cycle on the cellular uptake

- and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nat Nanotechnol.* 2012;7(January):62–8.
222. Iyengar SJ, Joy M, Ghosh K, Dey S. Magnetic , X-ray and Mössbauer studies on magnetite/maghemite core-shell nanostructures fabricated through an aqueous route. *RSC Adv.* 2014;4:64919–29.
 223. Schwaminger SP, Bauer D, Wagner FE, Berensmeier S. Oxidation of magnetite nanoparticles : impact on surface and crystal properties †. *CrystEngComm.* 2016;
 224. Costo R, Bello V, Robic C, Port M, Marco JF, Puerto Morales M, et al. Ultrasmall iron oxide nanoparticles for biomedical applications: improving the colloidal and magnetic properties. *Langmuir.* 2012;28(1):178–85.
 225. Boskovic M, Goya GF, Vranjes-Djuric S, Jovic N. Influence of size distribution and field amplitude on specific loss power. *J Appl Phys.* 2015;117(1–6).
 226. Nasrazadani S, Raman A. The application of infrared spectroscopy to the study of rust systems - II. Study of cation deficiency in magnetite (Fe₃O₄) produced during its transformation to maghemite (γ-Fe₂O₃) and hematite (α-Fe₂O₃). *Corros Sci.* 1993;34(8):1355–65.
 227. Guin PS, Das S, Mandal PC. Electrochemical Reduction of Quinones in Different Media: A Review. *Int J Electrochem.* 2011;2011:1–22.
 228. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):346–56.
 229. Machado S, Pinto SL, Grosso JP, Nouws HPA, Albergaria JT, Delerue-Matos C. Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. *Sci Total Environ.* 2013;445–446:1–8.
 230. Darroudi M, Hakimi M, Goodarzi E, Kazemi Oskuee R. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Green preparation, characterization and their cytotoxicity effects. *Ceram Int.* 2014;40(9 PART B):14641–5.
 231. Niraimathee VA, Subha V, Ravindran RSE, Renganathan S. Green synthesis of iron oxide nanoparticles from *Mimosa pudica* root extract. 2016;X(3):1–14.
 232. Mahdavi M, Namvar F, Ahmad M Bin, Mohamad R. Green Biosynthesis and Characterization of Magnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Using Seaweed (*Sargassum muticum*) Aqueous Extract. 2013;5954–64.
 233. Kumar B, Smita K, Cumbal L, Debut A. Biogenic synthesis of iron oxide nanoparticles for 2-arylbenzimidazole fabrication. *J Saudi Chem Soc.* 2014;18(4):364–9.
 234. Cai Y, Shen Y, Xie A, Li S, Wang X. Green synthesis of soya bean sprouts-mediated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2010;322(19):2938–43.
 235. Abdeen M, Sabry S, Ghozlan H, El-Gendy AA, Carpenter EE. Microbial-Physical Synthesis of Fe and Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Using *Aspergillus niger* YESM1 and Supercritical Condition of Ethanol. *J Nanomater.* 2016;2016:1–7.
 236. Venkateswarlu S, Subba RY, Balaji T, Prathima B, Jyothi N. Biogenic synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using platain peel extract. *Mater Lett.* 2013;100:241–4.
 237. Venkateswarlu S, Natesh Kumar B, Prasad CH, Venkateswarlu P, Jyothi NVV. Bio-inspired green synthesis of Fe₃O₄ spherical magnetic nanoparticles using *Syzygium cumini* seed extract. *Phys B Condens Matter.* 2014;449:61–71.
 238. Lee JH, Roh Y, Hur HG. Microbial production and characterization of superparamagnetic magnetite nanoparticles by *Shewanella sp.* HN-41. *J Microbiol*

- Biotechnol. 2008;18(9):1572–7.
239. Rieger KA, Schiffman JD. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. *Carbohydr Polym.* 2014;113:561–8.
 240. Han Y-S, Bastianetto S, Dumont Y, Quirion R. Specific plasma membrane binding sites for polyphenols, including resveratrol, in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):238–45.
 241. P. Calatayud M, Asin L, Tres A, F. Goya G, R. Ibarra M. Cell Bystander Effect Induced by Radiofrequency Electromagnetic Fields and Magnetic Nanoparticles. *Curr Nanosci.* 2016;12(3):372–7.
 242. Asín L, Goya GF, Tres A, Ibarra MR. Induced cell toxicity originates dendritic cell death following magnetic hyperthermia treatment. *Cell Death Dis.* 2013;4(4):e596.
 243. Overgaard J. Ultrastructure of a murine mammary carcinoma exposed to hyperthermia in vivo. *Cancer Res.* 1976;36(3):983–95.
 244. Zierler S, Klein B, Furtner T, Bresgen N, Lütz-Meindl U, Kerschbaum HH. Ultraviolet irradiation-induced apoptosis does not trigger nuclear fragmentation but translocation of chromatin from nucleus into cytoplasm in the microglial cell-line, BV-2. *Brain Res.* 2006;1121(1):12–21.
 245. Hergt R, Hiergeist R, Zeisberger M, Schüler D, Heyen U, Hilger I, et al. Magnetic properties of bacterial magnetosomes as potential diagnostic and therapeutic tools. *J Magn Magn Mater.* 2005;293(1):80–6.
 246. Guardia P, Corato R Di, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-hernandez M, et al. Water-Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. *ACS Nano.* 2012;6(4):3080–91.
 247. Quester K, Avalos-borja M, Castro-longoria E. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron.* 2013;54–55:1–27.
 248. Fortin JP, Gazeau F, Wilhelm C. Intracellular heating of living cells through Néel relaxation of magnetic nanoparticles. *Eur Biophys J.* 2008;37(2):223–8.
 249. Senthil M, Ramesh C. Biogenic Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles using *Tridax procumbens* leaf extract and its antibacterial activity. *Dig J Nanomater Biostructures.* 2012;7(3):1655–60.
 250. Manquían-Cerda K, Cruces E, Angélica Rubio M, Reyes C, Arancibia-Miranda N. Preparation of nanoscale iron (oxide, oxyhydroxides and zero-valent) particles derived from blueberries: Reactivity, characterization and removal mechanism of arsenate. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2017;145:69–77.
 251. Mathew S, Abraham TE. In vitro antioxidant activity and scavenging effects of *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. *Food Chem Toxicol.* 2006;44(2):198–206.
 252. Hovorka O. Thermal activation in statistical clusters of magnetic nanoparticles. *J Phys D Appl Phys.* 2017;50(4):44004.
 253. Makarov V V, Makarova SS, Love AJ, Sinitsyna O V, Dudnik AO, Yaminsky I V, et al. Biosynthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* Plants. 2014;30(20):5982-88.
 254. Goya GF, Fernandez-Pacheco R, Arruebo M, Cassinelli N, Ibarra MR. Brownian rotational relaxation and power absorption in magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater.* 2007;316(2 SPEC. ISS.):132–5.
 255. Hergt R, Dutz S. Magnetic particle hyperthermia-biophysical limitations of a visionary

- tumour therapy. *J Magn Magn Mater.* 2007;311:187–92.
256. Wani KD, Kadu BS, Mansara P, Gupta P, Deore A V, Chikate RC, et al. Synthesis , Characterization and In Vitro Study of Biocompatible Cinnamaldehyde Functionalized Magnetite Nanoparticles (CPGF Nps) For Hyperthermia and Drug Delivery Applications in Breast Cancer. 2014;9(9).
 257. Förster H. *UV/VIS Spectroscopy.* Weitkamp, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;
 258. Coates J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach.* John Wiley and Sons Ltd, editor. Chichester: R.A. Meyers (Ed.); 2000. 1085-10837 p.
 259. Alpert N. *IR-Theory and Practice of Infrared Spectroscopy.* New York: Plenum-Roseta; 1983.
 260. Cullity B. *Elements of X-ray diffraction.* In Notre Dame, Indiana: Adisson-Wesley Publishing Company Inc.; 1956. p. 509.
 261. Yao N, Lin Wang Z. *Handbook of microscopy for nanotechnology.* Boston: Kluwer Academic Publishers; 2005. 717 p.
 262. Hendrych A, Kubíneck R, Zhukov A. The magnetic force microscopy and its capability for nanomagnetic studies. *Mod Res Educ Top Microsc.* 2007;2:805–11.
 263. Williams D, Carter C. *Transmission Electron Microscopy a Textbook for Materials Science.* New York: Springer; 2009. 757 p.
 264. www.zeiss.com.mx.
 265. Orloff J, Utlaut M, Swanson L. *High Resolution Focused Ion Beam and its Applications.* New york: Kluwer Academic Plenum Publishers; 2003.