



Universidad Zaragoza

Nuevos polímeros anfifílicos para la transferencia de nanopartículas a fase acuosa

Novel amphiphilic polymers for the transfer of nanoparticles to the aqueous phase

Trabajo de fin de grado

Autor

Eva Barcelona

Directores

Rafael Martín Rapún

Jesús Martínez de la Fuente



D. Rafael Martín Rapún, investigador del grupo de Nanotecnología y Apoptosis en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza, y D. Jesús Martínez de la Fuente, científico titular en el mismo grupo en el Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón (Universidad de Zaragoza - CSIC),

INFORMAN:

Que EVA BARCELONA ESTAJE ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título *“Nuevos polímeros anfifílicos para la transferencia de nanopartículas a fase acuosa”* y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices para el Trabajo Fin de Grado en Biotecnología

Zaragoza, 22 de junio de 2016

Firmado: Dr. Rafael Martín Rapún

Firmado: Dr. Jesús Martínez de la Fuente

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1 Nanotecnología y nanomateriales	3
2.2 Aplicaciones en biomedicina	3
2.3 Síntesis de nanopartículas magnéticas	4
2.4 Recubrimiento para la estabilización de nanopartículas	4
2.5 Polímeros anfífilicos para el recubrimiento de nanopartículas	5
3. Planteamiento y objetivos	7
4. Materiales y métodos	8
4.1 Síntesis y transferencia	8
4.1.1 Síntesis del polímero 1 (PMAO + Gly).....	8
4.1.2 Síntesis del polímero 2 (PMAO + amina).....	9
4.1.3 Transferencia a agua de las nanopartículas	9
4.1.4 Purificación del exceso de polímero y electroforesis	10
4.1.5 Funcionalización con glucosa	11
4.2 Técnicas de caracterización.....	12
4.2.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	12
4.2.2 Espectroscopía infrarroja (IR)	12
4.2.3 Determinación de hierro en nanopartículas magnéticas	13
4.2.4 Análisis termogravimétrico (TGA)	13
4.2.5 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	14
4.2.6 Dispersión de la luz electroforética.....	14
4.2.6 Microscopía electrónica de transmisión	15
5. Resultados y discusión	16
6. Conclusiones	23
7. Bibliografía	24
8. Anexos	26
8.1 Anexo I.....	26
8.2 Anexo II.....	28
8.3 Anexo III.....	30

1. RESUMEN

Las nanopartículas inorgánicas tienen una gran variedad de aplicaciones en distintos ámbitos entre los cuales se encuentra la biotecnología. Para estabilizar estas nanopartículas, se han usado distintos tipos de moléculas entre las cuales se encuentran los polímeros anfifílicos que les otorgan la capacidad de pasar de medio orgánico (hexano) a medio acuoso.

Hasta el momento, el polímero utilizado es el poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO) a partir del cual, en este trabajo, se plantea la síntesis de distintos polímeros anfifílicos: con la mitad de cargas negativas (polímero **1**) que el polímero original o con cargas positivas (polímero **2**). Una vez obtenidos los polímeros deseados y caracterizados por RMN e IR se han utilizado para transferir nanopartículas magnéticas de hexano a agua. El polímero **2** no estabiliza adecuadamente las nanopartículas en medio acuoso. Sin embargo el polímero **1**, ha presentado un gran potencial para este fin. Las nanopartículas recubiertas por el polímero **1** son monodispersas y estables en agua y se han caracterizado por TEM, DLS, TGA y potencial Z. Por último se ha realizado su funcionalización con un fluoróforo y glucosa.

ABSTRACT

Inorganic nanoparticles have been widely investigated due to their variety of applications in diverse fields including biotechnology. Different kinds of molecules such as polymers, have been used to stabilize nanoparticles. Amphiphilic polymers give them the ability to move from organic medium (hexane) to aqueous medium.

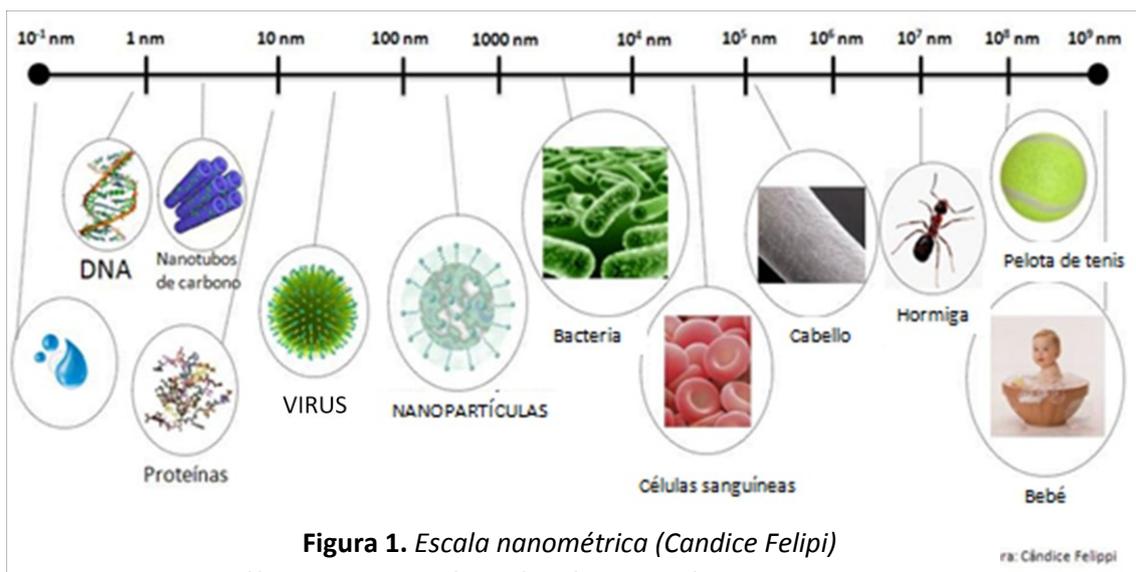
Until now, poly(maleic anhydride-alt-1-octadecene) (PMAO) has been the polymer of choice. In this essay the synthesis of two polymers is raised from PMAO. The polymer **1** has half of charges than the original one and the polymer **2** has positive charges. Once obtained, the desired polymers were characterized by RMN and IR and they were used to transfer nanoparticles from hexane to water. The polymer **2** doesn't stabilize adequately nanoparticles in aqueous medium. On the other hand, the polymer **1** has great potential for this purpose. Nanoparticles coated with polymer **1** are monodisperse and stable in aqueous medium and they have been characterized by TEM, DLS, TGA and Z Potential. Finally the functionalization with glucose and a fluorophore has been performed.

2. ANTECEDENTES

2.1. Nanotecnología y nanomateriales

Se define como nanomaterial aquel en el que al menos una de sus dimensiones es de entre 1 y 100 nm. Desde la antigüedad se han utilizado nanomateriales, concretamente nanopartículas, en aplicaciones como el pulido de materiales, recubrimiento de cerámica o coloración de vidrio. Sin embargo, no fue hasta 1959 cuando Richard Feynman habló por primera vez de manipular y controlar objetos a pequeña escala.¹

Debido a sus dimensiones nanométricas los nanomateriales presentan propiedades (ópticas, químicas, magnéticas o electrónicas) únicas y diferentes a las del mismo material a escala macroscópica.³ Este hecho ha despertado un gran interés y ha motivado el desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología como nuevos dominios científicos y tecnológicos dedicados al diseño, fabricación y aplicación de nanoestructuras, así como al estudio de la relación entre las propiedades y las dimensiones nanométricas.^{2,3}



Hoy en día hay una gran variedad de nanomateriales: cerámicos, metales, semiconductores, polímeros o combinación de todos los anteriores. Uno de los que más interés ha suscitado son las nanopartículas magnéticas (MNPs), formadas por elementos como hierro, níquel o cobalto o sus óxidos. La sensibilidad a un campo magnético las hace idóneas para una gran cantidad de aplicaciones, algunas de ellas descritas más adelante.⁴

Dependiendo del tamaño y grado de cristalinidad las MNPs pueden ser superparamagnéticas a temperatura ambiente. Las nanopartículas se magnetizan en presencia de un campo magnético externo. Cuando se retira el campo magnético, la

magnetización cambia de signo rápida y aleatoriamente por efecto de la temperatura dando lugar a una magnetización promedio nula. El superparamagnetismo a temperatura ambiente es propio de la nanoescala e indispensable para el uso de MNPs en biomedicina puesto que las MNPs vuelven a un estado no magnetizado cuando deja de actuar el imán, evitando así un comportamiento activo cuando no hay ningún campo aplicado y los efectos secundarios a los que esta continua activación daría lugar.^{5,6}

2.2. Aplicaciones en biomedicina

El uso de MNPs en biomedicina se remonta al los años 90. Su utilidad se debe a la biocompatibilidad del hierro, que se metaboliza con relativa facilidad, a que las nanopartículas tienen un tamaño idóneo para la interacción con proteínas, células, ADN, etc. y a que las partículas poseen un elevado momento magnético.⁷ Hoy en día, se han desarrollado aplicaciones *in vivo* e *in vitro*, tanto en el diagnóstico como en terapia. Algunas de ellas se describen a continuación.⁸

i) Hipertermia magnética: Las células tumorales son más sensibles a los cambios de temperatura que las sanas. La hipertermia magnética se observa cuando nanopartículas superparamagnéticas disipan como calor la energía magnética recibida al aplicar un campo magnético alterno. Una hipertermia controlada, a 42- 45 °C, debilita o mata las células que se encuentran en la zona tratada.^{9,10}

ii) Direccionamiento y liberación de fármacos: El guiado se relaciona con el movimiento que experimentan las MNPs al aplicarles un campo magnético externo. También se pueden dirigir mediante una funcionalización apropiada de la superficie. Una vez en la zona de tratamiento se puede utilizar la hipertermia como medio terapéutico en sí o para desencadenar la liberación localizada de un fármaco. El tratamiento localizado permite reducir la dosis de fármacos y, por tanto, los efectos secundarios.^{11,12}

iii) Resonancia magnética de imagen (RMI): Se basa en la diferencia de relajaciones magnéticas de los protones entre los fluidos y los tejidos. Las MNPs actúan como agente de contraste modificando la velocidad de relajación magnética de forma que aumentan el contraste de la imagen al aumentar las diferencias entre distintos tipos de tejidos y entre tejidos normales y patológicos.^{13,14}

iv) Separación y selección: Consiste en añadir una disolución de MNPs a la suspensión que contiene la sustancia a separar. Esta se va a adsorber sobre las nanopartículas pudiendo ser recuperada usando un separador magnético apropiado.¹⁵

2.3. Síntesis de nanopartículas magnéticas

En las últimas décadas ha habido un alto número de publicaciones en las que se describen métodos y rutas de síntesis de nanopartículas magnéticas monodispersas, con tamaños controlados y alta estabilidad. Algunos de los métodos más populares incluyen la co-precipitación, descomposición térmica, síntesis en micelas, síntesis hidrotermal y técnicas de pirólisis láser.¹⁶ La descomposición térmica se basa en la descomposición de precursores inorgánicos de hierro en disolventes orgánicos de alto punto de ebullición y en presencia de surfactantes (ácido oleico y oleilamina). Proporciona MNPs con baja polidispersidad, alto rendimiento y gran control de tamaño y forma. Como consecuencia las propiedades magnéticas son muy buenas y las nanopartículas son óptimas para su uso en biomedicina. Por otra parte, presenta inconvenientes como el uso de montajes complicados y la obtención de las nanopartículas en hexano.^{17,18}

2.4. Recubrimiento para la estabilización de nanopartículas

Por el método de descomposición térmica se obtienen nanopartículas estabilizadas por surfactantes y dispersas en un disolvente orgánico (hexano). Sin embargo las aplicaciones biomédicas requieren el uso de agua como medio de dispersión. Además, los medios fisiológicos son sumamente complejos ya que contienen una gran cantidad de componentes que pueden desestabilizar las nanopartículas y causar su agregación.

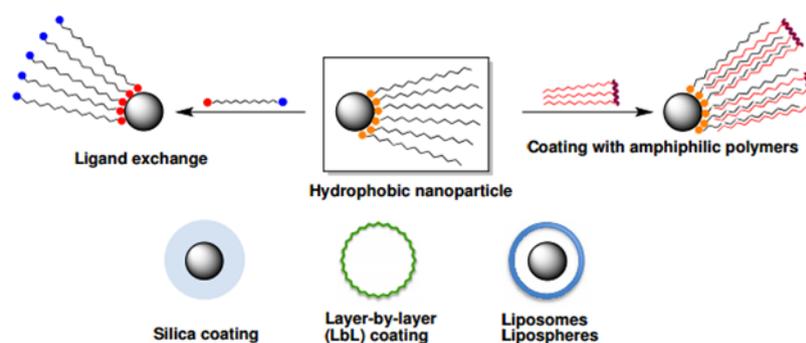


Figura 2. Estrategias para el recubrimiento de MNPs.¹⁹

Es por esto que es necesario un recubrimiento de las nanopartículas que además de estabilidad en medios acuosos, ofrezca una superficie susceptible de ser funcionalizada con biomoléculas. Las estrategias más usadas para la estabilización de MNPs en medios acuosos son las siguientes:

i) Intercambio de ligandos: Basado en el intercambio de las moléculas hidrofóbicas que actúan como surfactantes recubriendo las MNPs originalmente, por ligandos hidrofílicos. La naturaleza de estos ligandos, dependerá de la composición de la nanopartícula.

ii) Recubrimiento con sílica: Proporciona nanopartículas solubles en agua con una gran estabilidad y biocompatibilidad. Además es muy fácil controlar el proceso de recubrimiento y funcionalizarlo con otras moléculas.

iii) Modificación química de las moléculas de surfactantes: Mediante una reacción química se cambian las cadenas hidrófobas de las moléculas de surfactantes por grupos polares, preferentemente cargados.

iii) Encapsulación: Consiste en rodear la nanopartícula con una cápsula orgánica. Puede tratarse de liposferas, o polimerosomas entre otros.

iv) Recubrimiento con polímeros: Se pueden usar polímeros como el poli(etilen glicol) o derivados del quitosano o dextrano, aunque nos centraremos en los polímeros anfifílicos.^{19,23,25}

2.5. Polímeros anfifílicos para el recubrimiento de nanopartículas

Los polímeros anfifílicos, han sido ampliamente utilizados para la dispersión de nanopartículas en soluciones acuosas debido a que no solo permiten su paso a agua sino que proporcionan una superficie con la que conjugar biomoléculas.²⁰ Aunque no covalente, la unión del polímero con MNPs es altamente estable puesto que consiste en la interacción múltiple de cadenas laterales hidrofóbicas del polímero con el surfactante original de la nanopartícula. Los grupos hidrofílicos del polímero (-COO⁻ normalmente) otorgan al sistema solubilidad en agua y estabilidad frente a la agregación gracias a la repulsión electrostática.^{20,21}

Actualmente, el grupo de investigación utiliza el poli(anhídrido maleico-*alt*-1-octadeceno) o PMAO, el cual contiene cadenas hidrofóbicas de 16 carbonos que se intercalan con el ácido oleico y la oleilamina que rodean el núcleo inorgánico de la nanopartícula. Una vez la nanopartícula está encapsulada por el polímero en medio orgánico (cloroformo), los grupos anhídrido se hidrolizan por tratamiento con una disolución acuosa de hidróxido de sodio, y las nanopartículas pasan a la fase acuosa encapsuladas por el polímero (Figura 3). Las nanopartículas se hacen solubles en agua y tienen una gran estabilidad coloidal, la cual se debe básicamente a la presencia de grupos carboxilato cargados negativamente en la superficie (repulsión electrostática). A su vez, la alta densidad de cargas disminuye su biocompatibilidad por lo que hay que reducir su número funcionalizando el polímero sin comprometer su estabilidad.^{22,23}

La estabilidad coloidal de las nanopartículas depende del pH y de la fuerza iónica del medio. A valores de pH ácido, la carga negativa se neutraliza al protonarse los grupos carboxilato y las nanopartículas tienden a agregar.

Por otro parte, la alta densidad de cargas negativas a pH fisiológico en las nanopartículas obtenidas por este sistema influye negativamente en la conjugación con algunas biomoléculas polianiónicas, como los ácidos nucleicos, debido a la repulsión electrostática (resultados no publicados).

Aunque el PMAO es el polímero utilizado hasta el momento, existen otros muchos polímeros aptos para este uso. Por ejemplo, antes de optimizar el protocolo de pasaje, se usaba el poli(anhídrico maleico-*alt*-1-tetradeceno) o PMAT.²⁴ Sin embargo, hay diferencias a la hora de solubilizar las nanopartículas en medio acuoso ya que PMAT, presenta cadenas hidrofóbicas de 12 carbonos mientras que las del PMAO, tienen 16 y para que el recubrimiento proporcione nanopartículas estables, hay que añadir una molécula para que se entrecruce con el polímero.²⁵

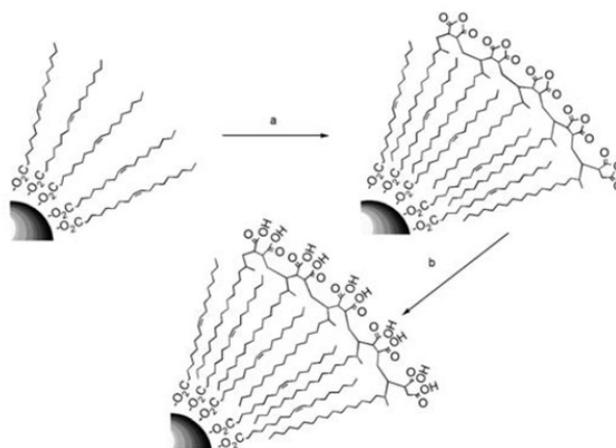


Figura 3. a) Recubrimiento de MNPs con PMAO. b) hidrólisis del polímero con NaOH 0.05 M.²⁶

Cabe destacar la existencia de otros polímeros que estabilizan las nanopartículas por un proceso de intercambio de ligandos con el surfactante de las nanopartículas. Este tipo de polímeros presenta algunas ventajas como que no aumenta el radio hidrodinámico que se produce con el entrecruzamiento de los polímeros anfifílicos mencionados anteriormente y que evita la encapsulación de varias nanopartículas en una misma micela.²⁷

3. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes se plantean dos objetivos:

i) La obtención de NPs positivas a pH neutro y estables a pH ácido.

ii) NPs con una menor densidad de carga en la superficie, más fácilmente conjugables con ácidos nucleicos (polianiones).

Para ello se propone utilizar polímeros anfifílicos al tratarse de una estrategia conocida por el grupo. Por derivatización del polímero se cambiará el grupo ionizable y se reducirá la densidad de cargas en la superficie.

Se propone la síntesis de los siguientes polímeros como alternativa al PMAO (figura 4). El polímero **1** tiene la mitad de cargas negativas mientras que el polímero **2** tiene una amina terciaria como grupo ionizable por lo que será estable a pH neutro y ácido.

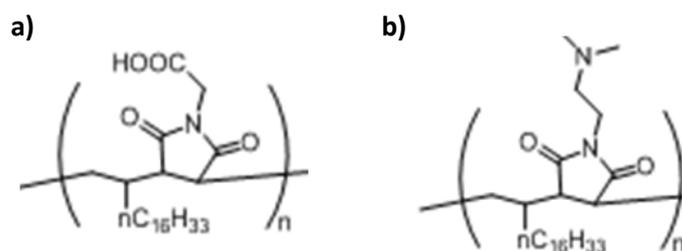


Figura 4. a) Estructura del polímero **1**. b) Estructura del polímero **2**.

Una vez sintetizados, se procederá a su caracterización tanto de manera independiente como en conjugación con las nanopartículas magnéticas para así, entre otras cosas, comprobar su estabilidad. Posteriormente, se conjugarán las nanopartículas revestidas con el polímero correspondiente con diversas biomoléculas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Síntesis y transferencia

En este apartado, se describe la síntesis de los polímeros utilizados en este trabajo así como la transferencia a agua de las nanopartículas magnéticas y los distintos modos de purificación para la eliminación del exceso de polímero en las disoluciones acuosas de las nanopartículas.

4.1.1. Síntesis del polímero 1

Para llevar a cabo la síntesis de este polímero, se utilizan como reactivos PMAO, glicina y trietilamina (Figura 5). La trietilamina se utiliza como base, para neutralizar el grupo ácido de la glicina, y que la amina actúe mejor como nucleófilo. Se toman las cantidades que aparecen en la tabla 1. Se ponen los reactivos en un matraz y se añaden 100 ml de tolueno. Se aumenta la temperatura hasta la temperatura de reflujo del tolueno (111 °C). Se utiliza un sistema Dean-Stark para la eliminación del agua formada en el medio de reacción.

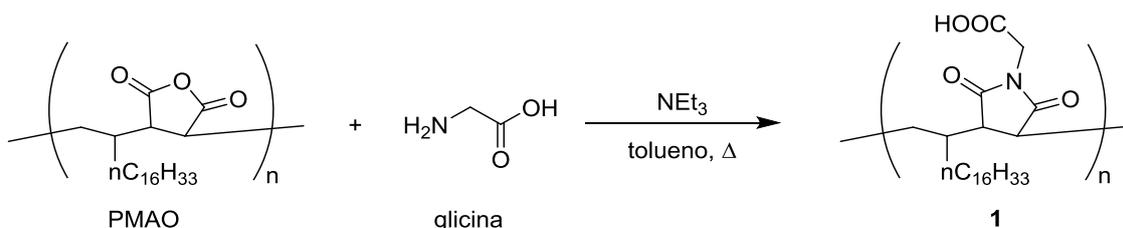


Figura 5. Reacción de síntesis del polímero 1

Tabla 1. Proporciones de los reactivos empleados para la síntesis del polímero 1

Reactivo	Pm (g/mol)	Equiv.	mmol	mg	ρ (g/ml)	V (ml)
PMAO	350,54 ^a	1	5	1752,5	-	-
Glicina	75,07	1,1	5,5	412,8	-	-
Trietilamina	101,19	1,2	6	607,1	0,726	0,836
Tolueno	-	-	-	-	-	100

^a peso molecular de la unidad repetitiva

Tras 48 h de reacción, se procede a evaporar el tolueno utilizando el rotavapor. En el producto, se encuentran además del compuesto de interés, la trietilamina y el exceso de glicina, por lo que para purificarlo, se adicionan 8 ml de tolueno y se centrifuga 30' a 4000 rpm. Nos quedamos con el sobrenadante y se evapora finalmente en el rotavapor.

4.1.2. Síntesis del polímero 2

La síntesis del polímero **2** se lleva a cabo con los reactivos PMAO y *N,N*-dimetiletilendiamina (figura 6) según las cantidades que aparecen en la tabla 2. Se ponen a reaccionar durante toda la noche a la temperatura de reflujo del tolueno. Se utiliza un sistema Dean-Stark para la eliminación del agua formada en el medio de reacción

A las 24 h se para la reacción y se retira el sobrenadante quedando en el matraz el polímero **2**.

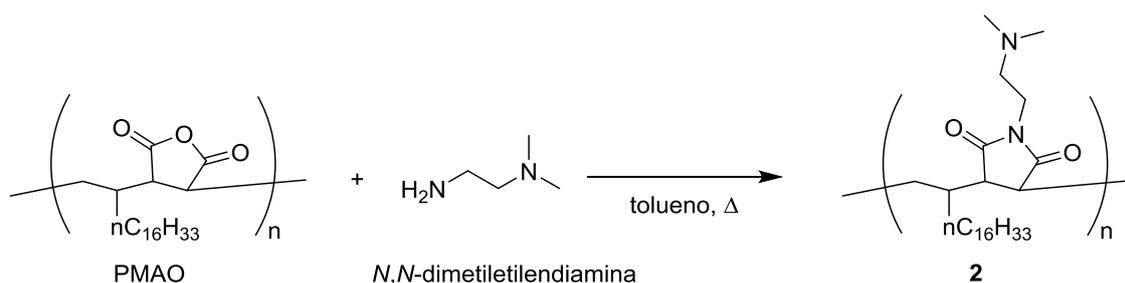


Figura 6. Reacción de síntesis del polímero **2**²⁸.

Tabla 2. Proporciones de los reactivos empleados para la síntesis del polímero **2**

Reactivo	Pm (g/mol)	Eq	mmol	mg	% pureza	ρ (g/ml)	V (ml)
PMAO	350,54 ^a	1	1,25	438,25	-	-	-
<i>N,N</i> -dimetil etilendiamina	83,15	1	1,25	115,98	95	0,805	114,07
Tolueno	-	-	-	-	-	-	25

^a peso molecular de la unidad repetitiva

4.1.3. Transferencia a agua de las nanopartículas

La cantidad de polímero utilizada en la transferencia de las nanopartículas a la fase acuosa se calcula a partir del número de unidades repetitivas de polímero que se quieren añadir por cada nanómetro cuadrado de superficie de las nanopartículas en la muestra, es decir, según una proporción (ratio) de unidades repetitivas por unidad de superficie (u.r./nm^2).

Se parte de una dispersión en hexano de nanopartículas de 12 nm de diámetro preparadas por el método de descomposición térmica. Las nanopartículas de partida se precipitan con etanol 3 veces, para eliminar el exceso de reactivos que puedan quedar tras su síntesis y se resuspenden en 2 ml de CHCl_3 . La cantidad de polímero apropiada para el ratio planeado se disuelve en 200 ml de CHCl_3 en un matraz de 500 ml. En este trabajo, se realizaron varios pasajes con distintos ratios (indicados en la

tabla 3) para la puesta a punto de la transferencia a agua de cada uno de los polímeros usados.

Tabla 3. Pasajes realizados con los distintos polímeros así como los ratios utilizados para llevarlos a cabo y la cantidad de polímero que corresponde a cada uno.

Polímero	Pm unidad repetitiva (g/mol)	Cantidad de Fe (mg)	Ratio (monom/nm ² de NP)	Cantidad de polímero (mg)
2	420,04	1,5	125	19,27
		1,5	2000	219,16
1	410,61	1,5	125	18,54
		1,5	500	74,17
		1,5	1000	148,3
		1,5	2000	294,6

Una vez que el polímero se ha disuelto en cloroformo se introduce el matraz en un baño de ultrasonidos y la disolución de las nanopartículas se adiciona gota a gota con una pipeta Pasteur. La mezcla se deja 15 minutos adicionales sonicando. Posteriormente se elimina la mayor parte del cloroformo en el rotavapor a 40 °C y 500 mbar de presión dejando entre entre 5 y 10 ml de volumen. Se eleva la temperatura a 60 °C y se añaden 10 ml de agua y otros 10 ml de NaOH 0,1 M en el caso del polímero **1** y 10 ml de HCl 0,1 M en el caso del polímero **2** para desprotonar los grupos carboxilo o protonar los grupos amino respectivamente. Se aumenta el vacío a 200 mbar para eliminar todo el cloroformo y posteriormente se filtra en caliente la disolución acuosa de nanopartículas con filtros de 0,22 µm de acetato de celulosa para eliminar las impurezas y agregados.

4.1.4. Purificación del exceso de polímero y electroforesis

Para eliminar el exceso de polímero se han probado dos métodos:

a. Lavados mediante centrifugaciones

En este método, se llevan a cabo 3 centrifugaciones a 24000 rpm (69673 g), 18 °C durante 2 h. Tras cada una de las centrifugaciones el sobrenadante se recupera con una pipeta pasteur y las nanopartículas se vuelven a resuspender en agua.

b. **Gradiente de sacarosa**

En vez de realizar las centrifugaciones como en el apartado anterior, se crea un gradiente de sacarosa en tubos de centrífuga de 50 ml adicionando 5 ml de las disoluciones de sacarosa con distintas concentraciones (0,5 M, 0,8 M, 1 M, 1,2 M y 1,5 M) poniendo en la parte inferior la más densa y disminuyendo la molaridad. En la parte superior se añade la disolución de nanopartículas obtenida en el apartado 5.1.4 y se realizan dos ciclos de centrifuga a 24000 rpm, 18 °C durante 15' cada una. Posteriormente, se elimina el sobrenadante y el *pellet* de nanopartículas precipitadas en el fondo el tubo se resuspende en agua. Se lleva a cabo un último ciclo de centrifuga a 24000 rpm, 18 °C durante 2 h para eliminar la sacarosa que se hubiese podido quedar en el *pellet*. Finalmente se resuspende en agua.

La comprobación de que se ha eliminado el exceso de polímero se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa (0,6% (w/v) en TBE 0,5x). Se cargan 4 µl de suspensión de nanopartículas así como de los sobrenadantes recogidos después de cada una de las centrifugaciones junto con 6 µl de TBE:glicerol (4:1). Se deja correr la electroforesis durante 40' a 90 V y 3 A. Finalmente se observa el gel en el transiluminador para observar la presencia o ausencia de polímero en los distintos carriles.

4.1.5 Funcionalización con glucosa

La funcionalización con glucosa se trata de una bioconjugación en la que se van a unir moléculas de glucosa a los grupos carboxilatos del polímero con el que se encuentran recubiertas las nanopartículas. El protocolo a seguir consiste en añadir a dos disoluciones de 500 µl de tampón fosfato de sodio (NaP) (0,1 M, pH 7) 1 mg de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y 0,63 mg de N-hidroxisulfosuccinimida (S-NHS) respectivamente. Se mezclan y se dejan agitando en rodillos 10 minutos para luego añadir 0,5 mg de NPs recubiertas con el polímero. Se deja agitando 35 minutos en rodillo. Posteriormente se añade NaP (0,1 M, pH 7) hasta 1 ml y se carga en una *sephadex* (columna de cromatografía de exclusión) previamente equilibrada con NaHCO₃ 50 mM (pH 8,3). Se recogen las NPs y se añade 1 ml de una disolución de TAMRA 0,05 mg/ml en NaHCO₃ 50 mM (pH 8,3). Se deja reaccionar al menos 2h cubierto con papel de aluminio.

Se centrifuga la mezcla a 4°C, 30 min a 18000 rfc y se retira el sobrenadante. Se añade agua y se repite el proceso de centrifugación hasta que el sobrenadante sea completamente transparente. Hasta aquí las MNPs se encuentran funcionalizadas con TAMRA. Para realizar la bioconjugación con glucosa se centrifugan las nanopartículas obtenidas anteriormente 20' a 14000 rpm, 4 °C y se resuspende el *pellet* en 320 µl de SSB (50 mM, pH 9). Se preparan también diluciones de glucosa (4,15 mg en 630 µl de SSB) y de EDC (12,5 mg en 200 µl de SSB). Se añade la disolución de glucosa a las MNPs

y 50 µl de la disolución de EDC y se deja incubar en el rodillo durante 30 min. Se vuelven a añadir otros 50 µl de la disolución de EDC y se pone a incubar 2,5 h en el rodillo. Una vez finalizado se realizan lavados mediante centrifugaciones (4 °C, 30 min a 14000 rpm) para posteriormente caracterizar las nanopartículas funcionalizadas.

4.2. Técnicas de caracterización

Estas técnicas ofrecen una visión sobre los resultados obtenidos en la síntesis tanto del polímero, como de las nanopartículas estabilizadas por este. Por una parte se han empleado técnicas de caracterización química como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de infrarrojo y la determinación espectrofotométrica de la concentración de hierro. En este trabajo también se ha llevado a cabo una caracterización estructural con la que se han estudiado importantes parámetros como el tamaño, la dispersidad y la forma de las nanopartículas gracias a técnicas como la microscopía electrónica de transmisión (TEM), la dispersión dinámica de la luz (DLS) y dispersión de luz electroforética (ELS, para la medida de potencial Z).

4.2.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Se trata de una técnica que permite llevar a cabo un análisis estructural y estereoquímico para la caracterización de compuestos químicos con núcleos activos así como la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos y el control de impurezas.

Fundamento. Consiste en una espectroscopía de absorción en la cual un núcleo magnéticamente activo absorbe energía electromagnética en el rango de las radiofrecuencias. El momento magnético neto del núcleo está orientado en el seno de un campo magnético y por efecto de esta energía cambia su orientación. Los núcleos magnéticamente activos más frecuentes son ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P y ^{19}F .

Preparación de la muestra. Se toma una cantidad pequeña del compuesto a analizar, aproximadamente unos 20 mg y se introducen en un tubo especial para el análisis por RMN. Se disuelven en 0,8 ml de CDCl_3 y se llevan a analizar. Es muy importante el uso de disolventes deuterados ya que en caso contrario el disolvente sería detectado impidiendo la interpretación de la resonancia magnética de nuestro producto.

4.2.2. Espectroscopía infrarroja (IR)

Espectroscopía de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Junto con la espectroscopía de RMN permite identificar un compuesto así como investigar la composición de una muestra gracias a las frecuencias de vibración de los enlaces químicos, dependientes de la energía potencial de la

molécula, la geometría molecular, las masas atómicas y el acoplamiento molecular de la sustancia que estemos analizando.

Fundamento. Cuando las moléculas reciben luz con la misma energía de vibración, esta es absorbida y aparece en el espectro infrarrojo como una banda de absorción.

Preparación de la muestra. Tomamos directamente una pequeña cantidad de la muestra y se deposita en el orificio de medida del aparato infrarrojo. La muestra se puede medir sin más preparación gracias a la utilización de un accesorio que permite medir la reflectancia total atenuada (ATR)

4.2.3. Determinación de hierro en nanopartículas magnéticas

Va a permitir tener una medida del rendimiento en el proceso de síntesis así como en el pasaje a agua ya que, como se trata de nanopartículas de óxido de hierro, la cantidad de este indicará las cantidad de nanopartículas que se conservan al final del pasaje.

Fundamento. La medición de la cantidad de lleva a cabo gracias a la formación de un complejo coloreado formado por Fe (III) - Tiron (4,5-dihidroxi-1,3-bencenodisulfonato de sodio) el cual se puede medir espectrofotométricamente a 480nm.

Preparación de la muestra. Se trabaja por triplicado tanto con las muestras de las cuales queremos saber la concentración como con una serie de patrones que tienen una concentración de Fe (III) conocida, todos elaborados a partir de una disolución patrón de Fe (III). Las concentraciones usadas como patrón serán de 100, 200, 400, 600 y 800 $\mu\text{g/ml}$. Se toman 50 μl de cada uno y se depositan en eppendorfs, a los cuales se añaden posteriormente 100 μl de agua regia ($\text{HCl}:\text{HNO}_3$, 3:1 v/v) durante 15' a 60 °C. En el caso de las muestras, en función de lo concentradas o diluidas que estén se ponen 5, 10 o 20 μl de la muestra y el resto del volumen hasta alcanzar 50 μl del medio en el que se encuentren las nanopartículas magnéticas. También se les adicionan 100 μl de agua regia con la cual se consigue digerir la capa orgánica y destruir las nanopartículas oxidando todo el hierro a Fe (III). Pasados 15 min, se añaden 350 μl de agua Mili-Q para detener la digestión, y se toman 50 μl de cada eppendorf para depositarlos en una placa de ELISA de 96 pocillos. Finalmente, se añaden 60 μl de una disolución 1:5 de Tiron 0,25 M y KOH 4 N y 100 μl de Na_3PO_4 0,2 M (pH9,7). Pasados 15' de incubación, se mide la absorbancia a 480 nm. Con los patrones se realiza una recta de calibrado con la cual se puede interpolar el dato de la absorbancia de nuestra muestra y su concentración de hierro.

4.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica permite determinar la cantidad de materia orgánica, ya sean ligandos o polímeros, que cubren las nanopartículas.

Fundamento. Se realiza una continua medición de la masa de una muestra en función de la temperatura y/o el tiempo bajo una atmósfera adecuada. La materia orgánica se quema a una temperatura inferior que la inorgánica liberando gases de combustión (CO₂, H₂O vapor, NOx...) y provocando una pérdida de masa que se mide.

Preparación de la muestra. Se liofiliza 1 mg de la muestra de MNPs y se realizan las medidas bajo una atmósfera de aire aumentando la temperatura a una velocidad de 10 °C/min hasta que se alcanza una temperatura final de 800 °C. Las mediciones las realiza el equipo *Universal V4.5 de TA Instruments*. Consta de una balanza analítica sumamente sensible que registra pequeñas variaciones en el peso de la muestra y un horno donde se calienta la muestra a la velocidad especificada.

4.2.5. Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Con esta técnica se puede estudiar la distribución de tamaños de nanopartículas en suspensión, así como el radio hidrodinámico de polímeros, proteínas y coloides.

Fundamento. Cuando las nanopartículas se encuentran en suspensión, poseen un movimiento aleatorio debido a la interacción con otras nanopartículas o con moléculas del disolvente. Este hecho, permite medir la variación de la dispersión de un haz de luz láser monocromática, la cual va a variar según el movimiento de nanopartículas en el disolvente. Esta variación de la dispersión de la luz con el tiempo, es medida por el equipo de DLS y se correlaciona mediante una serie de algoritmos matemáticos con el tamaño de las nanopartículas puesto que las de menor tamaño, se mueven más rápido que aquellas que forman agregados o son de mayor tamaño. El detector, es un fotomultiplicador posicionado a 90 ° de la fuente de luz.

Preparación de la muestra. Se diluye la muestra de nanopartículas en agua filtrada hasta una concentración de 0,1 mg/ml en 2ml. Se realizan de cada muestra 8 medidas de 2 minutos cada una a 25 °C. Los resultados son analizados en términos del número de nanopartículas. Las mediciones se llevaron a cabo con el equipo *Brookhaven Z Pals*.

4.2.6. Dispersión de luz electroforética (ELS, para la medida de potencial Z)

La magnitud del potencial Z ofrece una indicación del potencial de un sistema coloidal lo cual, se puede relacionar con la carga superficial que este ofrece. Cuanto mayor sea el valor del potencial, en valor absoluto, mayor estabilidad coloidal tendrá la muestra ya que las nanopartículas tenderán a repelerse.

Fundamento. Un láser es utilizado para proporcionar una fuente de luz que ilumine las partículas en el interior de la muestra. Esta fuente, está separada en un rayo incidente y en otro de referencia. El rayo incidente pasa a través del centro de la muestra, de manera que se detecta la luz que se dispersa. Cuando se aplica un campo eléctrico a la celda, cualquier partícula que se encuentre en movimiento presente en la muestra, causará una variación de la intensidad de la luz detectada con una frecuencia proporcional a la velocidad de la partícula. La información es recogida por un procesador y posteriormente recogida por un ordenador que generará datos sobre la movilidad electroforética y el potencial Z.

Preparación de la muestra. Se diluyeron las muestras en KCl 10 mM hasta una concentración de 0,08 M y se adicionó HCl hasta pH 6,1. Las medidas fueron tomadas con el quipo *Brookhaven Z Pals*.

4.2.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Utilizada para llevar a cabo la caracterización morfológica, estructural y composición de las nanopartículas.

Fundamento. Basado en la aplicación de un haz de electrones de alta energía a través de la muestra de tal forma, que al interactuar con ella, parte de los electrones chocarán y el resto la atravesarán chocando contra una pantalla fluorescente. Se van a producir una serie de diferencias de energía entre la energía inicial y final del haz, las cuales serán detectadas por un sistema de lentes proyectoras formando una imagen ampliada de la muestra.

Preparación de la muestra. Se toman 2 μ l de la muestra de nanopartículas y se diluyen en 10 μ l de agua miliQ. Con una rejilla de cobre recubierta de carbono, se toma la gota y se deja secar al aire antes realizar la medida con el microscopio.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El polímero **2** (figura 4a) se sintetiza mediante la reacción de PMAO con *N,N*-dimetiletildiamina²⁹ según se especifica en el apartado 4.1.2 generando un polímero con cargas positivas a pH ácido. Por otra parte **1** se forma por la reacción de PMAO y glicina (apartado 4.1.1) dando lugar a un polímero con la mitad de cargas negativas que el polímero de partida.

Los resultados obtenidos en el RMN se reflejan en la figura 7.

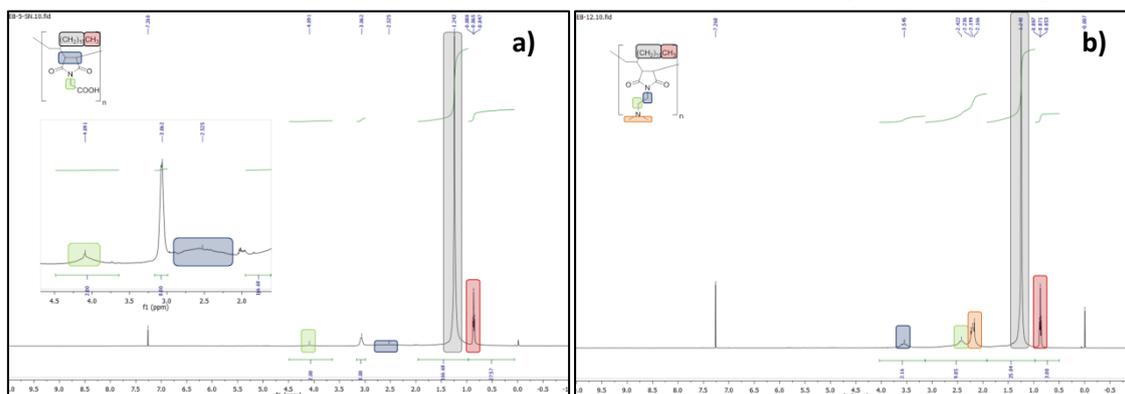


Figura 7. a) RMN del polímero **1**. b) RMN del polímero **2**.

En los espectros de RMN la posición de los picos depende del apantallamiento de los núcleos de hidrógeno, es decir, la densidad de electrones que haya sobre estos. De esta forma, aquellos que estén cercanos a grupos atractores de electrones están más desapantallados y aparecen con un mayor desplazamiento químico, mientras que los que estén cerca de grupos dadores de electrones están más apantallados y aparecen con un menor desplazamiento químico.

En la figura 7a) se aprecia el RMN del polímero **1**. A 0,75 ppm aparecen los protones correspondientes al metilo terminal de la cadena alifática. El resto de protones de la cadena alifática (grupos -CH₂-) se encuentran a 1,25 ppm. A 2,5 ppm están los protones del anillo succinimida (rodeados con un rectángulo azul) y finalmente, a 4 ppm se encuentran los hidrógenos del carbono alfa de la glicina, siendo los más desplazados debido a las contribuciones desapantallantes del carbono carboxílico y del nitrógeno de la imida.

Por otra parte la figura 6b) es el RMN del polímero **2**. De nuevo a 0,75 y 1,25 ppm se encuentran las señales de los protones de la cadena alifática. Con un desplazamiento de 2,25 ppm están los singletes correspondientes a los protones correspondientes a los dos metilos de la amina terciaria (rectángulo naranja) y para finalizar a 2,5 y 3,5 ppm los CH₂ en α y β respecto la imida, debido al desapantallamiento que ejercen esta y la amina.

En los RMN de los polímeros las señales son muy anchas debido a que crean disoluciones viscosas (se trata de moléculas de elevado peso molecular), a su entorno

químico y a que sus núcleos (protones en este caso) tienen menos capacidad de relajación que en moléculas más pequeñas. Por lo tanto, la asignación de la estructura correspondiente a los espectros RMN no es del todo inequívoca. En las condiciones de reacción es posible obtener dos productos distintos, la imida y la amida (Figura 9). Para corroborar la formación de la imida se sintetizaron dos moléculas análogas de bajo peso molecular en las mismas condiciones que los polímeros sustituyendo únicamente el PMAO por anhídrido succínico. Se sometieron a RMN obteniendo los resultados que aparecen en la figura 8.

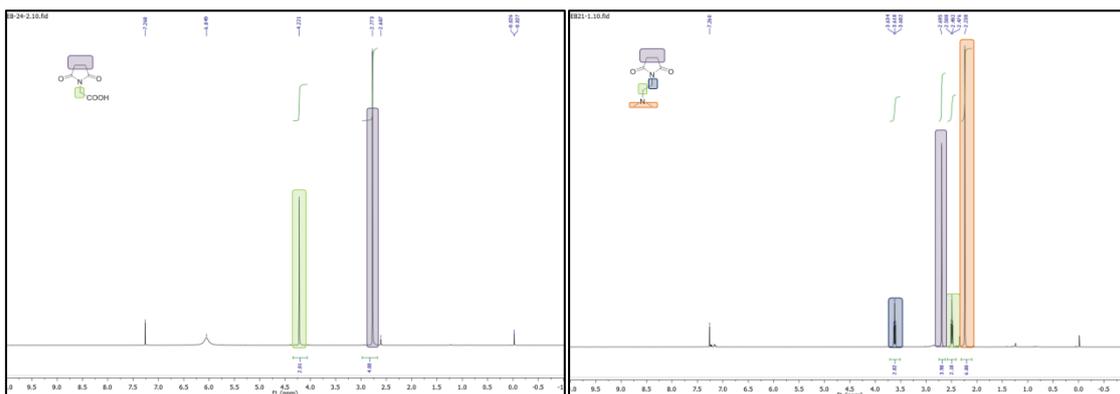


Figura 8. a) RMN del anhídrido correspondiente al polímero 1. b) RMN del anhídrido correspondiente al polímero 2.

Se aprecian señales más estrechas, debido a los factores que se han comentado antes, que proporcionan integrales más fiables. En la figura 8a) aparecen los mismos picos que en el RMN del polímero 1, al igual que en la figura 8b) con el polímero 2, a excepción de los correspondientes a la cadena alifática ausente en los compuestos de bajo peso molecular. En esta figura (8b) se ve que se ha formado la imida esperada en vez de una amida (figura 9) porque los CH₂ que forman el anillo aparecen a 2,75 ppm como un singlete, hecho que no pasaría en el caso de que se hubiese originado amida, menos simétrica (figura 9b).

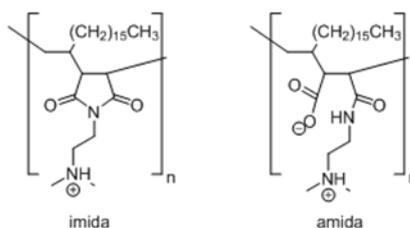


Figura 9. a) Estructura esperada para el polímero 2. b) Estructura que se podría haber generado en la síntesis del polímero 2.

Se realizó también espectroscopía infrarroja de los polímeros 1 y 2 obteniéndose picos coincidentes con los tabulados para las estructuras correspondientes (Anexo I)

Tras confirmar las estructuras de los polímeros, se utilizaron para llevar a cabo el pasaje de las nanopartículas a agua. Para evaluar la cantidad de polímero que se adiciona en los pasajes para recubrir las nanopartículas se utiliza la relación existente entre la cantidad de polímero que se añade y la superficie de las nanopartículas, es decir, el número de unidades repetitivas de polímero por cada nm² de superficie de nanopartícula.

A continuación, se indican los cálculos que hay que realizar para calcular esa proporción así como los datos necesarios para realizarlo.

Tabla 4. Datos conocidos para calcular la masa de polímero a añadir en cada pasaje con un ratio dado

Datos necesarios para calcular la cantidad de polímero					
Generales		NPs		Polímero 1	
Parámetro	Unidades	Parámetro	Unidades	Parámetro	Unidades
Mw (Fe ₃ O ₄)	g/mol	[Fe]	mg/ml	Mw (u.r.)	g/mol
Mw (Fe)	g/mol	Diámetro	nm	Ratio	u.r./nm ²
Densidad (ρ)	g/cm ³	Radio	nm	-	-
Nº Avogadro	molec/mol	Volumen (V _t)	ml	-	-

Conocida la concentración de hierro del lote de nanopartículas de partida se puede calcular la concentración de Fe₃O₄ (material del que están compuestas las MNPs) :

$$[Fe_3O_4] = \frac{[Fe] \cdot Mw(Fe_3O_4)}{3 \cdot Mw(Fe)}$$

Por otra parte, se calcula también el volumen, la masa y la superficie de una única nanopartícula a partir del radio obtenido por microscopía electrónica y la densidad de la magnetita:

$$V = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r^3 \qquad Masa = V \cdot \rho \qquad Superficie (A) = 4 \cdot \pi \cdot r^2$$

Se calcula ahora el número total de nanopartículas con las que se va a realizar el pasaje así como la superficie total de estas:

$$N^\circ NPs = \frac{[Fe_3O_4] \cdot V_t}{1000 \cdot Masa} \qquad A_t = A \cdot N^\circ NPs$$

Conocida la superficie total de las NPs y el ratio (Rt), que se ha establecido al principio, se puede calcular la cantidad de polímero que se ha de añadir:

$$\text{Moles polímero} = \frac{Rt \cdot A_t}{N.A.}$$

$$g \text{ polímero} = \text{moles} \cdot Mw \text{ (u.r.)}$$

Los resultados de estos cálculos para todos los pasajes realizados se recogen en la tabla 3 del apartado materiales y métodos

Con el objetivo de probar el comportamiento de los dos polímeros, se realizaron dos pasajes con cada uno de ellos con el ratio menor y el mayor, es decir, un pasaje con $Rt= 125 \text{ u.r./nm}^2$ y otro con $Rt= 2000 \text{ u.r./nm}^2$ para ambos polímeros.

Se realizó la purificación del exceso de polímero por lavados mediante centrifugaciones observándose después de cada ciclo de centrífuga una capa de polímero en forma de lentilla sobre el *pellet* de nanopartículas impidiendo su redispersión. Este hecho se debe a que la menor cantidad de cargas de los polímeros (respecto al PMAO hidrolizado) reduce su solubilidad en agua impidiendo que el exceso de los polímeros quede en el sobrenadante tras los lavados.

Para continuar analizando las MNPs revestidas con los distintos polímeros, se realizó electroforesis en gel de agarosa (0,6% w/v) de la muestra de NPs y de los sobrenadantes recogidos al hacer los lavados. Al contrario de lo que ocurre con PMAO algunas de las nanopartículas recubiertas con el polímero **1** no salen de su pocillo mientras que, en el caso del polímero **2** no se aprecia migración alguna. Además, no se observa polímero en ninguno de los sobrenadantes recogidos lo que indica que se encuentra en el *pellet* con las MNPs y que no se ha eliminado el exceso de estos de las NPs revestidas.

Pasados unos días, las MNPs recubiertas con el polímero **2** precipitaron indicando baja estabilidad debido a la cantidad de cargas positivas o a que las aminos no se encuentren protonadas al pH de trabajo (pH comprendido entre 6 y 7). A partir de ahora se centra en la optimización del proceso de pasaje y caracterización de las nanopartículas junto al polímero **1**.

El objetivo es averiguar qué proporción de polímero es la óptima obtener nanopartículas estables en medio acuoso. Se realizaron cuatro pasajes a agua con el polímero **1**, siempre con la misma cantidad de hierro (0,3 mg) pero con ratio variable: 125, 500, 1000 y 2000 u.r./nm² NP respectivamente (ver tabla 3). Para seleccionar el mejor ratio se tuvieron en cuenta las medidas de DLS con las que se mide el diámetro, la electroforesis y la estabilidad de las NPs a simple vista detectando la presencia de agregados en las muestras. Analizados todos los pasajes, se observó que las medidas de DLS en todas las muestras eran homogéneas, ya que se obtenía siempre un diámetro entre 50 y 60 nm y una polidispersidad menor a 0,3 lo que indica que son nanopartículas monodispersas. Además en todos los casos había únicamente una población (ver anexo III para distribución de tamaños). En la electroforesis migraban

igual, hacia el polo positivo debido a la carga negativa del polímero (Figura 10). Para finalizar, ninguna de ellas presentaba agregados de nanopartículas lo que indica su estabilidad a un pH ente 6 y 7. Debido a que todas las muestras tenían el mismo comportamiento con todos los ratios evaluados se escogió $Rt= 125 \text{ u.r./nm}^2$ NP para utilizar la menor cantidad de polímero posible en cada pasaje sin comprometer la estabilidad de las nanopartículas.

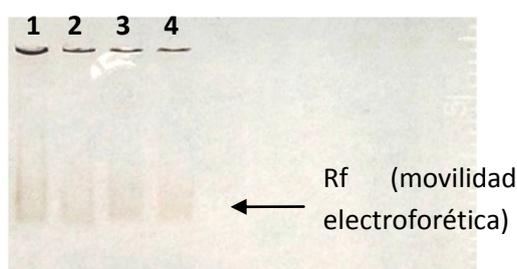


Figura 10. Electroforesis en agarosa de nanopartículas recubiertas con el polímero 1. 1: $Rt 125 \text{ u.r./nm}^2$. 2: $Rt 500 \text{ u.r./nm}^2$. 3: $Rt= 1000 \text{ u.r./nm}^2$. 4: $Rt=2000 \text{ u.r./nm}^2$.

En los pasajes realizados hasta ahora no se conseguía separar el exceso de polímero de las nanopartículas revestidas por lo que para solucionarlo se realizó de nuevo un pasaje a agua eliminando el exceso del polímero mediante centrifugación en gradiente de sacarosa (apartado 4.1.4b). Para comprobar que el gradiente funcionó como se esperaba se realizó una electroforesis (agarosa 0,6%).

Tal y como se observa en la figura 11 en el primer carril aparece una banda más oscura correspondiente a las nanopartículas y en el segundo hay una banda blanca correspondiente al exceso de polímero que queda en el sobrenadante después de los lavados. Se concluye, por tanto, que con la centrifugación en gradiente se sacarosa se separa todo el polímero libre de las nanopartículas recubiertas.

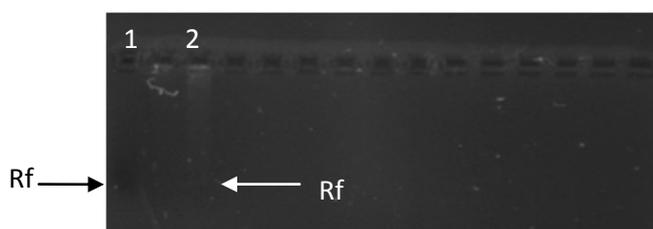


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa de nanopartículas recubiertas con el polímero 1. Pocillo 1: MNPs. Pocillo 2: Sobrenadante con exceso de polímero.

Para continuar con la caracterización se realizó una determinación de hierro (Anexo II). La muestra obtenida tenía una concentración de $1,24 \text{ mg Fe/ml}$. Conocido este valor, se evaluaron las nanopartículas con TGA, TEM, DLS y Potencial Z.

La TGA informa sobre la proporción de pesos en la muestra. En las nanopartículas recubiertas con PMAO (Figura 12, rojo), el polímero representa el 18,2% del peso mientras que en el caso de las NPs recubiertas con el polímero **1** representa el 41,5% del peso total. Esta diferencia de pesos no se explica únicamente por la diferencia de masa entre las unidades repetitivas del PMAO y el polímero **1** por lo que podría deberse a que las NPs se rodeen de más polímero para lograr estabilizarse.

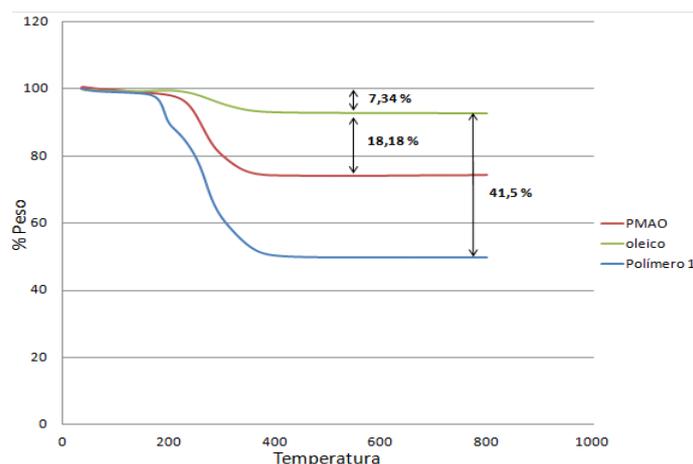


Figura 12. Termograma de las nanopartículas. En verde nanopartículas de partida estabilizadas con oleico, en rojo recubiertas con PMAO y en azul recubiertas con el polímero **1**.

El análisis por TEM muestra únicamente el núcleo inorgánico de las nanopartículas de manera que se puede evaluar su dispersión y su integridad a lo largo del pasaje. En la figura 13 se comprueba que tras recubrirlas con el polímero siguen siendo monodispersas y que tienen un diámetro medio de 12 nm sin contar la capa del polímero.

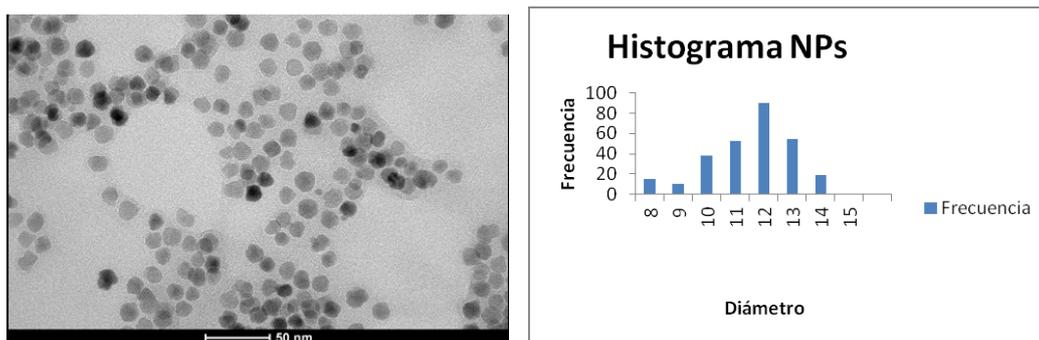


Figura 13. A la izquierda una imagen de TEM de NPs de 12 nm recubiertas con el polímero (escala = 50 nm). A la derecha histograma de la distribución de tamaños.

Continuando con la caracterización, se realizaron medidas de DLS y potencial Z:

Tabla 5. Tabla comparativa del DLS y Potencial-Z de las nanopartículas recubiertas con PMAO con las que están recubiertas con el polímero **1**

	DLS (nm)	Potencial-Z (mV)
PMAO	31,9	-40
Polímero 1	40,6	-30

Tal y como se observa en la tabla 5, las nanopartículas recubiertas con el polímero **1** presentan un diámetro unos 10 nm mayor que las recubiertas por PMAO (ver Anexo III para la distribución de tamaños), algo normal ya que como se ha comentado anteriormente, el polímero **1** se sintetiza a partir de PMAO y glicina por lo que esta diferencia de diámetro se podría deber al aminoácido. Por otra parte, en el caso del potencial Z se representa la diferencia de potencial entre el grano inorgánico de la nanopartícula. Se obtienen también valores lógicos puesto que el polímero **1** presenta la mitad de cargas negativas que el PMAO ya que presenta la mitad de grupos -COO^- en la superficie.

Comprobada la estabilidad de las nanopartículas, se procede a su funcionalización con glucosa. Tal y como se ha mencionado en los antecedentes, es preciso llevar a cabo una funcionalización para disminuir el número de cargas pero sin comprometer su estabilidad. Además para la mayoría de las aplicaciones biomédicas es necesario funcionalizar las MNPs con diversas biomoléculas y con TAMRA (para estudiar la internalización en células) por lo que va a ser necesario estudiar su estabilidad. Tras realizar el protocolo de funcionalización descrito en materiales y métodos se lleva a cabo una caracterización de estas.

Se realiza una electroforesis en gel de agarosa (0.6% w/v) frente a las nanopartículas sin funcionalizar, es decir, únicamente con el polímero. Como las MNPs que contienen glucosa habrán reducido la cantidad de muestra se aprecia menos R_f , tal y como se aprecia en la figura 14.

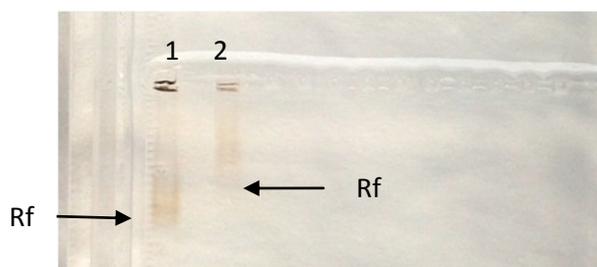


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa. Pocillo 1: Nanopartículas sin funcionalizar. Pocillo 2: Nanopartículas funcionalizadas con glucosa

En cuanto a las medidas realizadas con el DLS se obtuvieron unos valores de 60 nm (ver Anexo III para la distribución de tamaños) con valores menores de 0.3 de polidispersidad (muestra monodispersa) y en el potencial Z se obtuvo -25 mV. Si se comparan con los de las NPs sin funcionalizar se aprecia un aumento del diámetro, correspondiente a la molécula de glucosa y una disminución en la medida del potencial Z, debido también al monosacárido ya que disminuirá el número de grupos carboxilato libres.

6. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas tras el análisis de los resultados son las siguientes:

1. La síntesis de los polímeros **1** y **2** permite obtener dos polímeros anfifílicos con la mitad de cargas que el polímero de referencia, negativas en el caso del polímero **1** y positivas en el caso del polímero **2**.
2. El exceso de polímero al realizar los pasajes a agua se elimina eficazmente mediante centrifugación en gradiente de sacarosa.
3. Las nanopartículas recubiertas con el polímero **2** no son estables en agua y precipitan después de unos días.
4. Las nanopartículas recubiertas con el polímero **1** son estables y no muestran diferencias de comportamiento con diferentes ratios, de forma que se escoge un ratio de 125 u.r./nm² como ratio de trabajo.
5. Los resultados de DLS y TEM muestran que se trata de nanopartículas monodispersas lo que las hace idóneas en este aspecto para su uso en aplicaciones biomédicas.
6. Tras funcionalizar con glucosa las nanopartículas continúan siendo estables y monodispersas tal y como muestran los resultados del DLS.

The main conclusions after analysis of the results are summarized below:

1. Synthesis of polymers **1** and **2** allows to obtain two amphiphilic polymers with half charges than the original one, negative charges in polymer **1** and positive charges in polymer **2**.
2. The excess of polymer in water solubilisation has been efficiently eliminated by centrifugation in a sucrose gradient.
3. Nanoparticles coated with polymer **2** are not stable in aqueous medium and they precipitate after a few days.
4. Nanoparticles coated with polymer **1** are stable in aqueous medium and they show no differences with several ratios. For this reason 125 u.r./nm² has been chosen as working ratio.
5. DLS and TEM results show that the nanoparticles are monodisperse, suitable in that respect for biomedical applications.
6. The nanoparticles remain stable and monodisperse after the functionalization with glucose, as shown by DLS results.

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Roduner E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*,35(7),583-592.
- (2) Li B., Cao H., Shao J., Qu M., & Warner J. H. (2011). Superparamagnetic Fe₃O₄ nanocrystals@ graphene composites for energy storage devices. *Journal of Materials Chemistry*, 21(13), 5069-5075.
- (3) Wing C. E. G. (2006). Las NANOPARTÍCULAS: pequeñas estructuras con gran potencial. *El Inin Hoy, Contacto Nuclear*, 24-29.
- (4) Leslie-Pelecky D. L., & Rieke R. D. (1996). Magnetic properties of nanostructured materials. *Chemistry of materials*, 8(8), 1770-1783.
- (5) Batlle X., & Labarta A. (2002). Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport properties. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35(6), R15.
- (6) Enríquez-Navas P. M. & García-Martín M. L. (2012). "Application of Inorganic Nanoparticles for Diagnosis based on MRI". Página 234, Capítulo 9, en "Nanobiotechnology: Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles". Editores: de la Fuente, J. M. & Grazú V. Elsevier, 2012.
- (7) Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., & Dobson J. J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied physics*, 36(13), R167.
- (8) Mornet S., Vasseur S., Grasset F., & Duguet E. (2004). Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 14(14), 2161-2175.
- (9) Hildebrandt B., Wust P., Ahlers O., Dieing A., Sreenivasa G., Kerner T., ... & Riess H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 43(1), 33-56.
- (10) Luk K. H., Hulse R. M., & Phillips T. L. (1980). Hyperthermia in cancer therapy. *Western Journal of Medicine*, 132(3), 179.
- (11) Duguet E., Vasseur S., Mornet S., & Devoisselle J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine*, 1(2), 157-168.
- (12) Barakat N. S. (2009). Magnetically modulated nanosystems: a unique drug-delivery platform. *Nanomedicine*, 4(7), 799-812.
- (13) Corot C., Robert P., Idée J. M., & Port M. (2006). Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), 1471-1504.
- (14) Peng X-H., Qian X., Mao H., et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *International Journal of Nanomedicine*. 2008;3(3):311-321
- (15) Nam J. M., Thaxton C. S., & Mirkin C. A. (2003). Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science*, 301(5641), 1884-1886.

- (16) Lu A. H., Salabas E. E., & Schüth F. (2007). Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244.
- (17) Murray, Cbea, David J. Norris, and Mounji G. Bawendi. "Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E= Sulfur, Selenium, Tellurium) Semiconductor Nanocrystallites." *Journal of the American Chemical Society* 115, no. 19 (1993): 8706–15.
- (18) Jadhav S. A., & Bongiovanni, R. (2012). Synthesis and organic functionalization approaches for magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. *Adv Mat Lett*, 3(5), 356-361.
- (19) Fratila R. M., Mitchell S. G., del Pino P., Grazú V., & de la Fuente J. M. (2014). Strategies for the biofunctionalization of gold and iron oxide nanoparticles. *Langmuir*, 30(50), 15057-15071.
- (20) Yu W. W., Chang E., Falkner J. C., Zhang J., Al-Somali A. M., Sayes C. M., ... & Colvin V. L. (2007). Forming biocompatible and nonaggregated nanocrystals in water using amphiphilic polymers. *Journal of the American Chemical Society*, 129(10), 2871-2879.
- (21) Lin C. A. J., Sperling R. A., Li J. K., Yang T. Y., Li P. Y., Zanella M., ... & Parak W. J. (2008). Design of an amphiphilic polymer for nanoparticle coating and functionalization. *Small*, 4(3), 334-341.
- (22) Zhang F., Lees E., Amin F., Rivera_Gil P., Yang F., Mulvaney P., & Parak W. J. (2011). Polymer-Coated Nanoparticles: A Universal Tool for Biolabelling Experiments. *Small*, 7(22), 3113-3127.
- (23) Mout R., Moyano D. F., Rana S., & Rotello V. M. (2012). Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2539-2544.
- (24) Pellegrino T., Manna L., Kudera S., Liedl T., Koktysh D., Rogach A. L., ... & Parak W. J. (2004). Hydrophobic nanocrystals coated with an amphiphilic polymer shell: a general route to water soluble nanocrystals. *Nano letters*, 4(4), 703-707.
- (25) Moros M. "Síntesis de Gliconanopartículas Magnéticas Para Aplicaciones Biomédicas." Tesis doctoral, Universidad de Zaragoza, 2012.
- (26) Moros M., Pelaz B., López-Larrubia P., García-Martin M. L., Grazú V., & Jesus M. (2010). Engineering biofunctional magnetic nanoparticles for biotechnological applications. *Nanoscale*, 2(9), 1746-1755.
- (27) Wang W., Ji X., Na H. B., Safi M., Smith A., Palui G., ... & Mattoussi H. (2014). Design of a Multi-Dopamine-Modified Polymer Ligand Optimally Suited for Interfacing Magnetic Nanoparticles with Biological Systems. *Langmuir*, 30(21), 6197-6208.
- (28) Wang M., Yi S., Janout V., & Regen S. L. (2013). A 7 nm thick polymeric membrane with a H₂/CO₂ selectivity of 200 that reaches the upper bound. *Chemistry of Materials*, 25(19), 3785-3787.