

Trabajo Fin de Grado

Nanopartículas magnéticas inmovilizadas en la
membrana celular a través de química “click”
bioortogonal

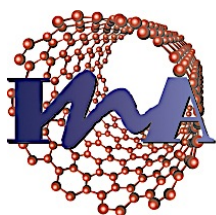
Autor

Guillermo García Marquina

Director

Raluca María Fratila

Facultad de Ciencias
2015



**Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón**
Universidad Zaragoza

Dña RALUCA MARIA FRATILA, Investigadora ARAID en el Instituto de Nanociencia de Aragón, Universidad de Zaragoza

INFORMA:

Que GUILLERMO GARCIA MARQUINA 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 inmovilizadas en la membrana celular a través de química “click” bioortogonal”* y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, 2015-06-18

Firmado:

Director

Raluca Maria Fratila

ÍNDICE

Resumen.....	p.3
1. Introducción.....	p.4
1.1. Nanomateriales.....	p.4
1.2. Aplicaciones de NPs magnéticas en nanomedicina.....	p.4
2. Antecedentes y planteamiento.....	p.5
2.1. Hipertermia magnética para el tratamiento de tumores.....	p.5
2.2. Química “click” bioortogonal para inmovilización de NPs.....	p.6
3. Objetivos.....	p.8
4. Materiales y métodos.....	p.8
4.1. Protocolos de síntesis y transferencia de NPs.....	p.8
4.1.1. Síntesis de NPs magnéticas.....	p.8
4.1.2. Transferencia de las NPs a medio acuoso.....	p.9
4.1.3. Funcionalización de las NPs con glucosa.....	p.10
4.2. Técnicas de caracterización de NPs.....	p.10
4.2.1. Determinación de la concentración de hierro.....	p.10
4.2.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	p.11
4.2.3. TGA (<i>Thermogravimetric Analysis</i>).....	p.11
4.2.4. TEM (<i>Transmission Electron Microscopy</i>).....	p.11
4.2.5. DLS (<i>Dynamic Light Scattering</i>).....	p.12
4.2.6. Potencial Z.....	p.13
4.2.7. SAR (<i>Specific Absorption Rate</i>).....	p.14
5. Resultados y discusión.....	p.14
5.1. NPs disueltas en hexano.....	p.14
5.1.1. Síntesis de NPs disueltas en hexano.....	p.14
5.1.2. Determinación de la concentración de hierro.....	p.15
5.1.3. Caracterización termogravimétrica.....	p.15
5.1.4. Caracterización por TEM.....	p.16
5.2. NPs disueltas en agua.....	p.17
5.2.1. Transferencia de las NPs a medio acuoso.....	p.17
5.2.2. Determinación de la concentración de hierro.....	p.18
5.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.....	p.18
5.2.4. Caracterización termogravimétrica.....	p.19
5.2.5. Caracterización por TEM.....	p.20
5.2.6. Caracterización por DLS.....	p.20
5.2.7. Caracterización por potencial Z.....	p.21
5.2.8. Caracterización por medidas de SAR.....	p.21

5.3.	NPs funcionalizadas con glucosa.....	p.21
5.3.1.	Funcionalización de las NPs con glucosa.....	p.21
5.3.2.	Caracterización por TEM.....	p.22
5.3.3.	Caracterización por potencial Z.....	p.22
6.	Conclusiones.....	p.23
	Bibliografía.....	p.24

RESUMEN

La nanotecnología es un campo de estudio con aplicaciones muy variadas, entre las cuales se encuentra la nanomedicina. Las nanopartículas magnéticas de óxido de hierro pueden suponer una herramienta útil para la eliminación de células tumorales por hipertermia. Por otro lado, en el grupo de investigación donde se ha realizado el presente trabajo, se ha planteado el uso de la reacción “click” bioortogonal entre azidas y alquinos tensionados para inmovilizar nanopartículas magnéticas en la superficie de células vivas. Este Trabajo Fin de Grado ha consistido en la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 monodispersas con características apropiadas para su posterior inmovilización covalente en membranas celulares. La síntesis de las nanopartículas fue realizada por el método de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$, obteniéndose nanopartículas de 6 nm que luego fueron recrecidas a un tamaño de 11 nm. Las nanopartículas sintetizadas en un disolvente orgánico fueron entonces transferidas a un medio acuoso utilizando un polímero anfifílico. También se realizó una funcionalización de las nanopartículas con un derivado de glucosa con el fin de aumentar su estabilidad de cara a su aplicación *in vitro*. Las nanopartículas obtenidas presentaron características muy prometedoras de cara a su futura aplicación, como un diámetro controlado, estabilidad, monodispersidad, carga de la superficie, cristalinidad y tasa de absorción específica.

ABSTRACT

Nanotechnology is a field with a large variety of applications, among which is nanomedicine. Magnetic iron oxide nanoparticles can represent a helpful tool for the elimination of tumor cells through hyperthermia. The research group in which this work has been carried out has proposed the use of “click” bioorthogonal reaction between azides and strained alkynes with the aim to immobilize magnetic nanoparticles on the surface of living cells. This Final Degree Dissertation has consisted in the synthesis and characterization of monodisperse Fe_3O_4 magnetic nanoparticles with the appropriate features for their subsequent covalent immobilization on cell membranes. The synthesis of the nanoparticles was performed by thermal decomposition of $\text{Fe}(\text{acac})_3$, obtaining nanoparticles of 6 nm size, which were later grown to a size of 11 nm. The synthesized nanoparticles were then transferred from the organic solvent to an aqueous medium. Moreover, the functionalization of the nanoparticles with a glucose derivative has been carried out in order to increase their stability for *in vitro* applications. The obtained nanoparticles display very promising features for their future application, such as controlled diameter, stability, monodispersity, surface charge, crystallinity and specific absorption rate.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. NANOMATERIALES

Los nanomateriales son una clase de materiales formados por distintas composiciones (ya sean cerámicos, metales, semiconductores, polímeros, o combinaciones de varios de ellos) y que tienen al menos una de sus dimensiones comprendida entre 1 y 100 nm (Fig.1). Debido a su tamaño reducido, los nanomateriales tienen propiedades distintas de las del mismo material a escala macroscópica.

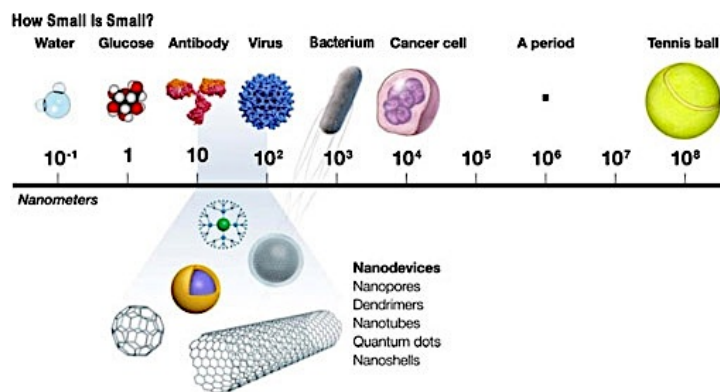


Figura 1: Representación en la escala nanométrica del tamaño de los nanomateriales con respecto a otros objetos. ©2011 National Institute of Health

Las nanopartículas (NPs) son nanomateriales que tienen sus tres dimensiones ubicadas en el régimen nanométrico. Las NPs han sido utilizadas por los humanos desde el siglo IX a.C. en Mesopotamia, donde los artesanos las empleaban para generar un efecto resplandeciente en sus cerámicas. No es sino hasta 1857 que Faraday realiza el primer estudio sistemático sobre las propiedades de coloides de oro, observando que su color dependía del tamaño de las diminutas partículas de oro. Hoy en día, la gran variedad de nanomateriales favorece su utilización en diversos campos, como la electrónica, la ingeniería, la comunicación, la energía, la industria textil y la medicina, entre otros¹.

1. 2. APLICACIONES DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EN NANOMEDICINA

Las NPs magnéticas poseen propiedades únicas con respecto al resto de nanomateriales, como el hecho de poder ser manipuladas por un campo magnético externo. Se ha extendido especialmente el uso de NPs de óxido de hierro debido a su biocompatibilidad. Las NPs de óxido de hierro están formadas por un núcleo de magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), y según las condiciones utilizadas para su síntesis, se puede obtener un amplio espectro de tamaños y formas. Además, también se puede hacer uso de diferentes componentes para recubrir las NPs y así dotarlas de la estabilidad necesaria en medios acuosos fisiológicos.

Determinadas NPs magnéticas muestran superparamagnetismo a temperatura ambiente, es decir, que poseen alta imanación en presencia de un campo magnético externo, pero no muestran remanencia cuando este campo se retira. Esta propiedad

es de gran utilidad para la aplicación de NPs magnéticas *in vivo*, ya que de esta forma se consigue evitar la agregación de las NPs al retirar el campo, hecho que podría dar lugar a trombos en los vasos sanguíneos.

De esta forma, las NPs de óxido de hierro tienen numerosas aplicaciones en la biomedicina, como el transporte y liberación controlada de fármacos guiados por un imán en el sitio deseado, la eliminación de células tumorales por hipertermia, el contraste en resonancia magnética de imagen (RMI), la separación celular, la magnetofección o el desarrollo de biosensores².

2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO

2. 1. HIPERTERMIA MAGNÉTICA PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES

La hipertermia es el aumento de la temperatura de un tejido a 40-46°C. Las células tumorales son más sensibles al calor que las células sanas, luego la hipertermia puede ser utilizada para el tratamiento del cáncer como terapia complementaria a la quimioterapia, la radioterapia y la terapia génica, ya que al aumentar la temperatura se puede conseguir matar las células tumorales sin afectar a las sanas³. Tradicionalmente, la hipertermia se ha aplicado por medio de radiofrecuencias, ultrasonidos, microondas o radiación IR, pero estas técnicas presentan varios inconvenientes, como falta de especificidad y penetración limitada en el tejido.

La hipertermia magnética utiliza la capacidad de las NPs magnéticas de generar calor cuando están expuestas a campos magnéticos alternos. Estas NPs pueden ser funcionalizadas con moléculas de reconocimiento, como ligandos específicos de las células tumorales. De esta forma, se consigue dirigir a las NPs a las zonas afectadas por el tumor y aplicar la hipertermia en el sitio deseado, evitando el calentamiento del tejido sano y aumentando la eficacia del tratamiento. Además, las frecuencias de los campos magnéticos empleados para inducir la hipertermia no poseen efectos nocivos para el tejido sano y solo afectan a las zonas donde se localizan las NPs. Finalmente, se pueden emplear NPs portadoras de fármacos en combinación con la hipertermia magnética como mecanismo para asegurar su liberación controlada⁴.

En la actualidad, se buscan NPs con alta eficacia para inducir hipertermia. Esta se mide a través del “índice específico de absorción” o SAR (*Specific Absorption Rate*), que representa la cantidad de energía transformada en calor por unidad de tiempo y masa. Para aplicaciones biológicas es fundamental saber si el valor del SAR se ve afectado por la interacción de las NPs con las células.

El calentamiento de las partículas superparamagnéticas se da por la rotación del momento magnético, es decir, por la relajación de Néel principalmente. La relajación de Brown contribuye al calentamiento en forma de pérdidas por fricción. La relajación de Néel se produce en NPs pequeñas y se trata de una rotación del vector de momento magnético de la red cristalina sin que haya una rotación mecánica de la NP. La relajación de Brown se produce en NPs grandes y se trata de una rotación de la NP manteniendo su momento magnético en la misma dirección por efecto del torque ejercido por el campo sobre el momento, de tal forma que la rotación física dentro del líquido transportador permite que se dé la alineación (Fig.2)^{5,6}.

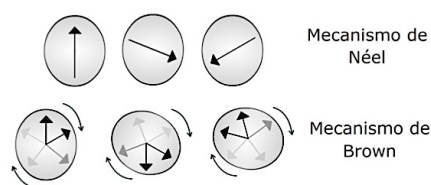


Figura 2: Representación esquemática de los mecanismos de relajación de Néel y de Brown⁶.

Si las NPs se encuentran en la membrana de las células o internalizadas por las mismas, los valores de SAR no son los mismos que los de las NPs en disolución. Esto se debe a una minimización (o incluso a una completa inhibición) de la relajación de Brown. Por ello, además de medir los valores de SAR de las NPs en disolución, es necesario llevar a cabo un estudio de hipertermia más detallado que comprenda la interacción de las NPs con el entorno celular.

Hasta la fecha, solo se ha publicado un estudio sistemático sobre la eficacia de la hipertermia magnética usando varios nanomateriales magnéticos expuestos a entornos celulares. Todos estos nanomateriales mostraron una bajada de su valor de SAR al ser internalizados por las células (incubación a 37°C) o al estar inmovilizados en la membrana celular (mediante incubación a 4°C para evitar su internalización). Las células utilizadas en este estudio tuvieron que ser fijadas tras la inmovilización de las NPs para asegurar su mantenimiento en la membrana⁷. La utilización de células vivas en estos estudios supondría un gran avance para investigar el efecto de la localización de las NPs sobre sus valores de SAR, así como el efecto de la hipertermia sobre varios procesos celulares.

2. 2. QUÍMICA “CLICK” BIOORTOGONAL PARA INMOVILIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

La química bioortogonal consiste en la incorporación de una sonda, un motivo químico único y pequeño (a veces un sencillo grupo funcional), a una biomolécula que se pretende estudiar, usando la propia maquinaria biosintética celular. Después, se suministra exógenamente un marcador químico específico que se une covalentemente a la sonda. Este marcador representa un tamaño pequeño respecto a la molécula original, por lo que no se modifica sensiblemente su estructura ni su funcionalidad, pero la hace detectable.

El marcaje covalente selectivo de biomoléculas, especialmente en células y tejidos vivos, no es una tarea fácil. En primer lugar, el medio biológico está repleto de grupos funcionales que pueden interferir con la reacción deseada (NH_2 y SH). En segundo lugar, los reactivos utilizados en reacciones bioortogonales deben ser estables en medios acuosos y reaccionar entre sí en este tipo de medios. Tampoco deben presentar incompatibilidad con reacciones redox y enzimáticas. Finalmente, no se deben emplear condiciones de reacción (presión y temperatura) ni reactivos y/o catalizadores que puedan ser tóxicos para el organismo vivo⁸.

Dentro del amplio abanico de reacciones de la química orgánica se encuentran las denominadas reacciones “click”. El término “click” es un concepto utilizado para describir una reacción química fiable que genera sustancias de forma rápida uniendo pequeñas moléculas entre sí. Las reacciones “click” pueden ser de gran utilidad para monitorizar procesos biológicos a nivel celular (expresión de proteínas, interacciones proteína-proteína, estudios de actividad enzimática, etc).

La cicloadición [3+2] entre azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (CuAAC), el ejemplo más significativo de reacción “click”, proporciona de manera selectiva 1,4-triazoles químicamente muy estables. Tanto los alquinos como las azidas son grupos reactivos muy pequeños que no perturban a la mayoría de sistemas biológicos. Añadido a esto, la velocidad y la relativa simplicidad de esta reacción hacen que la CuAAC sea de gran utilidad para la monitorización de biomoléculas^{8,9}.

El cobre tiene un conocido efecto citotóxico, luego supone un inconveniente a la hora de trabajar con células. Como alternativa a la reacción clásica, se desarrolló una cicloadición [3+2] entre azidas y alquinos tensionados, en la que la tensión del anillo actúa como activador del alquino y promueve la reacción, sin necesidad de usar cobre como catalizador. El primer alquino tensionado diseñado fue el ciclooctino andamio OCT, que comprende enlaces C≡C-C tensionados en 17° con respecto a la geometría lineal clásica. Mediante modificaciones iterativas en esta molécula, se han obtenido diez ciclooctinos diferentes útiles para realizar la cicloadición azida-alquino, entre los cuales destacan el dibenzociclooctino (DIBO) y el biarilazaciclooctino (BARAC) (Fig.3)^{8,10,11,12}.



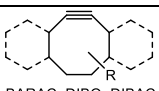
CuAAC		 R, Cu(I)	k_{obs} 10–100 (10–100 μM Cu)	Se necesita catalizador de cobre
Cicloadiciones azida-alquino promovidas por tensión de anillo	R-N ₃	 OCT, DIFO, BCN	0,0012–0,14 (ACN)	No se necesita catalizador metálico; Algunos octinos son susceptibles a ataques por tioles
		 BARAC, DIBO, DIBAC	0,17–0,96 (ACN)	

Figura 3: Tabla con los principales alquinos (tensionados y no tensionados) utilizados en la cicloadición [3+2] con azidas⁸

A pesar de tener ya muchas aplicaciones en biología y bioquímica, el uso de la química “click” bioortogonal para unir de manera covalente nanomateriales a membranas celulares apenas se ha explorado hasta la fecha y no se ha descrito ningún ejemplo de uso de esta metodología para unir NPs a membranas de células vivas. En el grupo de investigación donde se ha realizado el presente Trabajo de Fin de Grado, se ha planteado recientemente el uso de la química “click” bioortogonal como herramienta para inmovilizar NPs magnéticas en la superficie de células vivas (Fig.4). Se estima que, debido a la unión covalente, las NPs permanecerían en la membrana celular el tiempo necesario para poder llevar a cabo los estudios de hipertermia mencionados en el apartado 2.1.

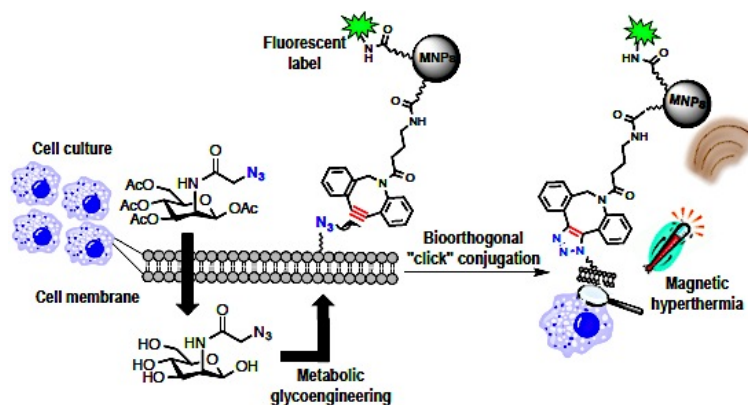


Figura 4: Unión covalente mediante química “click” bioortogonal de NPs magnéticas a la superficie de membranas celulares

3. OBJETIVOS

El fin de este trabajo de Fin de Grado consiste en la síntesis y caracterización de NPs magnéticas monodispersas para su inmovilización covalente en la superficie de membranas celulares y posterior uso en estudios de hipertermia magnética. Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Síntesis de NPs magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) mediante el método de descomposición térmica de $\text{Fe}(\text{acac})_3$.
2. Transferencia a fase acuosa de las NPs obtenidas en medio orgánico mediante su recubrimiento con un polímero anfifílico, el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO).
3. Funcionalización de las NPs recubiertas de PMAO con un derivado de glucosa.
4. Caracterización físico-química de las NPs sintetizadas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en la casa comercial Sigma-Aldrich y se utilizaron sin su posterior purificación.

4.1. PROTOCOLOS DE SÍNTESIS Y TRANSFERENCIA A AGUA DE NANOPARTÍCULAS

4.1.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Para este proyecto, se busca sintetizar NPs monodispersas de Fe_3O_4 de 11 nm de diámetro medio, y para ello se utilizó un método ya descrito mediado por recrecimiento de semillas de Fe_3O_4 de 6 nm.

En un matraz de 250 mL de tres bocas provisto de agitación mecánica mediante una varilla de vidrio (Fig.5), se añadieron: 0,71 g (2,01 mmol) de $\text{Fe}(\text{acac})_3$; 2,58 g (9,98 mmol) de 1,2-hexanodecanodiol; 2 mL (5,65 mmol) de ácido oleico; 2 mL (4,22 mmol) de oleilamina; 40 mL de éter bencílico. Tras mezclar los reactivos, el matraz se colocó en una manta calefactora y se realizaron tres ciclos de vacío/argón. La temperatura de la reacción se mantuvo bajo control utilizando un controlador de temperatura programando varias rampas de temperatura de la siguiente manera: Calentamiento de temperatura ambiente a 200°C (velocidad de 180°C/h); Mantenimiento a 200°C (durante 2 h); Calentamiento de 200°C a 305°C (velocidad de 10°C/min); Mantenimiento a 305°C (durante 2 h); Enfriamiento de 305°C a temperatura ambiente^{13,14}.

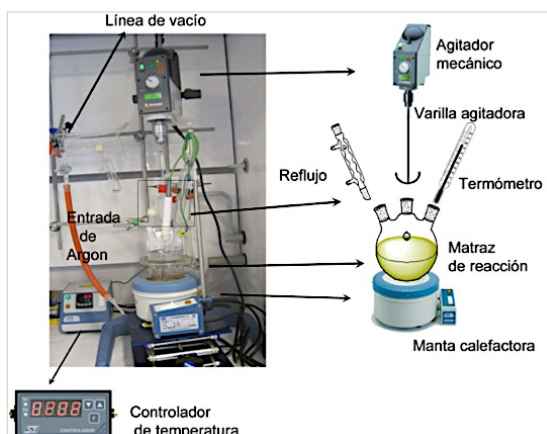


Figura 5: Esquema del montaje experimental para sintetizar NPs en fase orgánica¹⁵.

Tras enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente, se realizaron varios lavados para eliminar el exceso de reactivos. En un primer lavado se añadió a las semillas una fracción de etanol (cuya función es la desestabilización y precipitación de las NPs) y se utilizó un imán para separar las NPs precipitadas del sobrenadante. En el resto de lavados, se añadió hexano (como disolvente) y etanol (en proporción 1:2) y se realizó el mismo procedimiento. Finalmente, las NPs se resuspendieron en una mezcla de hexano, ácido oleico y oleilamina y se almacenaron a 4°C.

Para obtener las NPs de 11 nm de diámetro, se partió de las semillas de 6 nm sintetizadas previamente. Por ello, fue necesario realizar varios lavados para eliminar el exceso de ácido oleico y oleilamina. Siguiendo el mismo protocolo de síntesis, pero con distintas cantidades de los reactivos, se añadieron: 40 mg de semillas de 6 nm de Fe₃O₄ disueltas en hexano; 1,42 g (4,02 mmol) de Fe(acac)₃; 5,16 g (19,97 mmol) de 1,2-hexanodicanodiol; 1 mL (3,12 mmol) de ácido oleico; 1 mL (3,06 mmol) de oleilamina; 40 mL de éter bencílico^{13,14}.

El volumen de semillas a añadir se calculó a partir de la masa que se quería introducir (40 mg) y de la concentración en hierro de las semillas (determinada siguiendo el protocolo explicado en el apartado 4.2.2).

Las rampas de temperatura aplicadas en este caso fueron las siguientes: Calentamiento de temperatura ambiente a 100°C (velocidad de 180°C/h); Calentamiento de 100°C a 200°C (velocidad de 3°C/min); Mantenimiento a 200°C (durante 1 h); Calentamiento de 200°C a 305°C (velocidad de 10°C/min); Mantenimiento a 305°C (durante 1 h); Enfriamiento de 305°C a temperatura ambiente.

Una vez se hubieron obtenido las NPs recrecidas de 11 nm, se realizaron los lavados de la misma forma que se ha detallado anteriormente.

4.1.2. TRANSFERENCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS A MEDIO ACUOSO

Cada reacción de transferencia a agua se llevó a cabo utilizando 20 mg de NPs de 11 nm. El volumen de NPs recrecidas a tomar se calculó pues a partir de este valor y de la concentración de hierro obtenida. Las NPs se lavaron tres veces con etanol, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en 2 mL de CHCl₃.

Por otro lado, se prepararon en un matraz 198 mL de CHCl₃ y se añadieron 224 mg del polímero orgánico poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) (Fig.6), mezclándolo con agitación.

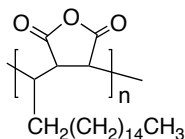


Figura 6: Estructura química del PMAO.

Después, se añadió la disolución de NPs en CHCl₃ a la disolución de PMAO en CHCl₃, gota a gota y con sonicación, y se dejó la mezcla sonicando durante unos 15 minutos, con el matraz tapado. El disolvente se eliminó en el rotavapor a 40°C y 400 mbar dejando un margen de volumen en el fondo para que las NPs no se secan por completo.

Después de evaporar el CHCl₃, se añadieron 10 mL de H₂O y 10 mL de NaOH 0,1 M. La mezcla se volvió a introducir en el rotavapor, esta vez a 70°C y sin vacío, con el fin de evaporar los restos de CHCl₃. A los pocos segundos de introducir el NaOH en la mezcla, se observó la formación de espumas en la solución. Cuando las

espumas se atenuaron, se fue subiendo el vacío poco a poco hasta alcanzar los 200 mbar y se esperó hasta que la solución estuviera en reposo y no se formaran más espumas. Después, se filtró todo el líquido obtenido en caliente con un filtro de 0,2 μm para eliminar los posibles agregados de NPs formados en el proceso^{13,15,16}.

A continuación, se centrifugó durante 2 horas a 18°C y 24000 rpm. De esta forma, las NPs más pequeñas y el exceso de moléculas de polímero no unido se quedaron en el sobrenadante. Tras el ciclo de centrifuga, se retiró el sobrenadante con una pipeta Pasteur, se añadió agua y se volvió a centrifugar la mezcla. Generalmente, se realizan cuatro ciclos de centrifuga para eliminar los restos de polímero. Es importante guardar los sobrenadantes de cada lavado para detectar posteriormente la presencia y la cantidad de polímero (apartado 4.2.2).

4.1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON GLUCOSA

Para funcionalizar las NPs recubiertas de PMAO con glucosa, se disolvieron 20 mg de glucosa (70 μmol) en 960 μL de tampón SSB (50 mM, pH 9), y a dicha mezcla se añadieron 414 μL de las NPs obtenidas en el apartado 5.1.2. Después, se añadieron 15 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) disueltos en 50 μL de SSB a la mezcla. Tras 30 minutos de agitación, se añadieron a la mezcla otros 15 mg de EDC. Tras 3 horas de agitación, la muestra fue agitada y centrifugada durante 8 minutos a 5500 rpm. Se realizaron dos lavados con agua, dejando un volumen final de entre 1,5 y 2 mL. Finalmente, se filtró la muestra con un filtro Millipore de 0,22 μm ^{15,16}.

4.2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS

4.2.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO

La determinación de la cantidad de Fe en las muestras obtenidas es fundamental para conocer la concentración de las NPs, que será necesaria para realizar algunos de los pasos explicados anteriormente.

La cantidad de Fe se determina por espectrofotometría, siendo necesario preparar una serie de estándares de disoluciones de Fe(III) para obtener una recta de calibrado. Las concentraciones de los estándares (en $\mu\text{g/mL}$) son las siguientes: 0, 100, 200, 400, 600 y 800. Para la preparación de las muestras, se toman de 10 a 50 μL de muestra cuya concentración de Fe se pretende determinar y se rellena hasta 50 μL con hexano o con agua (en función de en qué disolvente estén disueltas las NPs).

A todas las muestras se les añaden 100 μL de aqua regia (HCl/HNO_3 en proporción 3:1) y se calienta durante 15 minutos a 60°C para eliminar la capa orgánica. Después, se añaden 350 μL de H_2O miliQ a todas las muestras para diluir el aqua regia. Del volumen total, se toman 50 μL y se trasvasan a una placa de 96 pocillos. A cada pocillo se añaden también 100 μL de Na_3PO_4 (pH=9,7; 0,2 M) y 60 μL de una disolución formada por 50 μL de KOH (4 N) y 10 μL de Tiron (0,25 M). El Tiron, o ácido 1,2-dihidroxibencen-3,5-disulfónico, es un compuesto que forma un complejo con el Fe de todo el pocillo. El KOH es la base que proporciona el pH de actuación del Tiron. Finalmente, el Na_3PO_4 , añadido al pocillo unos segundos después que el Tiron, estabiliza y detiene la formación del complejo. Tras añadir el Tiron y el Na_3PO_4 a todos

los pocillos de la placa, se deja reposar durante unos 15 minutos y se mide la absorbancia de las muestras a 480 nm en el espectrofotómetro. Con los datos de los estándares se realiza una recta de calibrado que se utilizará para extrapolar el dato de absorbancia de la muestra y obtener de esta forma la concentración en Fe de ésta.

4.2.2. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica útil para determinar la presencia de polímero en las muestras y en los lavados.

El gel al 1% (w/v) de agarosa es preparado disolviendo polvos de agarosa en tampón 0,5X Tris-borato-EDTA (TBE). En cada pocillo se aplican 5 µL de muestra y 1 µL de tampón de carga TBE-glicerol. Después, se aplica un campo eléctrico de 90 V y 150 mA, y se deja correr durante 30 minutos. El polímero presente en la muestra que no se ha unido a la superficie de la NP es fácilmente detectable por excitación con luz UV. De esta forma, se utiliza luz visible para detectar las NPs y luz UV bajo un filtro azul para detectar las emisiones azules del exceso de polímero que no se ha unido.

En la imagen del gel, se pueden apreciar las NPs como bandas oscuras y el exceso de polímero como bandas blanquecinas.

4.2.3. TGA (*THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS*)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que mide el peso de una muestra frente al tiempo o la temperatura controlando una atmósfera específica, que puede ser estática o dinámica. La TGA solo puede detectar pesos cuando hay una variación de estos, es decir, para reacciones como descomposiciones, sublimaciones, reducciones, desorciones, absorciones, etc. De esta forma, puede ser utilizada para cuantificar el recubrimiento orgánico de las NPs.

El equipo utilizado para analizar la masa de la muestra frente a la temperatura es un equipo Universal V4.5A TA Instruments.

Las medidas de la pérdida de materia orgánica de las muestras se realizan por calentamiento de estas en atmósfera de aire, aumentando la temperatura a una velocidad de 10°C/min hasta una temperatura final de 800°C. Previamente, se liofilizaron las muestras para eliminar los restos de agua.

4.2.4. TEM (*TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY*)

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utiliza para la caracterización morfológica, microestructural y composicional de las NPs.

El microscopio electrónico se compone de un sistema de vacío, una pantalla donde se proyecta la imagen aumentada de la muestra y una cámara fotográfica o pantalla de ordenador para registrar la imagen. Dentro del sistema de vacío hay un cañón que produce un haz de electrones y un sistema de lentes electromagnéticas (Fig.7). El haz de electrones es acelerado mediante una diferencia de potencial que puede oscilar entre 80 y 200 kV. Este haz es dirigido y focalizado por las lentes condensadoras hacia la rejilla donde está depositada la muestra. Cuando los electrones interactúan con la muestra, una parte de ellos chocan y rebotan, mientras que otros la atraviesan, formando una imagen que posteriormente será aumentada y proyectada por las lentes proyectoras.

La caracterización microscópica de las NPs se realizó a partir de las imágenes obtenidas con un microscopio Tecnai T20 (FEI), dotado de un cañón termoiónico y voltaje acelerador de hasta 200 kV.

Para visualizar las NPs en el TEM, es necesario realizar una preparación previa de la muestra, que variará en función de si las NPs son solubles en disolventes orgánicos o en agua. En ambos casos, la muestra ha de estar muy diluida, siendo las NPs hidrófobas diluidas en hexano y las NPs hidrófilas en agua. Se aplicaron entonces 5 μ L de las muestras sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se secaron al aire antes de ser introducidas en el microscopio.

Una vez obtenidas las micrografías de las NPs, con la ayuda del *software Digital Micrograph*, se midió el diámetro de unas 200 NPs, se representó la distribución de tamaños en forma de histograma y se calculó el tamaño medio de las NPs.

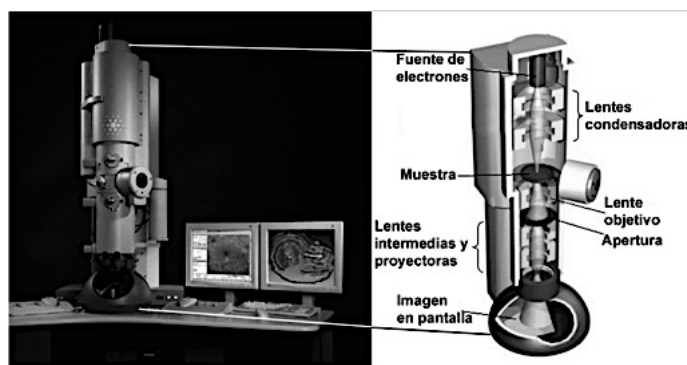


Figura 7: TEM Tecnai T20 (FEI) y esquema con los componentes principales de un TEM¹⁵.

4.2.5. DLS (*DYNAMIC LIGHT SCATTERING*)

El DLS (*Dynamic Light Scattering*) es una técnica espectroscópica utilizada para caracterizar el radio hidrodinámico de polímeros, proteínas y coloides en disolución. El DLS es también una técnica útil para determinar la distribución de tamaños de NPs en suspensión. En términos generales, los componentes principales del aparato de DLS son una fuente de luz, un espectrómetro (que contiene un sistema óptico para definir el ángulo de dispersión y limitar el número de áreas de cohesión), un detector (normalmente un fotomultiplicador) y un analizador de la señal (Fig.8).

En un experimento de DLS, el analito en suspensión es irradiado con la luz láser monocromática. Se miden entonces las fluctuaciones de la intensidad de la luz difractada en función del tiempo. El detector es normalmente un fotomultiplicador posicionado a 90° de la fuente de luz, y funciona captando la luz difractada por la muestra. Los datos de intensidad son entonces transformados por el analizador de la señal para determinar la distribución de tamaños de las partículas de la muestra.

Las muestras se prepararon diluyendo las NPs en agua con una concentración final de 0,1 mg/mL en un volumen final de 2 mL y filtrándolas con un filtro de 0,2 μ m. Se realizaron 10 medidas de cada muestra a 25°C y los resultados se analizaron en términos de intensidad. Las medidas se toman en un equipo *Brookhaven Zeta PALS*, siendo las muestras irradiadas con un láser helio-neón a una longitud de onda de 660 nm.

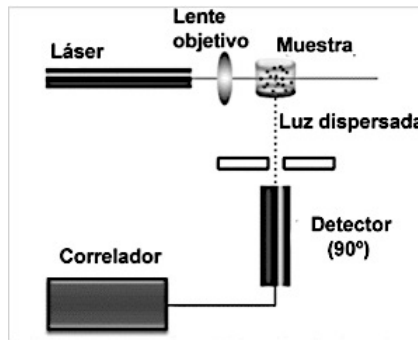


Figura 8: Diagrama esquemático del aparato de DLS¹⁵.

4.2.6. POTENCIAL Z

Las medidas de potencial Z se utilizan para determinar la carga superficial de las NPs y su magnitud da una indicación de la estabilidad del sistema coloidal. Si las partículas en suspensión tienen un amplio potencial Z negativo o positivo tenderán a repelerse entre ellas. No obstante, si las partículas tienen valores bajos de potencial Z, no habrá fuerza que pueda evitar que las partículas se unan y floculen.

Un sistema de medida de potencial Z comprende seis componentes principales. En primer lugar, el láser es usado para proporcionar una fuente de luz que ilumine las partículas dentro de la muestra. Para medidas de potencial Z, esta fuente de luz está separada en un rayo incidente y otro de referencia. El rayo láser incidente pasa a través del centro de la muestra, y se detecta la luz que dispersa a un ángulo de unos 13°. Cuando se aplica un campo eléctrico a la celda, cualquier partícula en movimiento presente en el volumen de medida provocará la fluctuación de la intensidad de la luz detectada con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula. Esta información pasa a un procesador de la señal digital y posteriormente a un ordenador (Fig.9). El *Zetasizer Nanosoftware* produce un espectro de frecuencia a partir del cual se calcula la movilidad electroforética y el potencial Z.

Las muestras se prepararon en las mismas condiciones que las muestras utilizadas para las medidas del DLS. El equipo utilizado es igualmente el *Brookhaven Zeta PALS*, aunque el *software* en este caso es el *Zeta PALS Analyzer*.

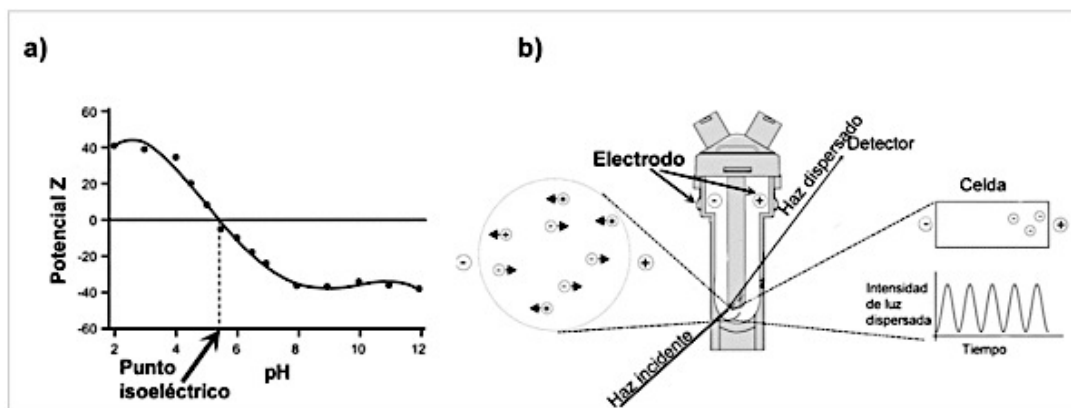


Figura 9: (a) Diagrama mostrando el potencial Z frente al pH de una disolución. (b) Diagrama esquemático de una celda donde se mide el potencial Z de una disolución al aplicar una diferencia de potencial mediante electrodos¹⁵.

4.2.7. MEDIDAS DE SAR (*SPECIFIC ABSORPTION RATE*)

La potencia disipada por un material magnético sometido a un campo magnético alternativo es comúnmente denominada SAR (*Specific Absorption Rate*), y se expresa en W/g de Fe. La medida de SAR se expresa a través de la siguiente ecuación:

$$SAR = c \cdot \frac{m_{muestra}}{m_{magnetita}} \cdot \frac{dT}{dt}$$

donde c es la capacidad calorífica del agua, $m_{muestra}$ es la masa de la muestra, $m_{magnetita}$ es la masa del óxido de hierro presente en la muestra y dT/dt es la pendiente inicial de la curva de calentamiento.

Las muestras fueron preparadas en agua a una concentración de 1 mg/mL, con un volumen de medida de 1 mL.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. NANOPARTÍCULAS DISUELTAS EN HEXANO

5.1.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DISUELTAS EN HEXANO

Como se ha mencionado en el apartado 3, en este trabajo se ha llevado a cabo la síntesis de NPs magnéticas empleando el método de descomposición térmica. Los principales métodos de síntesis de NPs magnéticas son la coprecipitación de sales de Fe(II) y Fe(III) y la descomposición térmica de los precursores. La coprecipitación tiene como ventajas la simplicidad (reactivos baratos y condiciones de reacción suaves en medio acuoso), su versatilidad y el hecho de que las NPs puedan obtenerse a gran escala. Sin embargo, las NPs obtenidas por esta vía suelen ser polidispersas y con baja cristalinidad¹⁷. Por otro lado, la descomposición térmica, a pesar de requerir montajes más complicados, suele dar lugar a NPs monodispersas y cristalinas, por lo que se ha elegido este sistema para trabajar, ya que una buena cristalinidad es fundamental para las propiedades magnéticas de las NPs, incluida su capacidad de generar calor mediante hipertermia¹⁸.

El hecho de que las NPs sintetizadas por descomposición térmica sean uniformes en tamaño se puede explicar por el mecanismo de crecimiento propuesto por LaMer¹⁹ (Fig.10). La primera etapa de la síntesis es una etapa de nucleación; para que esta etapa se produzca, los reactivos se tienen que mezclar y generar especies precursoras. Cuando la concentración de los precursores llega a una concentración mínima (C_{min}), llamada también concentración crítica, empieza la nucleación. Una vez que esta etapa ha terminado, el número de precursores que generan núcleos disminuye y no se forman más núcleos. Los reactivos presentes en disolución difunden entonces a la superficie de los núcleos, dando lugar al crecimiento de los mismos y actuando como surfactantes. La capacidad de los surfactantes de coordinarse con la superficie de las NPs determina el tamaño real de estas.

Para obtener NPs homogéneas, las etapas de nucleación y crecimiento tienen que estar separadas, cosa que no ocurre en la síntesis por coprecipitación, pero sí en la síntesis por descomposición térmica. Además, las NPs no agregan, debido a la repulsión estérica impuesta por las moléculas de surfactante (ácido oleico y oleilamina).

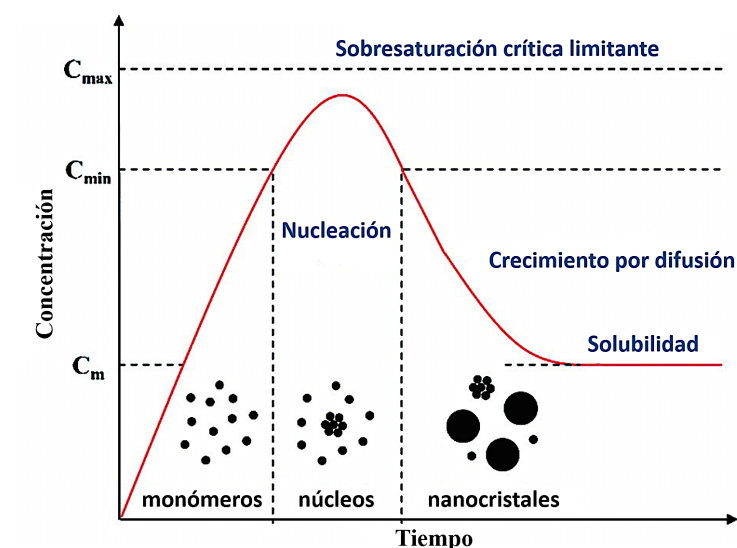


Figura 10: Representación esquemática de los procesos de nucleación y crecimiento

El complejo precursor comienza a formarse cuando la mezcla alcanza los 200°C, temperatura mantenida durante 2 horas para facilitar la formación del precursor. Después, cuando la temperatura es elevada a los 305°C en la siguiente rampa, el complejo se descompone dando lugar a la formación de los núcleos de Fe. El mantenimiento de esta temperatura durante 2 horas favorece el crecimiento de las NPs.

El recrecimiento se efectúa repitiendo el mismo proceso pero utilizando las NPs de 6 nm como semillas. El hecho de que el surfactante no esté covalentemente unido a las NPs permite que a altas temperaturas se desprenda de la superficie de las mismas, se produzca el crecimiento y tras este, se vuelva a adsorber a la superficie¹⁴.

5.1.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO

Los datos de absorbancia de los estándares permitieron obtener una recta de calibrado sobre la cual se extrapoló el dato de absorbancia de la muestra de NPs para determinar su concentración.

La concentración inicial de hierro de la muestra obtenida a partir de la recta de calibrado para las semillas de 6 nm en hexano fue de 1,73 mg/mL.

La concentración inicial de hierro de la muestra obtenida a partir de la recta de calibrado para las NPs recrecidas de 11 nm en hexano fue de 3,426 mg/mL.

5.1.3. CARACTERIZACIÓN TERMOGRAVIMÉTRICA

El análisis termogravimétrico (TGA) proporciona información sobre la pérdida de masa de la muestra frente a la temperatura, lo que permite evaluar la cantidad de recubrimiento orgánico de las NPs.

Como se observa (Fig.11), las muestras pierden cerca de un 1% de masa hasta los 200°C. Esto se debe principalmente a los restos de humedad y disolventes de la síntesis e indica que, al no perderse los surfactantes a dicha temperatura, el enlace entre el ácido oleico y la superficie de la NP es fuerte. A partir de los 200°C y hasta los 400°C, tiene lugar la mayor pérdida de la masa orgánica (10%).

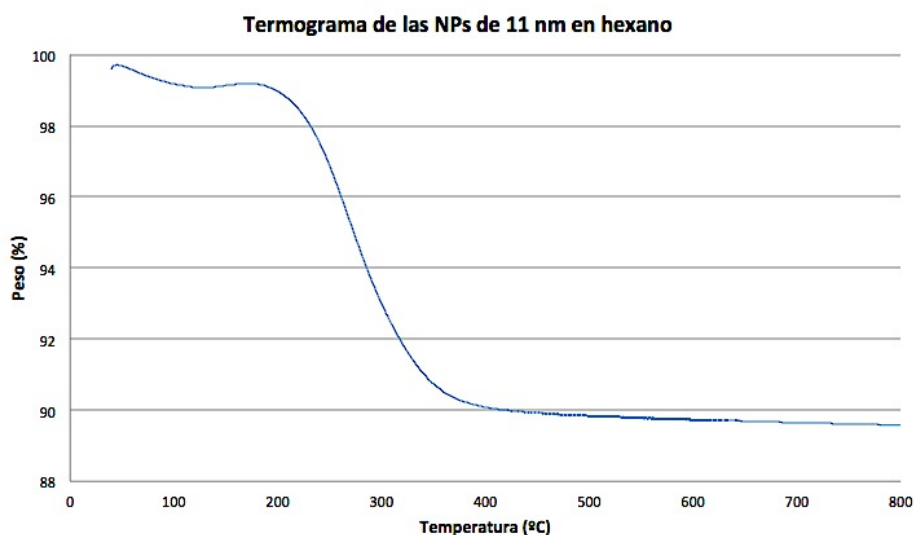


Figura 11: Termograma de las NPs de 11 nm en hexano. Representa la pérdida de peso (%) en función de la temperatura (°C).

5.1.4. CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) permite el estudio del tamaño, la forma y la homogeneidad de las NPs.

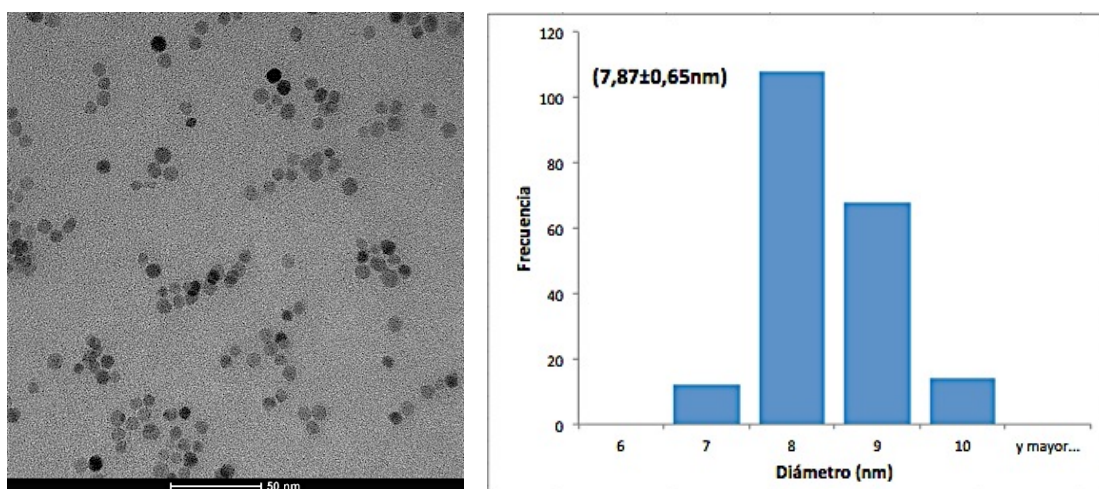


Figura 12: A la izquierda se muestra una micrografía de TEM de las NPs de 6 nm (escala=50 nm) en hexano. A la derecha se muestra el histograma de tamaños de las NPs (expresado en nm), con diámetro medio de 7,87 nm

Se observa (Fig.12) que el diámetro medio de las semillas obtenidas (7,87 nm) es algo mayor que el esperado (6 nm). Esto puede deberse a muchos parámetros, como la rampa de temperatura, el flujo de Ar, la agitación empleada o el estado de hidratación de los reactivos. La desviación típica es muy pequeña (0,65 nm), lo que quiere decir que las NPs sintetizadas son de un solo tipo y por tanto presentan homogeneidad de tamaño.

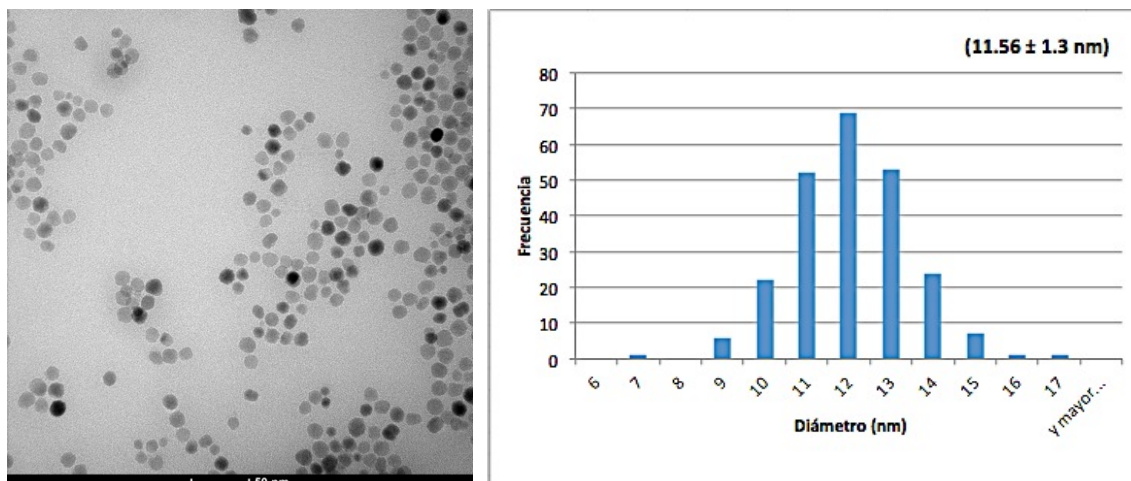


Figura 13: A la izquierda se muestra una micrografía de TEM de las NPs de 11 nm (escala=50 nm) en hexano. A la derecha se muestra el histograma de tamaños de las NPs (expresado en nm), con diámetro medio de 11,56 nm

Se observa (Fig.13) que el diámetro medio de las NPs obtenidas en la etapa de recrecimiento (11,56 nm) es muy próximo al esperado. La desviación típica es bastante baja (1,3 nm), por lo que, igual que en el caso de las semillas, las NPs de 11 nm presentan homogeneidad de tamaño.

5.2. NANOPARTÍCULAS DISUELTAS EN AGUA

5.2.1. TRANSFERENCIA DE LAS NANOPARTÍCULAS A MEDIO ACUOSO

La principal desventaja del método de síntesis por descomposición térmica es que las NPs que se obtienen son solubles solamente en disolventes apolares, con lo cual para poder emplearlos en aplicaciones biológicas es necesario realizar una transferencia a medio acuoso. Algunas de las estrategias comúnmente empleadas para transferir las NPs a medio acuoso son la encapsulación en liposomas, o el uso de ciclodextrinas, copolímeros de bloque o polímeros anfifílicos. En este caso se empleó un polímero anfifílico, el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO). Su parte hidrófoba tiene cadenas laterales de 18 carbonos que se intercalan e interaccionan hidrofóticamente con las cadenas de ácido oleico de las NPs. A pesar de que la interacción hidrofóbica entre las cadenas alifáticas es reversible, el elevado número de interacciones entre las cadenas del polímero y el surfactante dan lugar a recubrimientos muy estables. La parte hidrófila del polímero, las fracciones de anhídrido maleico, quedan expuestas hacia el exterior de la NP, proporcionando estabilidad y generando grupos -COOH tras su hidrólisis con NaOH ^{13,15,16} (Fig.14). Este paso de hidrólisis es crítico para asegurar la estabilidad de las NPs en agua, y genera dos grupos -COOH por cada unidad monomérica de anhídrido maleico.

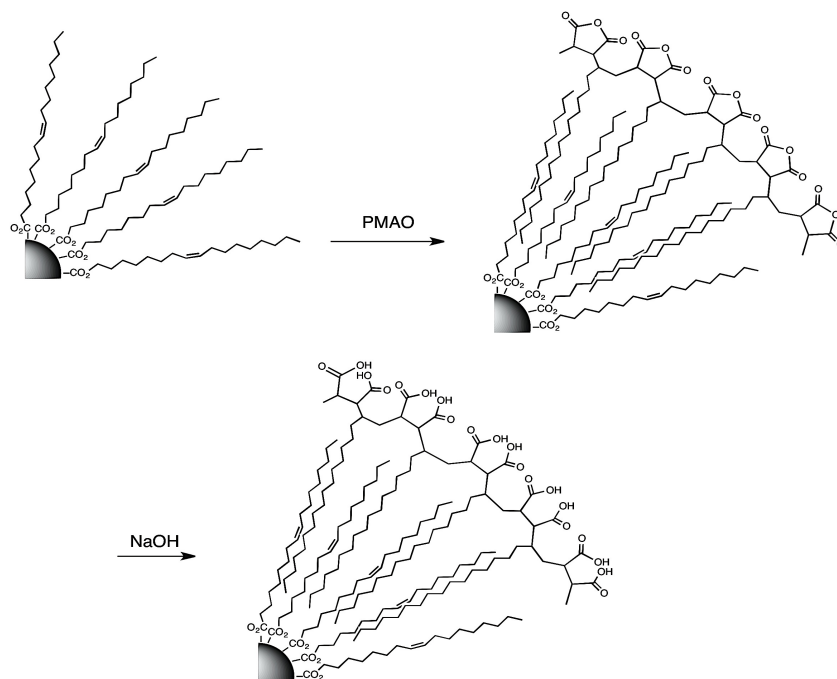


Figura 14: Arriba se muestra la funcionalización de las NPs con PMAO, y abajo la hidrólisis de la capa de polímero con NaOH 0,1 M¹³.

5.2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO

Los datos de absorbancia de los estándares permitieron obtener una recta de calibrado sobre la cual se extrapoló el dato de absorbancia de la muestra de NPs para determinar su concentración.

La concentración inicial de hierro de la muestra obtenida a partir de la recta de calibrado para las NPs recubiertas de 11 nm en agua fue de 1,61 mg/mL.

5.2.3. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

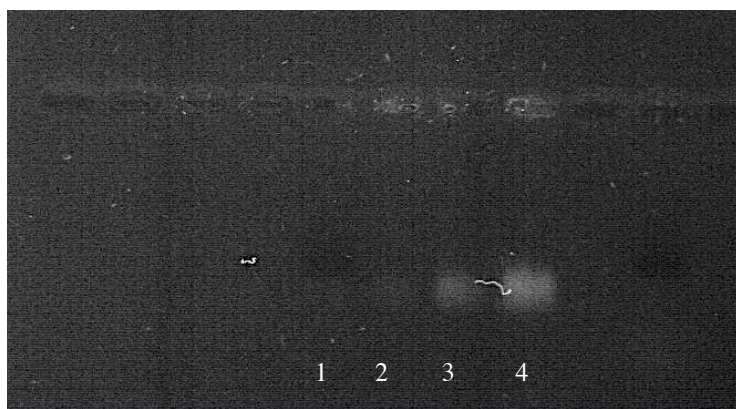


Figura 15: Electroforesis en gel de agarosa de las NPs en fase acuosa. Pocillo 1: NPs recubiertas de PMAO purificadas por centrifugación. Pocillo 2, 3 y 4: sobrenadantes de la centrifugación con exceso de polímero (bandas blancas).

En la foto del gel de electroforesis (Fig.15) se observa que en el pocillo en el que se han cargado las NPs purificadas hay una banda negra, correspondiente a dichas NPs. En los restantes pocillos, en los que se han cargado los sobrenadantes de cada

ciclo de centrifuga, se observan bandas blancas a la misma altura. Estas bandas corresponden con el exceso de polímero, y presentan una gradación de intensidad, siendo más intensa la banda correspondiente al primer sobrenadante (pocillo 4) y más clara la correspondiente al último (pocillo 2). Es fundamental que la muestra de NPs purificadas no contenga restos de polímero, ya que podrían interferir en otros estudios de caracterización.

5.2.4. CARACTERIZACIÓN TERMOGRAVIMÉTRICA

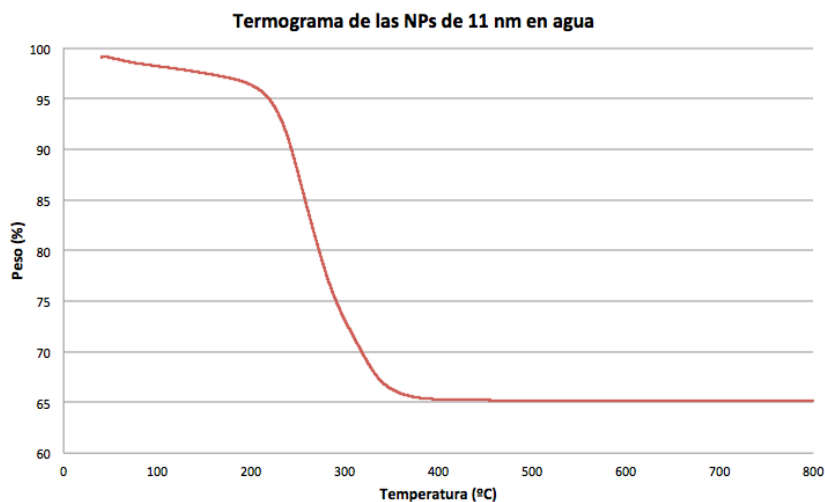


Figura 16: Termograma de las NPs de 11 nm en agua. Representa la pérdida de peso (%) en función de la temperatura (°C)

La pérdida de masa en el caso de las NPs transferidas a agua al alcanzar los 400°C, como se observa en el gráfico (Fig.16), es de en torno al 35%. A partir de la TGA de las NPs recubiertas con oleico en hexano y de las NPs con PMAO, se pudo estimar la cantidad de polímero unido por las NPs, asumiendo que la cantidad de ácido oleico es constante en ambas muestras. El porcentaje de pérdida de masa de las NPs en hexano se resta del de las NPs en agua para obtener la cantidad de polímero unido a la superficie de las NPs de PMAO, siendo en este caso del 25% (Fig.17). El 65% restante se asume como masa inorgánica, magnetita en este caso.

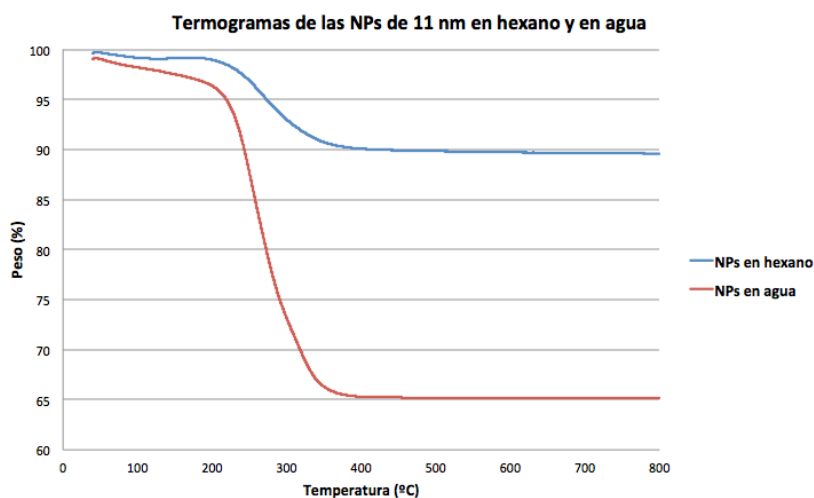


Figura 17: Termogramas de las NPs de 11 nm en hexano (azul) y en agua (rojo).

5.2.5. CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

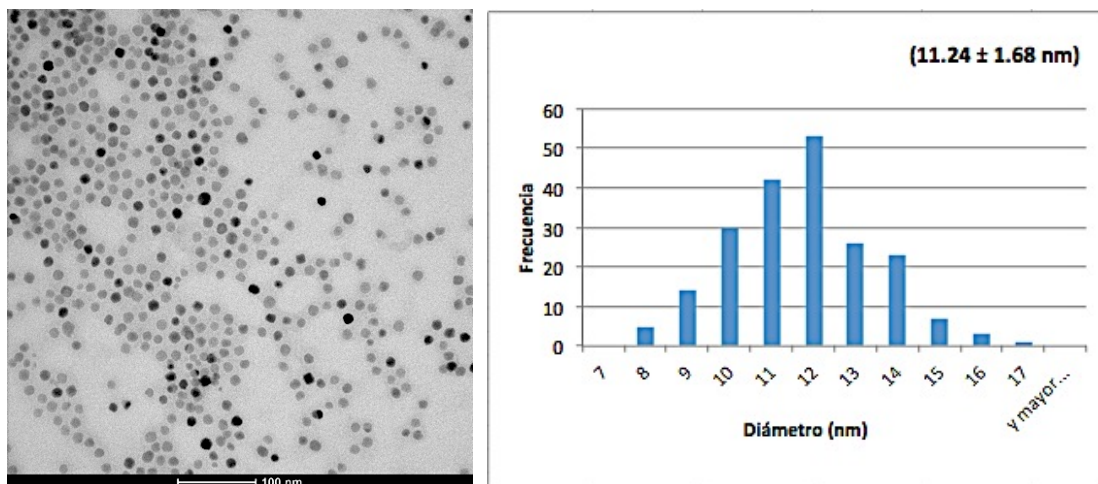


Figura 18: A la izquierda se muestra una micrografía de TEM de las NPs de 11 nm (escala=100 nm) en agua. A la derecha se muestra el histograma de tamaños de las NPs (expresado en nm), con diámetro medio de 11,24 nm

El histograma de tamaños (Fig.18) muestra un diámetro medio de 11,24 nm, pero hay que tener en cuenta que es muy difícil observar la capa de polímero con el TEM. La micrografía muestra que las NPs están en general aisladas y dispersas. Si bien es verdad que se pueden encontrar agregados mayores compuestos por NPs envueltas por la misma capa de polímero, su incidencia es muy baja.

5.2.6. CARACTERIZACIÓN POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ

El equipo *Brookhaven Zeta PALS* permitió realizar un cálculo del diámetro efectivo medio de las NPs y de su polidispersidad en solución, en función de las medidas de intensidad de la luz difractada. La función MSD proporcionó el porcentaje de tamaños de las NPs, siendo C(d) el porcentaje acumulado y G(d) la distribución de tamaños (Fig.19).

El diámetro efectivo obtenido fue de 29,1 nm, y la polidispersidad de 0,176. Una polidispersidad inferior a 0,3 indica que la muestra es monodispersa, mientras que una polidispersidad superior a 0,3 indica que la muestra es polidispersa. En este caso, se puede asumir que la muestra es monodispersa. Las características obtenidas en la muestra de NPs fueron pues las deseables, ya que interesa que las NPs no formen agregados para garantizar un mejor transporte y propiedades magnéticas.

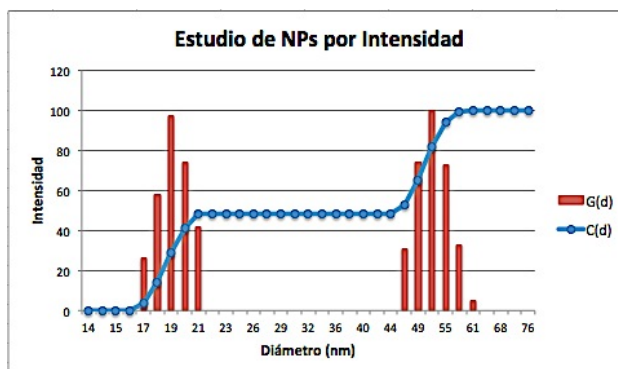


Figura 19: Gráfico representando el diámetro hidrodinámico de las NPs de 11 nm en agua. C(d) representa el porcentaje acumulado y G(d) representa la distribución de tamaños.

5.2.7. CARACTERIZACIÓN POR POTENCIAL Z

La medida de potencial Z de la muestra de NPs, obtenida a partir de la medida realizada por el *software Zeta PALS Analyzer*, fue de -38,14 mV a pH 6,82. La carga negativa de las NPs se debe a la gran cantidad de grupos -COOH que exhiben en su superficie. Debido a la gran cantidad de interacciones hidrófobas que tienen lugar entre el PMAO y las cadenas hidrocarbonadas de la superficie de la NP, la unión del polímero puede considerarse irreversible.

5.2.8. CARACTERIZACIÓN POR MEDIDAS DE SAR

Las medidas de SAR de la muestra de NPs recubiertas de PMAO se realizaron por triplicado, obteniéndose un valor promedio de 507 W/g Fe a un campo de 252 Gauss y a una frecuencia de 838,5 kHz. Este valor es muy prometedor de cara a las futuras aplicaciones de estas NPs en hipertermia, ya que NPs de tamaño similar sintetizadas anteriormente en el grupo no sobrepasaban 350 W/g Fe. El alto valor obtenido para las NPs sintetizadas en el presente TFG se ha atribuido a una muy buena cristalinidad de las NPs obtenidas en la etapa de recrecimiento, poniendo de manifiesto una vez más las ventajas del método de síntesis por descomposición térmica.

5.3. NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADAS CON GLUCOSA

5.3.1. FUNCIONALIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS CON GLUCOSA

En estudios llevados a cabo anteriormente en el grupo de investigación donde se realizó este TFG se observó que al introducir glucosa en la superficie de las NPs recubiertas de PMAO, la estabilidad de estas NPs en medios de cultivo celular aumentaba de manera considerable. Además, las células internalizaban mucho más rápido las NPs funcionalizadas con glucosa. Para comparar el efecto de la hipertermia cuando las NPs se encuentran internalizadas o inmovilizadas en la membrana celular, es necesario preparar unas NPs funcionalizadas con ciclooctino que presenten una buena internalización celular. Por lo tanto, se planteó funcionalizar parte de los grupos -COOH presentes en las NPs tras la hidrólisis de los grupos anhídrido del PMAO con un derivado de glucosa con grupos amino mediante la formación de un enlace amida (Fig.20). Para activar los grupos carboxilo, se utiliza una carbodiimida soluble en agua, la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimina (EDC), que forma un compuesto intermedio con el grupo carboxilo, una O-acilisourea, el cual es muy reactivo frente a aminas primarias y da lugar a la formación de un enlace amida. Los átomos de oxígeno de las moléculas de agua pueden actuar como nucleófilos, hidrolizando el éster reactivo y regenerando el grupo -COOH, lo que produce la disminución de la vida media del intermedio y supone por tanto un inconveniente importante de éste método¹⁵.

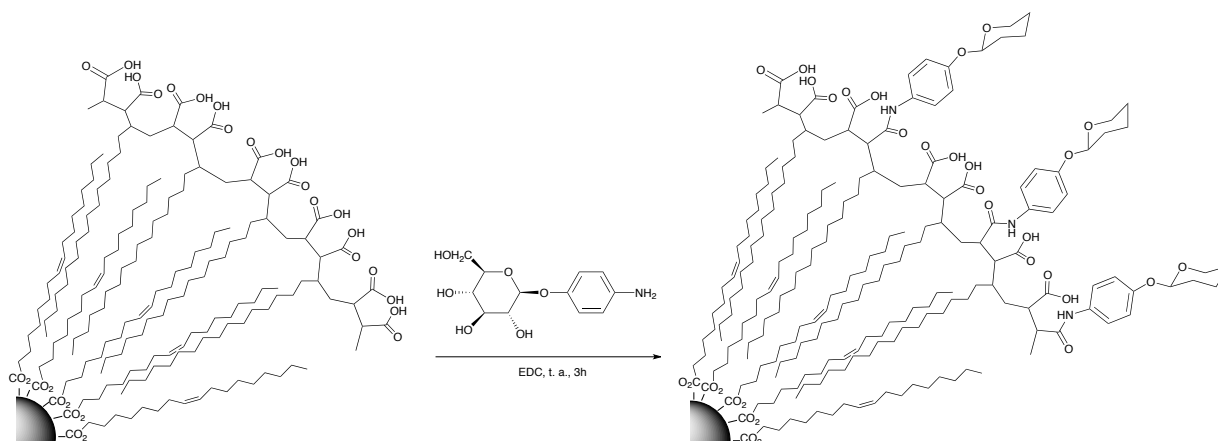


Figura 20: Funcionalización de las NPs con glucosa por la formación de un enlace amida¹³.

5.3.2. CARACTERIZACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

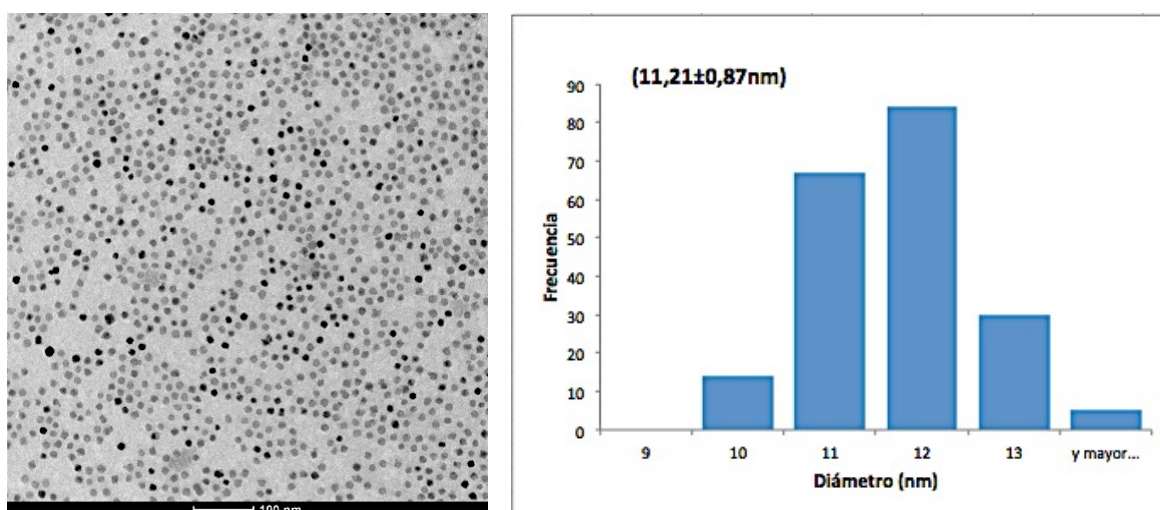


Figura 21: A la izquierda se muestra una micrografía de TEM de las NPs de 11 nm (escala=100 nm) en agua funcionalizadas con glucosa. A la derecha se muestra el histograma de tamaños de las NPs (expresado en nm). con diámetro medio de 11.21 nm

Como puede observarse en la micrografía y en el histograma de tamaños (Fig.21), ni la morfología de las NPs ni el tamaño medio de estas cambia con respecto a las NPs sin funcionalizar, y tampoco se produce agregación.

5.3.3. CARACTERIZACIÓN POR POTENCIAL Z

La medida de potencial Z de la muestra de NPs, obtenida a partir de la medida realizada por el *software Zeta PALS Analyzer*, fue de -24,91 mV. Como es de esperar, las NPs funcionalizadas con glucosa presentan una menor electronegatividad que las NPs que no han sido funcionalizadas (-38,14 mV), ya que parte de los grupos COOH están funcionalizados con azúcares.

6. CONCLUSIONES

En este trabajo se han sintetizado por descomposición térmica NPs magnéticas de Fe_3O_4 de 11 nm, que han sido transferidas a un medio acuoso y funcionalizadas con glucosa con el fin de optimizar las características requeridas para su posterior funcionalización en membranas celulares por medio de la reacción “click” bioortogonal. Los resultados obtenidos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La síntesis de NPs por descomposición térmica permite obtener NPs monodispersas, cristalinas y con un tamaño uniforme.
- El método de síntesis utilizado permitió obtener unas NPs con un aumento cercano al 50% de la tasa de absorción específica (SAR) con respecto a síntesis anteriores.
- Las NPs sintetizadas pudieron ser funcionalizadas fácilmente con glucosa, preservando sus características prometedoras, para futuras aplicaciones *in vitro*.

6. CONCLUSIONS

This dissertation has consisted in the synthesis by thermal decomposition of 11 nm Fe_3O_4 magnetic nanoparticles, which have been transferred to an aqueous medium and functionalized with glucose for their later grafting on cell membranes through a bioorthogonal “click” reaction. The results obtained allow reaching the following conclusions:

- The nanoparticles synthesis by thermal decomposition yields monodisperse, crystalline and uniform-sized nanoparticles.
- The synthesis method developed allows an increase of the specific absorption rate (SAR) of the nanoparticles of nearly 50% compared to previous synthesis.
- The obtained nanoparticles could be easily functionalized with glucose, preserving their promising features for future *in vitro* applications.

BIBLIOGRAFÍA

1. Wing, Claudia E. Gutiérrez. "Las NANOPARTÍCULAS: Pequeñas Estructuras Con Gran Potencial." *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 2006, 24–29.
2. Peng, Xiang-Hong, Ximei Qian, Hui Mao, Andrew Y. Wang, and others. "Targeted Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Tumor Imaging and Therapy." *International Journal of Nanomedicine* 3, no. 3 (2008): 311.
3. Luk, Kenneth H., R. Michael Hulse, and Theodore L. Phillips. "Hyperthermia in Cancer Therapy." *Western Journal of Medicine* 132, no. 3 (1980): 179.
4. Chatterjee, Dev Kumar, Parmeswaran Diagaradjane, and Sunil Krishnan. "Nanoparticle-Mediated Hyperthermia in Cancer Therapy." *Therapeutic Delivery* 2, no. 8 (2011): 1001–14.
5. Reeves, Daniel B., and John B. Weaver. "Simulations of Magnetic Nanoparticle Brownian Motion." *Journal of Applied Physics* 112, no. 12 (2012): 124311.
6. Mojica Piscioti, Mary Luz. "Estudio Del Proceso de Calentamiento de Nanopartículas Magnéticas Con Campos Magnéticos AC Para Su Utilización En Tratamiento de Tumores Por Hipertermia." Tesis doctoral, Universidad Nacional de Cuyo, 2009.
7. Di Corato, Riccardo, Ana Espinosa, Lenaic Lartigue, Mickael Tharaud, Sophie Chat, Teresa Pellegrino, Christine Ménager, Florence Gazeau, and Claire Wilhelm. "Magnetic Hyperthermia Efficiency in the Cellular Environment for Different Nanoparticle Designs." *Biomaterials* 35, no. 24 (August 2014): 6400–6411.
8. Patterson, David M., Lidia A. Nazarova, and Jennifer A. Prescher. "Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry." *ACS Chemical Biology* 9, no. 3 (March 21, 2014): 592–605.
9. Suárez, Andrés. "Reacciones de Cicloadición 1, 3-Dipolares a Alquinos Catalizadas Por Cobre." In *Anales de Química*, Vol. 108, 2012.
10. Koo, Heebeom, Sangmin Lee, Jin Hee Na, Sun Hwa Kim, Sei Kwang Hahn, Kuiwon Choi, Ick Chan Kwon, Seo Young Jeong, and Kwangmeyung Kim. "Bioorthogonal Copper-Free Click Chemistry In Vivo for Tumor-Targeted Delivery of Nanoparticles." *Angewandte Chemie International Edition* 51, no. 47 (November 19, 2012): 11836–40.
11. Best, Michael D. "Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules." *Biochemistry* 48, no. 28 (July 21, 2009): 6571–84.
12. Baskin, Jeremy M., Jennifer A. Prescher, Scott T. Laughlin, Nicholas J. Agard, Pamela V. Chang, Isaac A. Miller, Anderson Lo, Julian A. Codelli, and Carolyn R. Bertozzi. "Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, no. 43 (2007): 16793–97.
13. Moros, Maria, Beatriz Pelaz, Pilar López-Larrubia, Maria L. García-Martín, Valeria Grazú, and Jesus M. de la Fuente. "Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications." *Nanoscale* 2, no. 9 (2010): 1746.
14. Sun, Shouheng, Hao Zeng, David B. Robinson, Simone Raoux, Philip M. Rice, Shan X. Wang, and Guanxiong Li. "Monodisperse MFe_2O_4 ($M = Fe, Co, Mn$)

- Nanoparticles." *Journal of the American Chemical Society* 126, no. 1 (January 2004): 273–79.
15. Moros, Maria. "Síntesis de Gliconanopartículas Magnéticas Para Aplicaciones Biomédicas." Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, 2012.
 16. Fratila, Raluca M., Scott G. Mitchell, Pablo del Pino, Valeria Grazu, and Jesús M. de la Fuente. "Strategies for the Biofunctionalization of Gold and Iron Oxide Nanoparticles." *Langmuir* 30, no. 50 (December 23, 2014): 15057–71.
 17. Roca, A G, R Costo, A F Rebolledo, S Veintemillas-Verdaguer, P Tartaj, T González-Carreño, M P Morales, and C J Serna. "Progress in the Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine." *Journal of Physics D: Applied Physics* 42, no. 22 (November 21, 2009): 224002.
 18. Murray, Cbea, David J. Norris, and Mounji G. Bawendi. "Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E= Sulfur, Selenium, Tellurium) Semiconductor Nanocrystallites." *Journal of the American Chemical Society* 115, no. 19 (1993): 8706–15.
 19. LaMer, Victor K., and Robert H. Dinegar. "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols." *Journal of the American Chemical Society* 72, no. 11 (1950): 4847–54.