

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de este Trabajo Fin de Máster, Gema Martínez, toda su paciencia, tiempo y dedicación, sin los que no hubiera sido posible realizar este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio del INA, gracias por toda la ayuda prestada, especialmente a Ana, y por todos los buenos momentos que me habéis hecho pasar. Agradecer también a Vanesa que me hiciera posible y muy agradable la realización de las prácticas bajo su tutela.

Y por último dar las gracias a mi familia y mis amigos por su apoyo incondicional, sin el cual no habría llegado hasta aquí.

Muchas gracias a todos.

# Fabricación de Nanoplataformas Multifuncionales para su Aplicación en nanomedicina: Agentes de Contraste en Imagen Molecular, Hipertermia Magnética y Liberación de Fármacos.

---

## Resumen

En el presente trabajo se ha realizado la síntesis de diferentes suspensiones coloidales de nanopartículas basadas en magnetita y sílice densa y porosa, y su estudio como potencial aplicación en el campo de la biomedicina como agentes de contraste para imagen por resonancia magnética, hipertermia magnética y sistema de liberación de fármacos.

La síntesis de las nanopartículas magnéticas se ha llevado a cabo mediante descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro en disolventes orgánicos. Tras la síntesis es necesario refuncionalizar su superficie, para conseguir un coloide más estable y que pueda tener lugar la unión híbrida de estas nanopartículas sobre un soporte silíceo (denso o poroso) mediante un enlace peptídico. Las síntesis de las nanoplataformas multifuncionales de soporte poroso ha finalizado, mientras las nanopartículas híbridas de soporte denso se someten a un crecimiento, lo que proporcionará un recubrimiento (shell) de óxido de hierro sobre el soporte de sílice (core). Este paso es el intermedio para intentar sintetizar nanoplataformas multifuncionales huecas de óxido de hierro.

Tras cada síntesis, se procede a la caracterización de las nanopartículas para conocer la morfología, el tamaño, el diámetro hidrodinámico, la carga superficial y la concentración de la muestra. Y por último se sucederán una serie de experimentos para probar su validez en las aplicaciones de hipertermia, de carga de moléculas orgánicas (cristal de violeta) y como agente de contraste para resonancia magnética (relaxometría).

# Índice de Contenidos

1	INTRODUCCIÓN .....	1
2	OBJETIVOS .....	3
3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	4
3.1	Síntesis de Nanopartículas Magnéticas: $Fe_3O_4$ .....	4
3.2	Síntesis de Nanopartículas Híbridas: MCM-41@ $Fe_3O_4$ y $SiO_2@Fe_3O_4$ .....	5
3.3	Síntesis de nanopartículas Core-Shell $SiO_2@Fe_xO_y$ .....	5
3.4	Experimento absorción-desorción de CV .....	5
3.5	Caracterización .....	6
3.5.1	Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM) .....	6
3.5.2	Radio Hidrodinámico .....	7
3.5.3	Potencial Zeta ( $\xi$ ) .....	7
3.5.4	Relaxometría .....	8
3.5.5	Espectroscopia Ultravioleta-Visible .....	8
4	DISCUSIÓN Y RESULTADOS .....	9
4.1	Esquema de Trabajo .....	9
4.2	Nanopartículas superparamagnéticas .....	10
4.2.1	Agentes de Contraste .....	12
4.2.2	Hipertermia Magnética .....	13
4.3	Nanopartículas Híbridas: MCM-41@ $Fe_3O_4$ .....	13
4.3.1	Agentes de contraste .....	16
4.3.2	Absorción y desorción de CV .....	16
4.4	Nanopartículas Huecas .....	18
5	CONCLUSIONES .....	21
6	BIBLIOGRAFÍA .....	22
7	ANEXO: Prácticas del Trabajo Fin de Máster .....	23

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Escala nanométrica.</i>	1
<i>Figura 2. Algunos ejemplos de nanomateriales y sus aplicaciones en tecnología y biomedicina.</i>	1
<i>Figura 3. Síntesis por sonicación química y tratamiento térmico post-reacción.</i>	2
<i>Figura 4. Método layer-by-layer de Zhu, Y., et al. (2003) [5]</i>	3
<i>Figura 5. Sustitución nucleófila realizada por Kim, J., et al. (2006) [8].</i>	3
<i>Figura 6. Montaje para síntesis de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></i>	4
<i>Figura 7. Montaje para síntesis de NPs Core-Shell</i>	5
<i>Figura 8. Esquema funcional del TEM</i>	6
<i>Figura 9. Esquema de síntesis de NPs</i>	9
<i>Figura 10. Síntesis de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	10
<i>Figura 11. Funcionalización de NPs magnéticas.</i>	10
<i>Figura 12. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	10
<i>Figura 13. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) y (b) potencial zeta de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	11
<i>Figura 14. Magnetización de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (Miguel-Sancho, N., et al.(2011))</i>	12
<i>Figura 15. Relaxometría T<sub>2</sub> de las NPs magnéticas.</i>	12
<i>Figura 16. Hipertermia magnética de NPs magnéticas.</i>	13
<i>Figura 17. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs MCM-41.</i>	13
<i>Figura 18. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) y (b) potencial zeta de NPs MCM-41.</i>	14
<i>Figura 19. Síntesis de nanopartículas híbridas MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por reacción de condensación.</i>	14
<i>Figura 20. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	15
<i>Figura 21. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y potenciales zeta de NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y sus materiales iniciales.</i>	15
<i>Figura 22. Relaxometría T<sub>2</sub> de las NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	16
<i>Figura 23. Estudio de absorción de CV a diferentes pHs.</i>	17
<i>Figura 24. (a) Evolución temporal de adsorción y (b) cinética de segundo orden.</i>	18
<i>Figura 25. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs SiO<sub>2</sub>.</i>	19
<i>Figura 26. Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs SiO<sub>2</sub> densa.</i>	19
<i>Figura 27. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	19
<i>Figura 28. Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	20
<i>Figura 29. Síntesis de NP score-shell.</i>	20
<i>Figura 30. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub></i>	21

## Índice de tablas

<i>Tabla 1. Tabla de concentraciones de las muestras medidas por relaxometría.</i>	8
<i>Tabla 2. Concentraciones de Fe y de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en mg/ml de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	11
<i>Tabla 3. Concentraciones de Fe, de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de semillado en mg/ml de NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	16
<i>Tabla 4. Concentraciones de Fe y de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en mg/ml de NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.</i>	20

# 1 INTRODUCCIÓN

Los términos nanociencia y nanotecnología proceden del prefijo griego “nano” o del latín “nanus”, que significan “enano”. La nanociencia y la nanotecnología son unas de las disciplinas de mayor relevancia del siglo XXI, son multidisciplinares e interdisciplinares, y engloban distintas áreas científicas como química, física, ciencia de los materiales, ingeniería, biología e incluso medicina. La nanociencia puede definirse como la ciencia que estudia los fenómenos que tienen lugar a escala nanométrica, y la nanotecnología como el diseño, la síntesis, la manipulación y la aplicación de sistemas o dispositivos a través del control de la materia a nanoescala.

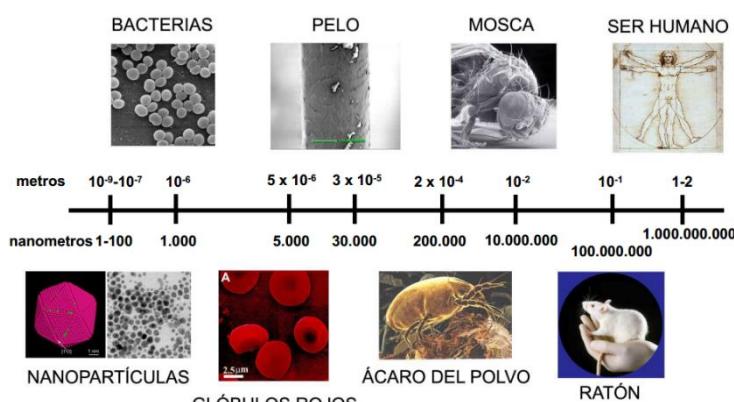


Figura 1. Escala nanométrica.

La figura 1 representa una escala nanométrica que compara diferentes tamaños desde el ser humano hasta las nanopartículas. Se considera nanomaterial a aquel que al menos una de sus dimensiones oscila entre un nanómetro y varios cientos de nanómetros. El interés de estas dimensiones radica en que, para determinados materiales, algunas de las leyes físicas a escala nanométrica difieren de las del material masivo, proporcionándole propiedades únicas como, fluorescencia, plasmón superficial, superparamagnetismo, alta relación superficie/volumen, etc. Debido a esto, el uso de los nanomateriales está creciendo de forma exponencial y sus aplicaciones cada vez abarcan un rango más amplio. Desde aplicaciones de la vida cotidiana como en cosméticos, crema de protección solar, envases para alimentación, sector textil y en electrodomésticos, hasta aplicaciones más específicas como nanobiosensores, absorbentes para purificación de aguas contaminadas, agentes de contraste para imagen médica, en ingeniería de tejidos, etc.

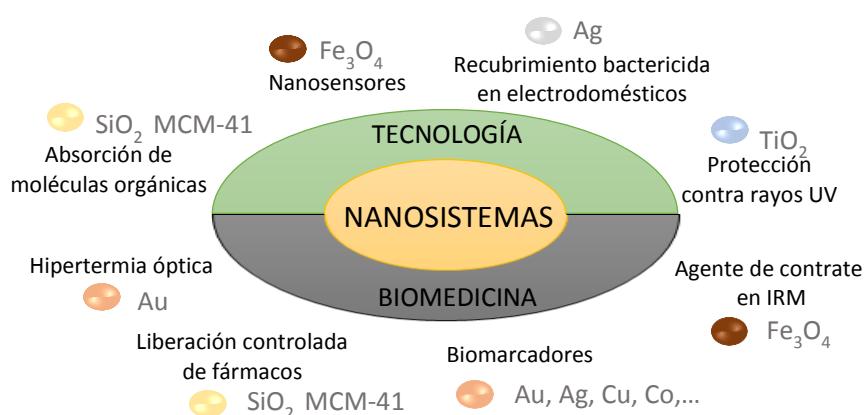


Figura 2. Algunos ejemplos de nanomateriales y sus aplicaciones en tecnología y biomedicina.

La figura 2 recoge algunos ejemplos de materiales nanoestructurados y sus aplicaciones. Entre los materiales más versátiles con aplicaciones tanto en el sector de la biomedicina como en el área tecnológica. Cabe destacar las nanopartículas magnéticas. La magnetita ( $Fe_3O_4$ ) es un material muy utilizado como agente de contraste, en biosensores, como separador catalítico, en hipertermia, etc. Esto se debe a que su principal característica a escala nanométrica es el superparamagnetismo. Es un comportamiento magnético con algunas características del ferromagnetismo y otras del paramagnetismo. Esto conlleva que bajo el efecto de un campo magnético, las nanopartículas tienen un comportamiento magnético, pero cuando cesa la influencia del campo, también cesa su respuesta magnética.

Otro material muy interesante es la sílice ( $SiO_2$ ), tanto densa como porosa, ya que es biocompatible y biodegradable. Su fabricación es sencilla, engloba un amplio rango de tamaños y su funcionalización abarca diferentes posibilidades. En el caso de la sílice porosa su relación superficie/volumen es muy grande, lo que hace que sea una candidata perfecta para cargar moléculas huésped.

Mientras que las nanopartículas individuales generalmente desempeñan una única función, la combinación de ellas permite crear sistemas híbridos que combinan diferentes funciones en un mismo nanosistema, produciéndose un efecto de sinergia. Para una unión híbrida es necesario una elección inteligente de materiales individuales a combinar, y ha de hacerse teniendo en cuenta las aplicaciones a las que se va a destinar.

Las propiedades únicas y los beneficios de la sílice y la magnetita los hacen nanomateriales ideales para combinarlos. El propósito de conseguir estas nanopartículas híbridas es que combinen aplicaciones biomédicas y tecnológicas. La presencia de las nanopartículas magnéticas daría a la estructura híbrida aplicación como agente de contraste en Imagen por Resonancia Magnética (IRM), mientras que la sílice porosa aportaría al nanosistema híbrido propiedades absorbente para cargar moléculas orgánicas, como fármacos o tintes, que posteriormente podrían ser liberados por hipertermia.

No son muchos los métodos de síntesis descritos en bibliografía que definan el anclaje de nanopartículas magnéticas sobre soportes de sílice densa, y menos aún sobre sílice porosa.

Los primeros procedimientos publicados fueron el método electroquímico [1] y la sonicación química [2, 3] de  $Fe(CO)_5$  sobre nanopartículas de sílice. El principal inconveniente es que las nanopartículas híbridas que se obtienen directamente de la síntesis no tienen respuesta magnética, por lo cual es necesario aplicar un tratamiento térmico post-reacción que produce la formación de agregados magnéticos distribuidos de forma heterogénea sobre la superficie de la sílice (figura 3).



Figura 3. Síntesis por sonicación química y tratamiento térmico post-reacción.

Métodos más recientes consisten en ensamblar a la superficie de la sílice nanopartículas magnéticas previamente sintetizadas a través de interacciones electrostáticas [4-6]. Como ejemplo cabe destacar el método layer-by-layer (autoensamblaje capa a capa) que intercala

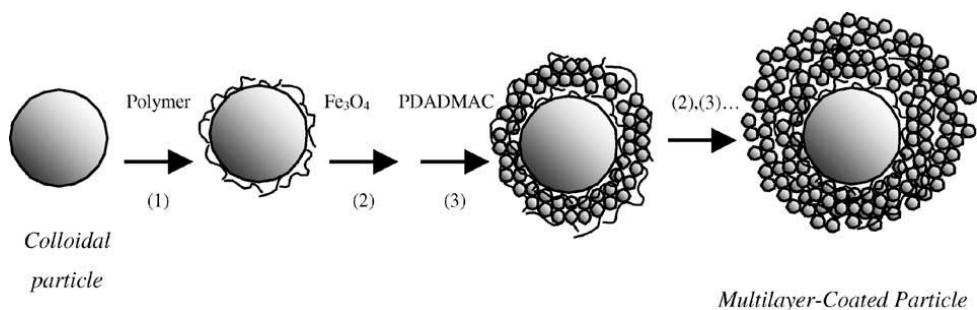


Figura 4. Método layer-by-layer de Zhu, Y., et al. (2003) [5]

capas de polielectrolito cargado positivamente con capas de nanopartículas magnéticas cargadas negativamente (figura 4). Sin embargo, el inconveniente de este método es que su síntesis requiere muchas etapas experimentales y además la fuerza iónica entre capas puede ser debilitada con variaciones en el pH del medio, llegando a producirse el desmoronamiento de la estructura.

Debido a los inconvenientes de los procedimientos anteriormente descritos, más recientemente se han desarrollado métodos en los que nanopartículas magnéticas han sido ancladas a la superficie de la sílice a través de interacciones covalentes [7-11], unión más robusta y estable frente a variaciones de pH que las interacciones iónicas. Kim, J., et al. (2006) desarrollaron un método de anclaje covalente utilizando una reacción de sustitución nucleófila (figura 5). El inconveniente de este método de síntesis es que la reacción se lleva a cabo con disolventes orgánicos tóxicos, como el tolueno. Además las nanopartículas híbridas resultantes tienen que ser recubiertas en una etapa posterior con PEG (polietilenglicol) para conseguir su biocompatibilidad.

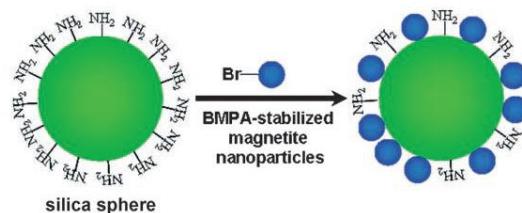


Figura 5. Sustitución nucleófila realizada por Kim, J., et al. (2006) [8].

En este contexto el reto inmediato que se plantea es el diseño de un nuevo método de síntesis que permita la unión covalente de las nanopartículas magnéticas a un soporte de sílice evitando la utilización de disolventes tóxicos y permitiendo su obtención en una única etapa y en medio acuoso.

## 2 OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son el diseño de una nueva ruta de síntesis de nanopartículas híbridas, compuestas por un núcleo o soporte (core) de sílice, densa o porosa, y un recubrimiento de nanopartículas magnéticas con potenciales aplicaciones tanto en el área biomédica como en el área tecnológica. Así como el estudio y caracterización de estos materiales de cara a su aplicación como agente de contraste en IRM y como sistema de carga de moléculas orgánicas y liberación por hipertermia.

### 3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### 3.1 Síntesis de Nanopartículas Magnéticas: $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Las nanopartículas (NPs) de magnetita solubles en agua se sintetizan siguiendo el procedimiento previamente descrito en bibliografía. Los reactivos necesarios para la síntesis son acetil acetonato de hierro (III) (Aldrich) y trietilenglicol (TREG) (Aldrich), ácido dimercaptosuccínico (DMSA), etanol absoluto, acetato de etilo (Aldrich) e hidróxido sódico (NaOH) (Aldrich).

En un matraz de tres bocas se introduce acetil acetonato de hierro (III) (0,6 g) y (TREG) (90 ml). Se procede a realizar el montaje de la figura 6, que consta de un agitador mecánico, un sistema de reflujo, un equipo para controlar la temperatura (termopar, manta y controlador de temperatura), y una corriente de argón para desgasificar. La mezcla se calienta hasta 180°C a una velocidad de 15°C/min, y se mantiene a dicha temperatura durante 30 minutos para conseguir la descomposición del precursor, que tiene lugar a temperaturas entre 180-190°C. A continuación, se calienta a una velocidad de 5°C/min hasta 280°C, temperatura a la cual se mantiene durante 30 minutos. La solución resultante se deja enfriar hasta temperatura ambiente. Posteriormente se añaden acetato de etilo (40 ml) y etanol absoluto (10 ml) y la mezcla resultante se deja bajo el efecto de un imán durante al menos una noche para producir la separación magnética de las nanopartículas.



Figura 6. Montaje para síntesis de NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Tras la precipitación magnética se procede a los lavados para eliminar los reactivos sobrantes. Sin que la solución deje de estar bajo el efecto del campo magnético del imán, se procede a la separación de las nanopartículas de su sobrenadante, simplemente vertiendo éste a otro recipiente. A continuación se añadirá etanol absoluto (10 ml) y acetato de etilo (40 ml) a las nanopartículas y para redispersar la mezcla, ya que estarán aglomeradas por efecto del imán, se utilizará un baño de ultrasonidos. Se repetirá el proceso otras dos veces.

Para funcionalizar las nanopartículas se prepara una disolución de agua destilada (20 ml) con ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (0,3 g) que se añade directamente sobre las nanopartículas magnéticas precipitadas dando una suspensión muy turbia, sobre la que se añade gotas de una disolución de hidróxido sódico (0,3g en 10 ml de agua) hasta que desaparezca la turbidez.

Tras este proceso se procederá a su diálisis para eliminar el exceso de DMSA y NaOH. Se introducirá la solución dentro de la membrana de diálisis, y ésta en un baño de agua destilada con agitación, el cual se cambiará regularmente para contribuir a la difusión.

### 3.2 Síntesis de Nanopartículas Híbridas: MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

El soporte de las nanoestructuras híbridas son nanopartículas de sílice densa (SiO<sub>2</sub>) y porosa (MCM-41), sintetizadas en el grupo siguiendo el método Stober [12] y el método reportado por Zeng et al. [13], respectivamente. Posteriormente a su síntesis ambas fueron tratadas con APTES (aminopropil trimetoxisilano) lo que permitió funcionalizar su superficie con grupos amino (NH<sub>2</sub>).

Para que la reacción se lleve a cabo se mezclan una relación de masas de sílice/magnetita de 0,75/0,45 mg, respectivamente. Las nanopartículas se encuentran en disolución acuosa, y la cantidad de volumen a mezclar dependerá de la concentración de la disolución. La concentración de la sílice es constante (30 mg/ml) para todas las síntesis, y se pipetearán 0,025 ml. En las disoluciones de magnetita, varía la concentración dependiendo del lote sintetizado, y en cada caso será un volumen diferente, el preciso para que pipeteen 0,45 mg de nanopartículas. Para que se produzca el ensamblaje y tenga lugar la formación del enlace peptídico es necesario un control exhaustivo del pH, que debe tener un valor en la disolución resultante en torno a 5. Se introduce la mezcla en un agitador rotativo para tubos a 40 rpm durante al menos 24 horas.

### 3.3 Síntesis de Nanopartículas Core-Shell SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>

Tras el semillado de la sílice densa, se procede al segundo paso para conseguir estructura core-shell. Los reactivos necesarios son: Cloruro férrico hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) (Aldrich), sulfato ferroso heptahidratado (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) (Aldrich) y etilenglicol (Aldrich).

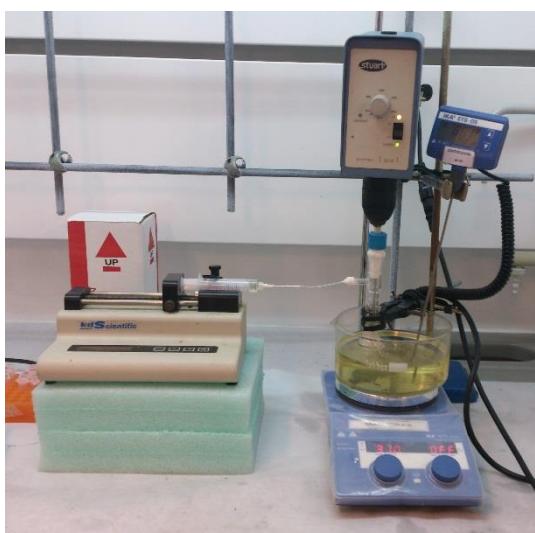


Figura 7. Montaje para síntesis de NPs Core-Shell

El montaje de la figura 7 es el necesario para el proceso experimental. Consta de un agitador mecánico, un controlador de la velocidad de inyección (0,1 ml/hora) y una placa calefactora con control de temperatura (85°C). El matraz contiene agua destilada (5 ml), etilenglicol (1 ml) y nanopartículas híbridas de sílice densa (0,5 ml de concentración de sílice 0,6 mg/ml). Sobre la disolución contenida en dicho matraz, se añadirán por inyección 0,5 ml de una disolución acuosa que contiene FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (0,9 mg) y FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1,8 mg) en 2 ml de agua. El proceso de adición se realiza durante 20 horas, después de las cuales las nanopartículas se aíslan por centrifugación y lavados con agua.

### 3.4 Experimento absorción-desorción de CV.

El reactivo escogido para estos ensayos es el cristal de violeta (CV) o violeta de metilo (Aldrich), un compuesto químico utilizado como tinte o marcador.

El experimento ha constado de varias partes, las cuales se detallan a continuación:

El primer paso fue preparar diferentes disoluciones de CV con concentraciones conocidas (0,01, 0,005, 0,0025, 0,00125 mg/ml) para construir una recta de calibrado que relacione absorbancia con concentración.

El segundo paso consistió en cargar las nanopartículas híbridas semilladas con CV durante 3h a diferentes pHs (2, 4, 6, 8, 10 y 12 aproximadamente) y ver el valor de pH óptimo en el cual las nanopartículas adsorbían la mayor cantidad de CV. El pH se ajustó con disoluciones de HCl y NaOH.

Una vez conocido el pH al cual la adsorción de CV es máxima, el tercer paso fue estudiar la cinética de adsorción del cristal de violeta. Para ello se ha seguido el siguiente procedimiento: Medir absorbancia del CV (inicial) una vez ajustado su pH. El siguiente paso será añadir las nanopartículas híbridas porosas (0,1 ml de 17,6 mg/ml de concentración) al CV (5,8 ml). Agitación un tiempo determinado en el agitador rotativo. Centrifugación (6000 rpm; 20 min) para que precipiten las nanopartículas, y poder extraer el sobrenadante, cuya concentración de CV se medirá en el equipo de espectroscopia UV-Vis. Después de la medición, el sobrenadante se añadirá de nuevo a las nanopartículas y la mezcla se someterá a ultrasonidos para obtener una suspensión homogénea. Ésta se pondrá en agitación de nuevo para seguir la cinética de absorción. Se repetirá el proceso desde la agitación, tantas veces como sea necesario hasta que se absorba la carga máxima.

### 3.5 Caracterización

#### 3.5.1 Microscopio Electrónico de Trasmisión (TEM)

##### Preparación de la muestra.

Para visualizar las nanopartículas en el microscopio electrónico de transmisión es necesario poseer una suspensión diluida de éstas. A continuación, se toma una gota (0,01 ml aproximadamente) de esta disolución y se deposita sobre una rejilla de cobre donde la gota se deja evaporar.

##### Funcionamiento teórico del equipo.

El microscopio electrónico se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta una imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador que tienen la función de registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío se encuentran un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas. El esquema del microscopio electrónico se puede observar en la figura 8.

Para la obtención de una imagen, el cañón electrónico produce un haz de electrones que es acelerado mediante una diferencia de potencial. El haz es dirigido y focalizado por las lentes condensadoras hacia la rejilla donde está depositada la muestra. Una vez que interactúen



Figura 8. Esquema funcional del TEM

con la muestra unos electrones chocarán y otros la atravesarán formándose así una imagen, gracias a las lentes objetivo, que posteriormente será aumentada y proyectada por las lentes proyectoras. El equipo utilizado ha sido el FEI TECNAI T20 del Laboratorio de Microscopías Avanzadas de la Universidad de Zaragoza.

### 3.5.2 Radio Hidrodinámico

El radio hidrodinámico de una nanopartícula es el que comprende la parte inorgánica que se visualiza en el TEM más los ligandos orgánicos de la funcionalización anclados a ella.

**Preparación de la muestra:** Para la medición se introduce una cubeta en el equipo con 3ml de muestra, debidamente diluida en caso necesario, porque si hay demasiada concentración de nanopartículas no se puede realizar la medición correctamente.

**Funcionamiento teórico del equipo:** La medición del diámetro hidrodinámico (Dh) de las partículas se realiza a partir de la medida del movimiento browniano de éstas, es decir a partir del movimiento al azar de las partículas dentro del solvente por efecto del choque con las moléculas del medio que las rodea. Al incidir la luz del láser sobre las partículas en suspensión, éstas dispersan luz en todas las direcciones llegando al detector la radiación dispersada a un ángulo determinado. Este detector registrará las fluctuaciones de la intensidad de la luz a lo largo del tiempo que son debidas al movimiento de las partículas. Un correlador digital compara las fluctuaciones a lo largo del tiempo con respecto a la primera señal creando una función de correlación que tras la aplicación de diversos algoritmos da como resultado el diámetro hidrodinámico de las partículas y su distribución. El equipo utilizado para esta caracterización ha sido Instruments 90 plus Particle Size Analyzer.

### 3.5.3 Potencial Zeta ( $\zeta$ ).

El potencial zeta es la carga eléctrica que posee la superficie de una nanopartícula.

**Preparación de la muestra:** Se realizarán distintas medidas, cada una a un pH diferente (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11), para lo cual es necesaria una disolución tampón de KCl (100 ml a 0,01M) de la que partir, y en diferentes viales (10 ml de KCl en cada uno) ir ajustando el pH en cada caso con ayuda de un pHímetro y disoluciones de HCl y NaOH. En la cubeta se introducirá la disolución tampón pH 2 (1,5 ml), la muestra (0,1 ml, diluido debidamente si es necesario), y el electrodo que creará una diferencia de potencial. Se repetirá el proceso para los distintos pHs.

### Funcionamiento teórico del equipo.

La medición de la carga superficial de las partículas se realiza a partir de la medida de la velocidad con la que migran las partículas al aplicar una diferencia de potencial a los electrodos de la célula que contiene la suspensión (movilidad electroforética). Este registro de la movilidad electroforética se lleva a cabo a partir de la técnica de velocimetría de láser Doppler en la que se mide las fluctuaciones del haz dispersado y combina con un haz de referencia. La combinación de estos haces da como resultado un haz en el que la intensidad de las fluctuaciones es directamente proporcional a la velocidad de las partículas. A partir de la obtención de la movilidad electroforética se puede calcular el potencial  $\zeta$ . El equipo utilizado es el Instruments 90 plus Particle Size Analyzer.

### 3.5.4 Relaxometría

La relajación es el conjunto de procesos por los que la magnetización nuclear recupera el equilibrio tras someterse a pulsos de campos magnéticos externos. El tiempo de relajación es el tiempo que le ocupa retorna a su estado de equilibrio.

#### Preparación de la muestra.

Para realizar la caracterización, se estudian diferentes muestras de diferentes concentraciones atemperadas a 37ºC, preparadas en tubos RMN como se indica en la tabla 1:

	H2O destilada	Muestra
<b>Tubo RMN 1</b>	0,2 ml	0 ml
<b>Tubo RMN 2</b>	0,16 ml	0,4 ml
<b>Tubo RMN 3</b>	0,12 ml	0,8 ml
<b>Tubo RMN 4</b>	0,8 ml	0,12 ml
<b>Tubo RMN 5</b>	0,4 ml	0,16 ml
<b>Tubo RMN 6</b>	0 ml	0,2 ml

Tabla 1. Tabla de concentraciones de las muestras medidas por relaxometría.

#### Funcionamiento teórico del equipo.

La base de esta técnica es la aplicación de un campo magnético fijo a lo largo de un eje para dar una dirección estable a la magnetización, y después una serie de pulsos perpendiculares para rotar la magnetización y dejar que vuelva a relajarse. Para la medición del tiempo de relajación trasversal T2 se ha empleado una secuencia de pulsos llamada “Carr-Purcell-Maiboom-Gill” (CPMG). Tras la aplicación del campo magnético de 1,5 T se aplica un pulso de 90º en el eje x que va seguido de un pulso de 180º en el eje y tras un tiempo  $\tau$ . A este pulso le sigue otro de 180º en el mismo eje y pasados dos veces el tiempo  $\tau$  se registra la señal del momento magnético de los núcleos en los ejes x e y, que disminuye con el tiempo. El equipo utilizado fue Minispec MQ60 de Brucker.

### 3.5.5 Espectroscopia Ultravioleta-Visible

La espectroscopia es el estudio de la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, y la espectroscopia ultravioleta-visible (UV/VIS) es la que trabaja esas zonas del espectro electromagnético. Esta técnica se emplea en este proyecto para cuantificar concentraciones de hierro.

#### Funcionamiento teórico del equipo.

Cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución contenido un analito absorbente, la intensidad incidente del haz es atenuada. Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) pero a efectos prácticos se utilizará la absorbancia ( $A = -\log T$ ). Este equipo permite comparar la radiación absorbida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia.

#### Preparación de la muestra.

Para poder medir la muestra es necesario haberla digerido con anterioridad, para transformar moléculas complejas en moléculas más sencillas, en este caso para conseguir iones de  $\text{Fe}^{3+}$  a partir de la magnetita. Para ello se utilizarán  $\text{HCl}$  (3,64 ml) y  $\text{HNO}_3$  (1,24 ml) diluidos en

agua (2,128 ml), de los cuales se prepararán dos lotes, uno para la medición del blanco que se reservará y otro para la digestión, al cual se añadirán las nanopartículas (0,4 ml). A continuación la mezcla se mantendrá agitando, con ayuda de un pequeño imán, y calentando (65°C) durante 150 minutos. En que la nueva muestra esté a temperatura ambiente, se enrasará en un matraz aforado (10 ml) con una disolución de HCl (6M).

Tras ello se procederá a la valoración de la muestra. La primera medida deberá ser del blanco, para realizar la medida de referencia sin nada de soluto. La segunda se realizará con ayuda de una disolución de tiocianato de potasio (KSCN) (50 ml de 1,5M), que se unirá a los iones de hierro y la solución adquirirá una tonalidad rosácea, más intensa cuanta más alta sea la concentración y viceversa. En una cubeta se añadirán KSCN (1,5 ml), y la muestra (1,5 ml). Se repetirá el proceso 3 veces para hacer la media de los tres resultados.

## 4 DISCUSIÓN Y RESULTADOS

### 4.1 Esquema de Trabajo

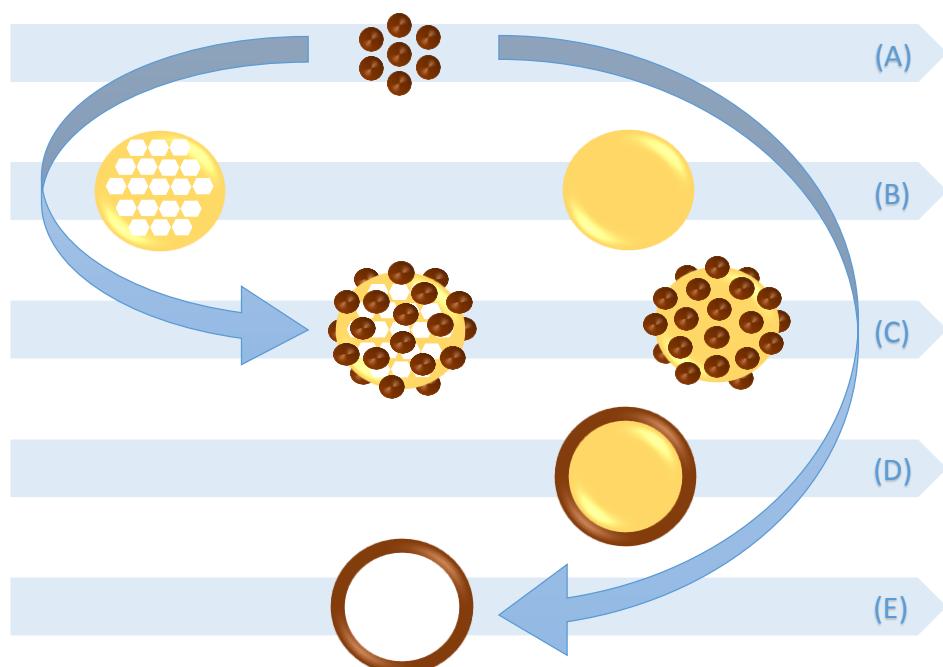


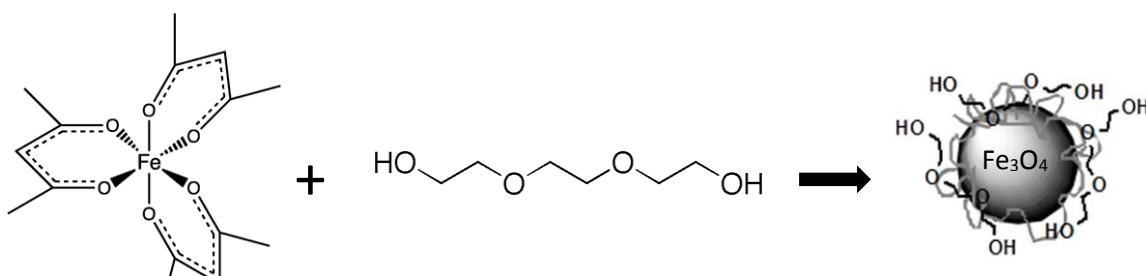
Figura 9. Esquema de síntesis de NPs.

En la figura 9 se pueden apreciar claramente las dos síntesis desarrolladas en este trabajo. Se distinguen 5 niveles A-E. A y B son los materiales iniciales, siendo magnetita, sílice porosa MCM-41 y sílice densa. El nivel C representa las nanopartículas híbridas multifuncionales. El proceso  $A + B \rightarrow C$  es el semillado de las nanopartículas de magnetita sobre las respectivas sílices. El proceso  $C \rightarrow D$  es la etapa de crecimiento para dar la estructura core-shell D. Y por último, en el nivel E se encuentra la nanopartícula hueca, tras pasar por un procedimiento  $D \rightarrow E$  para eliminar el soporte de sílice.

## 4.2 Nanopartículas superparamagnéticas

La síntesis de las nanopartículas de hierro se ha realizado mediante el método de descomposición térmica de un precursor en medio orgánico. El precursor de hierro utilizado es el acetil acetonato de hierro (III) y el disolvente orgánico en el que tendrá lugar la descomposición es el TREG. El cual actúa como reductor y estabilizante quedando adsorbido en la superficie de las nanopartículas (figura 10). El disolvente promueve la reducción parcial del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , dando como resultado nanopartículas compuestas por óxido ferroso-diférrico o magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), con fórmula química:  $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$ .

Inicialmente, la mezcla de reacción posee una tonalidad rojiza, pero cuando el proceso de síntesis finaliza, la solución resultante adquiere un tono negro debido a la formación de nanopartículas.



Debido a que el TREG está unido débilmente a la superficie de las nanopartículas, podría desorberse con el tiempo provocando aglomeración de las nanopartículas. Por ello es necesario después de la síntesis en TREG realizar un cambio de ligando, que se realizará sustituyendo el TREG por DMSA (figura 11). La reacción de refuncionalización se lleva a cabo en medio acuoso. El DMSA se une covalentemente a la superficie de la nanopartícula, con lo que se evita la aglomeración de las nanopartículas con el tiempo, dejando en la superficie grupos COOH que servirán para el futuro anclaje de las nanopartículas magnéticas al soporte de sílice.

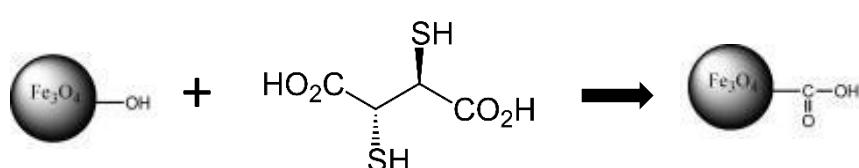


Figura 11. Funcionalización de NPs magnéticas.

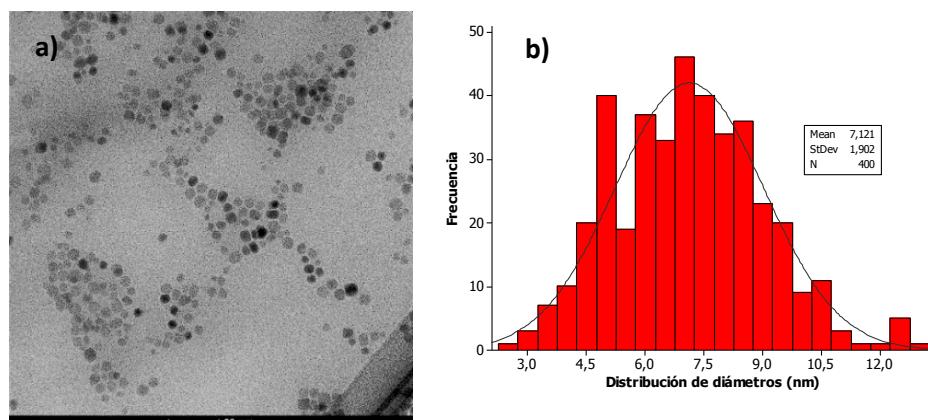


Figura 12. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

La figura 12a muestra una imagen de TEM correspondiente a las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DMSA. Se observa que la morfología de las nanopartículas es aproximadamente esférica. A partir de estas imágenes se pueden medir los diámetros de las nanopartículas. Para realizar el análisis del tamaño de partícula de cada muestra se midió la longitud más grande de cada partícula, de al menos 100 partículas, con la ayuda del programa IMAQ VISION BUILDER. Para el cálculo de la distribución de tamaños de la muestra, se realiza un estudio estadístico ajustando los datos a un modelo de distribución normal o gaussianana (figura 12b). Como resultado se obtiene un diámetro medio es de 7 nm con una desviación típica de  $\pm 2$  nm.

La figura 13a representa la distribución de diámetros hidrodinámicos para las nanopartículas de magnetita funcionalizadas con DMSA dispersas en agua. Se obtiene un diámetro medio de 13,77 nm, mayor al diámetro obtenido por TEM debido a la contribución del ligando.

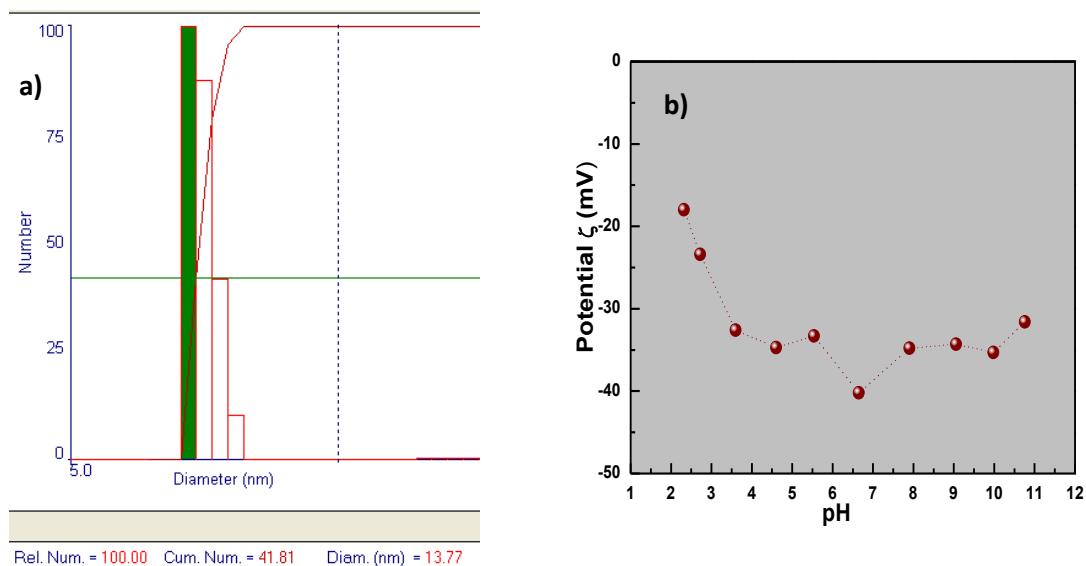


Figura 13. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) y (b) potencial zeta de NPs  $Fe_3O_4$ .

La carga superficial de las nanopartículas de  $Fe_3O_4$ -DMSA se realizó midiendo el potencial zeta en todo el rango de pH. Como se observa en la figura 13b la densidad de carga superficial de las partículas es negativa para todos los valores de pH.

En la práctica, se realizaron cuatro síntesis diferentes de nanopartículas superparamagnéticas, de cada una de las cuales es necesario saber su concentración. Ésta se determinó por espectroscopia UV/Vis y utilizando recta de calibrado que relaciona la absorbancia con la concentración: Absorbancia = 199,95. Concentración+0,0508. En la tabla 2 quedan reflejados los resultados finales de concentraciones de hierro y magnetita de cada síntesis.

	[Fe] (mg/ml)	[ $Fe_3O_4$ ] (mg/ml)
NPs_ $Fe_3O_4$ _1	$0,1795 \pm 0,0099$	$0,2481 \pm 0,014$
NPs_ $Fe_3O_4$ _2	$0,5399 \pm 0,0006$	$0,7463 \pm 0,0008$
NPs_ $Fe_3O_4$ _3	$0,7128 \pm 0,0035$	$0,9853 \pm 0,0048$
NPs_ $Fe_3O_4$ _4	$0,7542 \pm 0,0118$	$1,0427 \pm 0,0163$

Tabla 2. Concentraciones de Fe y de  $Fe_3O_4$  en mg/ml de NPs  $Fe_3O_4$ .

Las nanopartículas presentan comportamiento superparamagnético (figura 14), con una magnetización de saturación de 64 emu/g [12].

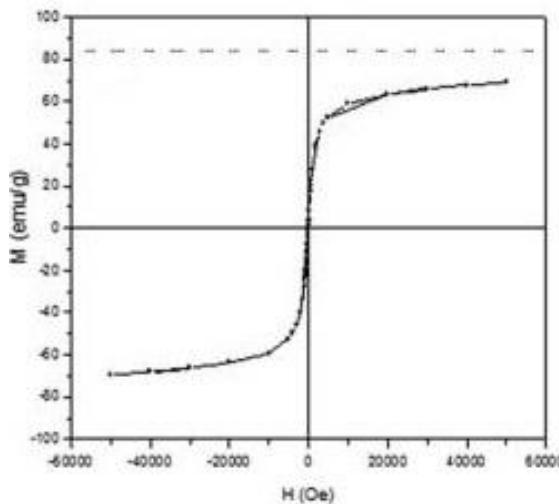


Figura 14. Magnetización de NPs  $Fe_3O_4$ . (Miguel-Sancho, N., et al.(2011))

#### 4.2.1 Agentes de Contraste

Debido a las propiedades superparamagnéticas, las nanopartículas de  $Fe_3O_4$  influyen acortando el tiempo de relajación de las moléculas de agua colindantes expuestas a un campo magnético. Este acortamiento se debe al decrecimiento en la señal y supone un contraste negativo en IRM, es decir que la zona destacada de la imagen será oscura, más oscura cuanta mayor sea la concentración de las nanopartículas. En la figura 15 se representa la inversa del tiempo  $T_2$  en la componente de ordenadas y la concentración de las diferentes muestras medidas en abscisas. El coeficiente  $r_2$  o la relajación específica es  $125 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , obtenido de la pendiente de la recta. Cuanto mayor sea la relajación específica mejor agente de contraste será el material, ya que proporcionará mayor contraste en la imagen con menor concentración de nanopartículas. En el trabajo realizado por Lee H.J., et. al. [10] la relajación específica es  $r_2=116 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , menor que en nuestro caso. Comparando con nanopartículas que se encuentran ya en el mercado, el Endorem®/Feridex® posee una  $r_2=120 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  y el Sinerem®/Combidex®,  $r_2=65 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  [14].

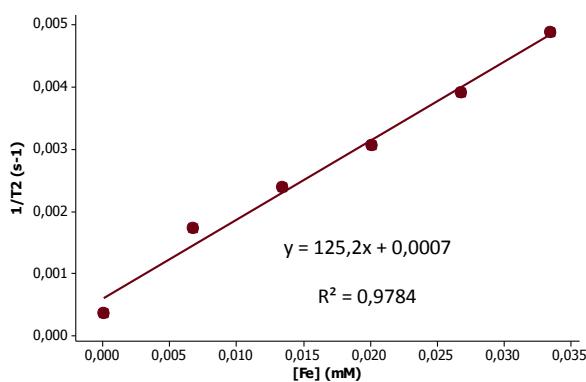


Figura 15. Relaxometría  $T_2$  de las NPs magnéticas.

#### 4.2.2 Hipertermia Magnética

Se realizó la medición sobre una solución acuosa de nanopartículas de magnetita de concentración 0,54 mg/ml de Fe, sometiéndola a un campo magnético constante (580 kHz, 300 Gauss). El resultado fue positivo, ya que se elevó su temperatura con el paso del tiempo (figura 16).

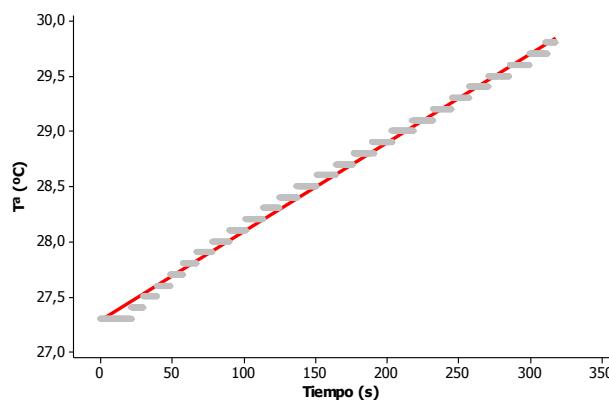


Figura 16. Hipertermia magnética de NPs magnéticas.

#### 4.3 Nanopartículas Híbridas: MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

La síntesis de las nanopartículas de sílice, que se utilizarán como soporte en la construcción de las nanoestructuras híbridas, fue previamente realizada en el grupo de acuerdo con el protocolo previamente descrito en bibliografía [13]. Tras su síntesis, las nanopartículas MCM-41 se funcionalizaron con APTES, lo que proporcionó grupos amino (NH<sub>2</sub>) en la superficie de las partículas.

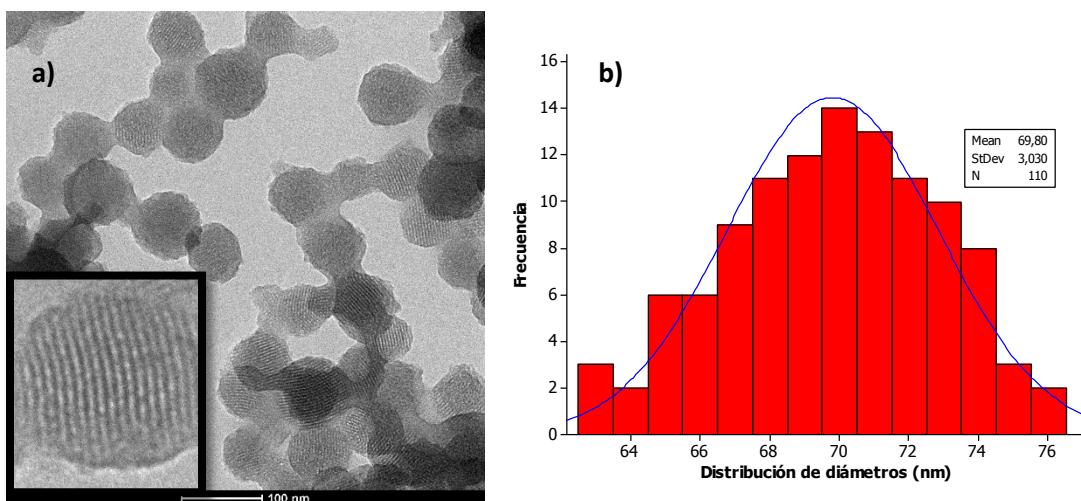


Figura 17. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs MCM-41.

De las fotos de TEM (figura 17a) cabe destacar que su morfología es aproximadamente esférica y los poros tienen forma de poliedros de base hexagonal. Su diámetro medio indicado en la figura 17b es de  $69,8 \pm 3,03$  nm.

En este caso, el diámetro hidrodinámico medio (figura 18a) es de 175,95 nm.

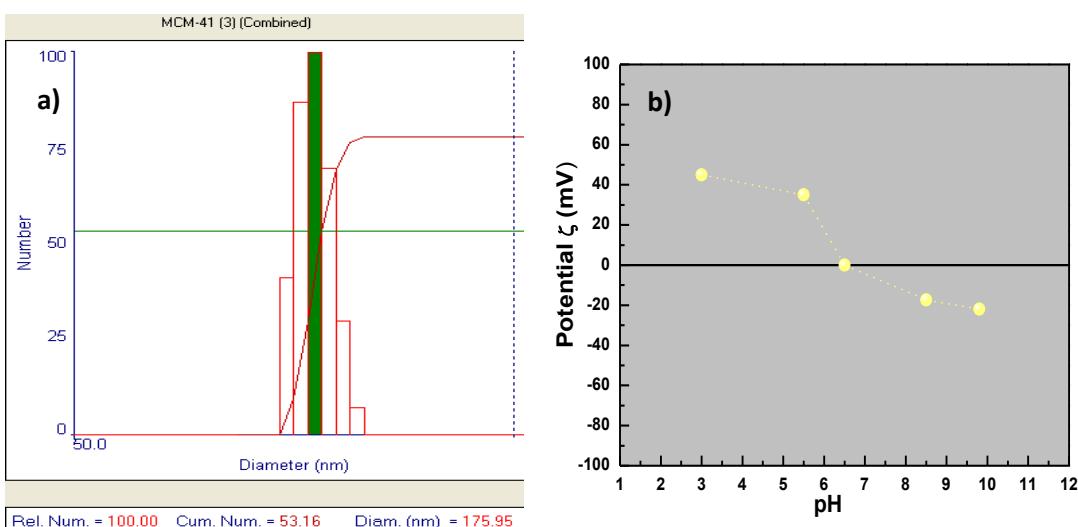


Figura 18. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) y (b) potencial zeta de NPs MCM-41.

La carga superficial de la sílice queda representada en la figura 18b. En la gráfica se contempla que dependiendo del pH su potencial zeta será negativo o positivo. El punto isoeléctrico se observa a un pH 6,2, a pH más ácidos su carga es positiva y a pH más básico es negativo. Esto se debe a que el grupo terminal amino  $-\text{NH}_2$ , a pH menor de 6,2 se encuentra protonado en forma de catión amonio  $-\text{NH}_3^+$ .

Las nanopartículas de MCM-41 están dispersas en agua con una concentración de 30 mg/ml.

La síntesis de las nanopartículas híbridas tiene lugar mediante la reacción de condensación descrita en la figura 19. Dos moléculas se combinan para dar un único producto acompañado de la liberación de una molécula de agua. La reacción tiene lugar a temperatura ambiente y en medio acuoso.

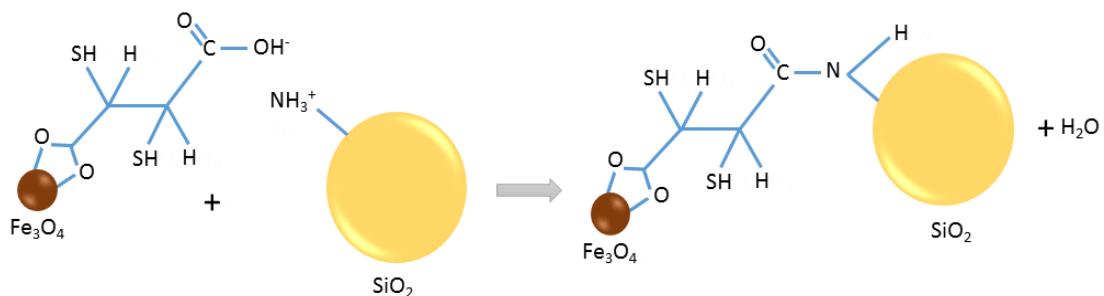


Figura 19. Síntesis de nanopartículas híbridas MCM-41@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  por reacción de condensación.

Para que tenga lugar la formación del enlace peptídico y la liberación de la molécula de agua se debe trabajar en un rango de pH determinado. En la figura 19 se representan los potenciales zeta de ambas nanopartículas, y su carga superficial a los diferentes pH. La zona resaltada entre pH 4 y pH 5,5 es el rango óptimo de pH para que el enlace covalente entre el grupo carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) de las magnéticas y el amino ( $-\text{NH}_3^+$ ) de la sílice tenga lugar satisfactoriamente. Si el pH está fuera de rango, el número nanopartículas de magnetita que recubran la superficie de la sílice se reducirá notablemente. La estabilidad de las nanopartículas

híbridas queda vigente cuando se las somete a pH extremos y las nanopartículas de magnetita siguen ancladas a la superficie de la sílice.

En la figura 20a la imagen de TEM nos indica que el anclaje de las nanopartículas magnéticas a lo largo de toda la superficie de la sílice se ha producido de manera uniforme. Al igual que se ha realizado en apartados anteriores, es necesario un análisis estadístico para obtener la distribución de diámetros de las nanopartículas. El diámetro medio calculado a partir de las micrografías de TEM es  $84,5 \pm 12$  nm (figura 20b), superior al de las nanopartículas de MCM-41 sin semillar debido al volumen extra aportado por las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ancladas.

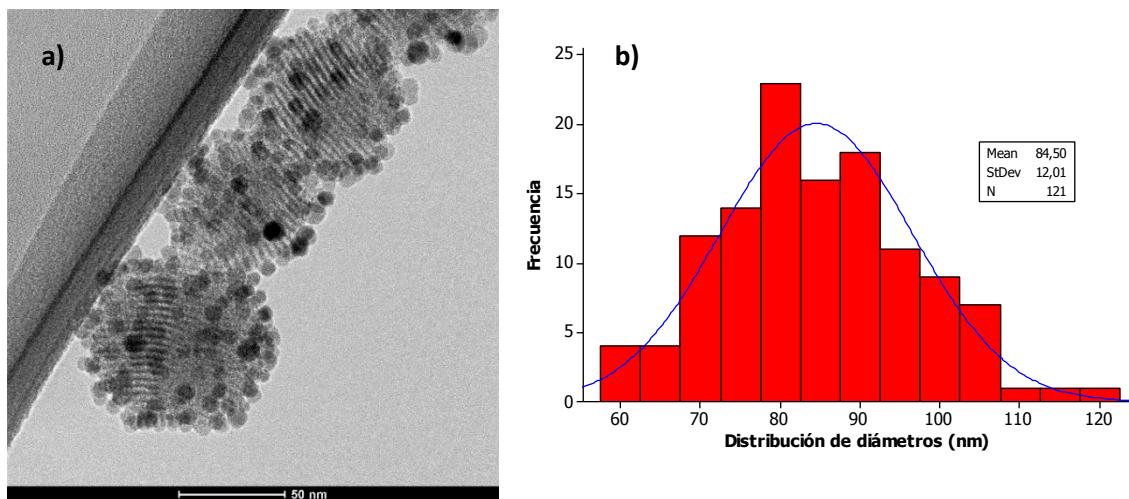


Figura 20. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs MCM-41@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

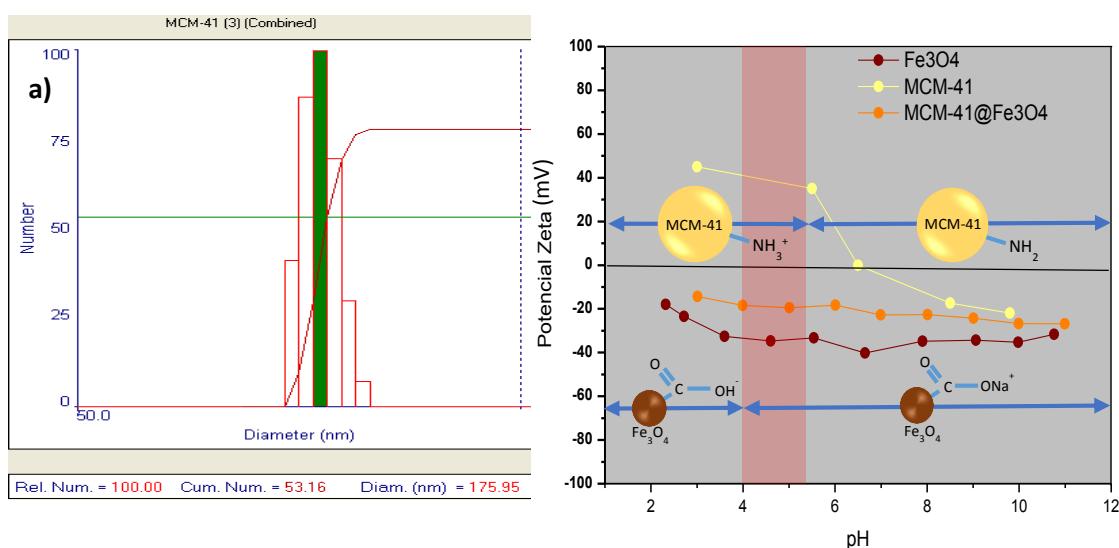


Figura 21. (a) Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs MCM-41@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y (b) potenciales zeta de NPs MCM-41@ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  y sus materiales iniciales.

El diámetro hidrodinámico medio registrado por la técnica DLS es 117 nm (figura 21a).

El potencial zeta de las nanopartículas híbridas es el representado en la figura 21b. Es negativo a cualquier pH, como cabía esperar, ya que al recubrir la sílice con la magnetita, el potencial zeta de esta última es el dominante por estar en la superficie de la nueva nanopartícula híbrida.

Se realizaron diferentes síntesis de estas nanopartículas híbridas, y en la tabla 3 se exponen algunos de los resultados obtenidos. Se miden concentraciones de hierro mediante espectroscopia UV/Vis, y a partir de ahí se calcula la de magnetita. Y por diferencia de pesada se calcula una concentración aproximada de las nanopartículas híbridas.

	[Fe] (mg/ml)	[Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] (mg/ml)	[MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] (mg/ml)
NPs_1_MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3	0,2243 ± 0,0283	0,3100 ± 0,039	-
NPs_2_MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3	0,2107 ± 0,0093	0,2913 ± 0,0128	-
NPs_3_MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3	0,4133 ± 0,0050	0,5713 ± 0,0069	-
NPs_4_MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _2	-	-	43,5
NPs_4_MCM-41@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _4	-	-	11,1

Tabla 3. Concentraciones de Fe, de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> y de semillado en mg/ml de NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

#### 4.3.1 Agentes de contraste

En la figura 22 se representa la inversa de la relajación trasversal frente a diferentes concentraciones. En este caso la relajación específica es  $215 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ , superior al de las nanopartículas magnéticas individuales ( $125 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ ), y más de tres órdenes superior al del agente de contraste comercial Sinerem®/Combidex®,  $r_2=65 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  [14].

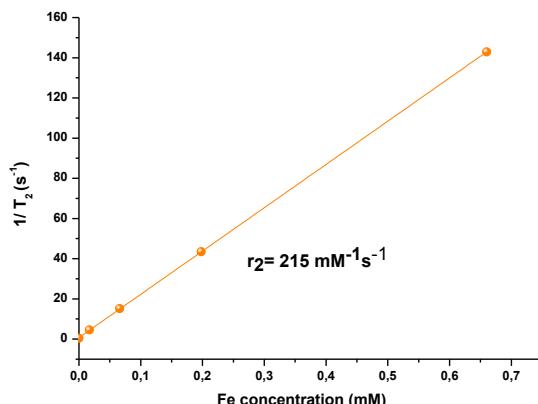


Figura 22. Relaxometría T2 de las NPs MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

#### 4.3.2 Absorción y desorción de CV

Las ventajas de utilizar estas nanopartículas híbridas para carga y liberación de moléculas orgánicas son las siguientes: el núcleo poroso de sílice es una plataforma perfecta para absorción, debido a su elevada superficie específica y la presencia de nanopartículas magnética permite la liberación molecular por calentamiento empleando un campo magnético (hipertermia magnética). Además como propiedad a destacar es que son nanoplataformas que pueden recuperarse magnéticamente con el objeto de su reutilización.

El compuesto químico utilizado para demostrar el potencial de estos nanosistemas híbridos como plataforma de carga es el cristal de violeta.

Lo primero fue estudiar la influencia del pH en el proceso de adsorción, con el objetivo de determinar el valor de pH para el cual la adsorción es máxima. Para ello y para el resto del experimento, se utilizó la siguiente recta de calibrado para relacionar absorbancia con concentración de cristal de violeta: Absorbancia = 177,23x[CV] - 0,0395.

En la figura 23 se representa la carga de CV (mol CV/g NP) frente al pH. El CV absorbido o carga de CV se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$q = \frac{([C]_{inicial} - [C]_{final}) \cdot V_{total}}{m_{nanopartículas}}$$

La carga es la diferencia de concentraciones, de la solución acuosa inicial y de la solución con las nanopartículas transcurridas un tiempo, por el volumen total de disolución y dividido por los gramos de nanopartículas híbridas utilizados en el experimento.

Se puede comprobar en la figura que la capacidad de absorción decrece significativamente a pH bajo (2-4), con una máxima absorción a pH 6,8. Esto puede ser atribuido a que la interacción electrostática entre las cargas superficiales de las nanopartículas y del cristal de violeta es máxima a este pH, ya que como se puede ver en la figura 13b, el potencial z más negativo de las nanopartículas magnéticas se alcanza alrededor en pH 6,8. A pH ácidos la adsorción de CV es menor porque hay una competencia por coordinarse la sílice entre las moléculas de tinte y los protones del medio. A pH básicos mayores a pH 8, las moléculas de cristal de violeta se descomponen.

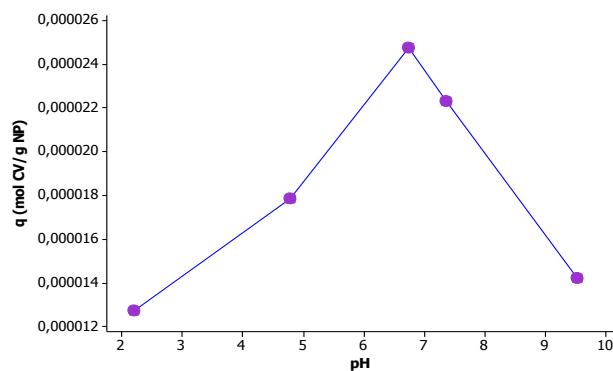


Figura 23. Estudio de absorción de CV a diferentes pHs.

Una vez conocido el valor de pH óptimo para la carga se ha estudiado la cinética de adsorción. Los resultados de estos estudios revelan la velocidad a la que son cargadas las moléculas orgánicas, lo cual es muy útil para la selección de material adsorbente [16].

En la figura 24a se representa la evolución de la carga de CV con el tiempo (18 h) a temperatura ambiente y pH 6,8. Se observa que en la absorción es mucho más acusada tiempos cortos, como cabe esperar debido al proceso de difusión. Conforme va transcurriendo el tiempo el gradiente es menor y absorbe más lentamente, hasta que llega un momento en el que hay equilibrio en la muestra y la absorción prácticamente se estabiliza. Esto ocurre aproximadamente a las 4 horas.

Del análisis de los datos cinéticos se representa  $t/q_t$  frente al tiempo (figura 24b), resultando una línea recta con un alto coeficiente de correlación ( $R^2>0,99$ ), con lo que se puede afirmar que la cinética de adsorción de CV en las nanopartículas híbridas es de segundo orden [17]. Comportamientos similares de materiales mesoporosos han sido publicados anteriormente [15].

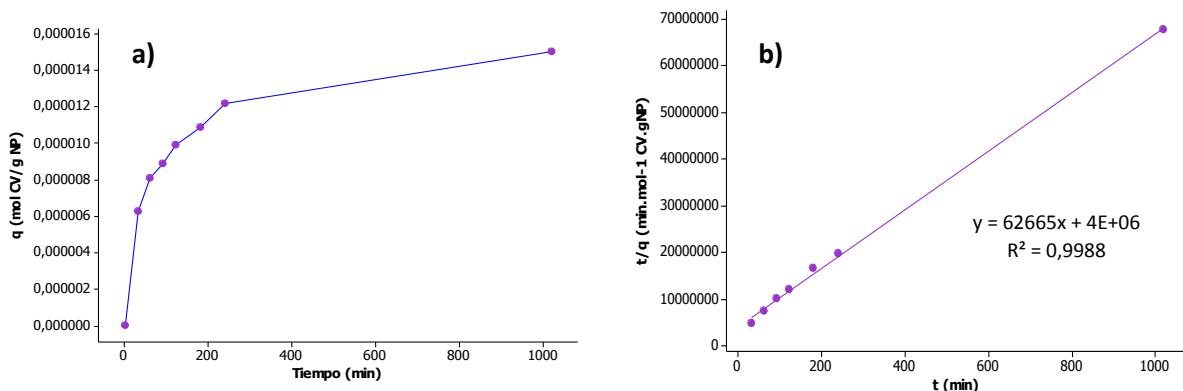


Figura 24. (a) Evolución temporal de adsorción y (b) cinética de segundo orden.

La capacidad de adsorción de equilibrio teórica obtenida de la pendiente de la recta es  $1,59 \times 10^{-5}$  mol/g, la cual concuerda con el valor experimental ( $1,5 \times 10^{-5}$  mol/g). La velocidad constante de reacción es  $976.5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ . Estos parámetros son comparables con otros reportados en artículos bibliográficos de adsorción de tintes orgánicos en disoluciones acuosas utilizando materiales mesoporosos [15, 18]. Y la conclusión es que las nanopartículas híbridas muestran una buena capacidad de adsorción del cristal de violeta en medio acuoso.

Por problemas técnicos del equipo sólo se ha podido realizar un ensayo de desorción por hipertermia. Un mililitro de disolución que contenía 1 mg de nanopartículas cargadas fue sometido a un campo magnético externo durante 30 minutos (inicialmente la concentración de CV en disolución es despreciable), transcurrido este tiempo se midió la concentración de CV en disolución y se observó una liberación del 20 %, mientras que la cantidad liberada por difusión natural al cabo de 12 horas es despreciable.

#### 4.4 Nanopartículas Core-Shell $\text{SiO}_2@\text{Fe}_x\text{O}_y$ .

Para la síntesis de estas nanopartículas son necesarios varias etapas. La primera sería la síntesis de nanopartículas híbridas  $\text{SiO}_2@\text{Fe}_3\text{O}_4$ . La segunda, realizar el crecimiento y conseguir la nanoestructura core-shell. Y por último eliminar el soporte y obtener las nanopartículas huecas.

La sílice densa ya estaba previamente sintetizada [12]. De su caracterización resaltar que las nanopartículas tienen forma esférica como se aprecia en la micrografía de TEM (figura 25a), su diámetro medio es  $137 \pm 7,636$  nm (figura 25b) y su radio hidrodinámico es 186,51 nm (figura 26).

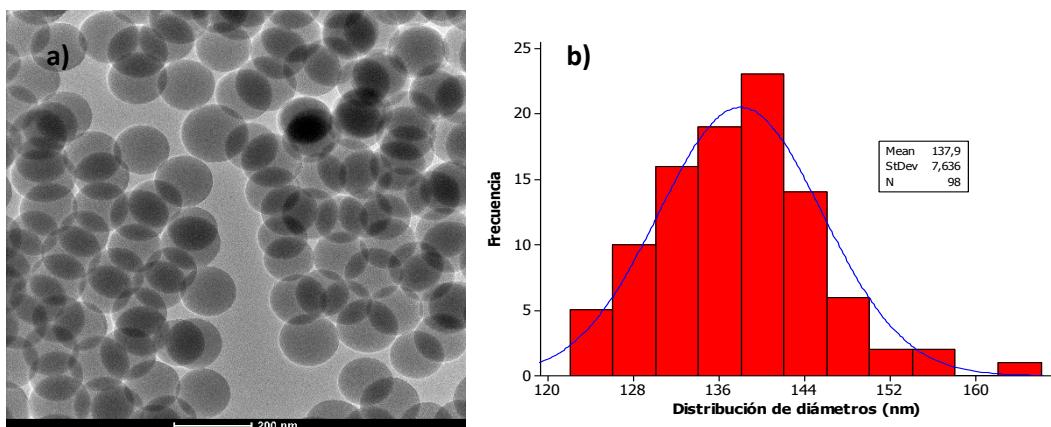


Figura 25. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs  $SiO_2$ .

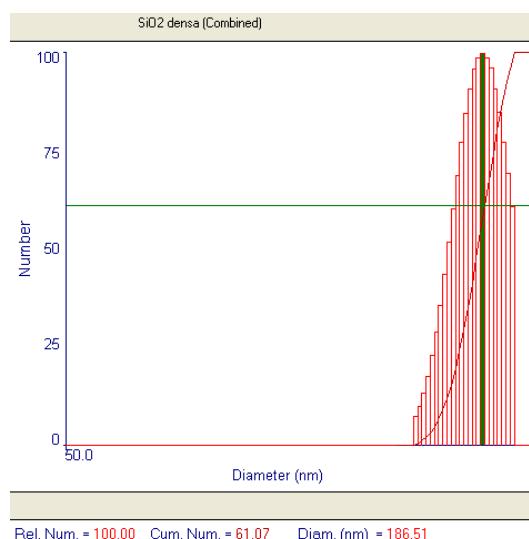


Figura 26. Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs  $SiO_2$  densa.

La síntesis y funcionalización de las nanopartículas  $SiO_2@Fe_3O_4$  es análoga al caso de las nanopartículas MCM-41@ $Fe_3O_4$ , descrito en el apartado 4.3 de este mismo proyecto.

En la figura 27a se observa la micrografía de TEM de estas nanopartículas híbridas, perfectamente dispersas y uniformemente semilladas. El diámetro medio calculado a partir de estas imágenes es  $157,9 \pm 11,88$  nm (figura 27b) y su radio hidrodinámico medio es de 439 nm (figura 28).

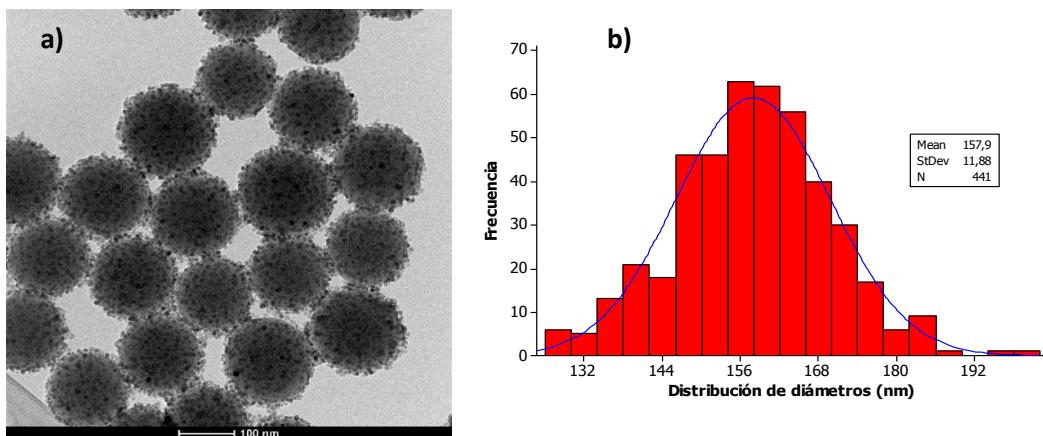


Figura 27. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs  $SiO_2@Fe_3O_4$ .

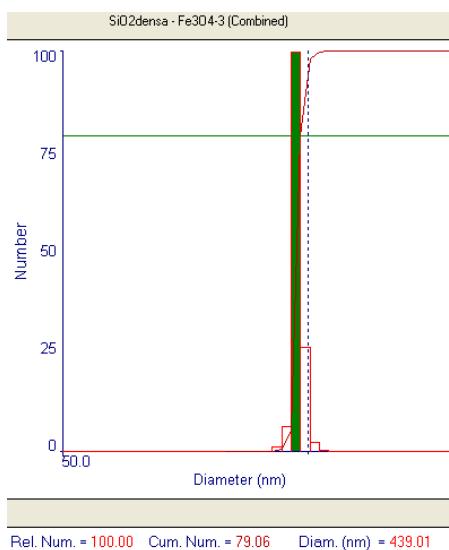


Figura 28. Distribución de diámetros hidrodinámicos (nm) NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

La última prueba realizada fue la medición de la concentración de hierro en la muestra por espectroscopia UV/Vis, necesaria para el siguiente procedimiento (tabla 4).

	[Fe] (mg/ml)	[Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ] (mg/ml)
NPs_SiO <sub>2</sub> @Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> _3	0,2243 ± 0,0283	0,3100 ± 0,039

Tabla 4. Concentraciones de Fe y de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en mg/ml de NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

No se realizaron más ensayos de caracterización, ya que es una etapa intermedia para conseguir las nanopartículas huecas, y con estos datos fue más que suficiente para corroborar que las nanopartículas se encuentran en perfecto estado y para emprender la segunda etapa de síntesis.

La síntesis de las nanopartículas core-shell tiene lugar mediante la reacción descrita en la figura 29.

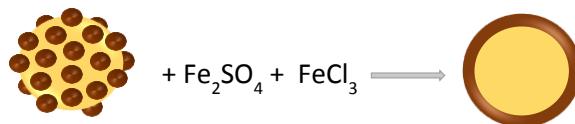


Figura 29. Síntesis de NP score-shell.

Los reactivos Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub> se descomponen y aportan iones de Fe<sup>2+</sup> y Fe<sup>3+</sup>, respectivamente, que se depositan sobre la superficie de las nanopartículas semilladas. Estos iones junto a las nanopartículas magnéticas producen un crecimiento de una capa alrededor de la sílice. Debido a que el crecimiento se produce a temperaturas no muy elevadas (85°C), la capa formada será poco cristalina, y por lo tanto poco magnética.

En la micrografía de TEM de la figura 30a se observa el crecimiento amorfo del shell. Todas las nanopartículas han sufrido crecimiento y la muestra está dispersa. Haciendo el análisis estadístico pertinente, el diámetro medio de la muestra es de 160 ± 10,08 nm (figura 30b).

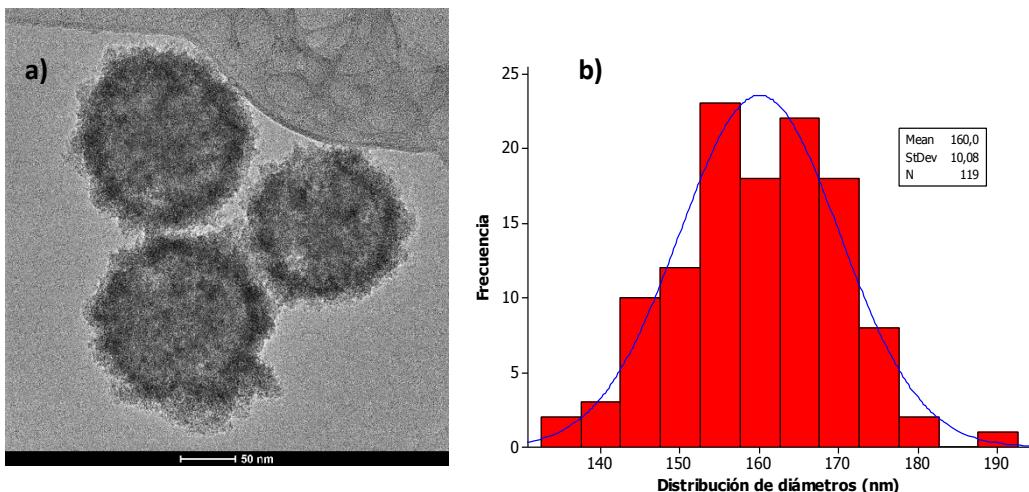


Figura 30. (a) Imagen TEM y (b) distribución de tamaños de diámetro (nm) de las NPs SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

El trabajo realizado en el laboratorio ha llegado hasta este punto, dejando como posibilidades de futuro: completar la caracterización con radio hidrodinámico y potencial zeta y conseguir un comportamiento magnético óptimo realizando procesos de recristalización en disolventes de alto punto de ebullición, además de ser el punto de partida para la síntesis de la nanoparticulas huecas, que se obtendrían por disolución del núcleo interno de sílice.

## 5 CONCLUSIONES

Las nanopartículas magnéticas se sintetizan a partir de un procedimiento sencillo y en disolución acuosa. Gracias a los resultados positivos tanto del ensayo de relaxometría, y a sus propiedades superparamagnéticas se puede afirmar su validez como futuro agente de contraste.

Se ha desarrollado un método fácil y versátil para la síntesis en medio acuoso de nanopartículas híbridas MCM-41@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a través de la formación de un enlace peptídico entre los dos componentes. La nanopartículas que se obtienen directamente ya están estabilizadas en agua, lo cual es de vital importancia para su posterior aplicación en biomedicina. Se ha probado también su validez como agente de contraste, mejorando su relajación específica respecto a las nanopartículas magnéticas iniciales. La adsorción de cristal de violeta ha demostrado la capacidad de las nanopartículas híbridas como sistemas de carga de moléculas, lo que abre un amplio abanico de posibilidades para su utilización, por ejemplo, en la carga y liberación controlada de fármacos o sistemas de purificación de agua como adsorbente. Además podrían cargarse con nanopartículas metálicas de tamaño inferior al poro para su utilización en catálisis como catalizadores recuperables magnéticamente.

En la primera etapa hacia las nanopartículas huecas, se ha sintetizado estructuras core-shell SiO<sub>2</sub>@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. La futura línea de trabajo que se deja abierta sería conseguir nanopartículas huecas con buena respuesta magnética que pudieran cargarse con moléculas orgánicas para su liberación por hipertermia. Así como la utilización de estas nanopartículas huecas como nanovectores para producir a escala atómica reacciones que necesiten de una activación, que en este caso se conseguiría debido a la propiedad de hipertermia magnética.

## 6 BIBLIOGRAFÍA

1. Abe, M., *Ferrite plating: a chemical method preparing oxide magnetic films at 24–100°C, and its applications*. *Electrochimica Acta*, 2000. **45**: p. 3337–3343.
2. Ramesh, S., et al., *Ultrasound Driven Deposition and Reactivity of Nanophasic Amorphous Iron Clusters with Surface Silanols of Submicrospherical Silica*. *Chemistry of Materials*, 1997. **9**(12): p. 2996-3004.
3. Ramesh, S., et al., *Reaction pathways at the iron–microspherical silica interface: Mechanistic aspects of the formation of target iron oxide phases*. *Journal of Materials Research*, 2000. **5**(4): p. 944-950.
4. Caruso, F., et al., *Magnetic Nanocomposite Particles and Hollow Spheres Constructed by a Sequential Layering Approach*. *Chemistry of Materials*, 2001. **13**: p. 109-116.
5. Zhu, Y., et al., *Preparation and characterization of core-shell monodispersed magnetic silica microspheres*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2003. **231**(1-3): p. 123-129.
6. Stoeva, S.I., et al., *Three-Layer Composite Magnetic Nanoparticle Probes for DNA*. *Journal of American Chemical Society*, 2005. **127**: p. 15362-15363.
7. Kim, J., et al., *Generalized fabrication of multifunctional nanoparticle assemblies on silica spheres*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(29): p. 4789-93.
8. Kim, J., et al., *Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2006. **45**(46): p. 7754-8.
9. Lee, J.E., et al., *Uniform Mesoporous Dye-Doped Silica Nanoparticles Decorated with Multiple Magnetite Nanocrystals for Simultaneous Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Fluorescence Imaging, and Drug Delivery*. *Journal of American Chemical Society*, 2010. **132**: p. 552–557.
10. Lee, J.-H., et al., *Dual-Mode Nanoparticle Probes for High-Performance Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging of Neuroblastoma*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2006. **45**: p. 8160-8162.
11. Huh, Y.-N., et al., *Hybrid Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging of Target-Specific Viral Gene Delivery*. *Advanced Materials*, 2007(19): p. 3109-3112.
12. Stober, W., et al., *Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1968. **26**: p. 62-69.
13. Zeng, W., et al., *Organic modified mesoporous MCM-41 through solvothermal process as drug delivery system*. *Materials Research Bulletin*, 2005. **40**(5): p. 766-772.
14. Corot, C., et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**: p. 1471-1504.
15. Monash, P. and G. Pugazhenthi, *Adsorption of crystal violet dye from aqueous solution using mesoporous materials synthesized at room temperature*. *Adsorption*, 2009. **15**(4): p. 390-405.
16. Liu, Y., et al., *Selective adsorption of uranyl ion on ion-imprinted chitosan/PVA cross-linked hydrogel*. *Hydrometallurgy*, 2010. **104**(2): p. 150-155.
17. Dai, J., et al., *Phosphate adsorption from aqueous solutions by disused adsorbents: Chitosan hydrogel beads after the removal of copper(II)*. *Chemical Engineering Journal*, 2011. **166**(3): p. 970-977.
18. Wang, S. and Li H., *Structure directed reversible adsorption of organic dye on mesoporous silica in aqueous solution*. *Microporous and Mesoporous Materials*, 2006. **97**((1-3)): p. 21-26.

## 7 ANEXO: Prácticas del Trabajo Fin de Máster

Las prácticas del Trabajo Fin de Master las realicé en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Miguel Servet de Zaragoza bajo la tutela de la Dra. Vanesa Andrés. En ella pude observar y participar en un ensayo clínico sobre fibroblastos de nuevos fármacos para una enfermedad rara, la enfermedad de Gaucher.

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad rara de herencia autosómica recesiva, debida a la acumulación de glucocerebrósido en el interior de las células por déficit de la enzima glucocerebrosidasa. Esta enfermedad afecta principalmente a médula ósea, hígado y bazo. Existen tres tipos de presentación de la enfermedad: tipo I, tipo II y tipo III. El tipo I no afecta al sistema nervioso central, al contrario que las otras dos, con las que se puede sufrir neuropatía aguda (II) o crónica (III).

Para el ensayo clínico se utilizan fibroblastos extraídos de la zona de la escápula del paciente mediante una biopsia de piel. Se realizan cultivos de estas células para que crezcan y tener más muestra con la que trabajar. Los fibroblastos son células adherentes, y como su nombre indica se quedarán adheridas a las placas de Petri. Cuando el cultivo ha finalizado se realizarán lavados con PBS y las células serán levantadas con tripsina. La suspensión celular se someterá a centrifugación (5000g 10 min) para separar las células de la tripsina, se elimina el sobrenadante y se agrega medio de cultivo. Se redispersa agitando cuidadosamente y se realiza el conteo celular con un Scepter para conocer la concentración de células. Para el ensayo van a ser necesarias 24 placas de Petri, en las cuales se depositarán 2 ml de medio y el volumen de suspensión celular adecuado para que aproximadamente se siembren 20.000 células. Se dejará 1 día en la estufa a 37°C para que las células se adhieran de nuevo. El segundo día se añadirán en placas diferentes:

- Dos fármacos nuevos a diferentes concentraciones: fármaco 1 (25µM) y fármaco 2 (5µM y 10µM).
- Un fármaco actual (ABX) a concentraciones 5, 10, 25, y 50µM
- Un control del disolvente en el que está el fármaco (DMSO) ya que es tóxico.

Hasta el momento se necesitaría 8 placas, pero es necesario realizar 3 réplicas para asegurarse de que el ensayo es fiable. De nuevo se meten las muestras en la estufa bajo las mismas condiciones.

Trascorridos 3 días, se procederá a realizar lavados y se añadirá de nuevo fármaco. Y al cabo de 3 días más incubando en la estufa, se recogen las células, volviéndolas a levantar, en este caso con PBS frío y un scrapper. Se somete a centrifugación (5000g 10 min), se elimina el sobrenadante y se resuspende la muestra en una medio de cultivo con antibióticos y antifúngicos para que se conserve hasta el estudio de las células.