



## Trabajo Fin de Máster

### **Química click bioortogonal como herramienta para la inmovilización de nanopartículas magnéticas en superficies**

**Bioorthogonal click chemistry as a tool for the  
surface immobilization of magnetic nanoparticles**

Autor

Marcos Navascuez Lominchar

Director

Raluca María Fratila

Escuela de Ingeniería y Arquitectura  
2016





DECLARACIÓN DE  
AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

(Este documento debe acompañar al Trabajo Fin de Grado (TFG)/Trabajo Fin de Máster (TFM) cuando sea depositado para su evaluación).

D./Dña. Marcos Navascuez Lominchar,

con nº de DNI 73015616T en aplicación de lo dispuesto en el art. 14 (Derechos de autor) del Acuerdo de 11 de septiembre de 2014, del Consejo de Gobierno, por el que se aprueba el Reglamento de los TFG y TFM de la Universidad de Zaragoza,

Declaro que el presente Trabajo de Fin de (Grado/Máster) Máster en Ingeniería Biomédica, (Título del Trabajo) "Química click bioortogonal como herramienta para la inmovilización de nanopartículas magnéticas en superficies"

"Bioorthogonal click chemistry as a tool for the surface immobilization of magnetic nanoparticles"

es de mi autoría y es original, no habiéndose utilizado fuente sin ser citada debidamente.

Zaragoza, 23/06/2016

Fdo: Marcos Navascuez Lominchar



## AGRADECIMIENTOS

Este es el momento que todos los que nos embarcamos en estudios de carrera y máster estamos esperando. Más en mi caso porque pongo fin a una etapa genial de mi vida y, aunque no soy muy dado expresar sentimientos y agradecimientos, creo que la ocasión lo merece.

En primer lugar tengo que agradecerle Jesús Martínez de la Fuente que haya apostado por mí para formar parte de este grupo y el trato y ayuda recibidos durante toda mi estancia.

En segundo lugar, tengo muchísimo que agradecer a mi directora Raluca Fratila. Podría escribir muchas líneas hablando de lo bien que te has portado; de la genial acogida cuando no conocía nada del funcionamiento del grupo, de tratarme como un igual a la hora de consultar dudas sobre nuestro proyecto, de ser exigente pero comprensiva al mismo tiempo, de continuar ayudándome en la búsqueda de horizontes futuros y un sinfín de etcéteras que hacen muy difícil que pueda encontrar una persona con la que se me haga tan fácil y llevadero el trabajo como contigo. Porque empezaste siendo mi directora pero has acabado siendo una verdadera amiga.

Un párrafo especial merece también la genial Vanessa Herrero (pero sólo porque así me gano yo un espacio en tu tesis que sino... nada :P). Gracias por ayudarme con las tareas más cotidianas, por las infinitas determinaciones de Fe que te he encasquetao, por nuestras bromas y peleas siempre entre risas y por preocuparte todos los días por mi bienestar tanto dentro como fuera del labo. Te echaré mucho de menos pero allí donde esté siempre tendré un hueco en mi agenda para meterme contigo ☺ jajaja.

Como no podía ser de otra manera tengo que agradecer a todo el grupo NAP su acogida, las cenas y cafés, los futbolines... y en definitiva haberme hecho pasar un año tan bueno aquí. En especial a esos becarios con despacho-poyata en el labo con los que me he reído muchísimo y con los que espero conservar la amistad porque me han demostrado ser gente que vale la pena.

Además, quería agradecer a mis amigos de “La Campana” y de “La Salchicha” con los que he pasado tan buenos y malos ratos y sobre todo con los que procuro pasar la mayor parte del tiempo libre que tengo porque ya son muchos los años y ANÉCDOTAS que tenemos juntos.

A todos mis compañeros del Máster de Ingeniería Biomédica y del Grado en Química que han pasado las mismas penurias que yo para salir adelante pero que siempre acababan con una borrachera legendaria y un sinfín de anécdotas para aliviar las penas.

Por último quería agradecerles a mis padres y a mi hermano toda la confianza que siempre han depositado en mí y toda la ayuda en los momentos complicados, y más especialmente, durante este año. A mi padre, que a pesar de estar muy liado con sus estudios siempre saca un hueco para preguntarme por los míos y escuchar mis sermones aunque no se esté enterando de la mitad. A mi hermano, porque aunque muchas veces acabes sacándome de quicio eres alguien en quien siempre se puede confiar y con el que no paro de reírme.

Mención especial para mi madre, esa heroína silenciosa, que es capaz de sacrificar todo el tiempo que tiene, y el que no también, porque podamos estudiar. Gracias por ordenar mi cuarto, escuchar mis problemas, opinar aunque no me guste lo que piensas, aguantarme en mis días malos y mis mil enfermedades y, en definitiva, GRACIAS POR HACERNOS FELICES.



## RESUMEN

La nanotecnología es un campo en continua expansión que se ha ido diversificando para poder dar soluciones a problemas de la vida diaria. Dentro de estas nuevas ramas de conocimiento se encuentra la nanobiomedicina y este trabajo se ha centrado más específicamente en las aplicaciones de las nanopartículas magnéticas en medicina. Concretamente se ha planteado el uso de la reacción “click” bioortogonal entre azidas y alquinos tensionados para inmovilizar nanopartículas magnéticas en superficies.

Este Trabajo Fin de Máster 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 y superficies. La síntesis se ha llevado a cabo por descomposición térmica de  $Fe(acac)_3$  obteniendo nanopartículas de 12 nm de diámetro medio que posteriormente se han transferido a medio acuoso mediante recubrimiento con un polímero anfifílico (poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno, PMAO). Posteriormente se ha llevado a cabo la estabilización estérica de las nanopartículas con dos moléculas voluminosas distintas (polietilenglicol y glucosa) y su funcionalización con dos alquinos cíclicos de diferente longitud de cadena espaciadora.

Para comprobar la viabilidad de la reacción *click* se han inmovilizado las nanopartículas funcionalizadas con alquinos sobre superficies modificadas con grupos azida, pudiéndose comprobar por microscopía electrónica de barrido (SEM) la unión covalente de las nanopartículas a la superficie.

Estos prometedores resultados van a permitir la continuación de la investigación con este tipo de nanopartículas sobre superficies más complejas (por ejemplo membranas celulares) con el objetivo de realizar futuros estudios de hipertermia magnética en células tumorales.



## **LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

**NPs:** nanopartículas

**MNPs:** nanopartículas magnéticas

**PMAO:** poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)

**TAMRA:** tetrametilrodamina-cadaverina

**PEG:** polietilenglicol ( $\text{NH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_{16}\text{-OCH}_3$ )

**GLU:** 4-Aminofenil  $\beta$ -D-glucopiranósido

**A1:** 2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxi)etanamina (ciclooctino de cadena corta)

**A2:** 2-(2-(2-(ciclooct-2-in-1-iloxi)etoxi)etoxi)etanamina (ciclooctino de cadena larga)

**EDC:** 1-étil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**SSB:** tetraborato de sodio

**DBCO:** dibenzociclooctinil-PEG<sub>4</sub>-5/6-sulfurodamina

**TEM:** Microscopía Electrónica de Transmisión

**SEM:** Microscopía Electrónica de Barrido

**TGA:** Análisis termogravimétrico

**XPS:** Espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X

**DLS:** Dispersión dinámica de la luz



# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Nanotecnología.....	1
1.2. Nanobiomedicina .....	1
1.3. Nanopartículas magnéticas: propiedades y aplicaciones.....	2
2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO.....	3
2.1. Hipertermia Magnética .....	3
2.2. Química click bioortogonal para la inmovilización de las nanopartículas en superficies.....	3
3. OBJETIVOS .....	5
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	6
4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas .....	6
4.1.1. Síntesis de nanopartículas hidrofóbicas .....	6
4.1.2. Caracterización de nanopartículas hidrofóbicas .....	6
4.1.3. Transferencia de nanopartículas hidrofóbicas a medio acuoso .....	7
4.1.4. Caracterización de nanopartículas hidrofílicas .....	9
4.2. Estabilización de NPs@PMAO-TAMRA mediante repulsión estérica .....	10
4.2.1. Justificación metodológica .....	10
4.2.2. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con polietilenglicol (PEG)...	10
4.2.3. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con glucosa (GLU).....	11
4.3. Funcionalización de NPs estabilizadas con alquinos tensionados .....	11
4.3.1. Justificación metodológica .....	11
4.3.2. Funcionalización de NPs-estabilizadas con ciclooctino .....	12
4.4. Caracterización comparativa de las nanopartículas (NPs / NPs@PEG / NPs@PEG@A <sub>1,2</sub> / NPs@GLU / NPs@GLU@A <sub>1,2</sub> ) .....	12
4.5. Caracterización por ensayo indirecto: inmovilización de NP@Alquino sobre sustratos funcionalizados con azida	
4.5.1. Justificación metodológica .....	13
4.5.2. Activación y funcionalización de superficies de sílica .....	17
4.5.3. Ensayo de inmovilización mediante química click de las NPs en superficie.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
5.1. Síntesis de nanopartículas en medio orgánico .....	20
5.1.1. Síntesis de MNPs de 6 nm de diámetro .....	20
5.1.2. Recrecimiento de 6 nm a 12 nm .....	20
5.2. Transferencia a agua .....	21

5.3. Ruta de NP@PEG .....	22
5.3.1. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con polietilenglicol (PEG)...	22
5.3.2. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA@PEG con ciclooctino.....	22
5.4. Ruta de NP@GLUCOSA .....	23
5.4.1. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con NH <sub>2</sub> -Glucosa.....	23
5.4.2. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA@Glucosa con ciclooctino..	23
5.5. Funcionalización de superficies de sílica con grupos azida (N <sub>3</sub> ).....	24
 6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN .....	25
6.1. Determinación de Fe .....	25
6.2. Electroforesis en Gel de Agarosa .....	25
6.3. Análisis Termogravimétrico (TGA) .....	26
6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	26
6.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	26
6.6. Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	27
6.7. Potencial Z .....	27
6.8. Espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X (XPS) .....	27
 7. CONCLUSIONES .....	28
 8. BIBLIOGRAFÍA .....	29
 9. ANEXOS.....	31



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Nanotecnología

La definición convencional de la nanotecnología según la NNI (Iniciativa Nacional en Nanotecnología de los Estados Unidos) la describe como “la ciencia, ingeniería y tecnología llevadas a cabo en la nano escala, que a su vez se define entre 1 y 100 nm”. [1]

El término nano equivale en la escala métrica a  $10^{-9}$  m y en los materiales que se encuentran en este rango de tamaños unas de las características más importantes son la gran área superficial en relación a su volumen y su capacidad de interactuar con fenómenos físicos luminosos con longitudes de onda que se encuentran en la misma escala de tamaño. Son estas y otras características, debidas a operar en ese rango dimensional, las que hacen que aparezcan fenómenos nuevos, capaces de sustentar nuevas propiedades. [2] Estas nuevas propiedades (ópticas, químicas, magnéticas o electrónicas) son únicas y diferentes a las del mismo material a escala macroscópica. Todo ello ha generado un nuevo campo de estudio en la ciencia de materiales dedicado al diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras, así como al estudio de las relaciones existentes entre las propiedades y las dimensiones de nanométricas. [3, 4]

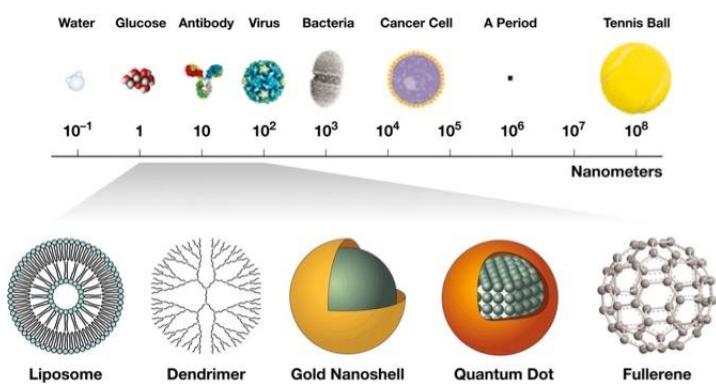


Figura 1. Escala nanométrica.  
<https://ocg.cancer.gov/news-publications/e-newsletter-issue/issue- 11>

Hoy en día, la nanotecnología es una de las áreas de investigación más prometedoras del siglo XXI, y es la gran variedad de propiedades de los nanomateriales lo que está favoreciendo su utilización en diversos campos entre los que se encuentra la medicina, hasta el punto de originar una nueva disciplina: la Nanobiomedicina.

## 1.2 Nanobiomedicina

La nanobiomedicina es la rama de la medicina que utiliza materiales de tamaño nanométrico para el diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades con la finalidad de mejorar la calidad de vida. [5]

La principal ventaja que presenta este tipo de materiales para su uso en medicina es que debido a su pequeño tamaño, similar al de la mayoría de biomoléculas, son capaces de interactuar de forma más eficiente con las células del organismo. Esto permite aumentar drásticamente la selectividad y la actividad de los materiales utilizados actualmente en el

campo de la terapia. Además, posibilita interacciones más específicas entre las biomoléculas y el material permitiendo usarlos en el campo del diagnóstico clínico.

Los nanomateriales pueden introducir mejoras en estas áreas y se están utilizando en técnicas analíticas o de imagen, en la vectorización y liberación de fármacos, en aplicaciones conjuntas de tratamiento e imagen (agentes teragnósticos) o en aplicaciones de regeneración tisular. [6]

### 1.3 Nanopartículas magnéticas: propiedades y aplicaciones

Las nanopartículas (NPs) magnéticas poseen algunas propiedades únicas con respecto al resto de nanomateriales, siendo la más importante su capacidad de interactuar con 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 ( $\gamma-Fe_2O_3$ ), y dependiendo de las condiciones de síntesis, se puede obtener un amplio espectro de tamaños y formas. Además, debido a que los medios fisiológicos son sumamente complejos ya que tienen una gran cantidad de componentes que pueden desestabilizar las nanopartículas y causar su agregación, se pueden incorporar diferentes recubrimientos que permitan dotar de estabilidad a las NPs en medio fisiológico.

Una propiedad específica de este tipo de nanomateriales es el superparamagnetismo. Esta propiedad consiste en que en presencia de un campo magnético externo las NPs sufren una elevada imanación pero no muestran remanencia cuando éste se retira. Esta propiedad no es exclusiva de las NPs magnéticas ya que hay materiales que pueden presentar superparamagnetismo a muy bajas temperaturas pero sí que es exclusivo de las NPs el superparamagnetismo a temperatura ambiente. [7, 8, 9]

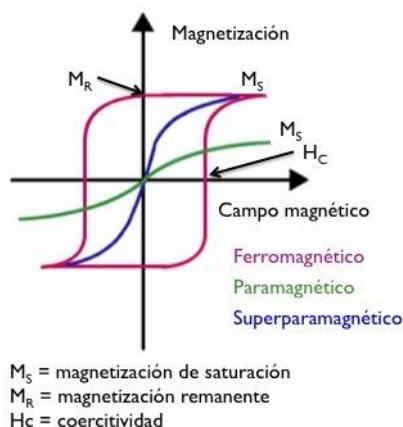


Figura 2. Comparación de ciclos de histéresis de materiales magnéticos.

Por lo tanto, 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. [10]

Algunas de las principales aplicaciones de las NPs magnéticas son el uso como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI), [7, 11] tratamientos tumorales mediante hipertermia magnética, [12] su uso como biosensores [13] o la liberación controlada de fármacos. [6]

## 2. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO

### 2.1. Hipertermia magnética

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, por ello, la hipertermia puede ser utilizada para el tratamiento del cáncer o como terapia complementaria a la quimioterapia, la radioterapia y la terapia génica, ya que al aumentar la temperatura se puede conseguir la muerte de las células tumorales sin afectar a las sanas. [12] 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 a través del tejido. Sin embargo, las NPs magnéticas pueden ser funcionalizadas con moléculas de reconocimiento, como ligandos específicos de las células tumorales, u otras que las doten de estabilidad sin perder su capacidad superparamagnética.

La hipertermia magnética utiliza la capacidad de las NPs magnéticas de generar calor cuando están expuestas a campos magnéticos alternos. Esta capacidad de calentamiento se debe principalmente a dos fenómenos físicos: relajación de Neel y relajación de Brown. La relajación de Neel 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 física 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 de tal forma que la rotación física dentro del líquido transportador permite que se dé la alineación generando calor por fricción en el proceso. [9]

Actualmente 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. [9, 14]

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 debido a los mecanismos celulares de homeostasis que tratan de restringir la movilidad interna de las NPs. 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. [8]

En este trabajo se han sintetizado nanopartículas magnéticas con unas características morfológicas, composicionales y de tamaño óptimas para poder realizar ensayos de hipertermia en células en el futuro. Por ello se ha tenido en cuenta en todo momento el tipo de medio en el que se iba a realizar dicho estudio así como las características físico-químicas que debería tener el recubrimiento superficial de las NPs.

### 2.2. Química *click* bioortogonal para la inmovilización de las nanopartículas en superficies

Las reacciones de **química bioortogonal** consisten en la unión entre un marcador químico incorporado a la célula y una molécula suministrada de forma exógena. En primer lugar es necesaria la incorporación de un marcador o grupo funcional concreto en la biomolécula a

estudiar usando la propia maquinaria biosintética de la célula. En segundo lugar, hay que suministrar externamente otra molécula, marcador químico específico, que reaccione con ésta formando un enlace covalente. Este marcador externo normalmente tiene un tamaño pequeño respecto a la molécula original, por lo que no se modifica sensiblemente su estructura ni su funcionalidad, pero la hace detectable por el marcador celular. [15]

El marcaje covalente selectivo de biomoléculas, especialmente en células y tejidos vivos, no es una tarea fácil. Esto es debido a que el medio biológico está repleto de grupos funcionales que pueden interferir con la reacción deseada ( $\text{NH}_2$  y  $\text{SH}$ ) y a que los reactivos utilizados en reacciones bioortogonales deben ser estables, no tóxicos, compatibles con reacciones redox y reaccionar entre sí en este tipo de medios. [15, 16, 17]

Una de las muchas reacciones dentro del campo de la química orgánica son las denominadas **reacciones click**. El término “click” es un concepto utilizado para describir una reacción química fiable y rápida mediante la unión de pequeñas moléculas entre sí.

La cicloadición [3+2] entre azidas y alquinos catalizada por Cu(I) (CuAAC), es uno de los ejemplos más representativos de reacción “click” y proporciona de forma selectiva 1,4-triazoles químicamente muy estables. [18] 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. Sin embargo, el efecto citotóxico del cobre hace difícil utilizar este tipo de química en presencia de células vivas. 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. [19, 20]

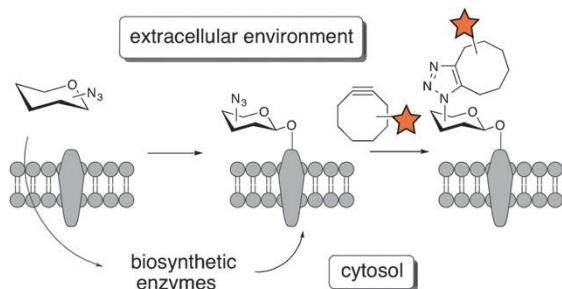


Figura 3. Esquema de reacción click bioortogonal de azido-azúcares de la membrana plasmática con ciclooctino como marcador. Los azido-azúcares son metabolizados por la célula e incorporados a las glicoproteínas de la superficie celular. Los grupos azida de las glicoproteínas de superficie reaccionan con un ciclooctino conjugado con un marcador externo concreto. [17]

A pesar de su potencialidad en campos como la biología y la bioquímica, el uso de la química “click” bioortogonal para unir de manera covalente nanomateriales a membranas celulares apenas se ha explorado hasta la fecha. Actualmente, en el grupo de investigación donde se ha realizado este Trabajo Fin de Máster se ha planteado el uso de química click bioortogonal como herramienta para la inmovilización de NPs en la superficie de células vivas. (Figura 4)

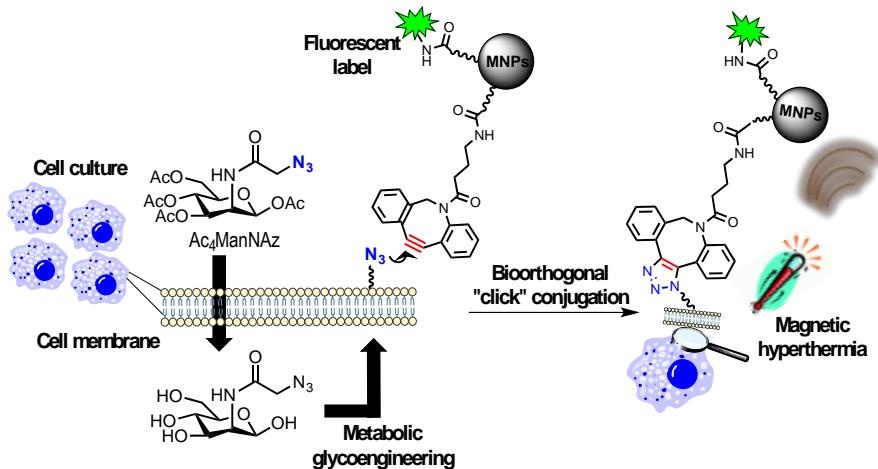


Figura 4. Unión covalente de NPs magnéticas a la superficie de membranas celulares mediante química “click” bioortogonal.

El objetivo a largo plazo en el que está enfocado este trabajo es un estudio comparativo de la hipertermia magnética en el interior celular frente a la hipertermia producida por NPs unidas externamente a la membrana. 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**.

Debido a la complejidad y duración del proyecto este Trabajo Fin de Máster se ha centrado únicamente en la incorporación de las moléculas de ciclooctino a las NPs y la posterior inmovilización de éstas sobre superficies funcionalizadas con grupos azida.

### 3. OBJETIVOS

El objetivo del proyecto es la funcionalización de nanopartículas magnéticas (MNPs) con alquinos tensionados para aplicaciones en química click bioortogonal. De esta manera, las MNPs se podrían inmovilizar de manera covalente en superficies y membranas celulares funcionalizadas con grupos azida utilizando una reacción *click* bioortogonal (cicloadición alquino-azida libre de cobre). Para ello, se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Síntesis de las MNPs mediante el método de descomposición térmica de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ .
2. Recubrimiento con un polímero anfifílico, el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO), para asegurar su estabilidad coloidal en agua e introducir grupos funcionales.
3. Funcionalización de las MNPs con polietilenglicol (PEG), glucosa (GLU) y dos tipos de alquinos tensionados (A1 y A2).
4. Caracterización físico-química de las MNPs y evaluación de su estabilidad coloidal utilizando las técnicas habituales (TEM, DLS, TGA, etc.).
5. Ensayo de reacción *click* en superficies marcadas con grupos azida.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Síntesis y caracterización de nanopartículas

#### 4.1.1 Síntesis de nanopartículas hidrofóbicas

Actualmente existen dos métodos principales de síntesis de nanopartículas magnéticas para aplicaciones biomédicas: coprecipitación y descomposición térmica.

El primero de ellos aporta como principales ventajas su simplicidad, versatilidad y la capacidad de obtención de nanopartículas a gran escala que posean carácter hidrofílico lo que aporta estabilidad en medios acuosos. A pesar de esto, presenta algunos factores limitantes como son: la amplia distribución de tamaños, el difícil control de la forma y la baja cristalinidad. [19] Por otro lado, el método de descomposición térmica requiere montajes más complejos y genera NPs hidrofóbicas por lo que es necesaria una etapa adicional de transferencia de las NPs a agua. Sin embargo, permite ejercer un gran control sobre el tamaño y la monodispersidad de las nanopartículas, así como obtener una buena cristalinidad. [21, 22]

Teniendo en cuenta que el objetivo final de estas nanopartículas es su utilización en estudios de hipertermia magnética resulta fundamental tener una elevada cristalinidad ya que esto repercute en las propiedades magnéticas de las mismas (especialmente en la capacidad de generar calor por hipertermia). Es por esto que hemos elegido el método de síntesis por descomposición térmica.

La síntesis por descomposición térmica consiste en la descomposición de complejos de hierro a altas temperaturas en presencia de un surfactante, ambos disueltos en un medio orgánico de elevado punto de ebullición. El hecho de que las NPs obtenidas sean uniformes en tamaño se debe a las etapas de nucleación y crecimiento y se ajusta al mecanismo propuesto por LaMer. [23] Las NPs limitan el tamaño obtenido en función de los surfactantes y su capacidad de coordinación con los núcleos por lo que en una primera etapa se obtienen unas NPs de 6 nm de diámetro medio.

Como las NPs más grandes mejoran sus propiedades magnéticas, fundamental en aplicaciones de hipertermia, [24] se realizó un crecimiento de la misma manera que en la síntesis de las NPs de 6 nm de diámetro pero utilizando éstas como “semillas” con el objetivo de obtener NPs de 12 nm de diámetro. Esto es posible ya que el surfactante no se une covalentemente a las NPs permitiendo su desprendimiento de las mismas a elevadas temperaturas y posterior readsorción tras el crecimiento. [22]

#### 4.1.2 Caracterización de nanopartículas hidrofóbicas

La caracterización que resulta especialmente relevante teniendo en cuenta la finalidad del material es la de la forma, el tamaño y la homogeneidad de las nanopartículas. La Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM, por sus siglas en inglés) permite obtener imágenes de la muestra útiles para observar su morfología y para obtener su distribución de tamaños.

En la *Figura 5* se observa que tanto las semillas (izquierda) como las NPs obtenidas tras la etapa de crecimiento (derecha) poseen geometría esférica (imagen de TEM) y un diámetro medio de  $6.41 \pm 1.11$  nm y  $11.31 \pm 1.41$  nm, respectivamente (histograma de tamaños). La distribución de tamaños y los rangos de desviación estándar entran dentro de lo esperado en este tipo de síntesis por lo que se puede confirmar que las NPs sintetizadas son de un solo tipo y presentan homogeneidad de tamaño.

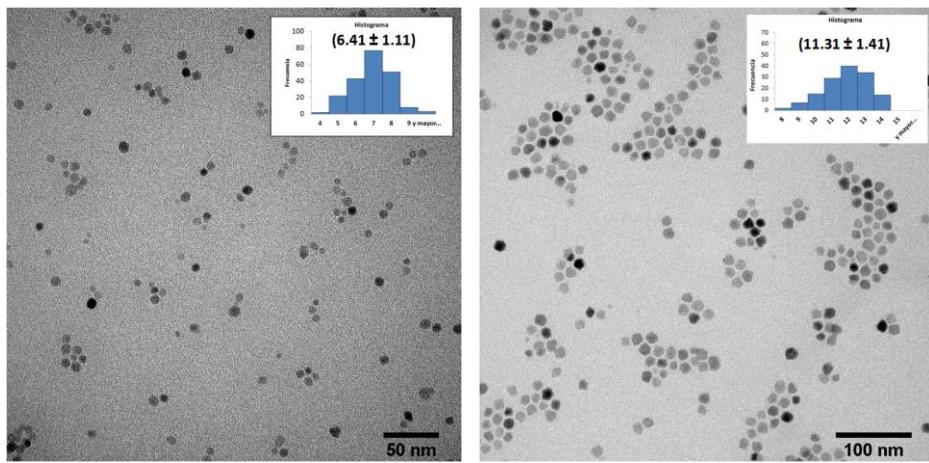


Figura 5. Micrografías de TEM de las NPs de 6 nm (izquierda, escala = 50 nm) y de 12 nm (derecha, escala = 100 nm) en hexano junto con sus histograma de tamaños (expresado en nm).

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 puede observar en la Figura 6 las primeras pérdidas de masa no comienzan hasta los 200 °C de temperatura lo que indica que 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 (7.34 %) que corresponde a la capa orgánica de ácido oleico.

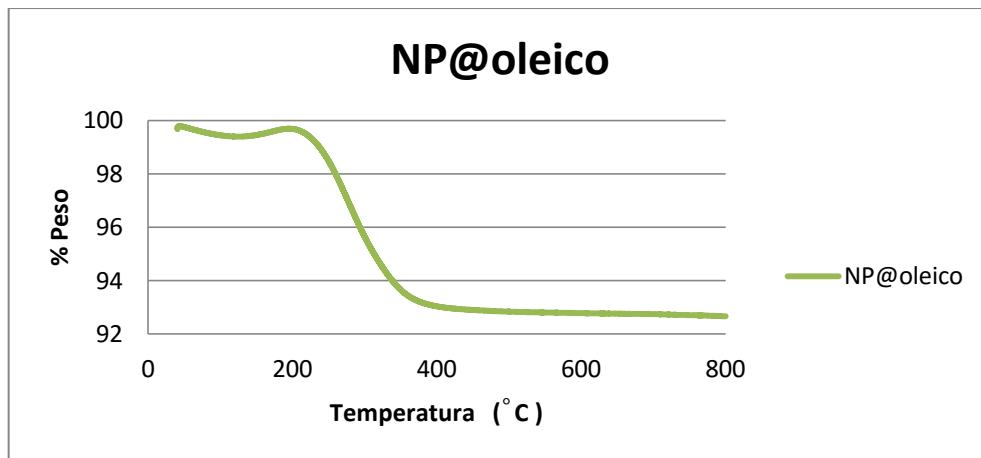


Figura 6. Termograma de las NPs de 12 nm en hexano. Representa la pérdida de peso (%) en función de la temperatura (°C).

#### 4.1.3 Transferencia de las nanopartículas hidrofóbicas a medio acuoso

La principal desventaja del método de síntesis por descomposición térmica es que las NPs que se obtienen son insolubles en agua, con lo cual para poder emplearlos en aplicaciones biológicas es necesario realizar una transferencia a medio acuoso. Para poder realizar esta transferencia de las NPs a agua se ha incorporado un polímero anfifílico, capaz de dotar de estabilidad a las NPs en medio acuoso y presentar además grupos reactivos en la superficie. Este polímero es el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) conocido como PMAO.

Debido a que uno de los objetivos del proyecto es la unión covalente de estas nanopartículas a diferentes membranas se hace necesario introducir un marcador fluorescente que nos permita visualizar las NPs en el medio. Por lo tanto, previamente al recubrimiento con el polímero fue necesaria la incorporación de una molécula fluorescente derivada de la tetrametilrodamina que presenta una coloración fluorescente roja denominada TAMRA-cadaverina.

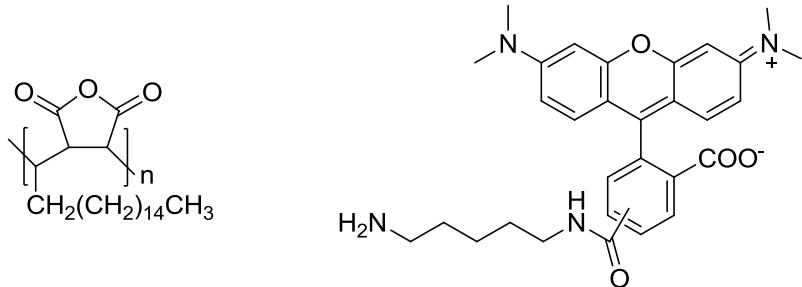


Figura 7. Estructura química del PMAO (Izquierda) y de la TAMRA-cadaverina (Derecha).

La TAMRA-cadaverina se une covalentemente al PMAO mediante apertura nucleófila de una pequeña cantidad de los grupos de anhídrido maleico presentes, consiguiendo obtener finalmente entorno al 1% de recubrimiento de los grupos carboxílicos del PMAO (suficiente para observar fluorescencia).

Una vez producido el marcate del polímero se procedió al recubrimiento de las NPs con el mismo. Su parte hidrófoba tiene cadenas alifáticas de 18 átomos de carbono que se intercalan mediante interacciones hidrofóbicas con las cadenas de ácido oleico de las NPs. A pesar de que la interacción hidrofóbica entre las cadenas alifáticas es débil, 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 carboxílicos ( $-\text{COOH}$ ) tras su hidrólisis con  $\text{NaOH}$  [2, 22, 25].

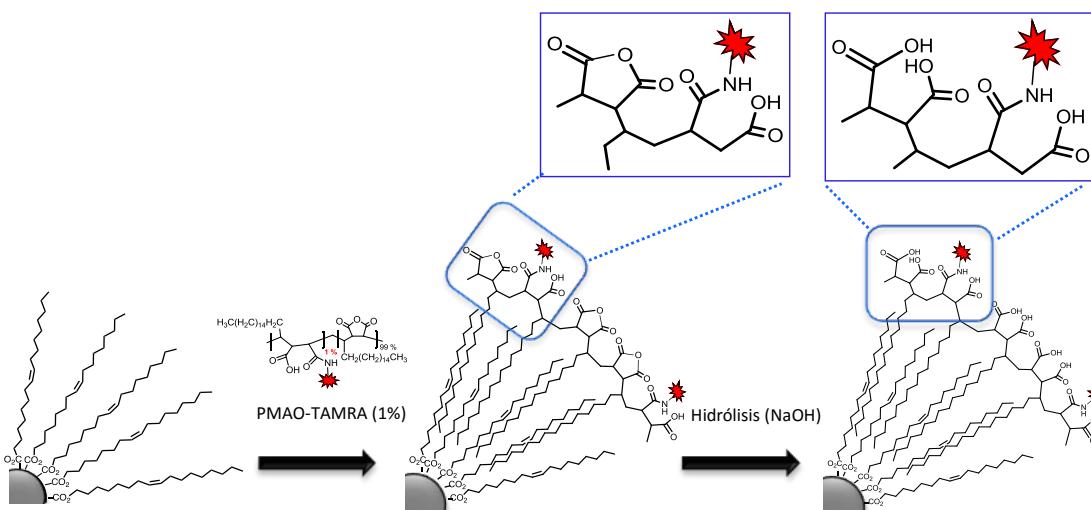


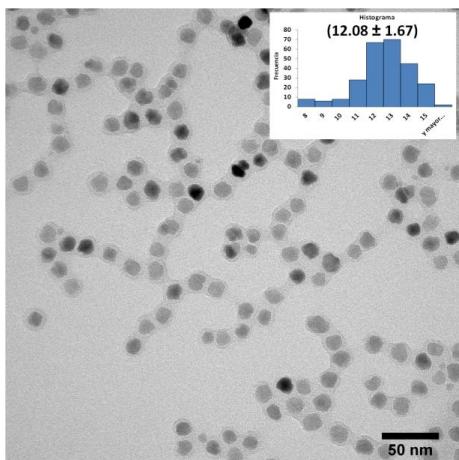
Figura 8: De izquierda a derecha podemos observar las dos etapas del recubrimiento: 1) Funcionalización de las NPs con PMAO-TAMRA; 2) Hidrólisis de los anhídridos con  $\text{NaOH}$  0.1 M. [25]

Este paso de hidrólisis es crítico para asegurar la estabilidad de las NPs en agua, y genera dos grupos  $-\text{COOH}$  por cada unidad monomérica de anhídrido maleico.

#### 4.1.4 Caracterización de nanopartículas hidrofílicas

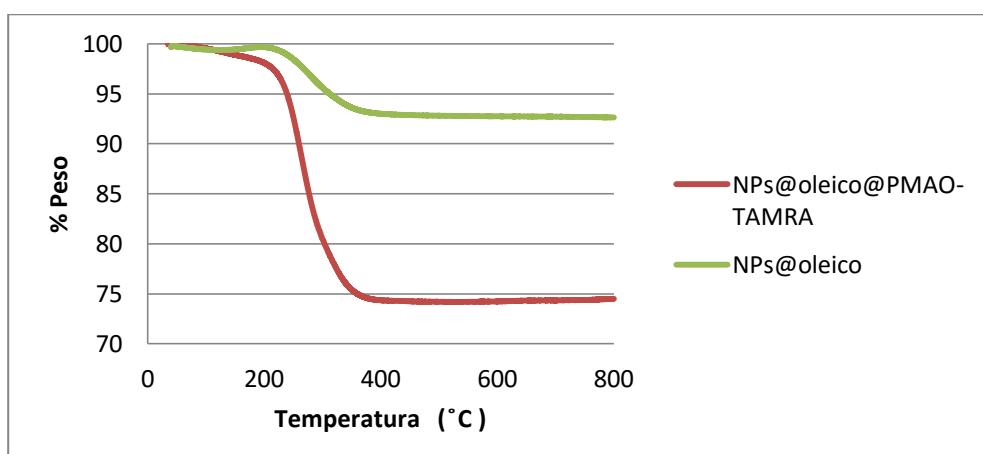
De igual forma que en el apartado anterior una primera forma de caracterización es la Microscopía de Transmisión de Electrones (TEM) que nos permite comprobar que se mantiene la morfología y la distribución de tamaños.

La *Figura 9* muestra una micrografía de TEM de las NPs recubiertas con PMAO-TAMRA. Se puede apreciar que se mantienen tanto la geometría esférica como el tamaño de las NPs, con un diámetro medio de  $12.09 \pm 1.67$  nm (histograma de tamaños). Además, también se observa el recubrimiento de polímero individual (gris difuminado) como una sola capa entre los núcleos inorgánicos (color gris-negro oscuro). La distribución de tamaños y los rangos de desviación estándar son casi idénticos a los del recrecimiento (**apartado 4.1.2**) confirmando la homogeneidad de tamaños.



*Figura 9. Micrografía de TEM de las NPs de en agua (escala = 50 nm) y su correspondiente histograma de tamaños (expresado en nm).*

El análisis termogravimétrico (TGA) de la muestra permite distinguir entre los dos tipos de recubrimiento orgánico de las NPs. Como se puede observar en la *Figura 10* las pérdidas de masa que comienzan a los 200 °C de NPs@PMAO-TAMRA corresponden a la pérdida total de materia orgánica, sin distinciones. Sin embargo, se puede calcular la masa de PMAO-TAMRA perdida teniendo en cuenta el análisis TGA anterior que mostraba que un 7.34 % de la masa corresponde al ácido oleico y por lo tanto el resto de la masa corresponderá a la capa orgánica de PMAO-TAMRA (18.18 %).



*Figura 10. Termograma de las NPs de 12 nm en agua. Representa la pérdida de peso (%) en función de la temperatura (°C).*

## 4.2 Estabilización de NPs@PMAO-TAMRA mediante repulsión estérica

### 4.2.1 Justificación metodológica

El objetivo final de las NPs sintetizadas es realizar estudios de hipertermia magnética en células. Para ello es necesario:

- 1) Incorporar un grupo alquino que posibilite la reacción *click* en superficie.
- 2) Mantener la estabilidad de las NPs para que no agreguen a pH fisiológico.

Tal como se muestra en el **apartado 4.1.3** (*Figura 8*) la estabilidad de las NPs tras el recubrimiento con el polímero PMAO se debe a la repulsión electroestática entre las cargas negativas de los grupos carboxílicos ( $-\text{COO}^-$ ) de la superficie, que están desprotonados al pH del medio celular ( $\text{pH} \approx 7$ ).

El problema de la estabilización por repulsiones electroestáticas es que los únicos grupos reactivos presentes en la superficie de las nanopartículas, los grupos carboxílicos ( $-\text{COO}^-$ ), son también los que proporcionan la estabilidad a la NP por lo que si se quieren incorporar otras moléculas a la superficie se puede llegar a comprometer la estabilidad del conjunto.

Inicialmente se trató de funcionalizar con alquino sólo un pequeño porcentaje de los grupos carboxílicos (5 % y 10 %). El resultado fue, en ambos casos, la agregación de las NPs debido a que la funcionalización de los grupos carboxílicos ( $-\text{COO}^-$ ) de la superficie con una molécula de alquino reduce el número de grupos  $\text{COO}^-$  libres y la carga eléctrica neta se ve reducida comprometiendo la estabilidad de las NPs.

Por este motivo se planteó la posibilidad de incrementar la estabilidad estérica (introducir grupos químicos voluminosos que actúan como separadores impidiendo la agregación) [2] de manera previa a la funcionalización con la molécula de alquino. La reacción necesaria para introducir estos grupos voluminosos también compromete parte de los grupos carboxílicos por lo que veremos reducida la carga neta de la NP y el número de carboxilos libres susceptibles de reaccionar en la etapa posterior con el alquino.

Teniendo en cuenta los objetivos y las futuras aplicaciones *in vitro* de las NPs se optó por funcionalizar las NPs con dos moléculas voluminosas diferentes: polietilenglicol y glucosa.

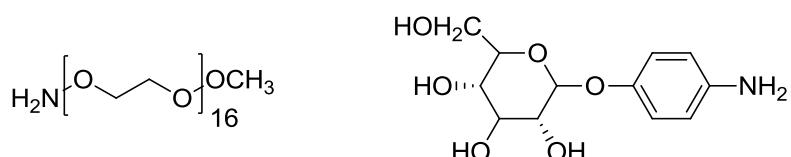


Figura 11. De izquierda a derecha se muestran las estructuras químicas de las moléculas de polietilenglicol (PEG) y 4-Aminofenil  $\beta$ -D-glucopiranósido (glucosa).

### 4.2.2 Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con polietilenglicol (PEG)

El polietilenglicol es un polímero biocompatible y muy versátil. Existen una inmensa variedad de tipos de PEG en función de los grupos químicos presentes en sus extremos terminales y de la longitud de su cadena hidrocarbonada ( $\text{OCH}_2\text{CH}_2$ )<sub>n</sub>. Además, se trata de una molécula no reconocida por los receptores de la membrana celular lo que favorece la no internalización de las NPs@PEG facilitando la reacción *click* en la membrana. Esto permitiría

realizar estudios de hipertermia con NPs unidas covalentemente a la membrana pero dispuestas en el exterior celular.

La molécula de PEG elegida para este trabajo es  $\text{NH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_{16}\text{OCH}_3$  (MW: 750 g/mol, *Figura 11*) que cuenta con un grupo amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) que es el que se une directamente al grupo carboxílico (-COOH) de la NP mediante la formación de un enlace peptídico (-CO-NH-). Además, posee una cadena hidrocarbonada con 16 unidades repetitivas de -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- que actúa como espaciador y es suficiente para impedir la agregación de las NPs.

#### 4.2.3 Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con glucosa (GLU)

La glucosa es un carbohidrato natural, presente en gran cantidad de organismos, que es utilizado por la célula como fuente de energía fundamental. Debido a estas características se ha planteado como alternativa al PEG ya que además de incrementar la estabilidad es capaz de favorecer la internalización celular al existir un gran número de proteínas de reconocimiento celular de esta molécula en la membrana. [26] Esto permitiría realizar estudios de hipertermia con NPs ya internalizadas en la célula y comprobar de esta manera si existen diferencias entre ambos procesos de hipertermia magnética.

Para este trabajo se ha elegido un derivado de glucosa (4-aminofenil  $\beta$ -D-glucopiranósido, *Figura 11*) que, al igual que el PEG, cuenta con un grupo amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) que se empleará para su unión al grupo carboxílico (-COOH) de la NP mediante la formación de un enlace peptídico (-CO-NH-). Esta molécula no es tan voluminosa como el PEG pero es lo suficientemente grande como para impedir la agregación de las NPs.

### 4.3 Funcionalización de NPs estabilizadas con alquinos tensionados

#### 4.3.1 Justificación metodológica

Una vez conseguida la estabilidad coloidal de las NPs mediante repulsiones estéricas es necesario incorporar la molécula que nos permita llevar a cabo la reacción *click* sobre las diferentes superficies. La reacción conocida como *click bioortogonal* consiste en una cicloadición [3+2] entre un alquino cíclico tensionado y una azida. [15, 16, 27] En este proyecto se ha tratado de incorporar la molécula de alquino en la nanopartícula y el grupo azida sobre las superficies. Esto es debido a que los estudios a realizar están basados en la incorporación de grupos azida en la membrana plasmática celular para la unión covalente de las NPs funcionalizadas con alquinos.

Teniendo en cuenta que para la unión entre la NP y la superficie basta con que se produzca un solo enlace *click* no es necesario contar con una gran cantidad de moléculas de alquino recubriendo las NPs sino conseguir funcionalizar un pequeño porcentaje de los carboxilos que aún queden libres tras la estabilización. De nuevo, la reacción química que se produce es la unión peptídica entre el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) del ciclooctino y los grupos carboxilo (-COOH) libres presentes en la superficie de las NPs.

Por otro lado, teniendo en cuenta que los recubrimientos para la estabilización estérica se han hecho con moléculas muy voluminosas, se va a realizar un estudio comparativo de cómo afecta la longitud de la cadena unida al alquino en esta reacción. Para ello se han utilizado dos moléculas de alquino cíclico (ciclooctino) con diferente longitud de la cadena separadora obteniéndose dos tipos distintos de NPs fluorescentes con un alquino cíclico en el extremo

accesible que es, por tanto, susceptible de reaccionar con azidas a través de una reacción *click bioortogonal*. En esta etapa plantea funcionalizar un 10 % del total de los grupos carboxilo presentes con la molécula de ciclooctino.

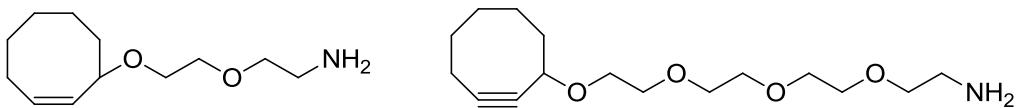


Figura 12. A la izquierda se muestra la estructura química del 2-(2-(cyclooct-2-in-1-oxi)ethoxy)ethanamina (ciclooctino de cadena corta, A1) y a la derecha la estructura química del 2-(2-(2-(cyclooct-2-in-1-oxi)ethoxy)ethoxy)ethanamina (ciclooctino de cadena larga, A2).

#### 4.3.2 Funcionalización de NPs-estabilizadas con ciclooctino

El ciclooctino de cadena corta (A1), 2-(2-(cyclooct-2-in-1-oxi)ethoxy)ethanamina, tiene un carácter más hidrofóbico debido a la presencia de grupos alquílicos ( $-\text{CH}_2-$ ) y a la corta cadena con grupos éter ( $-\text{O}-$ ) más susceptibles de formar puentes de hidrógeno con el agua y por tanto más hidrosolubles (Figura 12). Sin embargo, el ciclooctino de cadena larga (A2), 2-(2-(2-(cyclooct-2-in-1-oxi)ethoxy)ethoxy)ethanamina, tiene un carácter más hidrofílico debido a la presencia de menos grupos alquílicos hidrofóbicos ( $-\text{CH}_2-$ ) en comparación a la cantidad de grupos éter ( $-\text{O}-$ ) de la cadena. El objetivo de introducir dos cadenas de diferente longitud es comprobar si ésta afecta de forma relevante a la solubilidad de las NPs y a la accesibilidad del grupo alquino en la posterior reacción *click*.

### 4.4 Caracterización comparativa de las nanopartículas (NPs / NPs@PEG / NPs@PEG@A<sub>1,2</sub> / NPs@GLU / NPs@GLU@A<sub>1,2</sub>)

Mediante TEM se pudo comprobar que ni la distribución de tamaños ni la morfología de las NPs se vieron afectadas por la funcionalización debido a que el núcleo inorgánico permanece intacto y el tamaño de las moléculas utilizadas en la funcionalización (PEG, GLU, A1 y A2) es muy inferior a 1 nm.

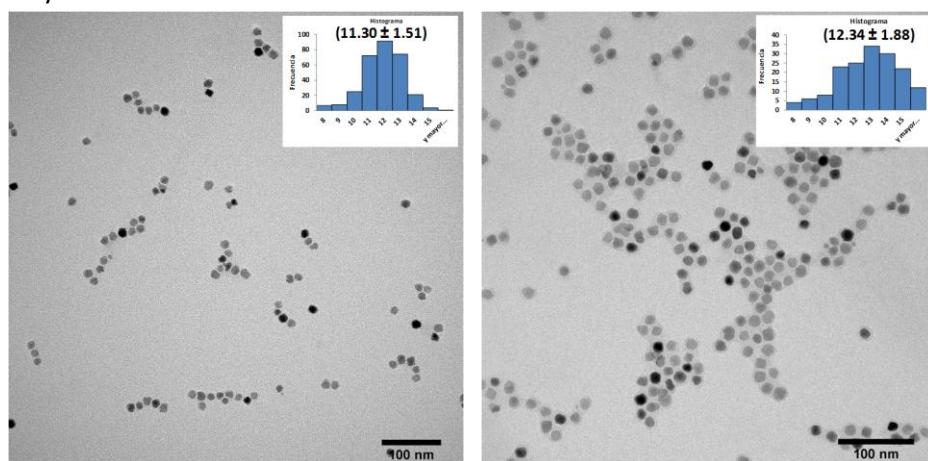
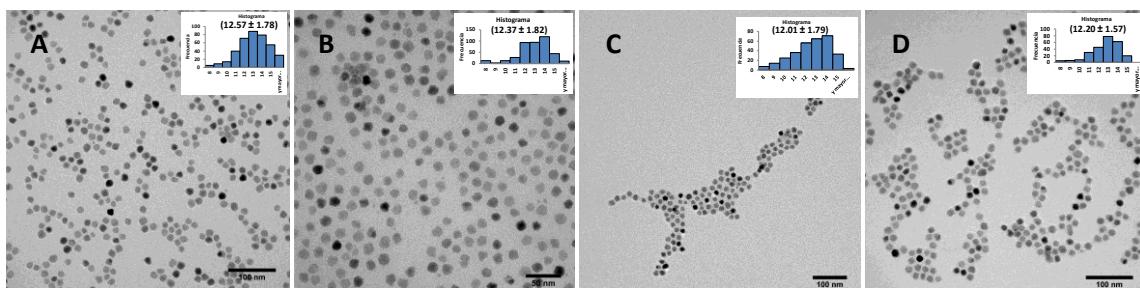


Figura 13. Micrografías de TEM de las NPs@PEG (izquierda, escala = 100 nm) y NPs@GLU (derecha, escala = 100 nm) en agua junto con los histogramas de tamaños de las NPs (expresado en nm).

En la *Figura 13* se puede ver que tanto las NPs recubiertas con PMAO-TAMRA@PEG como las recubiertas con PMAO-TAMRA@GLU mantienen la geometría esférica y el tamaño medio ( $11.30 \pm 1.51$  nm y  $12.34 \pm 1.88$  nm, respectivamente). Las distribuciones de tamaños y los rangos de desviación estándar son casi idénticos a los del recrecimiento (**apartado 4.1.2**) y transferencia a agua (**apartado 4.1.4**).

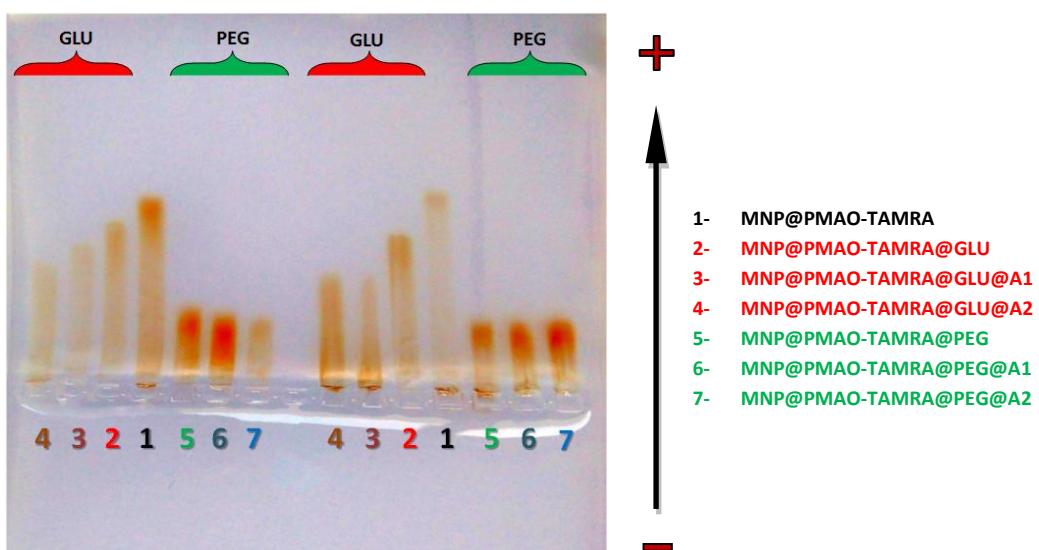
De igual manera, la morfología y la distribución de tamaños no cambian al incorporar la molécula de ciclooctino (*Figura 14*). Los cambios en el valor del diámetro medio entran dentro del error aceptable y se deben exclusivamente a la captura (ajustes y alineamiento del microscopio) y al tratamiento posterior de las imágenes con el software *ImageJ*.



*Figura 14.* Micrografías de TEM de las NPs funcionalizadas con ciclooctinos (escala = 100 nm) en agua: **A)** NPs@PMAO-TAMRA@PEG@A1; **B)** NPs@PMAO-TAMRA@PEG@A2; **C)** NPs@PMAO-TAMRA@GLU@A1; **D)** NPs@PMAO-TAMRA@GLU@A2.

Sin embargo, la caracterización por TEM no es muy útil para demostrar la correcta funcionalización de las NPs con las moléculas de ciclooctino por lo que será necesario el uso de técnicas que permitan determinar la composición y características del recubrimiento orgánico.

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica sencilla que permite determinar cualitativamente la carga neta de las nanopartículas en función de su movilidad electroforética, siendo de gran utilidad para comprobar la correcta funcionalización de las NPs.



*Figura 15.* Electroforesis en gel de agarosa (1 %) de NPs provenientes de dos lotes distintos. Evolución de las etapas de funcionalización: 1) NP@PMAO-TAMRA; 2) NP@PMAO-TAMRA@GLU; 3) NP@PMAO-TAMRA@GLU@A1; 4) NP@PMAO-TAMRA@GLU@A2; 5) NP@PMAO-TAMRA@PEG; 6) NP@PMAO-TAMRA@PEG@A1; 7) NP@PMAO-TAMRA@PEG@A2.

En los pocillos numerados con el **1** se encuentran los lotes correspondientes a dos pasajes a agua distintos de las nanopartículas (**NP@PMAO-TAMRA**). Se puede observar claramente su idéntica migración hacia el polo positivo de la celda electroforética, debido a la gran cantidad de grupos carboxilato (-COO<sup>-</sup>) cargados negativamente presentes en la superficie de las NPs.

Los pocillos numerados con el **2** se corresponden al recubrimiento de las nanopartículas con glucosa (**NP@PMAO-TAMRA@GLU**). Se puede comprobar cómo ambos lotes migran de manera similar y se observa una pequeña disminución en la migración con respecto a las NPs@PMAO-TAMRA (**1**) de partida debido a la disminución de los grupos carboxilato presentes en la superficie de la NP tras la funcionalización. Los pocillos numerados con el **5** se corresponden al recubrimiento con PEG (**NP@PMAO-TAMRA@PEG**). De igual forma se comprueba cómo ambos lotes migran de manera similar y se observa una migración mucho menor con respecto a las NPs@PMAO-TAMRA (**1**) de partida que podría deberse al efecto estérico o a que la disminución de los grupos carboxilato presentes en la superficie de la NP tras la funcionalización con PEG es superior a la que se produce con glucosa. Esto implicaría tener que disponer de un menor número de grupos carboxílicos susceptibles de reaccionar con los ciclooctinos, A1 y A2, en el caso de las NPs estabilizadas con PEG que en las estabilizadas con GLU.

En los pocillos **3** y **4** que fueron llenados con **NP@PMAO-TAMRA@GLU@A1** y **NP@PMAO-TAMRA@GLU@A2** respectivamente, se puede apreciar de nuevo un marcado descenso de la capacidad migratoria en comparación a su predecesor, **2**, debido a la reducción de la carga negativa que se atribuye a la disminución de los grupos carboxilato libres por la funcionalización con el ciclooctino. Esta disminución es más significativa que en sus homólogos estabilizados con PEG, los pocillos **6** y **7**, que fueron llenados con **NP@PMAO-TAMRA@PEG@A1** y **NP@PMAO-TAMRA@PEG@A2** respectivamente. En este caso se puede apreciar un leve descenso de la capacidad migratoria en comparación a su predecesor, **5**, debido a que se habrán incorporado un menor número de moléculas de ciclooctino tanto por la disminución de los carboxilatos libres en la anterior etapa como por el impedimento estérico del PEG que dificulta el contacto molecular y como consecuencia la reacción.

Además de una aproximación cualitativa de la carga neta de las NPs se puede determinar cuantitativamente la carga en superficie mediante la técnica del potencial Z. Esta medida permite comparar las diferentes etapas de funcionalización y corroborar los datos obtenidos con los observados empíricamente en el gel de electroforesis.

Con el mismo objetivo de caracterizar la capa orgánica se han llevado a cabo medidas del radio hidrodinámico de las NPs mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica permite obtener un valor del radio hidrodinámico total de la nanopartícula (núcleo inorgánico + recubrimiento orgánico) lo que, junto con los histogramas de tamaño de las imágenes de TEM, permite obtener una aproximación del tamaño del recubrimiento orgánico.

A la vista de los resultados de la *Tabla 1* se puede confirmar que el valor del diámetro hidrodinámico de las NPs tras las diferentes etapas de funcionalización permanece inalterado. En todos los casos el tamaño es próximo a 24-27 nm por lo que no se puede relacionar directamente con la funcionalización.

	Ref.	Tamaño (d <sub>nm</sub> )	Potencial Zeta (mV)
NP@PMAO-TAMRA	1	<b>21.02 ± 1.21</b>	<b>-35.2 ± 0.67</b>
NP@PMAO-TAMRA@GLU	2	<b>23.75 ± 2.82</b>	<b>-28.8 ± 1.05</b>
NP@PMAO-TAMRA@GLU@A1	3	<b>25.06 ± 1.34</b>	<b>-24.2 ± 0.87</b>
NP@PMAO-TAMRA@GLU@A2	4	<b>25.02 ± 2.29</b>	<b>-24.6 ± 0.24</b>
NP@PMAO-TAMRA@PEG	5	<b>25.93 ± 0.82</b>	<b>-25.2 ± 0.51</b>
NP@PMAO-TAMRA@PEG@A1	6	<b>23.24 ± 2.47</b>	<b>-19.5 ± 0.86</b>
NP@PMAO-TAMRA@PEG@A2	7	<b>24.94 ± 1.13</b>	<b>-20.4 ± 0.71</b>

**Tabla 1.** *Medidas de DLS y potencial Z de las muestras correspondientes a la estabilización con GLU (Ref.=2, 3 y 4) y con PEG (Ref.=5, 6 y 7).*

Sin embargo en las medidas de potencial Z se aprecian claras diferencias entre las muestras, relacionadas con el comportamiento observado en el gel de electroforesis. Conforme disminuye el número de grupos carboxilato libres se puede apreciar una bajada de la carga negativa en el valor de potencial Z lo que podría indicar la presencia de los grupos funcionales que se han añadido en cada etapa de la funcionalización. Este descenso de la carga negativa es mucho más acusado en el caso de las NPs estabilizadas con PEG lo que se corresponde con las observaciones de la *Figura 16*. De igual forma se puede observar un descenso más progresivo del potencial Z en el caso de las NPs estabilizadas con GLU que se corresponde con las observaciones del gel.

Al igual que en la etapa de transferencia a agua, el análisis termogravimétrico (TGA) de la muestra permite distinguir y cuantificar el porcentaje de materia orgánica que hay de cada tipo (*Figura 17*). Se puede calcular la masa de PEG perdida teniendo en cuenta los análisis de TGA anteriores que mostraban que un 7.34 % de la masa corresponde al ácido oleico y un 18,18 % al PMAO-TAMRA por lo que habrá un 15.77 % de PEG y el resto correspondería al núcleo inorgánico de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (58.71 %).<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> La caracterización por TGA de la muestra de NPs funcionalizadas con glucosa no se ha realizado debido a la cantidad relativamente alta de muestra que se requiere (>1 mg de NPs liofilizadas) y al elevado coste de este reactivo, teniendo en cuenta que se trata de una técnica destructiva. Además, la caracterización realizada mediante el resto de técnicas permite comprobar que se ha llevado a cabo correctamente la funcionalización.

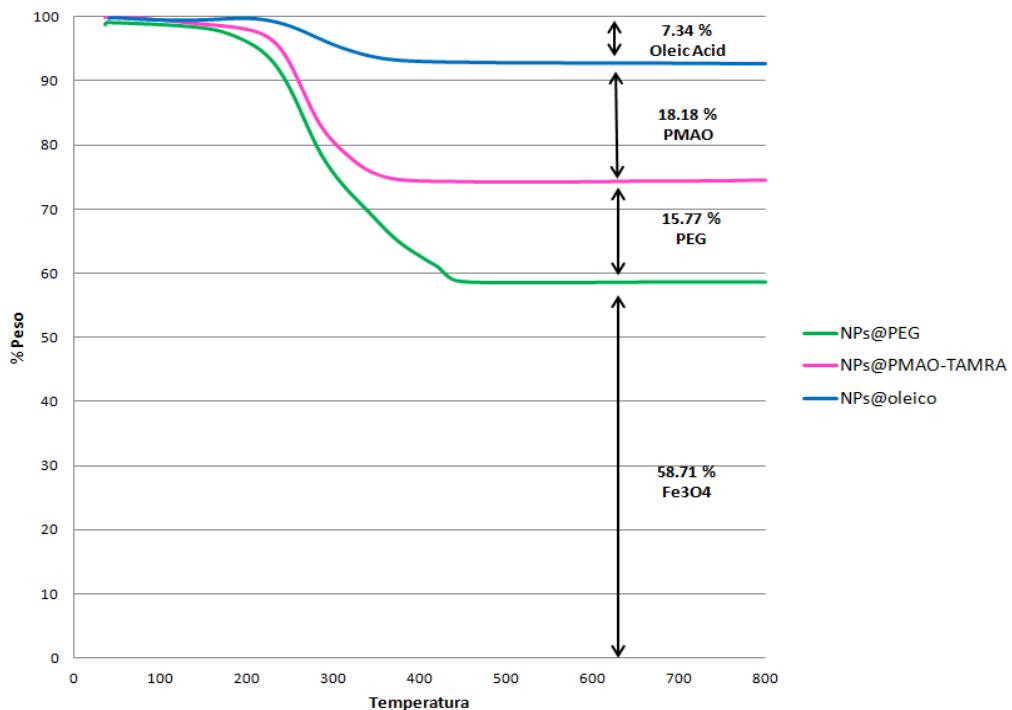


Figura 16. Termograma de las NPs de 12 nm. Representa la pérdida de peso (%) en función de la temperatura (°C).

## 4.5 Caracterización por ensayo indirecto: inmovilización de NP@Alquino sobre sustratos funcionalizados con azida

### 4.5.1 Justificación metodológica

Teniendo en cuenta que los objetivos de este proyecto a largo plazo consisten en la inmovilización de NPs magnéticas en la membrana celular mediante la reacción *click* entre un alquino tensionado y una azida se realizaron pruebas de caracterización indirecta que puedan demostrar que hay un alquino anclado a la NP y que es susceptible de reaccionar con superficies funcionalizadas con azida. El ensayo propuesto consiste en la funcionalización de superficies de silicio con grupos azida y la posterior reacción de cicloadición [3+2] entre las NPs@alquino y la superficie@azida (Figura 17).

En caso de que la reacción se produjera los enlaces covalentes formados unirían fuertemente las NPs a la superficie impidiendo su eliminación en las etapas de lavado. El objetivo de esta prueba es la visualización de fluorescencia en microscopio óptico como prueba inicial y observar mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) la presencia o ausencia de NPs sobre la superficie (prueba real) pudiendo demostrar que la reacción *click* ha funcionado y confirmar la presencia del ciclooctino en la nanopartícula.

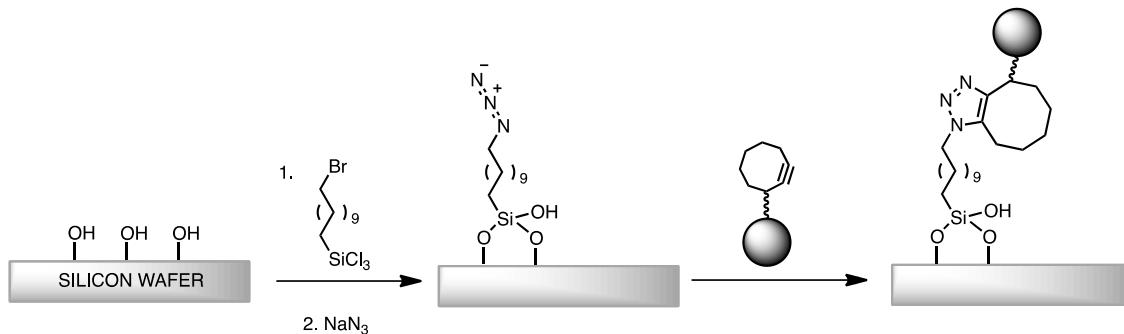


Figura 17. Esquema del ensayo de inmovilización de NPs en superficies activadas con azida. 1<sup>a</sup> Etapa: funcionalización de superficies de silicio con grupos azida ( $N_3^-$ ); 2<sup>a</sup> Etapa: Ensayo de reacción click de la NP@alquino sobre la superficie@azida.

#### 4.5.2 Activación y funcionalización de superficies de sílica

La funcionalización de las superficies de óxido de silicio se llevó a cabo en tres etapas:

1. Activación de la superficie con disolución piraña.
2. Incorporación de un bromoderivado.
3. Sustitución nucleófila del bromo por el grupo azida.

Para comprobar la correcta funcionalización se realizó un análisis por espectroscopía fotoelectrónica de rayos-X (XPS) de la superficie tras cada una de las etapas de reacción. La espectroscopía XPS es una técnica muy sensible que permite analizar la composición de la materia en superficie por lo que aporta información cuantitativa de gran interés. Como se puede observar en la *Figura 18* conforme avanza la reacción se observa la aparición de elementos característicos de cada etapa.

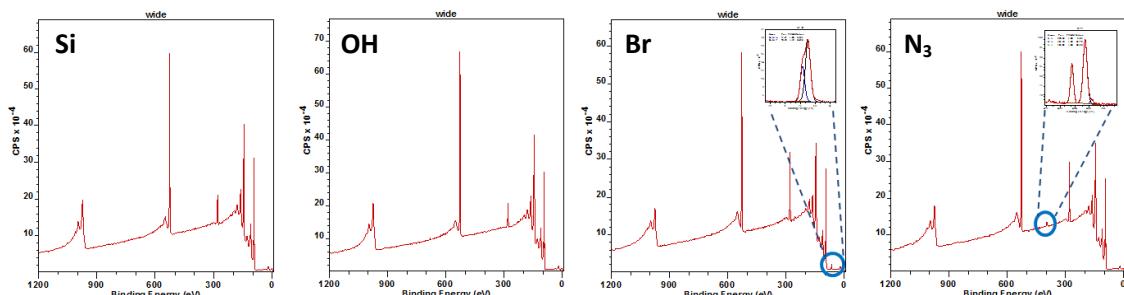


Figura 18. Espectro global de XPS de las diferentes etapas de funcionalización: Si) superficie de óxido de silicio (tras lavados); OH) superficie de óxido de silicio activada con piraña; Br) superficie funcionalizada con un bromoderivado;  $N_3^-$ ) superficie funcionalizada con azida.

Entre los dos primeros espectros no se observan grandes cambios en el espectro global ya que no se ha incorporado ningún nuevo elemento a la superficie, únicamente se observa un aumento de la cantidad porcentual de oxígeno al activar la superficie de sílica con piraña formando grupos silanoles (-Si-OH). En el espectro *Br* se puede observar claramente la aparición de una banda a 70.49 eV correspondiente al orbital 3d del bromo que nos indica que la reacción se ha producido. Finalmente en el espectro  $N_3^-$  se puede observar como desaparece la banda del orbital 3d del bromo y aparecen dos nuevos picos en la zona correspondientes al orbital 1s del  $N^-$  y al orbital 1s del  $N^+$  de la azida ( $-N^-N^+-N^-$ ). El pico de menor intensidad (30.36 eV)

%) a 404.83 eV corresponde al átomo de nitrógeno central ( $N^+$ ) de la azida mientras que el pico de mayor intensidad (65.79 %) a 401.18 eV corresponde a los dos átomos de nitrógeno de los extremos ( $N^-$ ). Estas intensidades se corresponden con la relación 1:2 de los átomos de nitrógeno en la azida y las energías de enlace con las descritas en la bibliografía. [28]

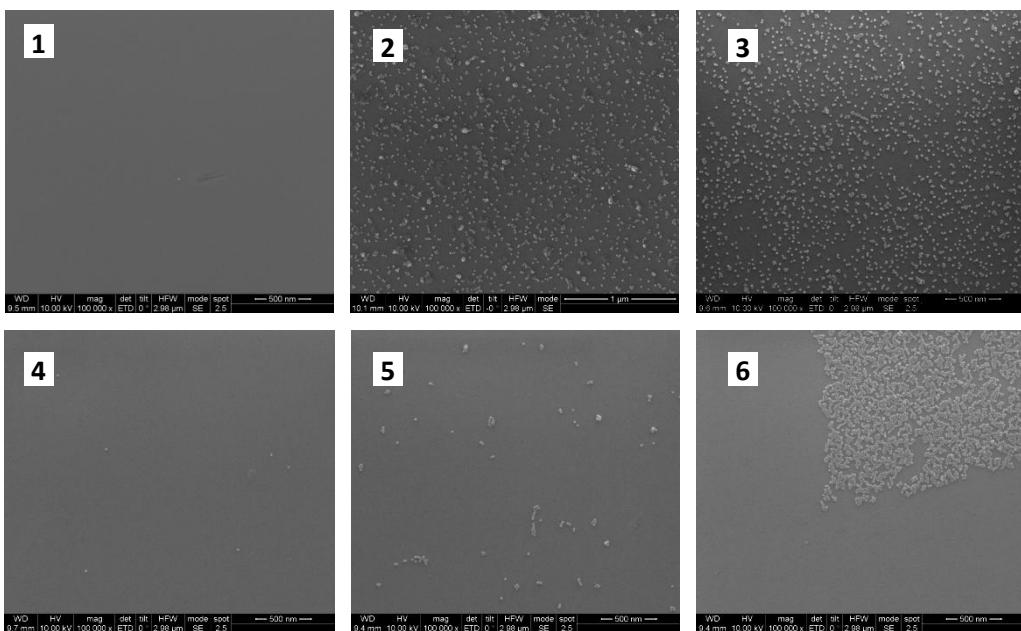
#### 4.5.3 Ensayo de inmovilización mediante química click de las NPs en superficie

En este ensayo se intenta determinar la presencia de alquino en la NP de forma indirecta tanto por observación de fluorescencia en superficie como por detección de NPs en superficie mediante SEM. Para tener una aproximación lo más parecida posible a los experimentos a realizar con células vivas, se utilizó la misma concentración de NPs que normalmente se emplea en el grupo para dichos experimentos (125  $\mu$ g/mL de Fe).

Para ello se han realizado 7 experimentos con 7 superficies funcionalizadas con grupos azida sobre las que se van a añadir los cuatro tipos distintos de NPs@alquino (NP@PEG@A1, NP@PEG@A2, NP@GLU@A1 y NP@GLU@A2) y tres muestras a modo de control (NP@PEG, NP@GLU y un ciclooctino fluorescente comercial, la dibenzociclooctinil-PEG-sulfurodamina B, DBCO). Los controles de NP@PEG y NP@GLU son controles negativos (no se espera observar fluorescencia ni ver NPs por imagen SEM) mientras que el alquino fluorescente DBCO es un control positivo de que la reacción click se ha producido (se espera ver fluorescencia).

Las 7 muestras se sumergieron completamente en 500  $\mu$ L de NPs con la concentración mencionada anteriormente. El experimento se llevó a cabo a temperatura ambiente, con leve agitación y en ausencia de luz durante 2 horas. Tras las dos horas se lavaron las superficies con acetona, etanol y abundante agua Milli-Q y se secaron con  $N_2$ .

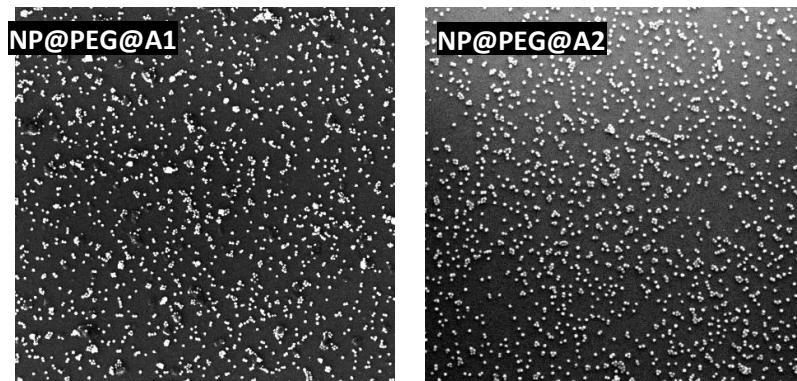
El análisis de las superficies mediante microscopía de fluorescencia indicó la correcta inmovilización del alquino cíclico fluorescente DBCO. Sin embargo esta técnica no proporcionó resultados concluyentes en caso de las muestras de NPs, por lo que el estudio se basa exclusivamente en las imágenes obtenidas por SEM (*Figura 19*).



*Figura 19. Micrografías de SEM de las superficies@azida con: 1) NP@PEG (control negativo); 2) NP@PEG@A1; 3) NP@PEG@A2; 4) NP@GLU (control negativo); 5) NP@GLU@A1 y 6) NP@GLU@A2.*

A la vista de las imágenes de SEM de la *Figura 19* se puede comprobar que no existen interacciones entre las NPs y la superficie en las muestras 1 y 4 que corresponden con los controles negativos (ausencia de alquino). Sin embargo sí se observan NPs en el resto de muestras lo que es un claro indicador de que la reacción *click* se ha producido y de que por tanto el alquino se encuentra unido a la nanopartícula. Las diferencias de densidad de NPs entre las NP@PEG@A<sub>1,2</sub> y NP@GLU@A<sub>1,2</sub> pueden deberse a las distintas interacciones que se producen entre las moléculas estabilizadoras (PEG y GLU). Las NP@PEG@A<sub>1,2</sub> son más estables debido al mayor tamaño y densidad de la moléculas de PEG en la NP por lo que interaccionan de forma individualizada con la superficie facilitando la reacción *click* con una distribución más homogénea sobre toda ella. Sin embargo, las NP@GLU@A<sub>1,2</sub> interactúan de forma más eficiente entre ellas (fuerzas intermoleculares más fuertes) por lo que se disminuye la probabilidad de contacto entre el grupo alquino de la NP y la azida en superficie propiciando la aparición de las zonas de aglomeración y zonas desnudas (muestras 5 y 6).

En el caso de las NPs@PEG@Alquino se ha llevado a cabo una cuantificación del porcentaje de superficie recubierto por las NPs mediante el software *ImageJ* y el posterior tratamiento de los datos en *Microsoft Office Excel*. El objetivo de este cálculo es discernir, de una forma más objetiva que a simple vista, si existen diferencias de comportamiento entre el alquino de cadena corta (A1) y el alquino de cadena larga (A2) a la hora de funcionalizar la superficie. Para realizar este cálculo se ha tenido en cuenta el área total de la imagen y el área de NPs detectada mediante el programa *ImageJ* para obtener un cálculo del porcentaje de superficie que recubierto por NPs (*Figura 20*).



*Figura 20. Cuantificación de la densidad de NPs en superficies@azida con NP@PEG@A1 y NP@PEG@A2 mediante cálculo de áreas de Micrografías de SEM tratadas con ImageJ.*

Tipo de NPs	Área porcentual
NP@PEG@A1	8,32 ± 0,15 %
NP@PEG@A2	5,96 ± 1,91 %

*Tabla 2. Cuantificación de la densidad de NPs en superficie según su porcentaje de área.*

A la vista de las imágenes de la *Figura 20* y de los datos obtenidos en la *Tabla 4* se puede intuir que la densidad de NPs está entorno al 5-8 %. No es posible asegurar que la reacción *click* con el alquino corto (A1) sea mejor a pesar de ofrecer un recubrimiento porcentual a priori superior. Esto es debido a que las diferencias porcentuales son demasiado pequeñas para establecer conclusiones claras ya que esta técnica tiene una gran dependencia de la zona donde se ha tomado la imagen.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos empleados fueron adquiridos en casas comerciales (Sigma Aldrich, Acros, AnaSpec, Rapp Polymere) exceptuando los ciclooctinos A1 y A2 que fueron sintetizados por el laboratorio del profesor Jesus M. Aizpurua de la Universidad del País Vasco (UPV-EHU), San Sebastián.

### 5.1 Síntesis de nanopartículas en medio orgánico

Las NPs monodispersas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 12 nm de diámetro medio utilizadas en este proyecto fueron sintetizadas empleando un método de descomposición térmica ya descrito mediado por el crecimiento de semillas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 6 nm de diámetro. [24, 25]

#### 5.1.1 Síntesis de MNPs de 6 nm de diámetro

En un matraz de 250 mL de tres bocas provisto de agitación mecánica mediante una varilla de vidrio, se añadieron: 0.71 g (2.01 mmol) de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , 2.58 g (9.98 mmol) de 1,2-hexadecanodiol, 2 mL (5.65 mmol) de ácido oleico, 2 mL (4.22 mmol) de oleilamina y 40 mL de éter bencílico. Tras mezclar los reactivos, el matraz se colocó en una manta calefactora y se realizaron tres ciclos de vacío/nitrógeno. La temperatura de la reacción se mantuvo bajo control utilizando un controlador de temperatura programando varias rampas de temperatura de la siguiente manera:

Programa de Temperaturas	
Calentamiento de temperatura ambiente a 200 °C	Velocidad de 180 °C/h
Mantenimiento de temperatura de 200 °C	2 h
Calentamiento de 200 °C a 305 °C	Velocidad de 10 °C/min
Mantenimiento de temperatura de 305 °C	2 h
Enfriamiento de 305 °C a temperatura ambiente	-

*Tabla 3. Programa de temperatura para la síntesis de MNPs de 6 nm de diámetro.*

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.

#### 5.1.2 Recrecimiento de 6 nm a 12 nm

En este crecimiento se utilizaron como semillas las MNPs de 6 nm de diámetro medio obtenidas según la descripción del apartado anterior. Para ello se partió de una cantidad preestablecida de nanopartículas de óxido de hierro (40 mg de Fe).

Partiendo de las semillas de 6 nm sintetizadas previamente se realizaron 3 etapas de lavado idénticas a las descritas en el apartado anterior para eliminar el exceso de ácido oleico y oleilamina. Se siguió el mismo protocolo de síntesis con distintas cantidades de los reactivos.

Se añadieron: 40 mg de semillas de 6 nm de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  disueltas en hexano, 1.42 g (4.02 mmol) de  $\text{Fe}(\text{acac})_3$ , 5.16 g (19.97 mmol) de 1,2-hexanodecanodiol, 1 mL (3.12 mmol) de ácido oleico, 1 mL (3.06 mmol) de oleilamina y 40 mL de éter bencílico.

El programa de temperaturas diseñado para este proceso es el siguiente:

<b>Programa de Temperaturas</b>	
<b>Calentamiento de temperatura ambiente a 100 °C</b>	Velocidad de 180 °C/h
<b>Calentamiento de 100 °C a 200 °C</b>	Velocidad de 3 °C/min
<b>Mantenimiento de temperatura de 200 °C</b>	1 h
<b>Calentamiento de 200 °C a 305 °C</b>	Velocidad de 10 °C/min
<b>Mantenimiento de temperatura de 305 °C</b>	1 h
<b>Enfriamiento de 305 °C a temperatura ambiente</b>	-

**Tabla 4.** Programa de temperatura para el crecimiento de MNPs de 12 nm.

Una vez se hubieron obtenido las NPs recrecidas de 12 nm, se realizaron los lavados de la misma forma que se ha detallado anteriormente y se resuspendieron en la mezcla de hexano, ácido oleico y oleilamina para ser finalmente almacenadas a 4 °C.

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 1.64 mg/mL y para las NPs recrecidas de 12 nm en hexano fue de 3.25 mg/mL.

## 5.2 Transferencia a agua

Previamente a la funcionalización de las NPs con las diferentes moléculas es necesario llevar a cabo su transferencia a agua.

### Protocolo de trabajo

En un matraz de 500 mL se preparó una disolución de 140 mg de PMAO (30000-50000 Da) en 15 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Posteriormente se añadieron 2 mg de TAMRA-cadaverina en 2 mL de EtOH y la mezcla se dejó reaccionando durante toda la noche con agitación magnética y el matraz recubierto con papel de aluminio para evitar la pérdida de fluorescencia. Antes de proceder a la adición de las NPs en fase orgánica se añadió  $\text{CHCl}_3$  hasta un volumen final de 98 mL.

Las NPs en medio orgánico se lavaron 3 veces con 20 mL (hexano + etanol). Tras el tercer lavado las NPs se resuspendieron en 2 mL de  $\text{CHCl}_3$ ; esta disolución se añadió gota a gota a la disolución de PMAO-TAMRA en  $\text{CHCl}_3$  en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos. El disolvente se eliminó en el rotavapor a 40 °C y 400 mbar dejando un volumen mínimo (5-10 mL) para que las NPs no lleguen a sequedad.

Una vez eliminado el disolvente se añadieron simultáneamente 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q y 10 mL de NaOH 0.1 M. La mezcla se introdujo al rotavapor a 70 °C y sin vacío, con el fin de evaporar los restos de  $\text{CHCl}_3$ , observándose la formación de espumas en la disolución. Cuando las espumas se atenuaron, se fue aumentando el vacío poco a poco hasta alcanzar los 200

mbar y manteniéndolo hasta que no se formen más espumas. El líquido obtenido se filtró en caliente con un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  para eliminar los posibles agregados de NPs formados durante este proceso. Finalmente mediante tres etapas de ultracentrifugación durante 2 horas a 20 °C y 25000 rpm se eliminaron las NPs más pequeñas y el exceso de polímero no unido que se quedan en el sobrenadante.

La concentración de hierro de la muestra de NPs@PMAO-TAMRA de 12 nm en agua fue de 5.2 mg/mL.

### 5.3 Ruta de NP@PEG

#### 5.3.1 Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con polietilenglicol (PEG)

Previa incorporación de la molécula de ciclooctino se llevó a cabo la estabilización de las NPs con PEG.

##### Protocolo de trabajo

En un Eppendorf de 1.5 mL se preparó una disolución de 16.7 mg (22.26  $\mu\text{mol}$ ) de  $\text{NH}_2\text{-PEG-OCH}_3$  (MW: 750 g/mol) en 172  $\mu\text{L}$  de tampón tetraborato sódico 50 mM, pH=9 (SSB) y se añadió el volumen de NPs correspondiente a 1 mg de Fe.

Se realizó una primera adición de 6.25 mg de 1-étil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) en 20  $\mu\text{L}$  de SSB (50 mM, pH=9), añadiendo el volumen necesario de tampón SSB (50 mM, pH=9) hasta llegar a 420  $\mu\text{L}$  para que se mantenga la concentración final de Fe de la reacción en  $[\text{Fe}^{+3}] = 2.3$  mg/mL. Dicha disolución se agitó durante 30 minutos / oscuridad; transcurrido este tiempo se realizó una segunda adición de 6.25 mg de EDC en 20  $\mu\text{L}$  de SSB (50 mM, pH=9) y se mantuvo en agitación durante 3 horas / oscuridad.

Para eliminar el exceso de reactivos se realizaron diez lavados con agua Mili-Q (5000 rpm, 15 min) utilizando dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, Millipore, 100 kDa).

La concentración de hierro de la muestra de NPs@PMAO-TAMRA@PEG fue de 1.59 mg/mL.

#### 5.3.2 Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA@PEG con ciclooctino

Esta etapa consiste en la unión química entre un alquino cíclico y las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  en medio acuoso previamente funcionalizadas con PMAO-TAMRA y estabilizadas con PEG. La reacción química que se produce es la unión peptídica entre el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) del ciclooctino y los grupos carboxilo (-COOH) libres presentes en la superficie de las MNPs.

En esta etapa se ha utilizado el mismo protocolo de síntesis con dos moléculas de alquino cíclico con diferente longitud de la cadena separadora obteniéndose dos tipos distintos de MNPs con un recubrimiento que presenta fluorescencia y un alquino cíclico en el extremo accesible y, por tanto, susceptible de reaccionar con azidas a través de una reacción "click" bioortogonal.

En esta etapa se intenta conseguir funcionalizar un 10% de los grupos carboxilo presentes en superficie de las nanopartículas con el ciclooctino. El protocolo de funcionalización se describe a continuación y es idéntico para ambas moléculas de ciclooctino.

### **Protocolo de trabajo**

En un Eppendorf de 2 mL se preparó una disolución de  $2.73 \times 10^{-4}$  mmol de ciclooctino, el volumen correspondiente a 0.5 mg de NPs y 3.125 mg de EDC en 10  $\mu$ L de tampón SSB (50 mM, pH=9). Se añadió el volumen necesario de tampón SSB (50 mM, pH=9) hasta llegar a 1.2 mL para que se mantuviera la concentración de Fe de la reacción en  $[Fe^{+3}] = 0.42$  mg/mL. El pH de la muestra debería estar próximo a 8-9. Dicha disolución se agita durante 30 minutos / oscuridad. Se realizó una segunda adición de 3.125 mg de EDC en 10  $\mu$ L de SSB (50 mM, pH=9) a cada uno. Dicha disolución se agitó durante 3 horas / oscuridad. El pH fue medido al acabar la reacción.

Para eliminar el exceso de reactivos se realizaron cuatro lavados con agua Mili-Q (5000 rpm, 15 min) utilizando dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, MilliPore, 100 kDa).

La concentración de hierro de la muestra de NPs@PMAO-TAMRA@PEG@A1 fue de 1.37 mg/mL y la de NPs@PMAO-TAMRA@PEG@A2 fue de 1.23 mg/mL.

## **5.4 Ruta de NP@GLUCOSA**

### **5.4.1 Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA con NH<sub>2</sub>-Glucosa**

Previa incorporación de la molécula de ciclooctino se llevó a cabo la estabilización de las NPs con glucosa.

#### **Protocolo de trabajo**

En un Eppendorf de 2 mL se preparó una disolución de 10 mg (36.86  $\mu$ mol) de NH<sub>2</sub>-PEG-OCH<sub>3</sub> en 960  $\mu$ L de SSB (50mM, pH=9) y se añadió simultáneamente el volumen de NPs correspondiente a 2.4 mg de Fe.

Se realizó una primera adición de 7,5 mg de EDC en 50  $\mu$ L de SSB (50 mM, pH=9). El pH de la muestra debería estar próximo a 8-9. Dicha disolución fue agitada durante 30 minutos / oscuridad. Posteriormente se realizó una segunda adición de 7.5 mg de EDC en 50  $\mu$ L de SSB (50mM, pH=9). El pH de la muestra debería estar próximo a 8-9. Dicha disolución se agitó durante 3 horas en la noria / oscuridad.

Para eliminar el exceso de reactivos se realizaron cuatro lavados con agua Mili-Q (5000 rpm, 15 min) utilizando dispositivos de filtración por centrifugación con membranas de celulosa (Amicon, MilliPore, 100 kDa). Posteriormente se filtra la disolución obtenida a través de un filtro 0.22  $\mu$ m.

La concentración de hierro de la muestra de NPs@PMAO-TAMRA@GLU fue de 1.57 mg/mL.

### **5.4.2. Funcionalización de MNPs@PMAO-TAMRA@Glucosa con ciclooctino**

Esta etapa consiste en la unión química entre un alquino cíclico (A1 y A2) y las nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> en medio acuoso previamente funcionalizadas con PMAO-TAMRA y estabilizadas con Glucosa. La reacción química que se produce es la unión peptídica entre el

grupo amino ( $-\text{NH}_2$ ) del ciclooctino y los grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) libres presentes en la superficie de las MNPs.

En esta etapa se ha utilizado el mismo protocolo de síntesis descrito en el **apartado 3.2** para conseguir un recubrimiento del 10% de los grupos carboxílicos de la superficie de la MNP. En este protocolo se utilizan las mismas dos moléculas de alquino cíclico con diferente longitud de la cadena separadora para obtener dos tipos distintos de MNPs con un recubrimiento que presenta fluorescencia y un alquino cíclico en el extremo accesible y, por tanto, susceptible de reaccionar.

La concentración de hierro de la muestra de NPs@PMAO-TAMRA@GLU@A1 fue de 0.72 mg/mL y la de NPs@PMAO-TAMRA@GLU@A2 fue de 0.79 mg/mL.

## 5.5 Funcionalización de superficies de sílica con grupos azida ( $\text{N}_3$ )

Con el objetivo de realizar un ensayo posterior útil en la caracterización de las NPs se llevó a cabo la funcionalización de superficies de óxido de silicio para incorporar grupos azida ( $\text{N}_3$ ). El principal propósito es observar si se produce la reacción *click* entre el grupo alquino de las NPs y el grupo azida de la superficie funcionalizada.

### Protocolo de trabajo

En primer lugar se lavaron las superficies de sílica durante 15 min con acetona y 15 min con etanol (sonicando en ambos casos). Finalmente se realizó un tercer lavado con agua Milli-Q previo a la activación con Piraña.

Se preparó la disolución Piraña ( $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$  3/1 v/v) añadiendo en primer lugar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y gota a gota el volumen correspondiente de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La mezcla se dejó en reposo durante 20 min, se sumergieron completamente las muestras de sílica y se dejaron reaccionar durante 30 minutos sin agitación. Las muestras fueron lavadas individualmente con abundante agua Milli-Q y secadas en corriente de  $\text{N}_2$ .

Se preparó una disolución de 11-bromoundeciltriclorosilano en tolueno (0.1% vol.) y se sumergieron completamente las muestras activadas en dicha disolución durante 45 minutos sin agitación. Las muestras fueron lavadas con tolueno, acetona y etanol (15 minutos, sonicando) y secadas en corriente de  $\text{N}_2$ .

Una vez secas se sumergieron en una disolución saturada de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) en dimetilformamida (DMF) y se dejaron reaccionar (48 h, 37 °C, bajo  $\text{N}_2$  y con agitación suave). Finalmente se lavaron las superficies con acetona y etanol (5 minutos, sonicando) y agua Milli-Q y se secaron en corriente de  $\text{N}_2$ . Todas las muestras se guardaron en el desecador hasta su posterior uso o análisis.

## 6. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

### 6.1. Determinación de Fe

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 las posteriores funcionalizaciones y experimentos.

#### Protocolo de la determinación

La cantidad de Fe se determinó 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 5 a 10  $\mu\text{L}$  de muestra (debido a la elevada concentración de NPs en la disolución) y se rellena hasta 50  $\mu\text{L}$  con hexano o agua (en función del medio en que se encuentren las NPs).

A todas las muestras se les añaden 100  $\mu\text{L}$  de agua regia ( $\text{HCl}/\text{HNO}_3$  en proporción 3:1) y se calientan durante 15 minutos a 60 °C para eliminar la capa orgánica. Posteriormente se añaden 350  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  milli-Q a todas las muestras para diluir el agua regia. Del volumen total, se toman 50  $\mu\text{L}$  y se trasvasan a una placa de 96 pocillos.

A cada pocillo se añaden 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ( $\text{pH}=9.7$ ; 0.2 M) y 60  $\mu\text{L}$  de una disolución formada por 50  $\mu\text{L}$  de KOH (4 N) y 10  $\mu\text{L}$  de Tiron (0.25 M). Tras añadir el Tiron (ácido 1,2-dihidroxibencen-3,5-disulfónico, compuesto que forma un complejo con el Fe) y el  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  a todos los pocillos de la placa, se deja reposar durante unos 15 minutos.

Finalmente se mide la absorbancia de las muestras a 480 nm en un espectrofotómetro *Multiskan Go* (Thermo Scientific). Con los datos de los estándares se realiza una recta de calibrado que se utiliza para extraer el dato de absorbancia de la muestra y obtener de esta forma la concentración en Fe de ésta.

### 6.2. Electroforesis en Gel de Agarosa

Esta técnica nos permite, por un lado, diferenciar la carga de las NPs en función de su capacidad migratoria, y por otro, detectar el polímero presente en la muestra que no se ha unido a la superficie de la NP 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.

#### Protocolo de trabajo

Se preparó una disolución al 1% (m/v) de agarosa en una disolución tampón 0.5X de Tris-borato-EDTA (TBE). Una vez preparado el gel, se cargaron las muestras previamente mezcladas con una disolución de glicerol al 20% en TBE 0.5X. Finalmente se aplicó un voltaje de 80 V y 3 A de intensidad durante 30 minutos (suficiente para observar diferencias en la migración).

### 6.3. Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que consiste en la medida del peso de una muestra frente a tiempo o temperatura bajo una atmósfera controlada, que puede ser estática o dinámica. La TGA permite detectar los cambios en la pesada que suelen producirse en 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 restos de agua.

### 6.4. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, permitiendo aumentar la potencia amplificadora de un microscopio óptico (limitada por la longitud de onda de la luz visible). Lo característico de este microscopio es el uso de una muestra ultrafina y la obtención de la imagen a partir de los electrones transmitidos.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) es útil en la caracterización morfológica, microestructural y composicional de las NPs. En este trabajo las imágenes fueron obtenidas con un microscopio *Tecnai T20 (FEI)*, dotado de un cañón termoiónico y voltaje acelerador de hasta 200 kV (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Universidad de Zaragoza).

Para visualizar las NPs en el TEM, es necesario realizar una preparación de la muestra diferente en función de si las NPs son solubles en medio orgánico o acuoso. En ambos casos, la muestra debe estar muy diluida, siendo las NPs hidrófobas diluidas en hexano y las NPs hidrófilas en agua. Se aplicaron 5 µL de las muestras sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono y se dejaron secar al aire antes de introducirse al microscopio.

Una vez obtenidas las micrografías de las NPs, con la ayuda del software *ImageJ*, se midió el área de unas 600 NPs (Procedimiento descrito en el [Anexo 1](#)), se representó la distribución de tamaños en forma de histograma y se realizó el cálculo del tamaño medio de las NPs.

### 6.5. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM), es una técnica de microscopía electrónica capaz de producir imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra utilizando las interacciones electrón-materia. Utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz para formar una imagen.

En este trabajo se han utilizado imágenes de SEM para visualizar las NPs unidas a las superficies funcionalizadas a través de química “click” y para estimar el porcentaje de área superficial ocupada por las NPs.

El instrumento utilizado fue un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo *CSEM-FEG INSPECT F50* (Laboratorio de Microscopías Avanzadas, Universidad de Zaragoza).

## 6.6. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

El DLS (*Dynamic Light Scattering*) es una técnica espectroscópica utilizada para caracterizar el radio hidrodinámico de diferentes moléculas, partículas o coloides en disolución. Por esto DLS es una técnica útil para determinar la distribución de tamaños de NPs en suspensión. En esta técnica el analito en suspensión es irradiado con luz láser monocromática y se miden entonces las fluctuaciones de la intensidad de la luz difractada en función del tiempo. Los datos de intensidad son 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 0,05 mg/mL en un volumen final de 1,5 mL.

Se realizaron 5 medidas de cada muestra a 25 °C y los resultados se analizaron en términos de número e intensidad. Las medidas se tomaron en un equipo *Malvern Zetasizer*, siendo las muestras irradiadas con un láser de helio-neón de 633 nm de longitud de onda.

## 6.7. Potencial Z

Las medidas de potencial Z se utilizan para determinar la carga superficial de las NPs y su magnitud está relacionada con la estabilidad del sistema coloidal. Si las partículas en suspensión tienen un amplio potencial Z negativo o positivo tenderán a repelerse entre ellas (repulsión electrónica). Sin embargo, si las partículas tienen valores bajos de potencial Z aumenta la inestabilidad del sistema coloidal y pueden llegar a agregar si no existen otro tipo de repulsiones de tipo estérico. Esta medida se basa en el uso de un láser como fuente de luz que ilumine las partículas de la muestra siendo el rayo láser incidente el que pasa a través del centro de la muestra permitiendo detectar la luz dispersada a un ángulo de unos 13°.

Al aplicar un campo eléctrico a la celda, cualquier partícula en movimiento presente en el volumen de medida provocará una fluctuación en la intensidad de la luz detectada con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula.

El posterior tratamiento de la señal mediante el software adecuado permite obtener diversos parámetros relacionados con el potencial Z y la movilidad electroforética de las partículas. Las muestras se prepararon en las mismas condiciones y se utilizó el mismo equipo de medida que para el DLS.

## 6.8. Espectroscopia de fotoelectrones de rayos-X (XPS)

La técnica espectroscópica de XPS permite realizar análisis cuantitativos de la composición elemental, fórmula empírica, entorno químico y estado de oxidación de los elementos presentes en la superficie del material con una elevada sensibilidad. Esta técnica consiste en irradiar con un láser de rayos X mientras se mide simultáneamente la energía cinética y el número de electrones que escapan de la capa superficial, de 0 a 10 nm, del material analizado.

En el presente trabajo esta técnica se ha utilizado para comprobar las diferentes etapas de funcionalización de superficies de silicio y detectar posibles cambios superficiales al añadir las diferentes NPs que indicaran si se ha producido la reacción *click*.

El instrumento utilizado fue un espectrofotómetro de fotoelectrones de rayos X *Kratos Analytical AXIS SUPRA™*.

## 7. CONCLUSIONES

En este trabajo se han sintetizado por descomposición térmica NPs magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  de 12 nm, que han sido transferidas a un medio acuoso y estabilizadas con polietilenglicol y glucosa. Posteriormente se ha conseguido funcionalizar cada una de ellas con dos ciclooctinos de diferente longitud de cadena espaciadora y probar su viabilidad mediante una reacción de química *click* sobre una superficie de sílica funcionalizada con grupos azida.

Uno de los retos de este proyecto era la realización de una caracterización adecuada que permitiera demostrar que se ha incorporado el ciclooctino a las NPs. El análisis de las NPs mediante microscopía TEM sólo nos permite evaluar la forma, polidispersidad y el tamaño de las NPs por lo que han sido necesarias técnicas complementarias que permitan estudiar la composición de la capa orgánica de recubrimiento. Utilizando el análisis por TGA únicamente se han obtenido datos de composición de la capa orgánica de las NPs. Sin embargo, otras técnicas como el DLS, potencial Z y la electroforesis en gel de agarosa han mostrado indicadores claros de la presencia de ciclooctino en las NPs.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de este proyecto es la funcionalización de NPs para llevar a cabo una reacción de química *click* bioortogonal sobre diferentes superficies se ha realizado un ensayo indirecto de inmovilización de NPs@alquino sobre superficies@azida. Para realizar este ensayo ha sido necesario funcionalizar en varias etapas superficies de silicio con el propósito de obtener una superficie recubierta con grupos azida. Para demostrar que la azida se encontraba en superficie se han realizado estudios por XPS de las superficies en las diferentes etapas de la reacción. Finalmente, este ensayo nos ha permitido comprobar que, además de haber conseguido funcionalizar las NPs con el ciclooctino, la reacción *click* sobre una superficie de azida es viable como se observa claramente a través de las imágenes de SEM.

Por último en este trabajo se ha intentado evaluar las posibles diferencias existentes entre los dos alquinos a la hora de producirse la reacción *click*. Para ello se ha tratado de cuantificar la densidad de NPs presentes en superficie a través de imágenes de SEM y su posterior tratamiento con el software *ImageJ*. La escasa diferencia entre las imágenes y la gran variabilidad existente entre zonas de la misma superficie nos han impedido obtener una conclusión clara acerca de si la longitud de la cadena podría afectar al funcionamiento de la reacción *click* en superficie.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

(1). Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chem. Soc. Rev.*, 35, 583-592.

(2). Moros, M. (2012). Síntesis de Gliconanopartículas Magnéticas Para Aplicaciones Biomédicas. Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza.

(3). Wing, C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. El Inin Hoy, Contacto Nuclear, 24-29.

(4). Cao, G. *et al.* (2011). Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications. (2<sup>nd</sup> ed.).

(5). Duncan, R. *et al.* (2011). Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharmaceutics*, 8, 2101-41.

(6). Sanvicens, N. *et al.* (2008). Multifunctional nanoparticles-properties and prospects for their use in human medicine. *Trends Biotechnol.* 26, 425-433.

(7). Enríquez-Navas, P. M. *et al.* (2012). Application of Inorganic Nanoparticles for Diagnosis based on MRI. Página 234, Capítulo 9, en “Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles”.

(8). Hervault, A. *et al.* (2014). Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*, 6, 11553-11573.

(9). Reeves, D. B. *et al.* (2012). Simulations of Magnetic Nanoparticle Brownian Motion. *J. Appl. Phys.* 112, no. 12: 124311.

(10). Batlle, X. *et al.* (2002). Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 35, R15.

(11). Peng, X. H. *et al.* (2008). Targeted Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Tumor Imaging and Therapy. *Int. J. Nanomed.*, 3, no. 3: 311.

(12). Luk, K. H. *et al.* (1980). Hyperthermia in Cancer Therapy. *Western J. Med.* 132, no. 3: 179.

(13). Tamanaha, C. R. *et al.* (2008). Magnetic labeling, detection, and system integration. *Biosens. Bioelectron.*, 24, 1-13.

(14). Mojica Pisciotti, M. L. (2009). 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.

(15). Jewet, J. C. *et al.* (2010). Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1272-1279.

(16). Patterson, D. M. *et al* (2014). Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chemical Biology* 9, no. 3: 592–605.

(17). Ramil, C. P. *et al.* (2013). Bioorthogonal chemistry: strategies and recent developments. *Chem. Commun.*, 49, 11007-11022.

(18). Suárez, A. (2012). Reacciones de Cicloadición 1,3-Dipolares a Alquinos Catalizadas Por Cobre. *An. Quím.*, 108, 306–313.

(19). Roca, A. G. *et al.* (2009). Progress in the Preparation of Magnetic Nanoparticles for Applications in Biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 42, no. 22: 224002.

(20). Agard, N. J. *et al.* (2004). A Strain-Promoted [3 + 2] Azide–Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 15046-15047.

(21). Vreeland, C. E. *et al.* (2015). Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer’s Mechanism. *Chem. Mater.*, 27, 6059-6066.

**(22).** Sun, S. *et al.* (2004). Monodisperse MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M=Fe, Co, Mn) nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 273-279.

**(23).** LaMer, V. K. *et al.* (1950). Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 4847-4854.

**(24).** Fortin, J. P. *et al.* (2007). Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 2628-2635.

**(25).** Moros, M. *et al.* (2010). Engineering Biofunctional Magnetic Nanoparticles for Biotechnological Applications. *Nanoscale*, 2, 1746-1755.

**(26).** Moros, M. *et al.* (2012). Monosaccharides *versus* PEG-Functionalized NPs: Influence in the Cellular Uptake. *ACS Nano*, 6, 1565-1577.

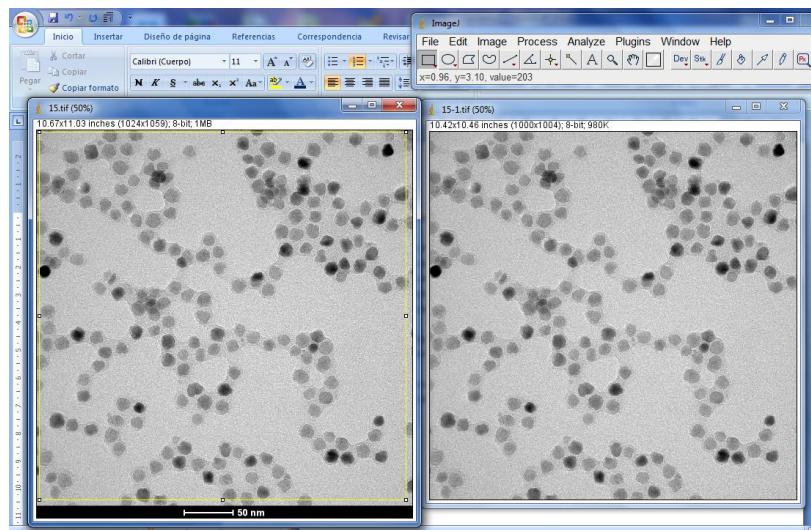
**(27).** M. King *et al.* (2014). Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions—Past and Present Trends. *Bioconjugate Chem.*, 25, 825-839.

**(28).** Azam, M. S. *et al.* (2011). Orthogonally Reactive SAMs as a General Platform for Bifunctional Silica Surfaces. *Langmuir*, 27, 741-750.

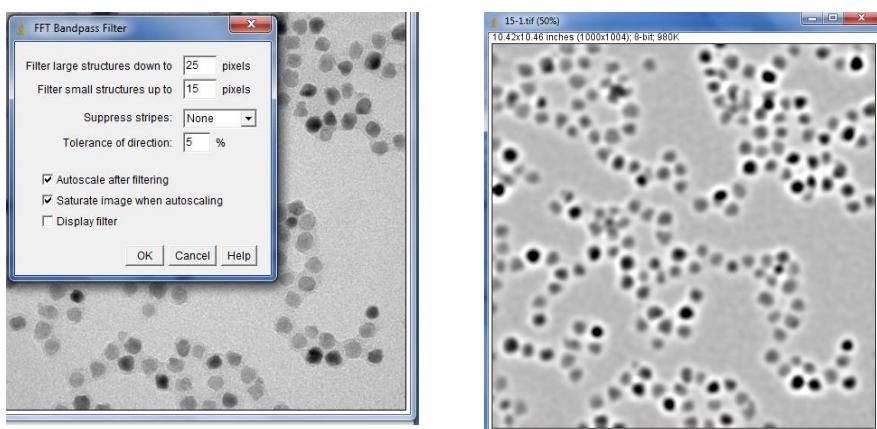
## ANEXOS

### **ANEXO I (Obtención de Histogramas mediante el método de ImageJ)**

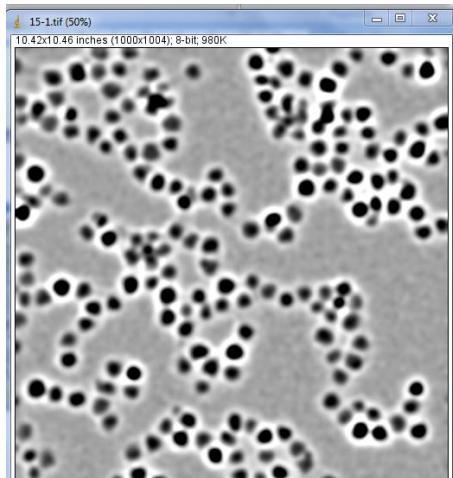
- 1) File -> open -> seleccionar imagen \*
  - \* La escala que da menos error es la de 50 nm (imágenes a menos de 8600 SA aumentos no ofrecen tanta precisión en la medida de las áreas)
  - \* Es importante que las NPs estén bien separadas, grupos aislados son más fáciles de detectar con su geometría exacta que aglomerados (necesario un mínimo espaciado entre NPs, resolución)
- 2) Analyze -> Set scale -> known distance (colocar línea recta en la escala previamente a dar este valor)
- 3) ImageTools (forma rectangular) -> recuadrar toda la imagen excepto la escala
- 4) Duplicate image
  - a. Con botón secundario -> duplicate
  - b. Image -> duplicate



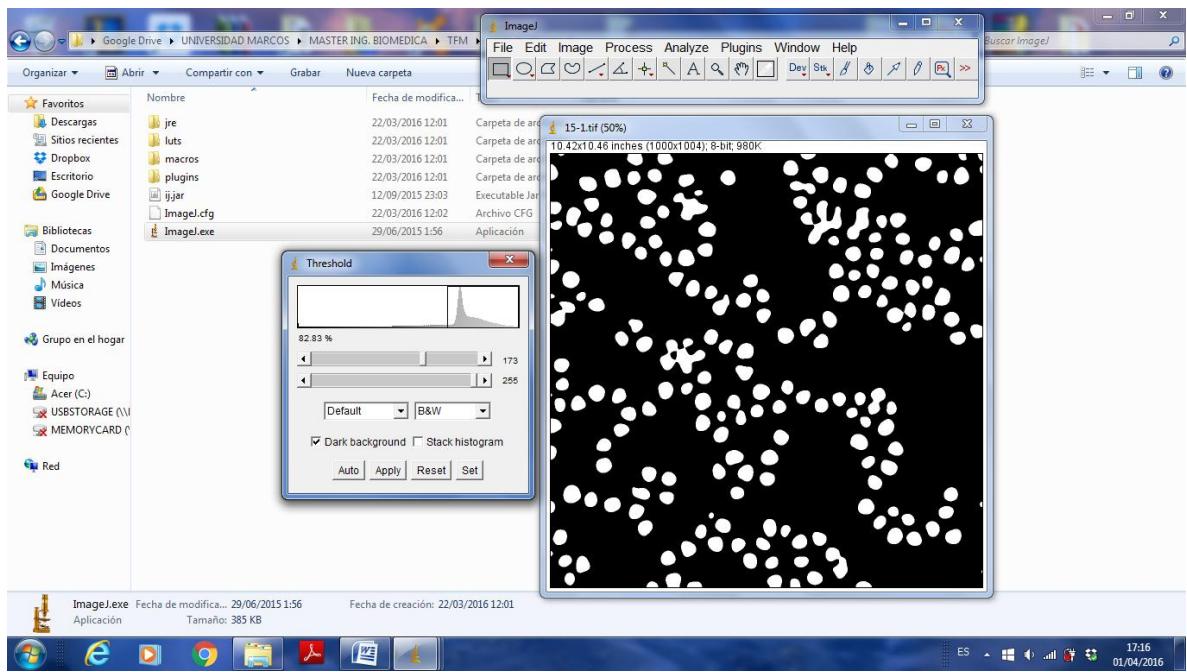
- 5) Process -> Smooth (suavizado)
- 6) Process -> FFT -> Bandpass filter (Large: 25 y small: 15)



7) Process -> Enhance Contrast (7-8 %)



8) Image -> Adjust -> Threshold \*

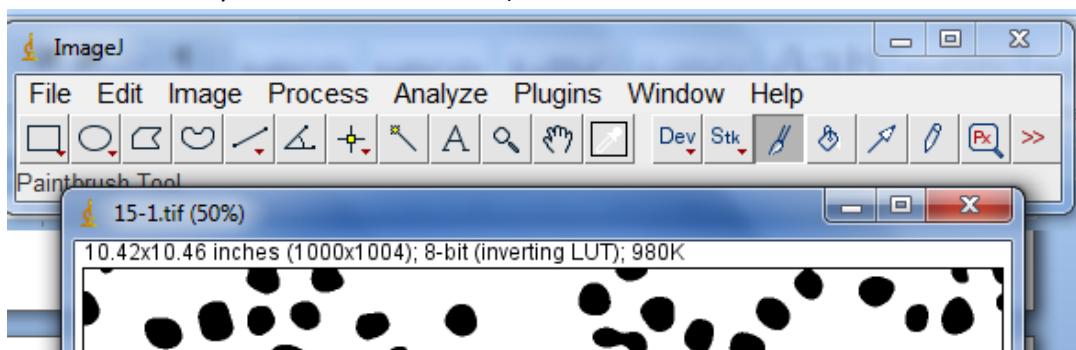


\*ImageJ hace un ajuste por defecto, bastante bueno, pero si queremos ajustar mejor el tamaño de las áreas que vamos a medir podemos mover la barra hacia derecha o izquierda hasta que veamos que las áreas de nuestra imagen binaria son similares en tamaño a las de nuestra imagen original.

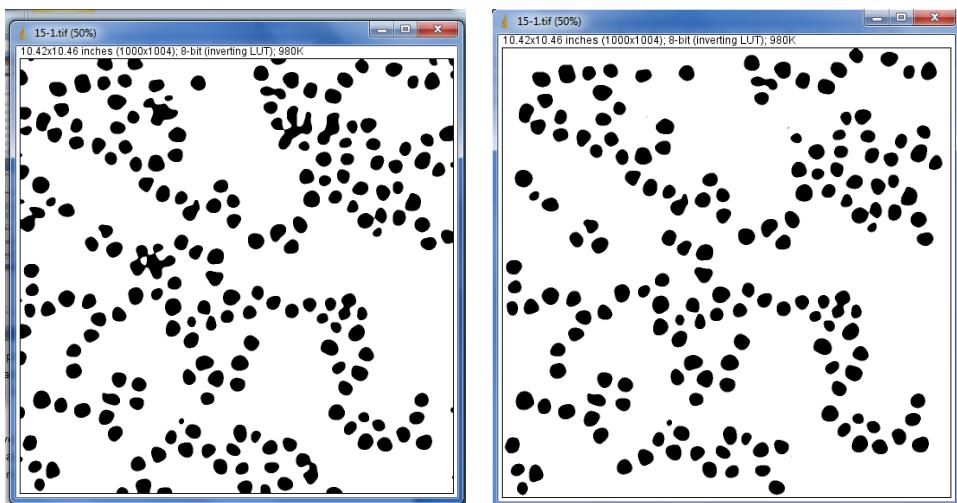
9) Pulsar el botón Apply (dos veces) -> Obtener fondo blanco y NPs en color negro\*

\* Si no se hace de esta forma el programa no detectará ninguna NP porque no detecta los blancos, solo las áreas en negro.

10) Podemos usar una herramienta para eliminar los bordes (son NPs cortadas cuya área no va a ser la real y falsean nuestros datos)



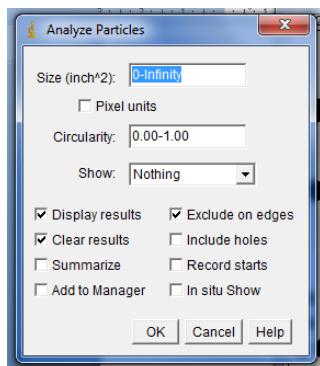
11) Eliminamos manualmente los bordes y algunas otras zonas donde el programa haya detectado varias NPs como una sola (Esto solo si vemos que es sencillo si no un sistema de filtros de Excel nos eliminará en el siguiente paso las áreas que sean demasiado grandes o demasiado pequeñas para ser una NP):



12) Process -> Binary -> Fill Holes (Brightness: Dark)\*

\* Esto solo es necesario en caso de que haya NPs que tengan huecos internos de color blanco debido a una detección errónea del programa.

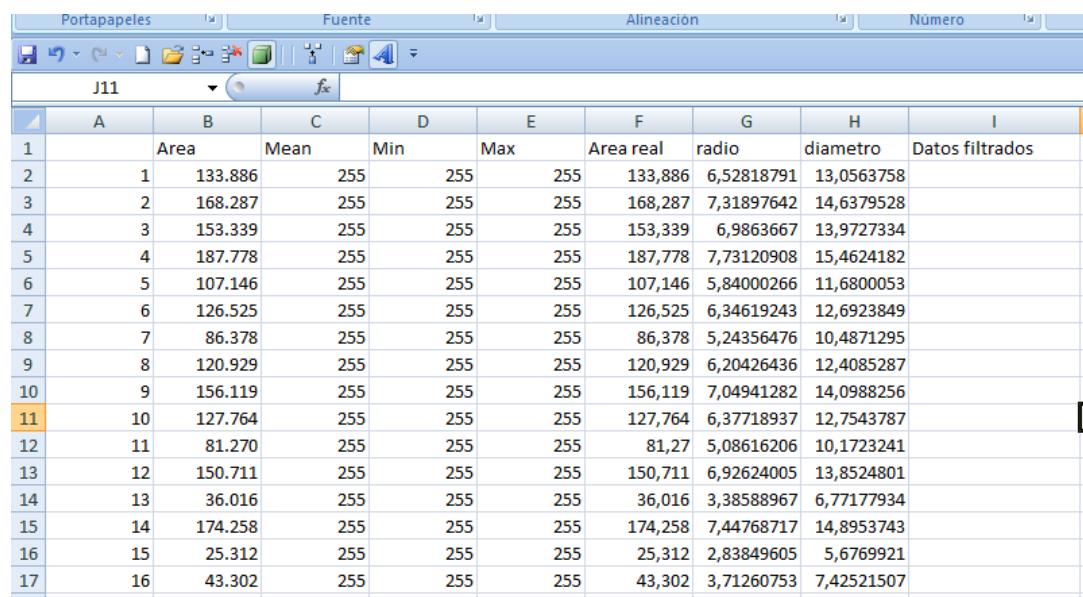
13) Analyze -> Analyze Particles -> OK



14) Results -> Edit -> Copy (nos llevamos la tabla de resultados a una hoja de cálculo)

15) Obtener los valores de:

- a. Área Real (dividir el área obtenida entre 1000)
- b. Radio
- c. Diámetro



	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Area	Mean	Min	Max	Area real	radio	diametro	Datos filtrados	
2	1	133.886	255	255	255	133,886	6,52818791	13,0563758	
3	2	168.287	255	255	255	168,287	7,31897642	14,6379528	
4	3	153.339	255	255	255	153,339	6,9863667	13,9727334	
5	4	187.778	255	255	255	187,778	7,73120908	15,4624182	
6	5	107.146	255	255	255	107,146	5,84000266	11,6800053	
7	6	126.525	255	255	255	126,525	6,34619243	12,6923849	
8	7	86.378	255	255	255	86,378	5,24356476	10,4871295	
9	8	120.929	255	255	255	120,929	6,20426436	12,4085287	
10	9	156.119	255	255	255	156,119	7,04941282	14,0988256	
11	10	127.764	255	255	255	127,764	6,37718937	12,7543787	
12	11	81.270	255	255	255	81,27	5,08616206	10,1723241	
13	12	150.711	255	255	255	150,711	6,92624005	13,8524801	
14	13	36.016	255	255	255	36,016	3,38588967	6,77177934	
15	14	174.258	255	255	255	174,258	7,44768717	14,8953743	
16	15	25.312	255	255	255	25,312	2,83849605	5,6769921	
17	16	43.302	255	255	255	43,302	3,71260753	7,42521507	

16) Datos -> Filtro -> diámetro -> entre (mayor que 4,5 y menor que 16)

17) Copiar datos -> pegar solo valores (en columna: datos filtrados)