

# DIGESTION DE MATRICES BIOLÓGICAS ASISTIDA POR MICROONDAS PARA EL ANALISIS ESPECTROMETRICO DE BORO EN BNCT

Farías S.S., Di Santo N.R., Garavaglia R.N., Pucci G.N.,  
Schwint A.\* y Batistoni D.A.

Unidad de Actividad Química, Gerencia Centro Atómico Constituyentes,  
Comisión Nacional de Energía Atómica, Avenida del Libertador 8250,  
(1429) Buenos Aires

\* Unidad de Actividad Radiobiología, Gerencia Centro Atómico Constituyentes

## RESUMEN

En el presente trabajo se describe el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de concentraciones de B a nivel de trazas en muestras biológicas provenientes de estudios de BNCT. Para la puesta en solución de las muestras se utilizó el método de digestión por microondas para el caso de tejidos, y la preparación de suspensiones (“slurries”) en solución de agente tensioactivo para el caso de sangre. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante espectrometría de emisión con plasma inductivo de argón. Estos métodos fueron validados empleado material de referencia certificado y ensayos de recuperación. Las metodologías se desarrollaron según el plan de gestión de la calidad de la Institución.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha resurgido un notable interés con respecto al uso de la terapia para el cáncer por captura neutrónica (BNCT) para una variedad de tipos de tumores no tratables usando terapias establecidas (1,2). En BNCT se administra al sujeto una especie molecular borada (enriquecida en  $^{10}\text{B}$ ) que se localiza en el tumor a través de varios mecanismos dependientes del tipo de tumor y su localización. Un aspecto muy importante de la investigación en BNCT es la necesidad de determinar precisa y exactamente la concentración de B a niveles relativamente bajos. Esa necesidad proviene del hecho que así como las especies boradas se localizan en el tejido tumoral, también lo hacen en otros tejidos y órganos tales como mucosas, bazo, hígado, riñones, etc. También, previamente a la utilización de una especie borada específica, es necesario determinar la biodistribución de ese compuesto en una población estadísticamente significativa. Esto requiere el procesamiento de un gran número de muestras en un tiempo adecuado.

Por otra parte es necesario predecir exactamente cuando debe iniciarse una irradiación y luego determinar la magnitud de la radiación requerida para lograr la dosis radiológica deseada a una concentración media especificada de B, lo que requiere la determinación de B en sangre, que está relacionada con la concentración en el tumor que se pretende atacar. Por lo tanto el método seleccionado para el análisis de B total en tejidos y sangre debe tener ciertas características: no debe ser dependiente de la forma

química del B, debe ser rápido y debe ser capaz de determinar exacta y precisamente concentraciones de B en un ámbito relativamente amplio ( de ng/g a µg/g).

El diseño y validación de modelos experimentales que utilizan animales en estudios sobre BNCT, y las determinaciones de B en sangre de sujetos tratados mediante esa terapia requieren disponer de procedimientos analíticos confiables para la cuantificación de boro en esos materiales biológicos. La espectrometría de emisión atómica o iónica con plasma inductivo (ICP-AES) utilizando nebulización neumática es uno de los métodos analíticos más convenientes (3,4,5,6,7), con la condición que la muestra pueda presentarse en forma líquida y con un contenido limitado de sólidos disueltos. Por consiguiente, en el caso de tejidos y otras muestras biológicas, se requiere una etapa de mineralización previa, seguida por una dilución. La digestión en sistemas abiertos puede dar lugar a la pérdida de analito por vaporización de compuestos volátiles. El ataque en recipientes cerrados, a alta presión, permite evitar esas pérdidas y aumentar la eficiencia de destrucción de materia orgánica debido a la acción conjunta de presión y temperatura. Además el consumo de reactivos es menor, lo que disminuye la cantidad de analito residual en los blancos de reactivos.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de concentraciones de B a nivel de trazas y ultratrazas en muestras biológicas, de interés en estudios sobre terapia para el cáncer por captura neutrónica.

Para la solubilización de las muestras se utilizó el método de digestión por microondas (5,8,9,10) y la preparación de suspensiones (“slurries”) (11,12). La determinación se llevó a cabo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inductivo de argón.

## EXPERIMENTAL

### 1. Preparación de muestras de tejidos

Para el procesamiento de muestras asistido por microondas se utilizó un digestor cerrado Milestone modelo MLS 1200 MEGA, provisto de recipientes de Teflon®. El sistema posee sensores de presión y temperatura para regular las condiciones de ataque a un máximo predeterminado.

Se ensayaron diferentes programas de operación, utilizando como variables el tiempo y la potencia aplicados. La masa de muestra fue de aproximadamente  $0.5 \pm 0.0001$  g, utilizándose como reactivos HNO<sub>3</sub> concentrado destilado sobre cuarzo o calidad reactivo suprapuro y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, calidad reactivo suprapuro. Se mantuvo un alto nivel de limpieza y descontaminación previa del material de laboratorio (de polipropileno o Teflon®) empleado. En todos los casos se analizaron blancos. Para llevar a volumen siempre se utilizó agua bidestilada desionizada calidad Nanopure®. Se observó en general una buena eficiencia de disolución con programas que involucran un calentamiento previo a 250 W por un dado período de tiempo, seguido por cuatro etapas de potencia creciente entre 250 y 650 W cada una, de la misma duración. El programa utilizado se resume en Tabla 1.

**Tabla 1.** *Puesta en solución (tejidos sanos y malignos)*

**MASA MUESTRA (g)** **VOLUMEN HNO<sub>3</sub> (mL)** **VOLUMEN H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (mL)** **VOLUMEN FINAL(mL)**  
**0.300- 1,000** **6** **1** **50**

ETAPA	TIEMPO(MIN)	POTENCIA (W)
1	2	250
2	2	0
3	6	600
4	5	500
5	5	650
6	5	0 Ventilación

## 2. Preparación de muestras de sangre humana y animal

La determinación de boro en sangre humana y animal se efectuó sin ataque previo, a partir del análisis de suspensiones directas de sangre entera heparinizada en solución de un agente tensioactivo (Triton X-100). Se ensayaron diferentes masas de muestras y concentraciones de agente tensioactivo, para un volumen de trabajo de 10 mL. Las condiciones finalmente adoptadas se indican en la Tabla 2. Desde el momento en que se extrae la muestra al paciente (2 mL), se estima en 5 minutos el tiempo de pesada y puesta en solución de los tres replicados extraídos, y en 3 minutos el tiempo de procesamiento de cada uno de ellos en el ICP (disponiéndose de la correspondiente calibración). El tiempo total empleado para el análisis es compatible con el requerido en los protocolos de análisis provenientes de Harvard- Massachussets Institute of Technology y del National Brookhaven Laboratory, realizados antes, durante y después de la irradiación. En el caso de estudios con animales no es imperativo realizar el análisis en plazos breves predeterminados, pero si debe hacerse la puesta en solución de la sangre como máximo 2 hs antes del análisis.

**Tabla 2.** *Condiciones utilizadas para la suspensión de sangre entera*

**MASA MUESTRA (g)** **VOLUMEN TRITON X- 100 2,5% (mL)** **VOLUMEN FINAL (mL)**  
**0.300** **0,200** **10,0**

## 3. Determinación de B por ICP- AES

Para la etapa determinativa se utilizó, como en el caso del análisis de cultivos celulares, un espectrómetro de emisión de plasma inductivo de argón (ICP-AES). La incorporación reciente de este espectrómetro simultáneo de última generación decidió su evaluación con el propósito de mejorar los valores de sensibilidad y precisión, y la rapidez de respuesta (que se obtenían con el equipo JY 38 I existente). Este instrumento utiliza una celda de observación axial que produce una mejora de hasta un orden de magnitud en los límites de detección. El selector de longitudes de onda ópticas se basa en una red de tipo "echelle" con posdispersos cruzado, que permite obtener un espectrograma digitalizado bidimensional con alta resolución ( $\cong 5 \text{ pm}$ ). La detección se

realiza mediante un detector de estado sólido de carga acoplada (CCD), de tipo segmentado. Este dispositivo posee capacidad para observar simultáneamente un gran número de longitudes de onda, con alta repetibilidad y con sustracción simultánea del fondo espectral. El ámbito dinámico lineal es superior a  $10^5$ . La performance de este tipo de instrumento para el análisis de B en las matrices mencionadas no ha sido descripta aún en la literatura.

La optimización incluyó variables de la celda del plasma y de la modalidad de calibración. Sin embargo, como el volumen de muestra disponible no constituye una limitación en este caso, se trabajó con inyección continua de solución, utilizando un dispensador automático. Esto permite alcanzar una mayor precisión al permitir el promediado de un mayor número de replicados de lecturas.

El Fe, presente en mayor concentración en las muestras de sangre y en algunos órganos (hígado), puede constituir una interferencia espectral importante en la determinación espectroscópica de boro. Dado que el efecto de superposición de líneas es más pronunciado sobre la línea analítica más sensible, la observación simultánea de dos longitudes de onda permitió evaluar y controlar esos efectos interelementos. Se optó por utilizar la línea B 249.6 nm, menos interferida aunque menos sensible.

Para la calibración se prepararon patrones de B de distintas concentraciones a partir de estándares certificados de 1000  $\mu\text{g/l}$  de B y se utilizó para cada caso la técnica de homologación de matriz. Los parámetros de mérito pueden observarse en la Tabla 3.

**Tabla 3.** *Parámetros de mérito*

	<b>B EN TEJIDOS</b>	<b>B EN SANGRE</b>
LD (base solución) ( $\mu\text{g/L}$ )	8	5
LD (base tejido) ( $\mu\text{g/g}$ )	0.2 – 0.7	0.2
PRECISION (base solución) 50 $\mu\text{g/mL}$ (%)	5	5
(base solución) 500 $\mu\text{g/mL}$ (%)	1	1
PRECISION (base tejido) 4 $\mu\text{g/g}$ (%)	5	5
(base tejido) 40 $\mu\text{g/g}$ (%)	1	1

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método desarrollado permite la determinación de concentraciones de boro entre 2.5 y 100  $\mu\text{g/g}$  de tejido. En la Tabla 4 se muestran algunos resultados obtenidos en experiencia con hámsters, utilizando MWD e ICP-AES y dos técnicas de inyección del compuesto borado fructosa- $^{10}\text{B}$ orofenilalanina (f-BPA): inyección intrayugular (IY) e intraperitoneal (IP).

Para el caso de sangre entera, es posible analizar concentraciones de boro comprendidas entre 0.6 y 200  $\mu\text{g/g}$  de sangre entera, compatible con los mínimos y máximos de las curvas de biodistribución para el caso de administración de dosis de  $^{10}\text{B}$  fenilalanina (f-BPA) establecidas en los protocolos en vigencia. Algunos de los resultados obtenidos en sangre humana entera pueden observarse en la Tabla 5.

**Tabla 4.** Determinación de B en tejidos y sangre de hamsters por MWD e ICP- AES, posterior a la administración de fructosa-<sup>10</sup>borofenilalanina (f- BPA).

Muestra	Tipo de inyección	Concentración de B( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) <sup>(a)</sup>
Sangre	IY	10.0 $\pm$ 0.1
Tumor	IY	65.1 $\pm$ 0.7
Tej. Ady.	IY	13.8 $\pm$ 0.2
Bolsa contr.	IY	19.2 $\pm$ 0.1
Sangre	IP	6.0 $\pm$ 0.1
Tumor	IP	18.3 $\pm$ 0.2
Tej. Ady.	IP	12.7 $\pm$ 0.1
Bolsa contr.	IP	10.2 $\pm$ 0.1
Hígado	IP	10.8 $\pm$ 0.2

(a) Concentración más una desviación estándar de la medición instrumental

**Tabla 5.** Determinación de B en sangre humana entera heparinizada, suspendida en solución de tensioactivo (con agregado de cantidades conocidas de B) por ICP-AES.

Muestra	Concentración de B ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
1	2.1 $\pm$ 0.3
2	3.4 $\pm$ 0.3
3	15.2 $\pm$ 0.7
4	32.4 $\pm$ 1.1
5	152.4 $\pm$ 3.8

La validación del procedimiento se llevó a cabo de dos maneras:

- a) por análisis de un material de referencia (Músculo Bovino, NIST RM 8414), con un contenido de  $0.6 \pm 0.4 \mu\text{gB}/\text{g}$ , sometido al procedimiento completo de digestión y determinación. Se obtuvo una concordancia aceptable entre el valor medido y el de referencia. (Tabla 6).

**Tabla 6:** Determinación de B en material de referencia *RM NIST 8414 BOVINE MUSCLE POWDER* (Concentración certificada  $0.6 \pm 0.4 \mu\text{gB}/\text{g}$ )

Muestra	Concentración de B Informada ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )
1	0.66
2	0.63
3	0.49
4	0.55
5	0.54
Promedio	0.57
Desviación estándar	0.07

b) a partir de ensayos de recuperación de boro agregado como ácido bórico sobre sangre entera heparinizada humana, suspendida en agente tensioactivo. (Tabla 7).

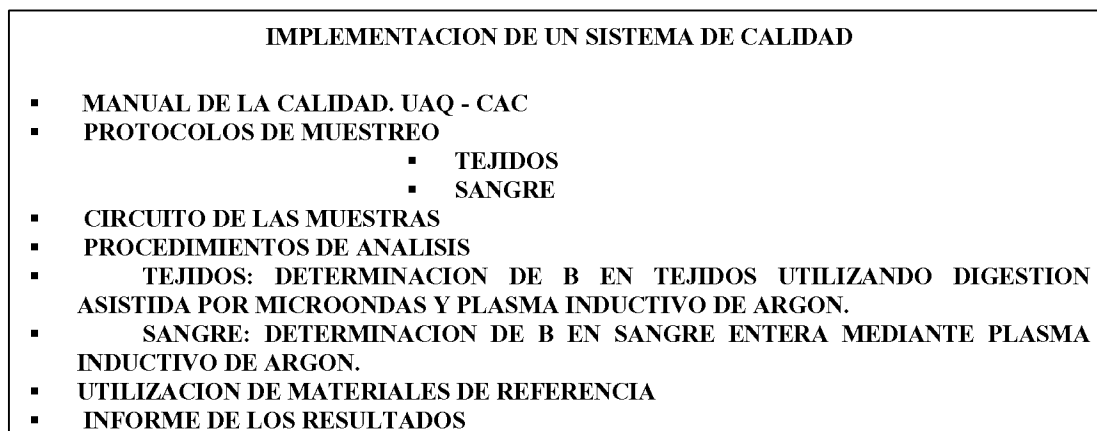
**Tabla 7: Ensayos de recuperación de B en sangre entera humana**

MUESTRA	Concentración de B agregada (µg/g)	Concentración de B medida (µg/g)	Recuperación (%)
1	2.1	2.1 ± 0.3	
98			
2	3.8	3.4 ± 0.3	93
3	16.5	15.2 ± 0.7	92
4	35.1	32.4 ± 1.1	92
5	161.8	152.4 ± 3.8	94

El método se utilizó, en el marco del Proyecto BNCT, para estudios de bio-distribución de boro suministrado como fructosa-BPA a partir de análisis de sangre, cerebro, tumor de cerebro, bazo e hígado de ratas Fisher y de bolsa sana, tumor de bolsa, sangre, hígado, bazo, lengua, mucosa oral, paladar y piel de hámsters, con el objeto de determinar la captación temporal de ese elemento por tejidos tumorales y sanos.

Los correspondientes protocolos analíticos, incorporando normativas de control y garantía de calidad, se encuentran en preparación. El esquema seguido para la implementación de un sistema de calidad se indica en la Figura 1.

**Figura 1: Implementación de un sistema de calidad**



**CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos muestran claramente que el método de digestión por microondas asociado a la determinación por ICP-AES para la cuantificación de B se adapta satisfactoriamente a los requerimientos de los estudios de modelos experimentales para BNCT (13).

En cuanto al análisis de B en sangre mediante la suspensión de muestras heparinizadas y cuantificación por ICP-AES, este se puede realizar en el tiempo adecuado para el caso de tratamiento de pacientes, y las determinaciones pueden ser llevadas a cabo con la exactitud y precisión requeridas en los protocolos establecidos actualmente, lo que resulta aceptable para esta etapa del trabajo experimental.

## REFERENCIAS

- 1) Soloway, AH, Tjarks, W; Barnum, A; Rong, F-G; Barth, RF; Codogni, IM; Wilson, JG (1998) *Chem. Revs.* 98: 1515-1562.
- 2) Allen, BT; Moore, DE; Harrington, BV; *Progress in Neutron Capture Therapy for Cancer* (1992) NY, Plenum Press.
- 3) Evans, S; Messel, T (1994) *Anal. Chim. Acta* 298: 267, 270.
- 4) Probst, TU; Berryman, T; Lemmen, P; Wießfloch, L; Auberger, T; Gabel, D; Carlsson, J; Larsson, B (1997) *J. Anal. Atom. Spectrom.* 12: 1115- 1122.
- 5) Sun, DH; Waters, JK; Mawhinney, TP (1997) *J. Anal. At. Spectrom.* 12: 675.
- 6) Tamat, SR; Moore, DE; Allen, BJ (1987) *Anal. Chem.* 59: 2161-2164.
- 7) Bauer, WS; Johnson, DA; Steele, SM; Messick, K; Miller, DL; Propp, WA (1989) *Strahlenther Onkol* 165: 176-179.
- 8) Evans, S.; Krähenbühl, U. (1994) *J. Anal. Atom. Spectrom.* 9: 1249- 1253.
- 9) Evans, S.; Krähenbühl, U. (1994) *Fresenius. Anal. Chem.* 34 9: 454-459.
- 10) Mingorance, MD; Pérez- Vazquez, ML; Lachica, M (1993) *J. Anal. Atom. Spectrom.* 8: 853- 858.
- 11) Wichman, MD; Fry, RC; Hoffman, MK (1986) *Appl. Spectrosc.* 40: 351
- 12) Bauer, WF; Micca, PL; White, BM (1992) Soloway, AH and Barth, RF, eds., *Proceedings of the fifth International Symposium on Neutron Capture Therapy.*
- 13) Schwint, AE; Kreimann, E; Daggrossa, A; Farías, SS; Garavaglia, RN; Batistoni, DA; Itoys, ME; Juvenal, G; Pisarev, MA (1999) *Proceedings of the Young Member Neutron Capture Therapy Meeting, Petten, The Netherlands.*