

Trabajo Fin de Grado

Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas

Autora

Sandra Almudena Guiral Foz

Director

Raluca Maria Fratila
Jesús Martínez de la Fuente

Facultad de Ciencias
2015

HOJA DE PRESENTACION

Dña. RALUCA MARIA FRATILA, Investigadora ARAID en el Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza y Dn. JESÚS MARTINEZ DE LA FUENTE, Científico Titular en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (CSIC-Unizar)

INFORMAN:

Que SANDRA ALMUDENA GUIRAL FOZ ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título "*Nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas*" y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, 2015-06-18

Firmado:



Director

Raluca Maria Fratila

Director



Jesús Martínez de la Fuente

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	7
4. OBJETIVOS.....	8
5. MATERIAL Y MÉTODOS	
5.1 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	9
5.2 TRANSFERENCIA A AGUA DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	10
5.3 FUNCIONALIZACIÓN.....	11
5.4 CARACTERIZACIÓN	
5.4.1 DETERMINACIÓN DE HIERRO.....	12
5.4.2 ELECTROFORESIS.....	12
5.4.3 DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING).....	12
5.4.4 POTENCIAL Z.....	13
5.4.5 TEM (MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN).....	13
5.4.6 SAR (SPECIFIC ABSORPTION RATE).....	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN.....	14
6.2 FUNCIONALIZACIÓN.....	19
7. CONCLUSIONES.....	24

1. RESUMEN

En este trabajo se ha abordado la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas con ácidos nucleicos en vista de su aplicación en liberación controlada de fármacos. Las MNPs fueron sintetizadas por descomposición térmica de un precursor organometálico de Fe(III) consiguiéndose un buen control del tamaño y de la morfología de las mismas. Su transferencia a fase acuosa se llevó a cabo usando un polímero anfifílico que genera grupos carboxilo para su posterior funcionalización con ácidos nucleicos. Se utilizaron distintas proporciones de ADN y PNA (ácido péptidonucleico) para establecer el protocolo óptimo de funcionalización.

Los resultados obtenidos indican que efectivamente, usando este procedimiento se puede controlar la cantidad de ADN/PNA que se une covalentemente a las MNPs, lo que es de importancia vital para diseñar futuras aplicaciones en el campo de la biomedicina.

ABSTRACT

This work deals with the synthesis and characterization of magnetic nanoparticles (MNPs) functionalized with nucleic acids magnetic hyperthermia-mediated drug delivery applications. The MNPs were synthesized by thermal decomposition of an organometallic Fe(III) precursor. This method provides good control over the size and the morphology of the obtained nanoparticles. The transfer of the organic MNPs to water was achieved using an amphiphilic polymer that generates carboxylic groups for their posterior functionalization with nucleic acids. Different ratios of ADN and PNA (peptide nucleic acid) were used in order to establish the optimal functionalization protocol.

The results obtained indicated that using this protocol it was possible to control the amount of ADN/PNA covalently attached to the MNPs which is very important for design future applications in the field of biomedicine.

2. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología se define como el estudio y la manipulación de materiales en la escala nanométrica.¹

Se trata de un campo que está en auge y está experimentando un gran desarrollo en los últimos años porque se están encontrando numerosas aplicaciones en sectores muy diferentes: medio ambiente², energético³, médico⁴, textil⁵, construcción⁶, etc. Algunos ejemplos de estas aplicaciones son tan dispares como desde la encapsulación de insecticidas botánicos⁷ a sistemas de transporte para vacunas⁴.

Se pueden encontrar diferentes tipos de nanopartículas. Las más investigadas debido a sus numerosas aplicaciones son los quantum dots, las nanopartículas de oro y las nanopartículas magnéticas.

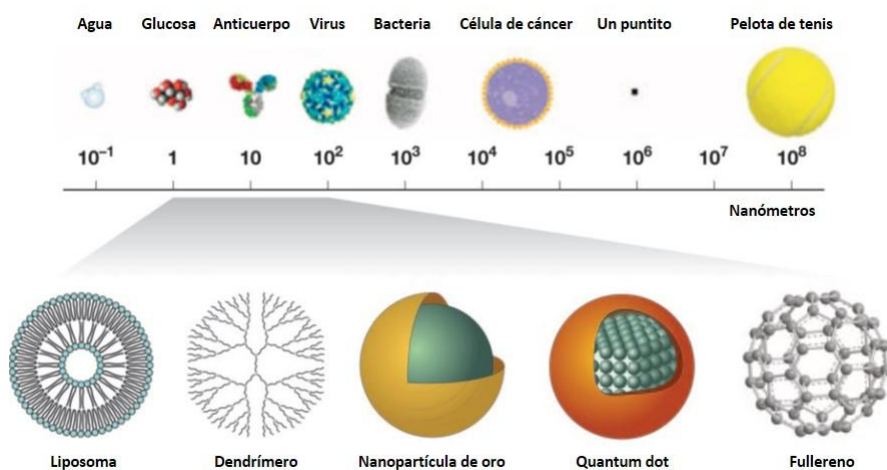


Ilustración 1. Escala en la que se ve el tamaño de las nanopartículas
(<http://www.justoginer.com>)

De todos los tipos de nanopartículas que existen, cabe destacar a los quantum dots que son nanocristales hechos de un material semiconductor y que dependiendo de su tamaño emiten un color de luz diferente. Sus principales aplicaciones están dirigidas a LEDs o como agentes de imagen clínica.⁸

También han sido muy investigadas por su importancia las nanopartículas de oro, especialmente en el campo de la biomedicina, ya que generalmente presentan baja citotoxicidad y se pueden obtener en gran cantidad con diferentes tamaños y morfologías. Además en la actualidad existen procesos de síntesis muy sencillos de llevar a cabo e incluso pueden realizarse de manera divulgativa.⁹

Las nanopartículas magnéticas (MNPs, por sus siglas en inglés) tienen propiedades únicas frente a otros nanomateriales; por ejemplo, por el hecho de poder ser manipuladas por un campo magnético externo. Las MNPs de óxido de hierro gozan de especial popularidad debido a su biocompatibilidad y han encontrado varias aplicaciones en el campo de la biomedicina, por ejemplo como agente de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI), hipertermia magnética (un tipo de tratamiento del cáncer basado en la capacidad de las NPs magnéticas de generar calor cuando se les aplica un campo magnético externo y la alta sensibilidad de las células tumorales al calor) o administración y/o liberación de fármacos de forma dirigida.^{1, 10}

Cabe destacar que es necesario realizar un protocolo de funcionalización de estas MNPs para que sean estables en medio fisiológico y para que puedan llevar a cabo la función para la cual han sido diseñadas.^{1, 10}

3. ANTECEDENTES

Se han estandarizado diferentes métodos para llevar a cabo la síntesis de las nanopartículas magnéticas de manera eficaz. Los dos más importantes son la coprecipitación y la descomposición térmica. A pesar de que el procedimiento de la descomposición térmica es más laborioso las nanopartículas que se obtienen son esféricas, monodispersas y de tamaño controlado.^{10,11,12,13}

Mediante el método de descomposición térmica del acetilacetonato de hierro ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) en presencia de ácido oleico y oleilamina se obtienen generalmente nanopartículas magnéticas formadas por un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) recubierto de moléculas de ácido oleico y oleilamina. Estos surfactantes se disponen de manera que el grupo carboxilo y amino, respectivamente, están en contacto con la superficie de la esfera de óxido de hierro. El extremo opuesto de estas moléculas, compuesto por cadenas alifáticas, queda en contacto con el exterior, lo que hace que estas nanopartículas sean solubles en disolventes orgánicos, pero no en disolventes polares.^{10,11,12,14}

Para que las nanopartículas puedan ser utilizadas para aplicaciones biomédicas es necesario que sean solubles y estables en disolventes acuosos y medios fisiológicos. Uno de los métodos más utilizados para transferir a agua nanopartículas sintetizadas en medio orgánico se basa en el uso de polímeros anfifílicos, como por ejemplo el PMAO (poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)).¹⁴

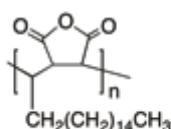


Ilustración 2. Estructura del PMAO. (ChemDraw)

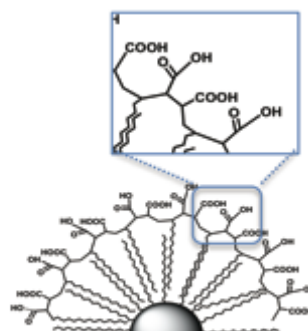


Ilustración 3. Resultado de la superficie de la nanopartícula cuando es soluble en agua. (ChemDraw)

Este polímero tiene tantos grupos hidrofílicos (anhídridos) como grupos hidrofóbicos (cadenas alifáticas). Las cadenas hidrofóbicas se pueden intercalar con las cadenas del ácido oleico que presentan en la superficie las nanopartículas dejando los grupos

polares hacia el exterior de manera que la nanopartícula pasará a ser soluble en agua (ilustración 3).

Para lograr el anclaje de un fármaco a la superficie de las nanopartículas éstas se van a funcionalizar con ácidos nucleicos. La superficie de la nanopartícula está funcionalizada con grupos carboxílicos, para facilitar su unión con el ADN vamos a disponer de una hebra con el extremo 5' modificado con un grupo amino.

Una vez se ha unido la primera hebra de ADN, se hará reaccionar con una segunda hebra que es complementaria y que en el extremo que queda libre lleva anclado el fármaco. De la misma manera además se pueden incorporar péptidos de internalización celular, marcadores tumorales y/o marcadores fluorescentes para poder estudiar la internalización y biodistribución de las MNPs.¹⁰

La estructura de la nanopartícula de esta manera facilita que al aplicar un campo magnético, la nanopartícula genere calor lo que provoca la desnaturalización del ADN. Cuando las dos hebras se separan, la segunda hebra que lleva anclado el fármaco queda libre podrá ejercer su efecto.

En este TFG se abordará la síntesis y funcionalización de MNPs para su aplicación en liberación controlada de fármacos mediante hipertermia magnética. Una de las posibles aplicaciones de esta técnica sería como tratamiento del cáncer, en cuyo caso las MNPs deben incorporar también un marcador celular selectivo de las células cancerosas.

Con el ánimo de optimizar la unión de las hebras de ADN a las MNPs se va a llevar un estudio utilizando distintas proporciones de ADN y PNA (ácido peptidonucleico): 100/0; 75/25; 50/50 y 25:75. La principal ventaja de usar el PNA es que tiene grupos amida en vez de grupos fosfato en su estructura de forma que no tiene carga negativa. Dado que la superficie de las MNPs tiene carga negativa por los grupos carboxilo, usando el PNA se disminuye esta repulsión electroestática.¹⁴

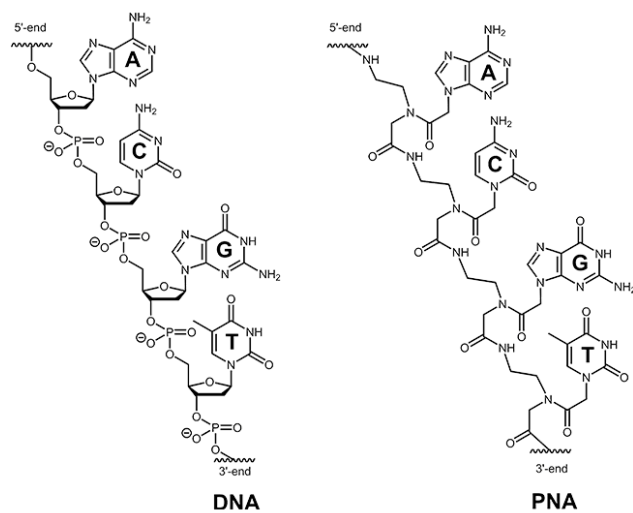


Ilustración 4. Esquema comparativo de las estructuras del ADN y del PNA.
<http://www.biomers.net>

4. OBJETIVOS

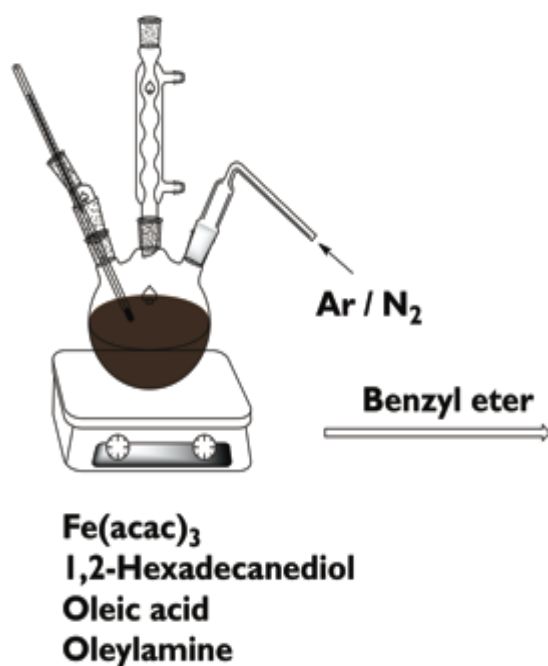
- ❖ La síntesis de MNPs monodispersas, esféricas y con un diámetro de 11 nm aproximadamente. Estas MNPs también deben tener unas propiedades magnéticas adecuadas para su posterior aplicación.
- ❖ Transferencia a agua de las MNPs usando el polímero anfifílico PMAO.
- ❖ Funcionalización con ácidos nucleicos usando diferentes proporciones de ADN y PNA y cuantificación de esta unión gracias a un fluoróforo (FAM), que está unido en el extremo libre de la segunda hebra de ADN.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos usados son de la casa comercial *Sigma-Aldrich* excepto la agarosa (*Lonza*), la disolución de hierro (*Acros Organics*) y los ácidos nucleicos (*Nanoimmunotech*).

5.1 SÍNTESIS NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas usadas a lo largo de este proyecto se obtuvieron en dos pasos. En primer lugar se sintetizaron las semillas de 6 nm y luego se llevó a cabo una etapa de recrecimiento en la que se obtuvieron nanopartículas de 11 nm.



Los reactivos necesarios fueron Fe(acac)₃ 0,71 g (2,01 mmol), 1-2 hexanodecanodiol 2,58 g (9,98 mmol), ácido oleico 2 ml (5,65 mmol), oleilamina 2 ml (4,22 mmol), éter bencílico (40ml).^{11,12}

Tras mezclar todos los reactivos y aplicar tres ciclos de vacío-argón, la mezcla de reacción se calentó de manera controlada utilizando un controlador de temperatura con las siguientes etapas:^{11,12}

Ilustración 5. Imagen que muestra como es el montaje del sistema de síntesis de MNPs por descomposición térmica.

- Calentamiento de temperatura ambiente (25-27 °C) a 200 °C a una velocidad de 180 °C/hora
- Mantenimiento a 200 °C durante 2 horas
- Calentamiento de 200 °C a 305 °C a una velocidad de 10 °C/minuto
- Mantenimiento a 305 °C durante 2 horas

Con el objetivo de eliminar los posibles restos de reactivos que pueden haber quedado sin reaccionar o especies derivadas del hierro que se hayan podido formar se llevan a cabo 3 lavados con etanol. Es un agente desestabilizante de las nanopartículas que provoca su agregación, lo que las hace fácilmente separables con la ayuda de un imán. Después de cada lavado con etanol las nanopartículas se resuspenden en hexano.

Tras el último lavado se resuspenden en una mezcla de hexano, ácido oleico y oleilamina (en proporción 90:5:5) para evitar que se deteriore la capa orgánica.

Para la etapa de recrecimiento de nanopartículas de 11 nm se mezclaron 40 mg de semillas disueltas en hexano con $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (4,02 mmol), 1-2 hexanodecanodiol (19,97 mmol), ácido oleico (1ml, 3,12 mmol), oleilamina (1ml, 4,22 mmol), éter bencílico (40 ml).^{11,12}

La mezcla de reacción se calentó utilizando el siguiente programa de temperatura:^{11,12}

- Calentamiento de temperatura ambiente (25-27 °C) a 100 °C a una velocidad de 180°C/hora.
- Mantenimiento a 100 °C durante 30 minutos
- Calentamiento de 100 °C a 200 °C a una velocidad de 3 °C/minuto
- Mantenimiento a 200 °C durante 1 hora
- Calentamiento de 200 °C a 305 °C en 15 minutos
- Mantenimiento a 305 °C durante 1 hora

Una vez concluida la etapa de recrecimiento se realizan tres lavados con etanol y hexano. Cuando se han terminado estos tres lavados las nanopartículas se resuspenden en la mezcla de hexano, ácido oleico y oleilamina (90:5:5).

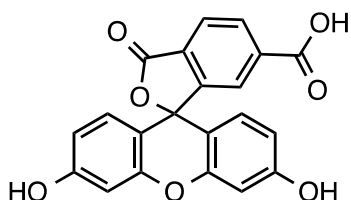
5.2 TRANSFERENCIA A AGUA DE LAS NANOPARTÍCULAS

Se disuelven 224 mg de PMAO (poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene)) en 200 ml de cloroformo. Cuando está perfectamente disuelto se añaden 20 mg de nanopartículas en el sonicador y se deja reaccionar la mezcla en este aparato durante 15 minutos para optimizar la unión del polímero (PMAO) a las cadenas alifáticas del ácido oleico.¹⁰

A continuación, usando el rotavapor, se evapora todo el cloroformo de la mezcla menos 5 ml a 40 °C y con vacío. Luego se añaden 10 ml H_2O y 10 ml NaOH (0,1 N) y se agita a 70 °C en el rotavapor.

Para eliminar el exceso de polímero se realizan 3 lavados a 24000 rpm, 18 °C y durante 2 horas.

5.3 FUNCIONALIZACIÓN



La secuencia de la hebra de ADN que se va a unir a la MNP es 5'-cagtcgccaagct-3', la del PNA es acccagtcgccaagc y la de la segunda hebra de ADN es 5'FAM-agcttggcgactg-3'.

Ilustración 6. Estructura del fluoróforo (FAM o 6-carboxifluoresceína) unido a la segunda hebra de ADN.

Paso 1- Funcionalización

Se preparan dos disoluciones, 150 μ l de EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (2,9 mg, 100 mM) en MES (pH 6,5, 50 mM) y 225 μ l de S-NHS (S-N-hidroxisuccinimida) (4,9 mg, 100 mM) en MES (pH 6,5, 100 mM).

Se juntan estas dos disoluciones y se agitan 10 minutos a temperatura ambiente.

Se añaden 2 μ l de SDS (dodecilsulfato sódico) (10%), 0,33 mg de MNPs y tanto volumen de MES (pH 6,5, 50 mM) como sea necesario para llegar a un volumen final de 1210 μ l.¹⁰

Se agita la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente y a continuación se sonica durante 30 segundos. Se adicionan 40 μ l de ADN/PNA (2000 pmol), se lleva al sonicador 30 segundos y se deja agitando durante 16 horas.

Se centrifuga a 13400 rpm y a 4 °C durante 30 minutos y se descartan 1,150 ml del sobrenadante. Se añade 1 ml de MES y se sonica hasta que se aprecie la re-dispersión de las MNPs. A continuación se centrifuga a 13400 rpm y a 4 °C durante 30 minutos y se elimina 1 ml de sobrenadante. Se repite el proceso desde la adición de 1 ml de MES dos veces más igual, excepto en el último lavado que no se añade 1 ml de MES.

Paso 2- Hibridación

Para hibridar las MNPs con la segunda hebra de ADN se añaden 16 μl de MNPs resultantes de los lavados anteriores, 4 μl de la segunda hebra de ADN (100 μM , 400 pmol) y 380 μl de 1xPBS. Se deja reaccionar 1 hora sin agitación.

A continuación se centrifuga a 13400 rpm y a 20 °C durante 20 minutos. Se descartan 320 μl del sobrenadante y se adicionan 800 μl de 1xPBS. Se vuelve a centrifugar a 13400 rpm y a 20 °C durante 20 minutos y se eliminan 800 μl del sobrenadante. Se repite este lavado desde la adición de 800 μl de 1xPBS dos veces más, pero en el último lavado en vez de añadir 800 μl , se añaden 320 μl de 1xPBS hasta un volumen final de 400 μl .¹⁰

Paso 3- Deshibridación

La solución del paso anterior se sonica hasta la re-dispersión de las MNPs y se añaden 4 μl de NaOH (2M). Se deja reaccionar durante 2 horas a temperatura ambiente sin agitación y sin luz. A continuación se centrifuga a 13400 rpm durante 20 min a 20 °C y finalmente se quitan 320 μl del sobrenadante y se mide la fluorescencia a una longitud de onda de 495 nm. Se usa un fluorímetro de la casa comercial *Perkin Elmer (LS55 Fluorescence Spectrometer)*.

Para añadir la máxima validez posible al experimento se realiza una recta patrón cada vez que se lleva a cabo una funcionalización. Para realizar esta recta de calibrado se usan diferentes concentraciones conocidas de la segunda hebra de ADN de las que se toman 500 μl y se les adiciona 10 μl de NaOH (2M). Esta mezcla se deja reaccionar 2 horas sin agitación y sin luz y después de centrifugar ya estarán listas para medir en el fluorímetro.

A la vez que se funcionaliza una muestra de MNPs con las dos hebras de ADN se va a realizar otra funcionalización simultanea de las mismas MNPs que va a ser el experimento control. Esta funcionalización va a tener la peculiaridad de que no vamos a añadir la primera hebra de ADN y por lo tanto nos va a servir como control para establecer cuáles son las interacciones no específicas que se generan entre la MNP y la segunda hebra de ADN.

Es necesario realizar un experimento control cada vez que se funcionaliza.

El protocolo de funcionalización para esta muestra control es el mismo, salvo que cuando se añade 40 μl de la primera hebra de ADN en esta muestra se va añadir 40 μl de la segunda hebra de ADN (50 pmol/ μl). Se continúa con el protocolo hasta el momento de la hibridación en el que se mezclan 16 μl de MNPs funcionalizadas y 384 μl de 1xPBS. El resto del protocolo es igual para las dos muestras.

5.4 CARACTERIZACIÓN

5.4.1 DETERMINACIÓN DE HIERRO

Es un protocolo que sirve para determinar cuál es la concentración de hierro en una muestra de nanopartículas.

Para realizar este procedimiento es necesario hacer una recta de calibrado cada vez que se quiera determinar la concentración de hierro de alguna muestra. Así luego, con una simple extrapolación se obtiene el dato de la concentración de hierro de la muestra.

El tratamiento de todas las muestras es el mismo. En primer lugar, hay que mezclar 50 μl de la muestra con 100 μl de aqua regia y calentar durante 15 minutos a 60 °C. Transcurrido este tiempo se añaden 350 μl de agua MiliQ. Finalmente se cogen 50 μl de esta solución y se añaden 60 μl de una disolución de TIRON (forma un complejo con todo el hierro) y 100 μl de Na_3PO_4 . Se deja reaccionar 15 minutos a temperatura ambiente y sin agitación y se mide en el espectrofotómetro a 480 nm la intensidad del complejo formado por el hierro y el TIRON.

5.4.2 ELECTROFORESIS

Se usó un gel de agarosa al 0,8% en TBE 0,5x. Las condiciones de electroforesis son 90 V, 150 mA y durante 30 minutos. Preparación de la muestra: Se mezclan 5 μl de la muestra que vamos a correr en la electroforesis con 1 μl de tampón de electroforesis (glicerol y TBE).

5.4.3 DLS (DYNAMIC LIGHT SCATTERING)

El equipo que proporciona el dato de DLS es *Brookhaven Zeta PALS*. El dato indica si se han formado agregados o no. Además va a llevar a cabo una distribución de tamaños del radio hidrodinámico de las nanopartículas.

El aparato realiza un número variable de repeticiones que se establecen antes de la medida. El resultado se puede presentar de dos formas, en intensidad o en número.

Normalmente se elige el resultado en intensidad porque es menos propenso a errores.¹⁴

Preparación de la muestra: Se prepara una disolución de la muestra con concentración 0,1 mg/ml en 2 ml de KCl (0,01M), se filtra y se mide en el aparato usando un cubeta de plástico.

5.4.4 POTENCIAL Z

Se utiliza el mismo equipo que para la medida de DLS.

El dato de potencial Z se relaciona con la carga superficial de las nanopartículas lo cual indica la estabilidad electrostática de las nanopartículas en disolución.¹⁴

Preparación de la muestra: Se filtran 1,5 ml de la solución con concentración 0,1mg/ml y se le añade 1 ml de KCl (0,01M) también filtrado. Hay que medir el pH antes porque el dato de potencial Z es pH dependiente.

5.4.5 TEM (MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN)

Con las imágenes obtenidas con el microscopio modelo *Tecnai T20 (FEI)* y utilizando el programa *Digital Micrograph* se realizaron histogramas para evaluar la dispersión de tamaños de cada muestra.¹⁴

Preparación de la muestra: Si la muestra está disuelta en hexano se hacen 3 lavados con etanol, diluyendo al final en cloroformo. De esta disolución se dispone una gota en una rejilla de cobre y se deja que se evapore por completo a temperatura ambiente.

Si la muestra está disuelta en agua, se preparan 200 µl de una disolución 0,1 mg/ml de donde se coge una gota que se dispone en una rejilla de cobre y se deja que se evapore el disolvente por completo a temperatura ambiente.

5.4.6 SAR (SPECIFIC ABSORPTION RATE)

Esta técnica va a medir la capacidad que tienen las nanopartículas de generar calor cuando se les aplica un campo magnético.¹⁴

El equipo que usamos es el *DM100, nB nanoscale Biomagnetics*.

Preparación de la muestra: Hay que preparar 1 ml de una disolución con concentración 1 mg/ml. Este mililitro se mide directamente.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

Hay varios procesos por los que podemos obtener nanopartículas magnéticas. Los principales son la coprecipitación del ión ferroso (Fe^{+2}) y del ión férrico (Fe^{+3}) por la adición de una base, la descomposición térmica de una solución alcalina de un quelato de hierro Fe^{+3} y la descomposición en fase orgánica de precursores de hierro a altas temperaturas.

El problema con los dos primeros métodos es que hay que estar ajustando el pH en todo momento. Y las nanopartículas que se obtienen no son tan pequeñas y monodispersas como las que se obtienen con la descomposición en fase orgánica. Además, usando este método se puede controlar el tamaño de las nanopartículas con variaciones en la temperatura o cambiando el precursor del metal con el que hacemos la reacción.

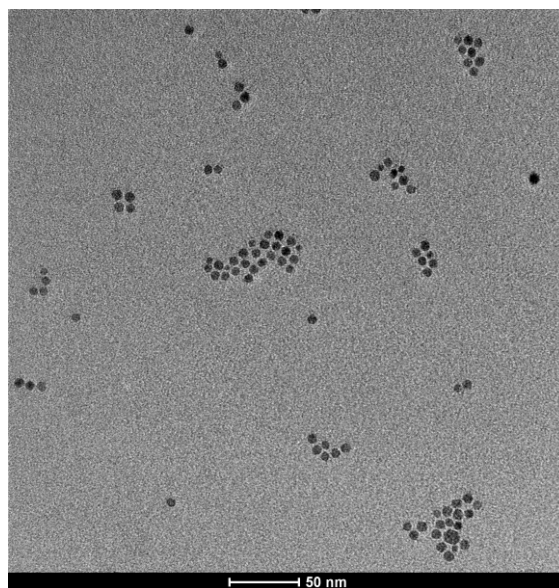


Ilustración 7. Imagen TEM de las semillas de MNPs. Escala= 50 nm.

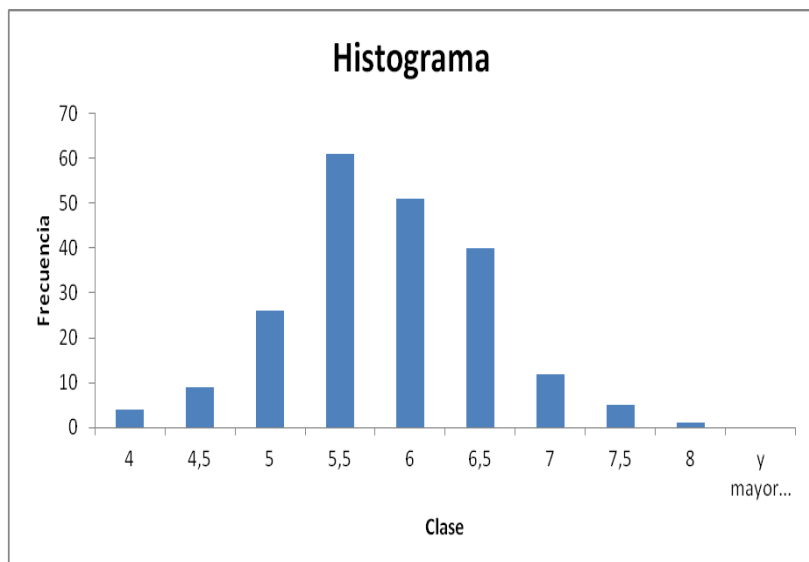


Ilustración 8. Distribución de tamaños de la ilustración 7. El radio medio de las MNPs es de 5,58 nm y la desviación estándar de 0,70 nm.

La determinación de hierro realizada revela una concentración de 1,73 mg Fe/ml para estas MNPs.

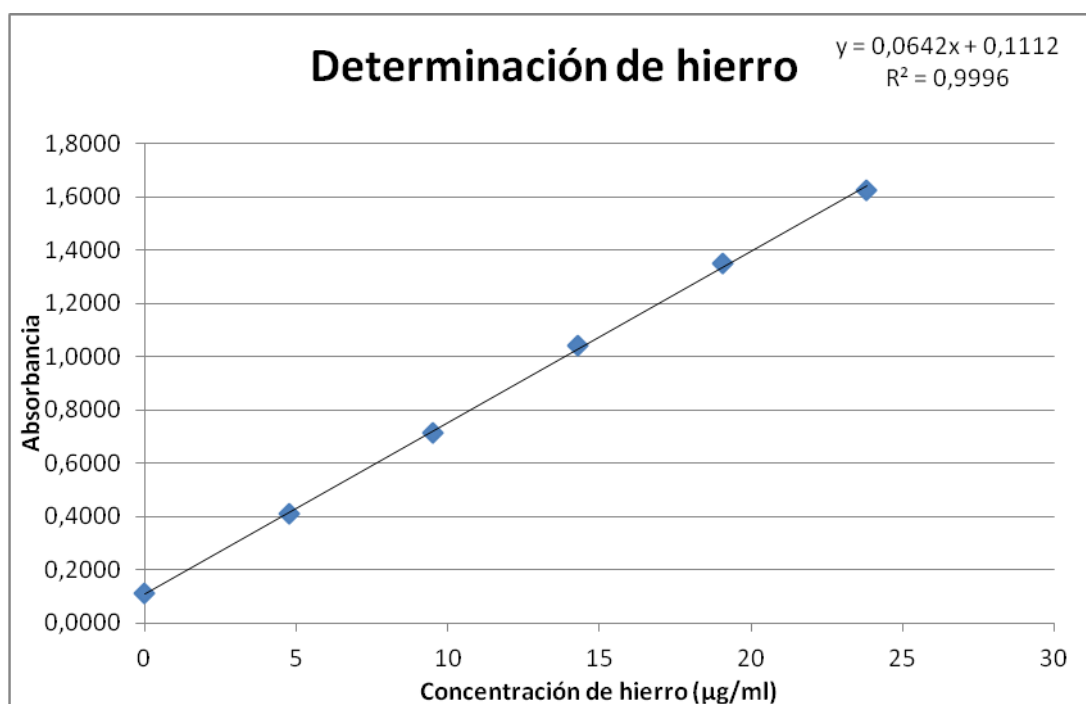


Ilustración 9. Recta de calibrado obtenida para realizar la extrapolación y determinar la concentración de hierro de la muestra. Se obtiene un valor de R^2 bastante elevado lo que indica la fortaleza estadística de la recta de calibrado.

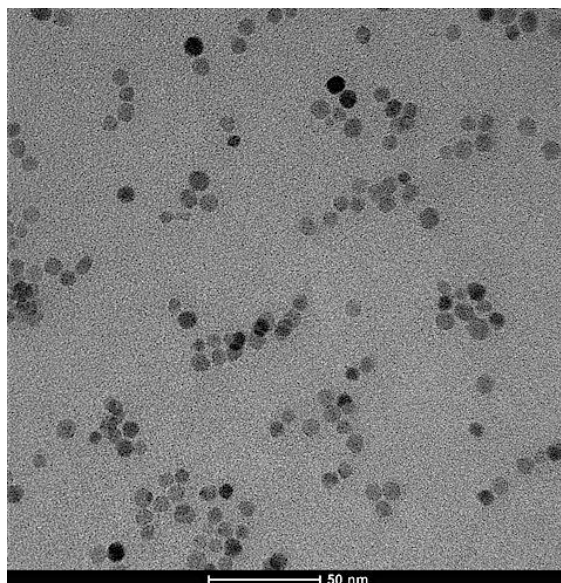


Ilustración 10. Imagen TEM de las MNPs de 11 nm en disolvente orgánico. Escala = 50 nm.

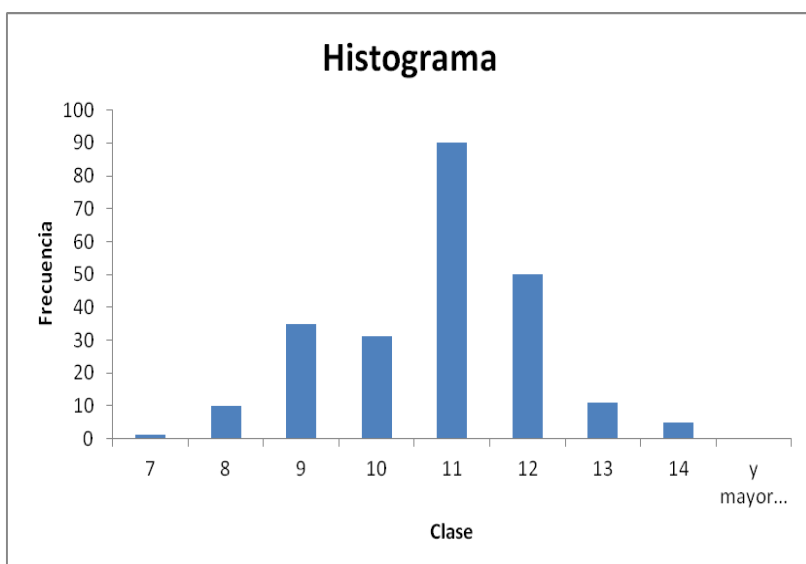


Ilustración 11. Distribución de tamaños de la ilustración 10. Se obtienen MNPs con un tamaño medio de 10,53 nm y una desviación estándar de 1,14 nm.

La determinación de hierro de estas MNPs de 11 nm en disolvente orgánico es de 3,42 mg Fe/ml.

El principal inconveniente que presenta este procedimiento es que la síntesis se realiza en disolvente orgánico, y va a ser necesaria la realización de otro paso extra para que estas nanopartículas sean solubles en disolvente acuoso. Por ello vamos a recubrir la nanopartícula con PMAO.

El PMAO es un polímero que se utiliza para la transferencia a agua porque su cadena alifática va a intercalarse entre las cadenas alifáticas de la oleilamina y del ácido oleico (interaccionan estableciendo fuerzas de Van der Waals). Lo que hace especial al PMAO es que cuando se hidroliza el grupo anhídrido con sosa (NaOH 0.1 M) se obtendrán dos grupos carboxílos por cada molécula de PMAO en la superficie de la nanopartícula. Esto provoca que la nanopartícula sea polar y por lo tanto soluble en disolventes polares. Por último, se elimina el polímero que haya podido quedar en la muestra por centrifugación. Para comprobar que el polímero había sido eliminado se realiza una electroforesis en gel de agarosa (ilustración 12).

Las nanopartículas transferidas a agua se han caracterizado de diferentes maneras. Las imágenes obtenidas con TEM muestran que las nanopartículas de 11 nm transferidas a agua, son monodispersas y que tienen una distribución de tamaños relativamente estrecha (ilustración 13 y 14)

También se utilizaron otras técnicas como la determinación de hierro (3,98 mg Fe/ml) , DLS (diámetro efectivo=29,1 nm y la polidispersidad=0,176) y potencial Z (-38,14 mV a pH 6,82) para determinar algunas de las características físico-químicas de estas MNPs de 11 nm.

Finalmente, la caracterización de la hipertermia de las MNPs dio como resultado un valor de 507 W/g Fe a un campo magnético de 252 Gauss y a una frecuencia de 838,5 kHz. Se trata un valor muy elevado y que pone de manifiesto cuan apropiadas son estas MNPs para las aplicaciones biomédicas para las que se están diseñando.

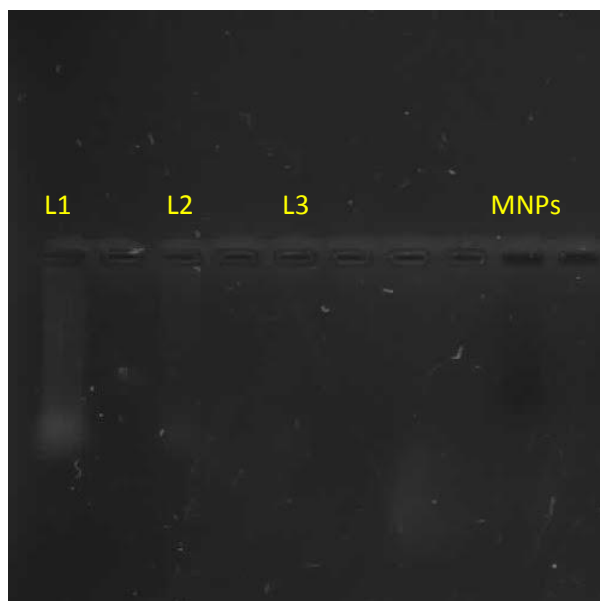


Ilustración 12. Electroforesis en gel de agarosa del sobrenadante de los diferentes lavados y de la muestra de MNPs recubiertas de PMAO. Se ve como en el los primeros lavados hay bastante cantidad de polímero sin reaccionar, aunque cada vez es menor. Y finalmente en la muestra de MNP no queda ya nada de polímero. (L1= lavado 1, L2= lavado 2, L3= lavado 3 y MNPs= muestra de MNPs).

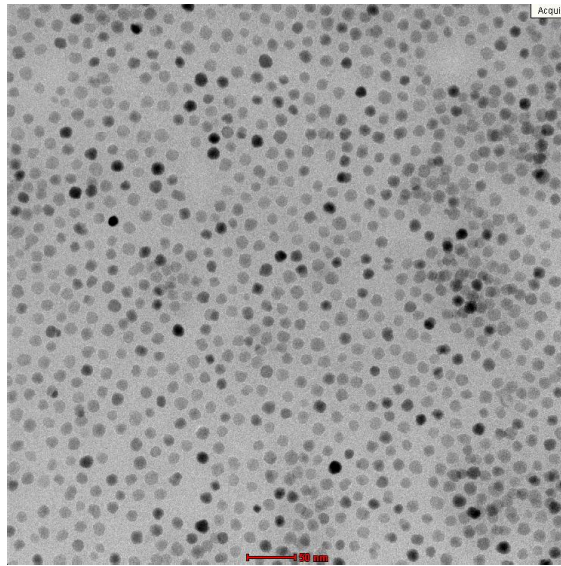


Ilustración 13. Imagen TEM de la muestra de MNPs de 11 nm y pasadas a agua. Escala 50 nm.

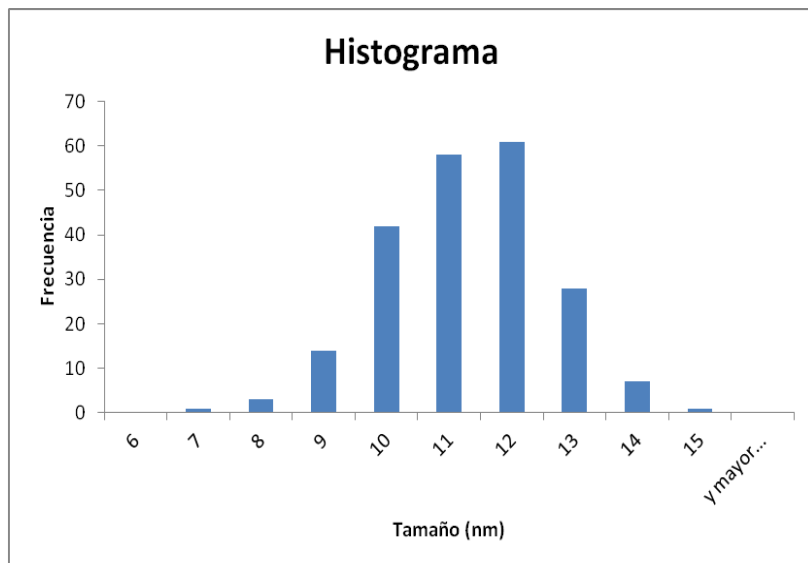


Ilustración 14. Distribución de tamaños de la muestra de la ilustración 13. El diámetro medio es de $11,20 \pm 1,05$ nm.

6.2. FUNCIONALIZACIÓN

En primer lugar se mezclan las MNPs con EDC, S-NHS y con SDS en diferentes cantidades, estos compuestos van a activar los grupos carboxílicos para facilitar su reacción con los grupos amino de la hebra de ADN/PNA. El SDS se añade como surfactante para estabilizar las MNPs. Tras la reacción con ADN/PNA, se realizan 4 lavados con MES para eliminar el exceso de reactivos que pueda haber en la muestra y separar las MNPs unidas a ADN/PNA.

A continuación se añade la segunda hebra de ADN que lleva unida el fluoróforo, pero no está modificado con un grupo amino. También se realiza un cambio de tampón, ahora se utiliza el tampón PBS. El tampón MES tiene una concentración de sales e iones que facilita la reacción de los grupos carboxílicos con los grupos amino. En cambio, el tampón PBS facilita la hibridación de las dos hebras de ADN.

Los lavados posteriores sirven para eliminar de la muestra todo el ADN que no haya hibridado.

Finalmente, se añade NaOH con la finalidad de deshibridar las dos hebras de ADN. Es decir, lo que se quiere conseguir es que todo ADN que se haya hibridado se separe y por lo tanto la segunda hebra de ADN pasará a estar en el sobrenadante y la podremos separar fácilmente centrifugando y cuantificar la fluorescencia en el fluorímetro.

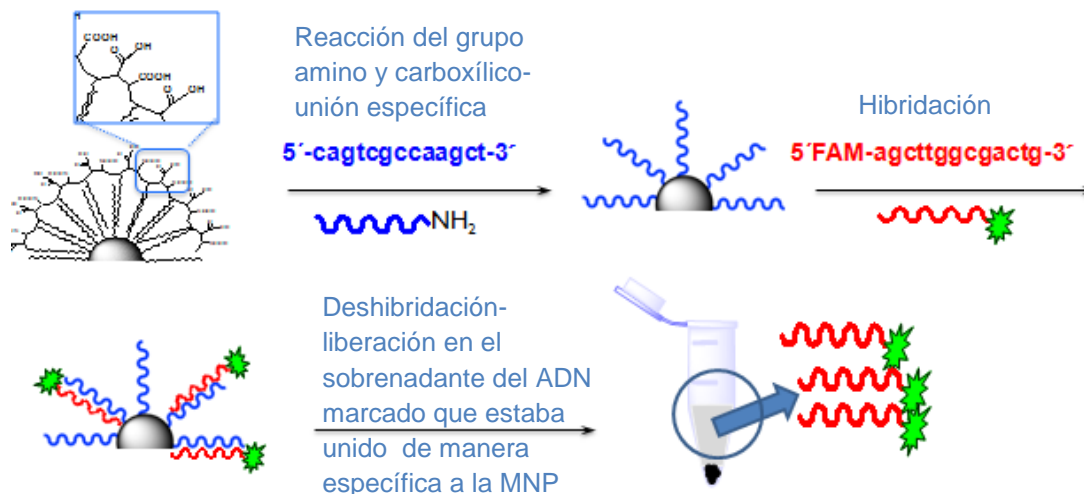


Ilustración 16. Esquema representativo de los pasos que se siguen en la funcionalización de las MNPs con ADN (en la muestra que no es la muestra control)

En la muestra control, solo se va a añadir la segunda hebra de ADN que tiene unido el fluoróforo, pero no el grupo amino de manera que no va a poder formar un enlace covalente con los grupos carboxílicos de la MNP. La utilidad de esta muestra es que permite evaluar las interacciones inespecíficas que se generan entre la MNP y esta hebra de ADN de manera que posibilita la discriminación de las diferentes proporciones de ADN/PNA usadas para funcionalizar. Así se puede determinar cuál es la proporción en la que se produce una mayor unión específica.

Esta unión específica es la que es interesante optimizar porque es la que sirve para la liberación controlada de fármacos.

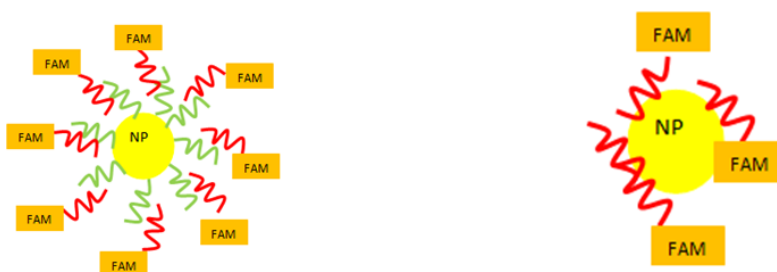


Ilustración 17. Modelos de cómo queda la estructura de las MNP cuando se les añade las dos hebras de ADN y cuando solo se añade una hebra.

ADN/PNA		
1 (100/0)	47,5	pmolADN/mgFe
	64,3	pmolADN/mgFe
2 (75/25)	53,7	pmolADN-PNA/mgFe
	124	pmolADN-PNA/mgFe
3 (50/50)	58	pmolADN-PNA/mgFe
	199	PmolADN-PNA/mgFe
4 (25/75)	74	PmolADN-PNA/mgFe
	328	pmolADN-PNA/mgFe

Tabla 1. Tabla que recoge los diferentes datos resultados de las funcionalizaciones con diferentes proporciones de ADN y PNA. En azul están los datos que corresponden a la funcionalización cuando solo se usa la segunda hebra de ADN (reflejan por tanto solo la unión inespecífica). Los de color rojo corresponden al uso de las dos hebras de ADN.

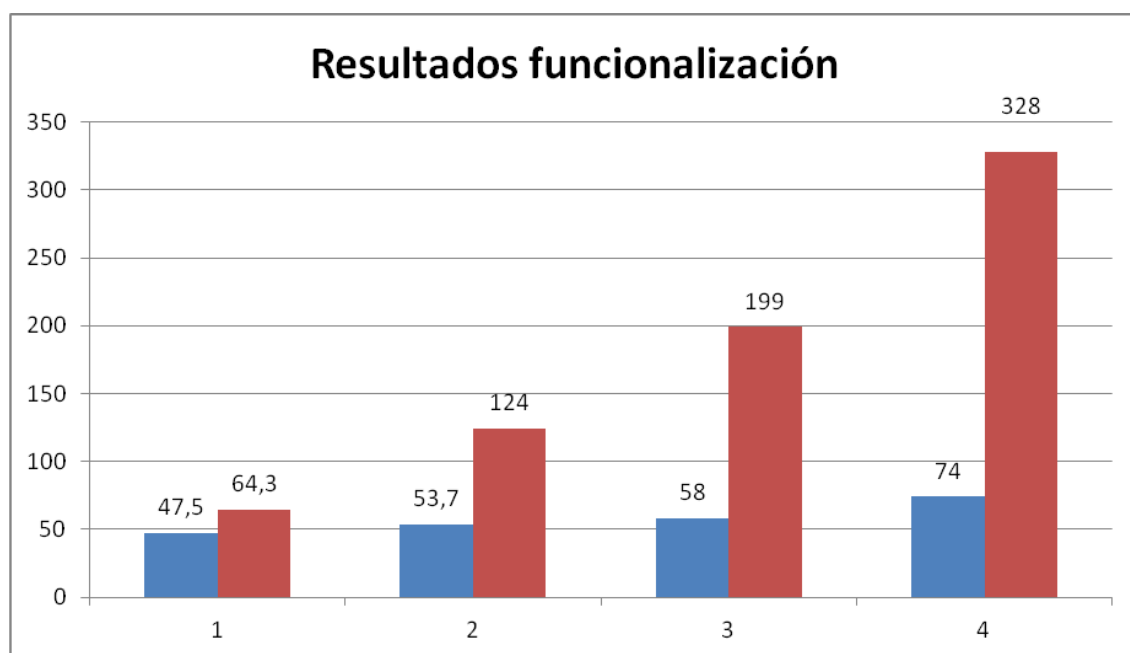


Ilustración 18. En esta gráfica se recogen los mismos datos que en la tabla 1.

En primer lugar estos datos reflejan la existencia real de las interacciones inespecíficas que se producen entre la hebra de ADN (la que no lleva el grupo amino) y la superficie de la MNP. Además, se puede apreciar que se mantiene más o menos constante salvo en el experimento 4 que sale más elevada.

En el experimento 1 se usó solo ADN, nada de PNA. El resultado es que el porcentaje de unión específica es muy parecido al que se obtiene como unión inespecífica, por lo que se puede concluir que la mayoría del ADN se ha unido de manera inespecífica.

En el experimento 2 se usó una muestra que contenía el 75% de ADN y el 25% de PNA. Se aprecia como hay un aumento del porcentaje de unión específica.

Lo mismo ocurre en el experimento 3 para el cual se usó una mezcla que estaba formada por el 50% de ADN y el 50% de PNA. En este caso también se vuelve a apreciar una subida en el porcentaje de unión específica.

Finalmente, en el experimento 4 que se llevó a cabo usando una mezcla de 25% de ADN y 75% de PNA es en el que se logró un mayor porcentaje de unión específica aun teniendo en cuenta que se produjo un aumento de las interacciones inespecíficas.

Este aumento en las interacciones específicas puede explicarse comparando las estructuras del ADN y del PNA (ilustración 4). Se puede apreciar que una de las mayores diferencias es que en el esqueleto del ADN hay grupos fosfato que aportan carga negativa a la cadena, mientras que en el PNA al no encontrarse estos grupos no hay carga negativa. Esta ausencia de la carga posibilita una menor repulsión con la superficie de la MNP que al estar recubierta de grupos carboxílicos también va a presentar carga negativa.

7. CONCLUSIONES

- ❖ Se ha conseguido llevar a cabo la síntesis y la transferencia a agua de MNP siguiendo un protocolo determinado y obteniendo MNP con propiedades estables en los diferentes procesos de síntesis. El estudio de estas propiedades se llevó a cabo usando diferentes técnicas de caracterización de las que se ha logrado un manejo total.
- ❖ Siguiendo un protocolo optimizado por el grupo también se ha logrado funcionalizar exitosamente las MNP con ADN y con PNA gracias a la adición de un grupo amino a la hebra de ADN que reacciona espontáneamente con el grupo carboxílico de la superficie de la MNP.
- ❖ Se ha puesto de manifiesto la existencia de interacciones inespecíficas que de momento no son evitables. Pero se pueden cuantificar para conocer exactamente las interacciones específicas que se producen.
- ❖ Al realizar la funcionalización con diferentes proporciones de ADN/PNA se observa que a mayor cantidad de PNA hay una mayor unión específica.

CONCLUSIONS

- ❖ *MNPs of 11 nm have been obtained by thermal decomposition and transferred to water. The resulting MNPs have been characterized using different techniques of characterization to study the properties of these MNPs.*
- ❖ *The functionalization of the MNPs with nucleic acids has been achieved using a protocol established in the group.*
- ❖ *It has been revealed that nonspecific interactions between DNA and the nanoparticles could not be avoided, but it is possible to quantify them using a control experiment.*
- ❖ *Functionalizing with different mixtures of DNA/PNA in different ratios revealed that the amount of DNA/PNA covalently attached to the MNPs increases with the amount of PNA used*

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Moros, M; Pelaz, B; Pilar, L; Garc, ML; Grazú, V. (2010) Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Advanced Material*, 2, 1746-1755.
2. Passalia, C; Alfano, OM; Brandi, RJ. (2011) A methodology for modeling photocatalytic reactors for indoor pollution control using previously estimates kinetic parameters. *Journal of Hazardous Material*, 357 (65), 211-212.
3. Hussein A. Applications of nanotechnology in renewable energies-A comprehensive overview and understanding. (2015) *Renewable And Sustainable Energy Reviews*, 42, 460-476.
4. Zhao Q, Zhang Q, Wang S, et al. (2015) Pharmaceutical nanotechnology: Investigation of 3D ordered macroporous carbon with different polymer coatings and their application as an oral vaccine carrier. *International Journal Of Pharmaceutics*, 487, 234-241.
5. Valldeperas, J; et al. (2005) Interpretación de las isothermas de absorción de colorantes. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y Cooperación Industrial Terrassa*. 127, 37
6. Jorge Iván, T; Óscar Jaime, R; Jorge Juan, P. (2007) Adición de nanopartículas al cemento Portland. *Dyna*. 152, 277.
7. de Oliveira, J; Campos, E; Bakshi, M; Abhilash, P; Fraceto, L. (2014) Research review paper: Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. *Biotechnology Advances*, 32, 1550-1561.
8. Golovynskyi, SL; et al. (2015) Photoelectric properties of the metamorphic InAs/InGaAs quantum dot structure at room temperature. *Journal of Applied Physics*. 117 (21), 214312:1-214312:6.
9. Pluchery, O; Remita, H; Schaming, D. (2013) Demonstrative experiments about gold nanoparticles and nanofilms: an introduction to nanoscience. *Gold Bulletin*, 46 (4), 319-327.
10. Fratila, R; Mitchell, S; del Pino, P; Grazu, V; M. de la Fuente, J. (2014) Strategies for the Biofunctionalization of Gold and Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir*, 30 (50), 15057-15071.
11. Sun, S; Zeng, H. (2002) Size-Controlled Synthesis of Magnetite Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 31, 8204-8205.
12. Sun, S; Zeng, H; Robinson, DB; et al. (2004) Monodisperse MFe_2O_4 (M= Fe, Co, Mn) Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 4(1), 126-132.

13. Moros Caballero, M. (2012) Síntesis de gliconanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas. Dirigida por Jesús Martínez de la Fuente y Valeria Grazú Bonavía. *Universidad de Zaragoza. Departamento de Química Orgánica.*
14. Pita, M; Abad, J; Fernández, V; et al. (2008) Synthesis of cobalt ferrite core/metallic shell nanoparticles for the development of a specific PNA/ADN biosensor. *Journal of Colloid And Interface Science*, 321, 484-492.