



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Polímeros para la biofuncionalización de nanopartículas de oro

Polymers for the functionalization of gold nanoparticles

Autor

Sonia García González

Director

Rafael Martín Rapún

Ponente

Joaquín Barberá Gracia

Facultad de Ciencias

2018



Instituto Universitario de Investigación
en Nanociencia de Aragón
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

D. Rafael Martín Rapún, investigador Ramón y Cajal en el Instituto de Nanociencia de Aragón de la Universidad de Zaragoza, y D. Joaquín Barberá Gracia, catedrático del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Zaragoza,

INFORMAN:

Que SONIA GARCÍA GONZÁLEZ ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título "*Polímeros para la biofuncionalización de nanopartículas de oro*" y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices para el Trabajo Fin de Grado en Química.

Zaragoza, 27 de junio de 2018

Dr. Rafael Martín Rapún (Director)

Dr. Joaquín Barberá Gracia (Ponente)

Resumen

En los últimos años, las nanopartículas de oro están siendo utilizadas como vehículos de fármacos para tratar enfermedades como el cáncer. Sin embargo, cuando las nanopartículas se introducen en el organismo, quedan cubiertas por una capa de biomoléculas (corona proteica), lo que disminuye el tiempo de circulación y la eficacia de las nanopartículas.

Este trabajo tiene como objetivo la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) cuyo recubrimiento cambie de signo con el pH. Este cambio de signo reduciría o eliminaría la corona de proteínas.

En primer lugar, se ha llevado a cabo la síntesis de tres polímeros polietilenglicol (PEG) diferentes. Todos ellos tienen en común un extremo con un grupo ditiolano, encargado de la unión con la nanopartícula, y difieren en el otro extremo de la cadena. Todos los productos se han caracterizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja (FT-IR) y espectrometría de masas (EM).

En segundo lugar, se han sintetizado nanoesferas de aproximadamente 14 nm de diámetro. Las nanoesferas se han obtenido recubiertas con un ligando citrato, que posteriormente se ha sustituido mediante una reacción de intercambio de ligando por cada uno de los polímeros preparados anteriormente. Para la obtención del grupo dependiente de pH se han seguido dos estrategias. Una de ellas consiste en la formación sobre la misma nanopartícula del grupo amida dependiente de pH, mientras que en la otra estrategia la amida se ha formado antes del intercambio de ligando.

Las nanopartículas se han caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), electroforesis en gel de agarosa, espectroscopía de absorbancia ultravioleta-visible (UV-Vis) y análisis termogravimétrico (TGA).

Por último, el comportamiento de las nanopartículas a diferentes pH se ha estudiado mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y medidas de potencial Z.

Abstract

Gold nanoparticles are being used as vehicles for drugs to treat diseases such as cancer. However, when nanoparticles are introduced into the body, they are covered by a layer of biomolecules (protein corona), which decreases the circulation time and the efficacy of the nanoparticles.

The objective of this project is the synthesis of gold nanoparticles (AuNPs), whose coating charge changes its sign with pH. This change of sign would reduce or eliminate the protein corona.

First of all, the synthesis of three different polyethylene glycol polymers (PEG) has been performed. All of them have one end in common with a dithiolane group to bind the nanoparticle, while they differ at the other end of the chain. All products were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR), infrared spectroscopy (FT-IR) and mass spectrometry (MS).

Second, gold nanospheres of 14 nm of diameter approximately were prepared. These nanoparticles were obtained with a coating of citrate ligand, which was replaced by each of the polymers previously prepared through a ligand exchange reaction. Two strategies have been followed for the formation of the pH dependent group. In one of them, the pH dependent amide group should be formed on the nanoparticle. In the other strategy, the bond was formed on the polymer prior to the ligand exchange.

The nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (TEM), gel electrophoresis, ultraviolet-visible absorbance (UV-Vis) and thermogravimetric analysis (TGA).

Finally, the nanoparticles behavior in different pH is studied by dynamic light scattering (DLS) and Z potential measurements.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Nanotecnología	1
1.2 Corona de proteínas	2
1.3 Grupos dependientes de pH.....	2
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO	4
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
3.1 Síntesis de los polímeros	6
3.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro esféricas	7
3.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro por el método Turkevich.....	7
3.2.2 Intercambio de los grupos citrato por las moléculas sintetizadas	8
3.2.3 Movilidad electroforética de las nanopartículas sobre gel de agarosa.	11
3.2.4 Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas con los compuestos 2 y 3.....	11
3.2.5 Estabilidad de las nanopartículas con el tiempo	15
4. EXPERIMENTAL.....	16
4.1 Instrumentos empleados	16
4.2 Síntesis de N ₃ -PEG-N ₃ (4)	16
4.3 Síntesis de NH ₂ -PEG-N ₃ (5)	17
4.4 Síntesis de TA-PEG-N ₃ (6).....	18
4.5 Síntesis de TA-PEG-NH ₂ (1).....	19
4.6 Síntesis de TA-PEG-NH-suc (2).....	20
4.7 Síntesis de TA-PEG-NH-DMMA (3)	20
4.8 Síntesis de nanoesferas con citrato.....	21
4.9 Nanoesferas oro con polímero 2.....	21
4.10 Nanoesferas oro con polímero 3.....	22
4.11 Electroforesis en gel de agarosa.....	22
4.12 Caracterización de las muestras por DLS	22
4.13 Caracterización de las muestras por medida de potencial Z.....	23
4.14 Análisis termogravimétrico de las nanoesferas de oro estabilizadas con polímero.....	23
5. CONCLUSIONES	24
6. BIBLIOGRAFÍA	25
ANEXOS	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Nanotecnología

Se define como nanotecnología el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales alguna de cuyas dimensiones se encuentre entre 1 y 100 nm. Cuando la materia es manipulada a una escala tan pequeña, presenta propiedades diferentes a la que presenta a mayor escala.¹

La primera vez que se habló de la investigación a escala nanométrica fue en 1959, cuando el físico Richard Feynman, en una conferencia titulada "There's Plenty of Room at the Bottom", habló sobre la posibilidad de manipular la materia átomo a átomo.²

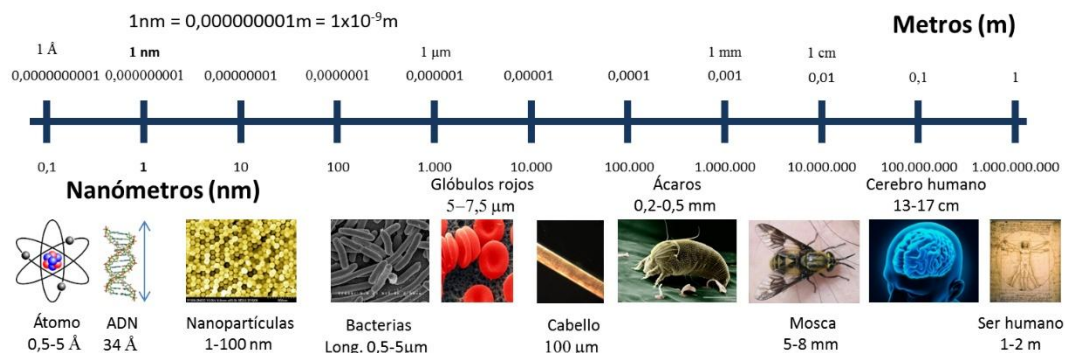


Figura 1: Escala comparativa para encuadrar la nanotecnología.³

La nanotecnología estudia cómo las diferencias en cuanto a comportamiento y propiedades pueden ser de utilidad en gran cantidad de campos como: medicina,^{4,5} medioambiente, electrónica o mecánica.

En los últimos años, dentro del campo de la medicina las nanopartículas de oro (AuNPs) han suscitado gran interés. Esto es debido a su elevada estabilidad, baja toxicidad y sus excepcionales propiedades ópticas.⁶ Estas nanopartículas pueden ser sintetizadas de diferentes formas y tamaños. La síntesis de las AuNPs es simple en el caso de nanopartículas esféricas. Consiste en la reducción de una sal de oro en presencia de agentes estabilizantes que eviten su agregación.

Las AuNPs presentan un gran potencial en la detección, diagnóstico y tratamiento de cáncer puesto que pueden funcionalizarse fácilmente con un gran abanico de ligandos como anticuerpos, polímeros, fármacos o ácidos nucleicos.⁷ Una misma AuNP se puede funcionalizar con varios tipos de ligandos a la vez, cada uno de los cuales puede cumplir una función distinta como, dirigir la AuNP a un órgano o tejido determinado, favorecer la internalización celular o aumentar el tiempo de circulación de la nanopartícula. El conjunto de ligandos sobre la nanopartícula en contacto con el medio se denomina identidad química y depende del diseño que se haya hecho de la nanopartícula.

1.2 Corona de proteínas

El diseño, la preparación y la biofuncionalización de nanopartículas conllevan un gran esfuerzo para poder conseguir un sistema con la identidad química deseada. Sin embargo, cuando una nanopartícula se introduce en un medio biológico es rodeada por biomoléculas que interactúan con ella de forma más o menos permanente. A este conjunto de biomoléculas se le denomina corona de proteínas puesto que estas son las biomoléculas más abundantes en ellas.⁹

La corona de proteínas cambia el tamaño y la composición de la interfase de la nanopartícula con el medio, proporcionándole una nueva identidad biológica. Esto provoca un cambio en la respuesta fisiológica a la nanopartícula por lo que cambian el tiempo de circulación en el organismo y la internalización de las nanopartículas por las células. Las interacciones entre la nanopartícula y las proteínas son fundamentalmente de tipo hidrófobo, pero también iónico entre ligandos de la superficie y dominios cargados de las proteínas. Para intentar impedir la formación de la corona de proteínas, y así evitar estos efectos, se emplean habitualmente polímeros de polietilenglicol (PEG).¹⁰

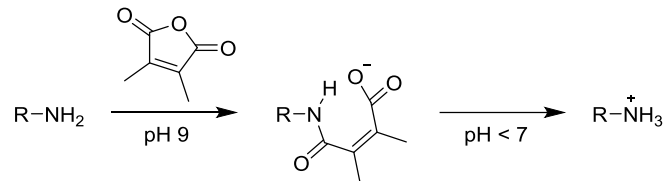
Los polímeros son macromoléculas cuya estructura química está formada por unidades menores que se repiten, denominadas monómeros. La unión química, así como el número de enlaces y topología de los monómeros, definen el comportamiento físico químico del polímero. La síntesis de los polímeros se lleva a cabo mediante un proceso de polimerización a partir del monómero correspondiente.¹¹

El carácter neutro y polar del PEG hace que la interacción con las proteínas sea menor, lo que permite tiempos de circulación más largos, y que la internalización sea más difícil.¹² Sin embargo, la flexibilidad de las cadenas de PEG hace que el recubrimiento no sea totalmente eficaz, puesto que deja lugares de unión libres. Por tanto, se consigue la reducción de la corona de proteínas, pero no su eliminación. Son necesarias nuevas estrategias que impidan o interrumpan la interacción de las nanopartículas con las proteínas.¹³ Una de estas estrategias, puede ser la modificación de la interacción entre las nanopartículas y las proteínas, a través de la inversión del signo de la carga de la superficie de la nanopartícula ya que las interacciones iónicas tienen gran importancia en la formación de la corona de proteínas.

1.3 Grupos dependientes de pH

Una de las aplicaciones más importantes en biomedicina, es utilizar la nanopartícula como vehículo para llevar el principio activo donde corresponde, y después liberarlo de forma controlada. Esto a veces se consigue a través de estímulos como la temperatura y el pH. Este último, tiene un especial interés en el caso de la liberación controlada de fármacos antitumorales, puesto que el microambiente extracelular tumoral tiene un pH notablemente más ácido (pH 6.5) que la sangre o un tejido normal (pH 7.4) debido al exceso de ácido láctico y protones producido por el metabolismo acelerado de las células tumorales.⁸

La reacción de una amina con el anhídrido del ácido 2,3-dimetilmaleico resulta en una amida β -carboxílica que enmascara la amina y deja libre el grupo carboxilato, cargado negativamente. A pH ligeramente ácido se produce la desprotección desenmascarando el grupo amina y provocando una inversión del signo de la carga de la molécula ya que a ese pH la amina se encuentra como ion amonio. Las células tienen una mayor afinidad por superficies cargadas positivamente, por ello esta inversión de la carga, se usa para favorecer la adhesión de nanopartículas a las células. ^{14,17}

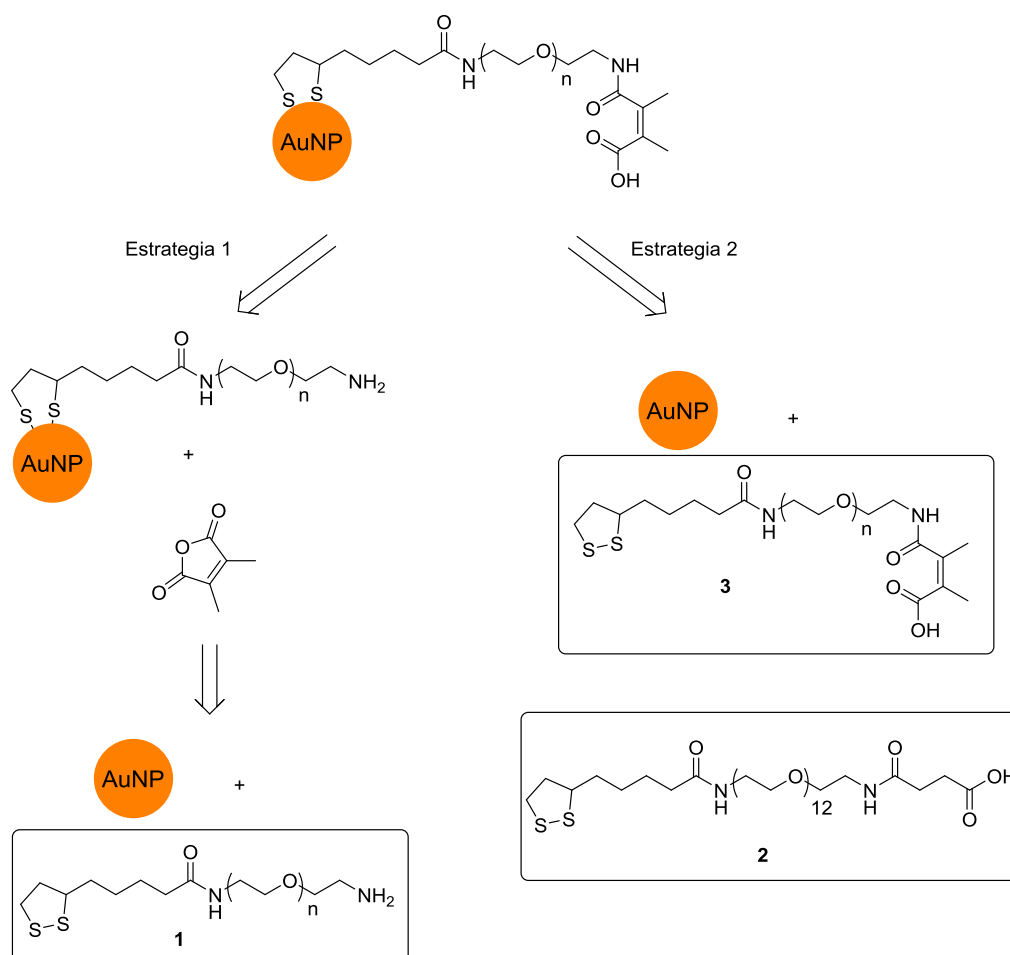


Esquema 1. Esquema de la reacción de un grupo amina con el anhídrido del ácido 2,3-dimetilmaleico y de la reacción de desprotección a pH ligeramente ácido.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

El objetivo de este trabajo es la preparación de nanopartículas de oro cuyo recubrimiento cambie de signo de carga con el pH. En un futuro se busca estudiar cómo afecta ese cambio de la superficie a la interacción de la nanopartícula con la corona de proteínas.

Esquema 2. Análisis retrosintético para la preparación de las AuNPs con superficie dependiente de pH.



Para ello se van a preparar nanopartículas de oro recubiertas con un polímero polietilenglicol con una amida dependiente de pH (Esquema 2). Siguiendo un análisis retrosintético las nanopartículas se pueden preparar según dos estrategias. En la estrategia 1 la amida se forma con el polímero sobre la nanopartícula. Para ello, previamente se debe funcionalizar la nanopartícula con el polímero **1** que tiene un grupo ditiolano para su unión con la nanopartícula y un grupo amino para la formación de la amida.

En la estrategia 2 la nanopartícula se funcionaliza con el polímero **3**, que ya contiene la amida dependiente de pH. El polímero **2** se sintetiza para experimentos control al contener una amida que es estable en todo el rango de pH.

Las nanopartículas de oro serán nanoesferas de oro estabilizadas con citrato, siguiendo el método Turkevich. Los grupos citrato se pueden desplazar con los ditiolanos **1-3** en una reacción de intercambio de ligando. (Figura 2).

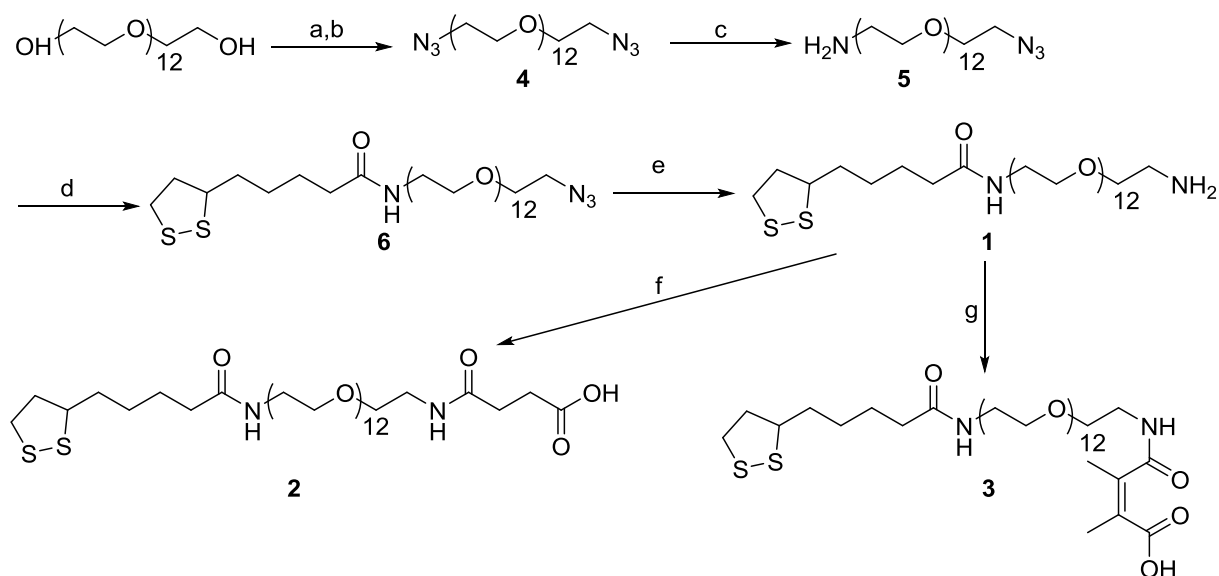
El comportamiento y estructura de las nanopartículas sintetizadas se estudia mediante diferentes técnicas. En primer lugar, se estudia tanto el tamaño de las nanoesferas como su agregación mediante microscopía electrónica de transmisión (MET). En segundo lugar, se evalúa la cantidad de polímero que satura la superficie de la nanoesfera mediante electroforesis con gel de agarosa y análisis termogravimétrico (TGA). Por último, se caracterizan mediante la medida de la dispersión dinámica de la luz (DLS), que nos da unas medidas de radio hidrodinámico y potencial Z, que aportan información sobre la estabilidad y movilidad de las nanopartículas a diferentes pH.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis de los polímeros

Los polímeros **1**, **2** y **3** son polímeros lineales heterofuncionales. Para su síntesis se decidió partir de un polímero PEG homofuncional, adaptando el procedimiento descrito por Matoussi *et al.*¹⁸ (Esquema 3). Este procedimiento permite obtener polímeros heterofuncionales sin basarse en planteamientos estadísticos lo que permite aumentar el rendimiento y facilitar la purificación.

Esquema 3. Ruta sintética utilizada para la obtención de los compuestos **1**, **2** y **3**.



(a) MsCl , Et_3N , THF; (b) NaN_3 , NaHCO_3 , H_2O ; (c) PPh_3 , EtOAc, HCl (1M); (d) ácido lipoico, DCC, DMAP, CH_2Cl_2 ; (e) PPh_3 , H_2O , THF; (f) anhídrido succínico, NEt_3 , CH_2Cl_2 (g) DMMA, NaOH (0,1M).

El primer paso es la activación de los grupos hidroxilo del polietilenglicol como ésteres de mesilo. Los grupos mesilato son buenos grupos salientes y pueden ser sustituidos en la reacción posterior con azida de sodio (NaN_3). Tras estos dos pasos, se realiza una purificación mediante columna en gel de sílice obteniéndose el compuesto **4** puro.

El objetivo de la siguiente reacción es conseguir reducir únicamente uno de los grupos azida del compuesto **4**. Esto se consigue mediante la separación de reactivos y producto en dos fases presentes en la mezcla de reacción: una fase orgánica (acetato de etilo) y una fase acuosa (HCl 1 M).

El polímero **5** se obtiene mediante la reacción de Staudinger. Esta reacción permite reducir azidas a aminas. Antes de comenzar la reacción tanto el polímero **4** como la trifenilfosfina (PPh_3) se encuentran en la fase orgánica, de forma que ambos reaccionan formando un iminofosforano que en presencia de agua se hidroliza para dar la amina $\text{N}_3\text{-PEG-NH}_2$ (**5**). Debido al pH ácido de la fase acuosa el compuesto formado se protona formándose $\text{N}_3\text{-PEG-NH}_3^+$ y pasa a la fase acuosa. La reacción no puede continuar con la reducción del segundo grupo azida, puesto que la trifenilfosfina se encuentra en la fase orgánica y el polímero en la fase acuosa.

Una vez terminada la reacción la fase acuosa se lava con acetato de etilo (EtOAc) y después se basifica con KOH para recuperar la amina que se puede extraer con acetato de etilo para aislar el polímero **5** con un 74 % de rendimiento, que indica una alta selectividad hacia el producto con solo una azida reducida.

La siguiente reacción permite instalar el grupo ditiolano que sirve para estabilizar las nanopartículas de oro. Para ello se forma una amida entre el polímero **5** y el ácido lipoico, utilizando como reactivos para el acoplamiento N,N'-4-dimetilaminopiridina (DMAP) y N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC). Terminada la reacción el polímero **6**, se obtiene tras una purificación mediante columna en gel de sílice.

El polímero **1** se obtiene a partir de **6** mediante la reacción de Staudinger. Esta vez, las condiciones son las habituales de esta reacción. En primer lugar, se adiciona PPh₃ formándose así el grupo fosfazida; este grupo tras perder N₂ forma un grupo iminofosforano. A continuación, se añade H₂O para hidrolizar el iminofosforano y obtener la amina **1** y óxido de trifenilfosfina. En este trabajo una vez se dio por finalizada la reacción se observó una mezcla de productos en RMN, por lo que se volvió a poner la reacción, obteniéndose finalmente el polímero **1**.

A partir de este último compuesto obtenido se llevan a cabo dos reacciones paralelas para la síntesis de los compuestos **2** y **3**.

En primer lugar, el polímero **2** se obtiene mediante la adición nucleófila de la amina de **1**, con anhídrido succínico.

En segundo lugar, la obtención del polímero **3** se lleva a cabo mediante la reacción del anhídrido 2,3-dimetilmaleico (DMMA) con la amina del compuesto **1**. Esta reacción se lleva a cabo en NaOH (0.1 M), y controlando que el pH se mantenga en torno a 11. Debido a la configuración Z del doble enlace y a la presencia de los sustituyentes metilo, el grupo resultante es muy lábil a pH ligeramente ácido. El producto de esta reacción es separado en dos fracciones. Una de ellas se purifica mediante cromatografía por exclusión de tamaño en una columna Sephadex, y posteriormente se liofiliza el producto para su caracterización. Mientras que la otra fracción únicamente se liofiliza y se usa para la síntesis posterior de las nanopartículas.

3.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro esféricas

3.2.1 Síntesis de nanopartículas de oro por el método Turkevich

Se han sintetizado nanopartículas esféricas de oro recubiertas con citrato, de un diámetro de 14 nm. La síntesis se ha llevado a cabo mediante el método de Turkevich, que consiste en una reducción en medio acuoso del ión tetracloroaurato (III) (AuCl₄⁻) con citrato de sodio. Este método permite la síntesis de nanopartículas de tamaños comprendidos entre 12 y 150 nm. El tamaño de las partículas sintetizadas depende tanto las condiciones de reacción, como de las cantidades de reactivos. Además, cambios en las condiciones pueden desestabilizar las nanopartículas y provocar su agregación.

En primer lugar, el citrato produce la reducción de AuCl_4^- a Au^0 . Una vez generados los átomos de oro forman núcleos de cristalización, que actúan como centros de nucleación de las partículas y los iones citrato controlan su crecimiento al adsorberse sobre la partícula. Es por este motivo, que el citrato además de actuar como reductor, lo hace como estabilizador de las nanopartículas sintetizadas. Los iones citrato proporcionan cargas negativas a la superficie de las nanopartículas generando repulsiones electrostáticas que impiden la agregación de las nanopartículas.

Estas nanopartículas presentan una gran estabilidad en agua, pero agregan fácilmente por cambios en el pH o en la fuerza iónica del medio. Además, no permiten una funcionalización sencilla con biomoléculas, por ese motivo se debe sustituir el citrato por otros estabilizantes.

Con el espectro de absorción UV-Vis se puede estimar el tamaño de las nanopartículas. En la Figura 2 se presenta la región entre 300 y 800 nm correspondiente al espectro de absorción UV-Vis de las nanopartículas preparadas.

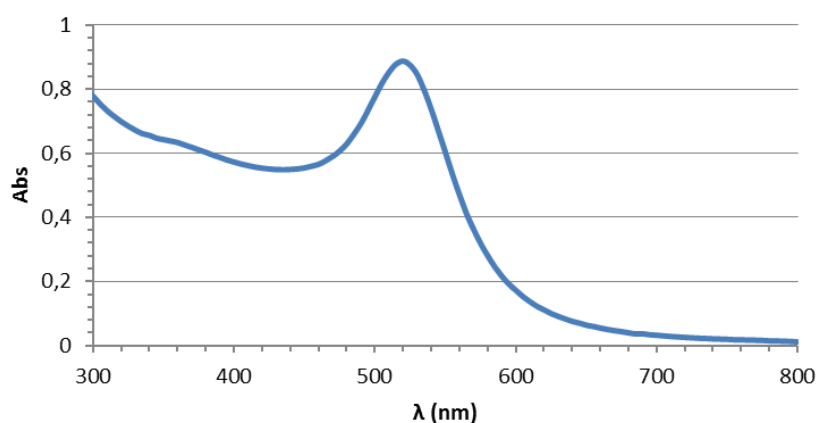


Figura 2. Espectro UV-Vis NPs citrato.

De acuerdo con lo establecido en la bibliografía se puede determinar el diámetro de las nanopartículas de oro calculando el cociente entre las absorbancias a la longitud de onda de la resonancia de plasmón de superficie localizado (LSPR) y a 450 nm (A_{450}).¹⁹ Las nanopartículas preparadas muestran el LSPR a 520 nm con $A_{\text{máx}} = 0.888$ a la concentración del análisis. Para la misma concentración A_{450} es 0.555, lo que da un cociente $A_{\text{máx}}/A_{450} = 1.6$ que corresponde a nanopartículas de entre 12 nm ($A_{\text{máx}}/A_{450} = 1.56$) y 14 nm ($A_{\text{máx}}/A_{450} = 1.61$). Además, el espectro de absorbancia UV-Vis nos permite conocer la concentración de las nanopartículas en la muestra. Esta concentración se obtiene mediante la Ley de Lambert-Beer, utilizando la absorbancia a 450 nm.

3.2.2 Intercambio de los grupos citrato por las moléculas sintetizadas

Se realiza un intercambio de ligando citrato, con los polímeros **1**, **2** y **3**. La reacción es la misma con los tres compuestos, únicamente cambia el polímero que se adiciona a la reacción en cada caso. La reacción consiste en la adición en un tubo de centrifuga de las nanopartículas recubiertas de citrato,

NaOH, SDS, H₂O miliQ y el polímero correspondiente en cada caso. Se deja agitar durante una noche, y al día siguiente se realizan tres centrifugas consecutivas para separar el citrato y el ligando en exceso (Figura 3).

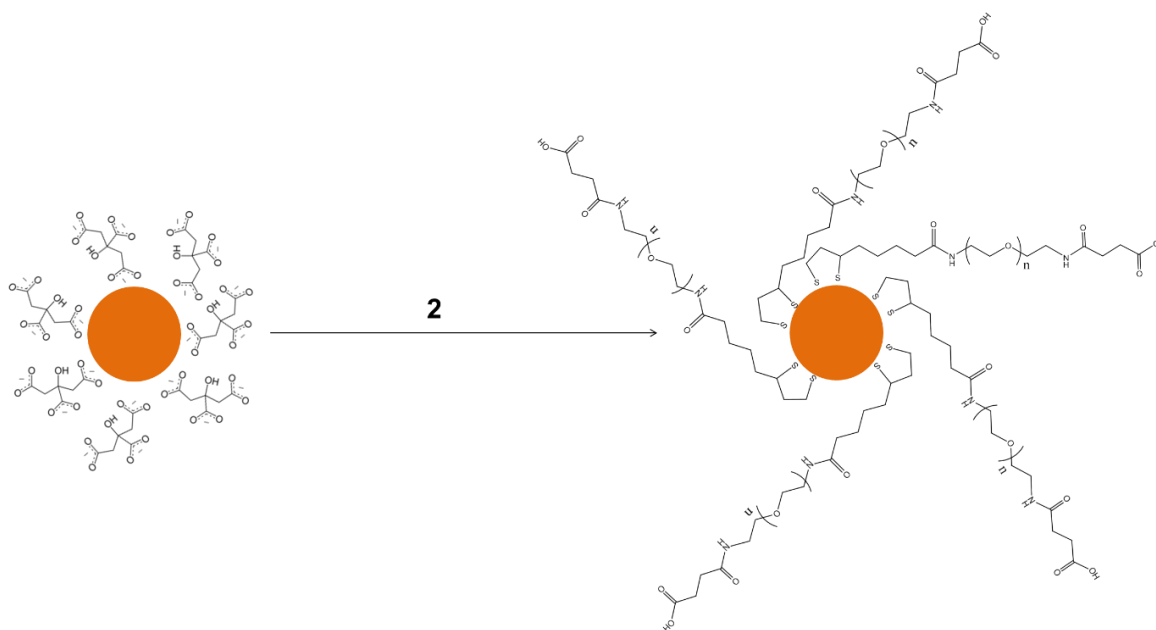


Figura 3: Reacción de cambio de ligando con polímero **2**.

El objetivo de realizar el intercambio de ligando con diferentes compuestos es comparar dos estrategias diferentes para obtener la nanopartícula de oro funcionalizada con un grupo lábil con el cambio de pH. Por un lado, con el compuesto **1**, lo que se busca es formar la amida sobre la propia nanopartícula; esta es la estrategia preferente ya que se facilitaría la purificación en los últimos pasos de la síntesis. Mientras que con los polímeros **2** y **3** la amida se forma antes de unirse a la nanopartícula. Por otro lado, la diferencia entre el intercambio de ligando con los compuestos **2** y **3**, es que el polímero **3** es dependiente con el pH, mientras que el polímero **2** no lo es.

La reacción de intercambio de ligando se realizó de forma satisfactoria con los polímeros **2** y **3** para obtener las nanopartículas NP2 y NP3 respectivamente. Tanto NP2 como NP3 resultaron aparentemente estables en agua (Figura 4).

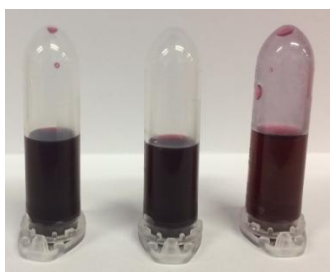


Figura 4: De izquierda a derecha: **NP2**, **NP3** y **NP1**.

Sin embargo, al realizar el intercambio de ligando con **1** con el procedimiento habitual en medio básico se obtuvieron las nanopartículas **NP1** que resultaron ser inestables. Al terminar la síntesis a simple

vista se observó la agregación de las nanopartículas (Figura 4). En la imagen se puede observar cómo **NP3** agregaron en las paredes.

Se registró el espectro de absorción UV-Vis para cada una de las preparaciones (Figura 5).

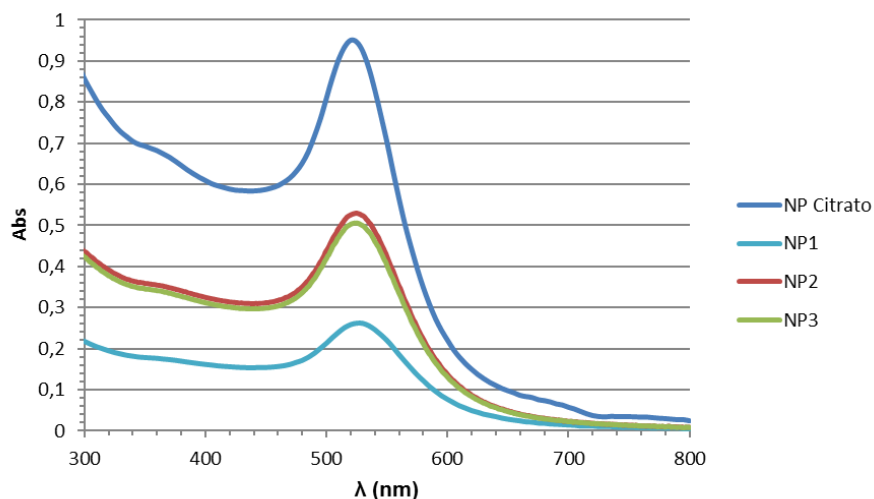


Figura 5. Espectros de absorción UV-vis para las nanopartículas NP1, NP2, NP3.

NP2 y NP3 presentaron espectros semejantes con la banda de absorción correspondiente al LSPR a 520 nm, la misma longitud de onda que para las nanopartículas de partida estabilizadas con citrato. Esto es signo de que las nanopartículas NP2 y NP3 no han agregado. Por otro lado, NP1, tratadas con el polímero **1**, presentan una banda LSPR más ancha y desplazada batocrómicamente, signo de que NP1 están agregadas.

A la vista de los resultados, se realizó el intercambio de ligando de **1** con las nanopartículas citrato sin poner medio básico (sin la adición de NaOH), puesto que el grupo amino otorgaría solubilidad en medio ácido. Sin embargo, se observó cómo las nanopartículas agregaron mientras se estaban realizando las diferentes centrifugaciones. En la figura 6 se comparan los microviales de los tres experimentos después de una centrifugación. La agregación de NP1 se comprobó al comparar su color morado oscuro frente al color rojizo de NP2 y NP3.

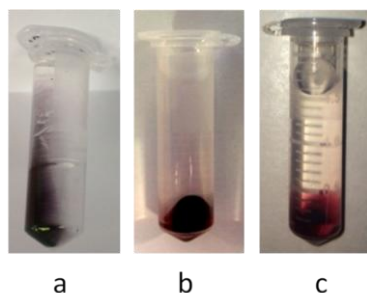


Figura 6. Fotografías de los sedimentos obtenidos al centrifugar las nanopartículas (a) NP1, (b) NP2 y (c) NP3.

Tras comprobar la estabilidad de las nanopartículas con los tres compuestos diferentes, se descartó seguir trabajando con **NP1** y se decidió estudiar la cantidad de polímeros **2** y **3** que satura la superficie

de la nanopartícula. Para ello se realizó un intercambio de ligando de las nanopartículas citrato con tres cantidades diferentes de polímero 500, 2000 y 4000 equivalentes, para cada uno de los compuestos **2** y **3**.

3.2.3 Movilidad electroforética de las nanopartículas sobre gel de agarosa.

La electroforesis es una técnica que se basa en la diferente movilidad de las partículas cargadas por acción de un campo eléctrico en un medio. La movilidad de las partículas depende de su tamaño, debido al entrecruzamiento del medio, y de su carga, debido al campo eléctrico. En este caso concreto, se busca obtener el número de equivalentes de cada uno de los polímeros sintetizados, que sature la superficie de la nanopartícula. Un mejor recubrimiento de la nanopartícula en principio debe producir una mayor movilidad electroforética por dos motivos: primero la mayor carga negativa de la nanopartícula puesto que cada molécula de **2** y **3** lleva un grupo carboxilato y, segundo, la menor interacción de las moléculas de polietilenglicol con la matriz del gel

En el caso de las nanopartículas recubiertas con el polímero **2**, se observó un incremento de la movilidad de las nanopartículas al aumentar la cantidad de polímero hasta 2000 equivalentes (Figura 7). Sin embargo, para las nanopartículas estabilizadas con el polímero **3** se observó una tendencia opuesta. No obstante, se decidió utilizar también 2000 equivalentes para la síntesis al considerar que el experimento con **2** era más fiable.



Figura 7: (3a) Polímero **3** (500 equivalentes); (3b) polímero **3** (2000 equivalentes) y (3c) polímero **3** (4000 equivalentes). (2a) Polímero **2** (500 equivalentes); (2b) polímero **2** (2000 equivalentes) y (2c) polímero **2** (4000 equivalentes).

Se decidió utilizar 2000 equivalentes de polímero para estabilizar las nanopartículas a mayor escala, tanto en el caso de **2** como en el de **3**.

3.2.4 Caracterización de las nanopartículas funcionalizadas con los compuestos **2** y **3**.

Se trataron las nanopartículas estabilizadas con citrato con 2000 equivalentes de **2** y de **3** en dos experimentos distintos. Estas síntesis dieron como resultado NP2-2 y NP3-2, en una cantidad que permitió su completa caracterización junto con las nanopartículas de oro estabilizadas con citrato.

Microscopía Electrónica de Transmisión

Las nanopartículas se caracterizaron mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (MET). Esta técnica permite determinar la forma y distribución de tamaños de las nanopartículas. Únicamente mide el diámetro de la parte metálica de la nanopartícula, no detecta el polímero que tiene alrededor, puesto que éste no proporciona suficiente contraste con la técnica y el equipo utilizados.

Para poder medir muestras en MET es necesario que la muestra sea lo suficientemente fina para que un haz de electrones, que es emitido por el microscopio, la pueda atravesar. Estos electrones son acelerados y focalizados sobre la muestra, interaccionando con ella y pudiendo obtener así una imagen, como las que se muestran a continuación (Figura 8A-C).

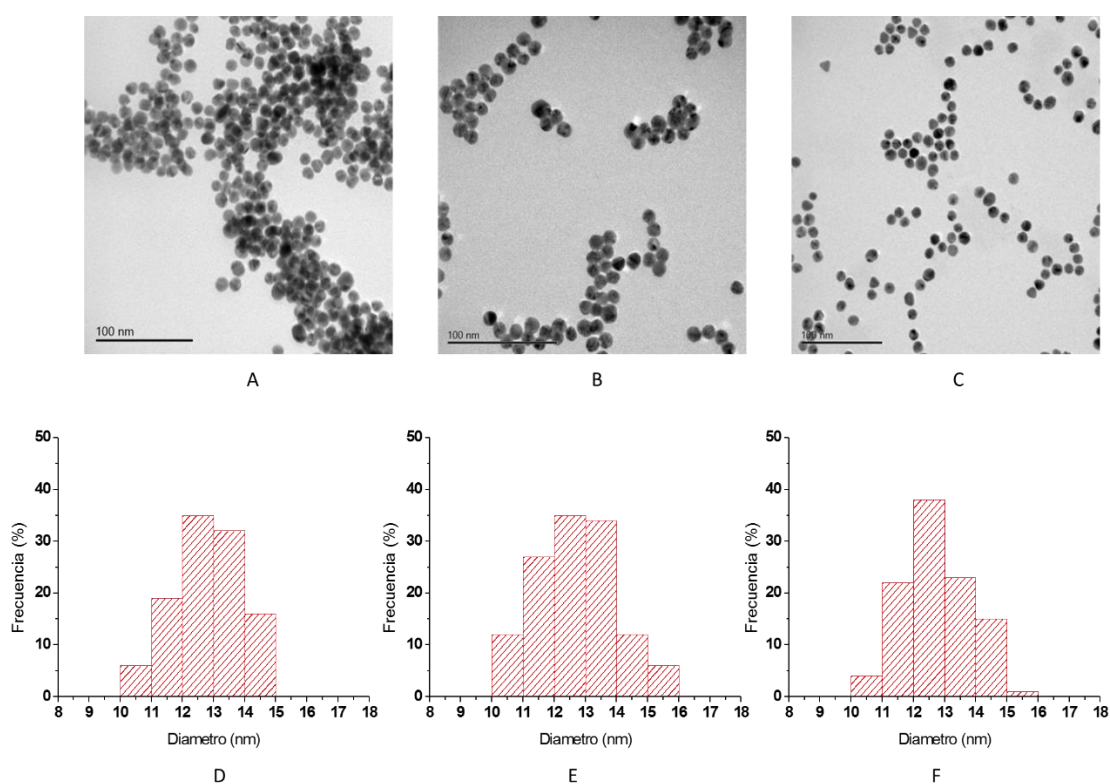


Figura 8: Imágenes MET de las nanopartículas estabilizadas con citrato (A), las nanopartículas NP2-2 estabilizadas con **2** (B) y las nanopartículas NP3-2 estabilizadas con **3** (C). D, E y F son los histogramas correspondientes con las nanopartículas estabilizadas con citrato, NP2-2 y NP3-2 respectivamente.

Las imágenes MET mostraron que las nanopartículas estabilizadas con citrato eran esencialmente monodispersas con un diámetro de 12.65 ± 1.09 nm. El tratamiento de las nanopartículas con **2** y con **3** no produjo ningún tipo de agregación, rotura o crecimiento de las nanopartículas en NP2-2 y NP3-2. El diámetro de las nanopartículas se mantuvo en los mismos valores, 12.67 ± 1.27 nm para NP2-2 y 12.73 ± 1.07 nm para NP3-2.

Dispersión dinámica de luz (DLS)

Por otro lado, se llevó a cabo el estudio del tamaño mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz. Mediante esta técnica se obtiene el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas, midiendo la difusión de la partícula en disolución. Con esta técnica sí se tiene en cuenta la nanopartícula metálica y el recubrimiento polimérico. Por tanto, el diámetro hidrodinámico obtenido tiene que ser mayor que el diámetro promedio obtenido por MET.

Es necesario tener en cuenta, que en el caso de que la partícula se encuentre agregada, el diámetro hidrodinámico obtenido corresponderá al agregado.

Con esta técnica se caracterizaron las nanopartículas con los compuestos **2** y **3** a diferentes pH, para comprobar la estabilidad.

Los diámetros promedio en nm de las nanopartículas a diferentes pH se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Valores promedio de diámetro hidrodinámico de las nanopartículas a diferentes pH.

MEDIDA DE D_H (nm)			
	pH básico NH_3 (10^{-3} M)	pH neutro	pH ácido HCl (10^{-3} M)
NPs estabilizadas con polímero 2	24.34 ± 5.42	22.84 ± 7.87	25.81 ± 5.85
NPs estabilizadas con polímero 3	30.76 ± 13.05	35.35 ± 2.42	30.81 ± 16.13

En el caso de las NPs estabilizadas con el compuesto **3**, en medio ácido la medida no era estable y el diámetro hidrodinámico medido variaba entre 13 y 56 nm.

Los resultados son los esperados, mayores diámetros que los obtenidos con MET, puesto que en este caso se trata del diámetro hidrodinámico. Se obtienen mayores diámetros hidrodinámicos para las nanopartículas estabilizadas con el polímero **3** que para las estabilizadas con el polímero **2**.

En anexos están los correspondientes histogramas, para cada una de las nanoesferas estabilizadas.

En alguna de las muestras se observan poblaciones de mayores diámetros. Pueden ser debidas a la presencia de polvo en la disolución; así como ciertos agregados de las nanoesferas.

Potencial Zeta

El potencial Zeta es una medida de la diferencia de potencial en la interfase, entre la nanopartícula y la disolución. La diferencia de potencial está relacionada con la carga superficial de la nanopartícula. Esta carga produce fuerzas de repulsión electrostáticas entre nanopartículas vecinas. Si la carga es lo

suficientemente elevada, las nanopartículas permanecen dispersas en suspensión. Sin embargo, si la fuerza es mucho menor, las nanopartículas estarían aglomeradas.

El potencial Zeta se ha medido con las NP2-2 y NP3-2 a diferentes pH y los resultados obtenidos se recogen en la tabla 2.

Tabla 2. Medidas de potencial Z en las nanopartículas a diferentes valores pH.

MEDIDA DE POTENCIAL (mV)			
	pH básico NH ₃ (10 ⁻³ M)	pH neutro	pH ácido HCl (10 ⁻³ M)
Compuesto 2	-24.95 ± 9.84	-27.01 ± 2.27	-19.38 ± 4.84
Compuesto 3	-21.56 ± 1.04	-18.11 ± 7.52	-12.29 ± 4.65

El potencial NP3-2 a pH ácido debería ser positivo. En una de las medidas que se realizan de las nanoesferas estabilizadas con compuesto 3 a pH ácido se observa cómo el potencial va aumentando desde un valor de -13 hasta llegar a -4; dando una media de -9.20 mV. Esta inestabilidad en la medida nos indica que se está produciendo la desprotección del grupo funcional del polímero. Pasado un día, se vuelve a medir la misma muestra para comprobar la desprotección total del grupo funcional. Tendríamos que haber observado un cambio de signo de potencial puesto que ahora en el extremo del polímero se debería encontrar el ion amonio. Sin embargo, se observa a simple vista un color más oscuro y como las nanoesferas quedan ligeramente pegadas a la pared. El resultado de la medida es de -31.60 mV.

Análisis termogravimétrico de las nanopartículas estabilizadas con polímero (TGA)

Se lleva a cabo un análisis termogravimétrico (TGA) para cuantificar la cantidad de polímero que recubre la nanoesfera de oro.

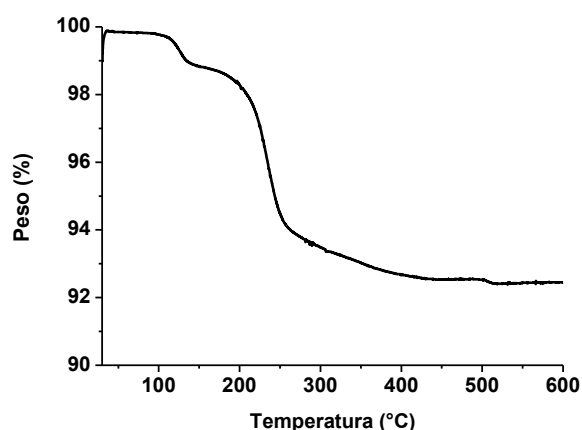


Figura 9: Análisis termogravimétrico de NP2-2.

El estudio se lleva a cabo con el polímero **2**, la pérdida de peso es de aproximadamente 7.5 %, que corresponden a unas 1440 moléculas de polímero **2** por nanopartícula de oro (Figura 9). Este resultado es el esperado, ya que la reacción se había llevado a cabo con 2000 equivalentes de polímero.

3.2.5 Estabilidad de las nanopartículas con el tiempo

Se preparan NPs con los polímeros **2** y **3**, y se dejan guardadas en nevera y recubiertas de papel de aluminio en todo momento. A lo largo de los días se van utilizando para las caracterizaciones.

Pasados 30 días desde la preparación se observó como las NPs funcionalizadas con el polímero **3**, están agregando en las paredes. Este hecho, nos puede dar errores en la caracterización, por lo que se decide realizar una nueva síntesis.

De nuevo se preparan NPs con polímero **3**. Esta vez se utiliza, por un lado, el compuesto **3** puro, y por otro el compuesto **3** sin purificar. Sin embargo, pasados 7 días de nuevo las nanopartículas con estos ligandos están agregadas.

Se decide entonces usar las primeras NPs que se prepararon para comprobar la saturación con el ligando, que no están agregadas.

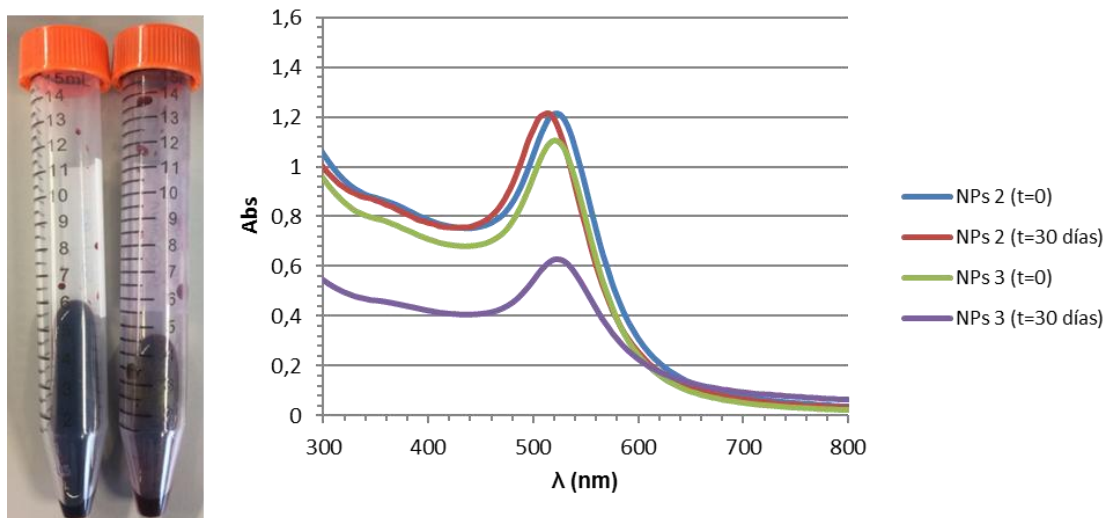


Figura 10. A la izquierda: NPs 2 (t=30 días), NPs 3 (t=30 días). A la derecha Espectro de absorción UV-vis de estas nanopartículas.

En el espectro UV-vis se observa como la absorbancia de las NPs estabilizadas con el polímero **3** al cabo de 30 días es mucho menor que cuando acababan de ser sintetizadas. Otro hecho que afirma la agregación de las nanopartículas es el desplazamiento del máximo hacia una mayor longitud de onda.

Esta agregación puede ser debida por la desprotección del grupo amino incluso en medio básico.

4. EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentos empleados

Los espectros de **resonancia magnética nuclear (RMN)**, de ^1H han sido registrados haciendo uso de un espectrómetro AV-400, empleando la señal del disolvente como referencia interna. Los disolventes empleados son cloroformo deuterado (CDCl_3) y agua deuterada (D_2O). Las constantes de acoplamiento J tienen unidades de (Hz) y los desplazamientos químicos δ se expresan en partes por millón (ppm). La simbología seguida para la multiplicidad de las señales es: s, singlete; t, triplete; m, multiplete.

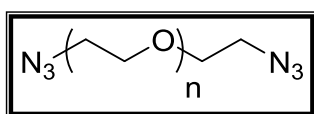
Los espectros de **infrarrojo (IR)**, se han registrado haciendo uso del espectrofotómetro FT/IR- 4100 Jasco.

Los **espectros de masas (EM)** se han obtenido mediante un espectrómetro de masas Bruker MicroFlex. Los espectros de **Ultravioleta-Visible (UV-Vis)** empleados para caracterizar las distintas nanoesferas, han sido obtenidos mediante el empleo de un espectrofotómetro Cary 50.

La caracterización de las nanopartículas mediante **MET** (microscopía electrónica de transmisión) fueron obtenidas con un microscopio Tecnai T20 (FEI). Los histogramas se han obtenido utilizando el programa ImageJ para medir el diámetro de al menos 100 nanopartículas y el programa OriginLab® (OriginLab, Northampton, MA, USA) para obtener el análisis estadístico de las frecuencias.

Las medidas de **Dispersión de Luz Dinámica (DLS)** fueron obtenidas usando un instrumento Brookhaven 90Plus DLS, mediante la técnica Photo-Correlation (PCS). El **Potencial Z**, es decir, el potencial de la superficie de cada nanoesfera se determinó midiendo la movilidad electroforética de una suspensión de nanotransportador de KCl 1 mM, con un analizador de tamaño de partícula Plus (Brookhaven Instruments Corporation).

4.2 Síntesis de $\text{N}_3\text{-PEG-N}_3$ (4)



En un matraz de 100 ml se disolvió $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-OH}$ (HO-PEG-OH, $m_w = 600$) comercial (12.51 g, 20.8 mmol) en 20 ml de THF en atmósfera inerte (N_2). Se adicionó trietilamina (NEt_3) (6.84 ml, 49.2 mmol). Cuando se consiguió la completa disolución, se introdujo el matraz en un baño de hielo y se adicionó cloruro de mesilo (3.5 ml; 46 mmol) gota a gota. Tras dos horas se quitó el baño de hielo y se dejó con agitación toda la noche.

Se realizó una cromatografía de capa fina. Se usó como eluyente CHCl_3 : MeOH = 10:1 (vol/vol), R_f (MsO-PEG-OMs) = 0.52, mientras que el R_f (HO-PEG-OH) = 0.45. Se usó ácido fosfomolibdico como revelador y se verificó la existencia de MsO-PEG-OMs en la mezcla de reacción.

Se preparó una disolución de NaHCO_3 (1.43 g, 17.0 mmol en 23 ml de H_2O) en un matraz de 250 ml; a esta se le añadió la mezcla de reacción obtenida y a continuación, se procedió a la destilación del THF. Para ello se preparó un sistema de destilado y la mezcla se calentó a 65°C .

La azida de sodio (3.32 g, 51.1 mmol) se añadió 30 minutos después del comienzo de la destilación. Cuando la destilación terminó, se dejó la mezcla a reflujo durante la noche.

Para confirmar la formación de producto N_3 -PEG- N_3 , se realizó otra cromatografía de capa fina. Se utilizó como eluyente $CHCl_3$: MeOH = 10:1 (vol/vol), y como revelador ácido fosfomolibdico. R_f (N_3 -PEG- N_3) = 0.71, R_f (HO-PEG-OH) = 0.45. Así se verificó la formación de N_3 -PEG- N_3 .

Con la mezcla obtenida, se realizaron cuatro extracciones con cloroformo. En base a los resultados de las correspondientes cromatografías de capa fina, las 4 fracciones obtenidas se combinaron en dos disoluciones, A (fracciones 2, 3 y 4) y B (fracción 1). A estas disoluciones se añadió Na_2SO_4 (6.6 g a B y 3 g a A). Se dejaron las muestras agitando 30 minutos.

A continuación, las disoluciones se pasaron por papel de filtro sobre un matraz tarado y se llevaron al rotavapor para eliminar el cloroformo.

Basándose en los espectros de RMN correspondientes a partir de este punto se utilizó la fracción A (10.08 g, 15.5 mmol) puesto que B (1.79 g, 2.7 mmol) contenía menor cantidad de material y con mayor cantidad de impurezas.

En primer lugar, se eliminaron las impurezas del producto mediante una cromatografía en columna de gel de sílice. El eluyente utilizado fue $CHCl_3$: MeOH = 20:1. Se obtuvieron 8 fracciones; de ellas contenían producto las fracciones 3, 4, 5, 6 y se separaron de la siguiente forma.

- SG-3-col- F1 (fracción 3): 1.63 g, 2.5 mmol
- SG-3-col-F2 (fracciones 4, 5, 6): 6.74 g, 10.4 mmol

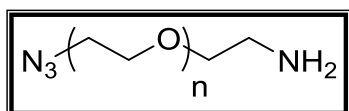
Se comprobó que las dos fracciones eran iguales por RMN. Por tanto, el producto fue un líquido incoloro del que se obtuvo 8.37 g después de la columna. (12.9 mmol, Rdto: 62%).

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 3.61-3.70 (m, 55H, O- CH_2 - CH_2 -O, -O- CH_2 CH $_2$ N $_3$), 3.37 (t, J = 5.0 Hz, 4H, CH_2 -N $_3$).

IR: 2869 cm^{-1} (tensión C_{sp^3} -H), 2104 cm^{-1} (tensión asimétrica de -N $_3$), 1099 cm^{-1} (tensión de C-O).

MS: 663.3, 679.3. Calculado para $C_{26}H_{52}O_{12}N_6Na$. ($M+Na^+$) = 663.35; calculado para $C_{26}H_{52}O_{12}N_6K$. ($M+K^+$) = 679.33.

4.3 Síntesis de NH_2 -PEG- N_3 (5)



El **polímero 4** (6.64 g, 10.2 mmol) se disolvió en EtOAc (60ml) en un matraz de 250 ml en baño de hielo y bajo atmósfera inerte (N_2). Se añadió HCl 1M (25 ml) y con un embudo de adición se añadió gota a gota una disolución de PPh_3 (2.94 g, 11.2 mmol) en EtOAc (40 ml). Se dejó con agitación toda la noche.

Se adicionó la mezcla de reacción a un embudo de decantación donde se observaron dos fases; se separó la fase acuosa y se lavó con acetato de etilo (2 x 40 ml).

La fase acuosa ya separada se introdujo en baño de hielo, se adicionó KOH lentamente (11.9 g, 212 mmol) y se agitó hasta disolución completa.

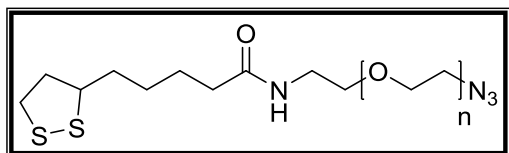
A continuación, se realizaron cuatro extracciones con acetato de etilo (4 x 20 ml). El producto estaba así en la fase orgánica. Se realizó una cromatografía de capa fina, usando como eluyente CHCl_3 : MeOH = 5:1 (vol/vol), R_f (N_3 -PEG-NH₂) = 0.10, R_f (N_3 -PEG-N₃) = 0.79, y como revelador ninhidrina. Se verificó así la existencia de N_3 -PEG-NH₂ en las fracciones 1, 2, 3. Estas se juntaron en un erlenmeyer y se adicionó Na_2SO_4 (19 g). Se agitó durante 20 minutos, la disolución se pasó por papel de filtro y se llevó al rotavapor para eliminar el acetato de etilo. El polímero **5** se obtuvo como un líquido amarillento (4.70 g, 7.5 mmol, Rdto: 74 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.60 (m, O-CH₂-CH₂-O), 3.46 (t, 2H, J = 5,6 Hz, O-CH₂CH₂N₃), 3.34 (t, 2H, J = 5,2Hz, O-CH₂-CH₂-NH₂), 2.81 (t, 2H, J = 5.2, O-CH₂CH₂N₃).

IR: 2867 cm^{-1} (tensión C_{sp^3} -H), 2104 cm^{-1} (tensión asimétrica de -N₃), 1455 cm^{-1} (flexión -NH₂), 1098 cm^{-1} (tensión de C-O).

MS: 615.3, 637.3, 653.3. Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{H}$. (M+H) = 615.38; $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{Na}$. (M+Na⁺) = 637.72; $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}_{12}\text{N}_4\text{K}$. (M+K⁺) = 653.83.

4.4 Síntesis de TA-PEG-N₃ (6)



Se adicionó **5** (4.50 g, 7.2 mmol), DMAP (0.18 g, 1.4 mmol), DCC (1.52 g, 7.4 mmol) y CH_2Cl_2 (44.50 ml) a un matraz de 100 ml con agitación. La mezcla se introdujo en baño de hielo y se puso bajo atmósfera inerte (N_2).

Con un embudo de adición, se añadió durante 30 min ácido lipoico (1.48 g, 7.2 mmol) y se disolvió en CH_2Cl_2 (28 ml). Cuando la adición se completó se dejó agitando toda la noche mientras se consumía el baño de hielo.

Transcurrida toda la noche, se filtró con celita, se lavó con CH_2Cl_2 y se evaporó el CH_2Cl_2 del filtrado. Se añadió al residuo agua y NaHCO_3 y se realizaron dos lavados con éter (2 x 100 ml).

Se realizaron cinco extracciones con CH_2Cl_2 (5 x 50 ml) a la fase acuosa obtenida, se juntaron las fases orgánicas, se secaron con Na_2SO_4 , y se pasaron por papel de filtro. Por último, se evaporó el disolvente en el rotavapor.

El producto obtenido fue necesario purificarlo, para ello se llevó a cabo una cromatografía en columna de gel de sílice. Se usó CHCl_3 : MeOH 20:1 (vol/vol) como eluyente. Se llevó a cabo cromatografía de capa fina para comprobar en qué fracciones había producto, usando como eluyente CHCl_3 : MeOH 10:1 (vol/vol). R_f (N_3 -PEG- TA) = 0.64, R_f (N_3 -PEG- NH₂) = 0.04, y como revelador ácido fosfomolibdico.

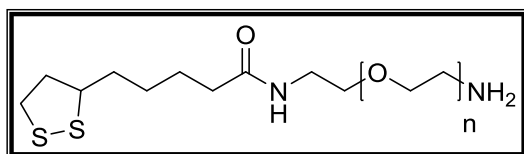
Se combinaron las fracciones con producto puro, se evaporó el disolvente y se dejó a vacío durante la noche. El producto se obtuvo como un aceite amarillo (4.17 g, 5.1 mmol, Rdto: 71 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.60-3.65 (m, 55H, O-CH₂-CH₂-O), 3.54 (t, *J* = 4,8 Hz, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 3.43 (t, 2H, *J* = 5Hz, O-CH₂-CH₂-N₃), 3.35 (t, 2H, *J* = 5.8Hz, HN-CH₂-CH₂), 3.06-3.16 (m, 2H, CH₂-S-S), 2.403-2.45 (m, 1H, S-S-CH-), 2.27 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz, CH₂-CO-NH-), 1.18-1.91 (m, 2H, S-CH₂-CH₂-CH-S), 1.61- 1.72 (m, 4H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO), 1.41-1.48 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO).

IR: 2865 (tensión C_{sp3}-H), 2102 (tensión asimétrica de N₃), 1667 (tensión C=O), 1097 (tensión C-O).

MS: 802.7, 825.3, 841.4; calculado para C₃₄H₆₆O₁₃N₄S₂. (M) = 802.41; C₃₄H₆₆O₁₃N₄S₂Na. (M+Na⁺) = 825.40; C₃₄H₆₆O₁₃N₄S₂K. (M+K⁺) = 841.37.

4.5 Síntesis de TA-PEG-NH₂ (1)



Se disolvió **6** (3.00 g, 3.7 mmol) en THF (42 ml) en un matraz con agitación y bajo atmósfera inerte (N₂). Se añadió PPh₃ (1.45 g; 5.5 mmol) y se dejó agitando 30 min. Se adicionó H₂O (0.66 ml) y se dejó con agitación toda la noche.

Transcurrido este tiempo se realizó una cromatografía de capa fina. Se usó como eluyente CHCl₃: MeOH = 10:1 (vol/vol), y como revelador ninhidrina R_f (**6**) = 0.65, mientras que el R_f (**1**) = 0.09. R_f (PPh₃) = 0.9. Se verificó así la existencia de TA-PEG-NH₂.

Se evaporó el disolvente y se añadió al residuo EtOAc. Se añadió a un embudo de decantación, junto con HCl (84 ml, 1 M). Se eliminó la fase orgánica.

Se adicionó a la fase acuosa Na₂CO₃ hasta obtener pH ≈ 9. Se extrajo el producto con CHCl₃ (3 x 25 ml) y se combinaron las fases orgánicas. Se secó con Na₂SO₄ y se pasó por papel de filtro. Por último, se evaporó el disolvente en rotavapor.

Tras observar el RMN del producto obtenido, se dedujo que había mezcla de productos, por lo que se volvió a poner la reacción anterior partiendo del crudo obtenido.

Se disolvió el crudo obtenido (2.59 g, 3.2 mmol) en THF (36 ml) en un matraz con agitación y bajo atmósfera inerte (N₂). Se añadió PPh₃ (1,25 g; 4,78 mmol) y se dejó agitando un día. Se adicionó H₂O (0,57 ml) y se dejó con agitación dos días.

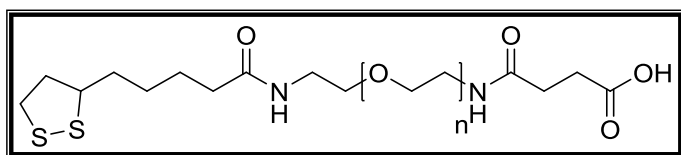
Transcurrido este tiempo se procedió como en la reacción anterior. El producto obtenido se obtuvo como un aceite amarillo (2.27 g, 2.9 mmol, Rdto: 78 %).

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.59-3.70 (m, 55H, O-CH₂-CH₂-O), 3.51-3.54 (m, 2H, NH-CH₂-CH₂-O), 3.40-3.44 (m, 2H, HN-CH₂-CH₂), 3.31-3.35 (m, 2H, CH₂-NH₂), 3.04-3.19 (m, 2H, CH₂-S-S), 2.15- 2.21 (m, 1H, S-S-CH-), 1.84- 1.97 (m, 2H, S-CH₂-CH₂-CH-S), 1.60- 1.71 (m, 2H, NH₂) 1.39-1.48 (m, 4H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO), 1.22- 1.25 (m, 2H, CH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO).

IR: 2866 (tensión C_{sp3}-H), 1662 (tensión C=O), 1099 (tensión C-O).

MS: 777.4, 799.4, 815.4 calculado para C₃₄H₆₉O₁₃N₂S₂H. (M+H) = 777.42; C₃₄H₆₉O₁₃N₂S₂Na. (M+Na⁺) = 799.41; C₃₄H₆₉O₁₃N₂S₂K. (M+K⁺) = 815.38.

4.6 Síntesis de TA-PEG-NH-suc (2)



Se añadió a un matraz **1** (518 mg, 0.64 mmol), NEt_3 (0.23 ml) y anhídrido succínico (127.80 mg, 1.3 mmol). Se dejó reaccionando toda la noche.

Se adicionó a la mezcla de reacción HCl (30 ml), y se realizaron 3 extracciones con CHCl_3 (3 x 55 ml). Se realizó una cromatografía de capa fina de las tres fracciones de fase orgánica obtenidas. Se usó como eluyente CHCl_3 : MeOH = 10:1 (vol/vol), R_f (**2**) = 0.6; y como revelador ácido fosfomolibdico. Se juntaron las dos primeras fracciones en un embudo de decantación; se lavó con salmuera y se añadió Na_2SO_4 . Por último, se pasó por papel de filtro y se llevó al rotavapor.

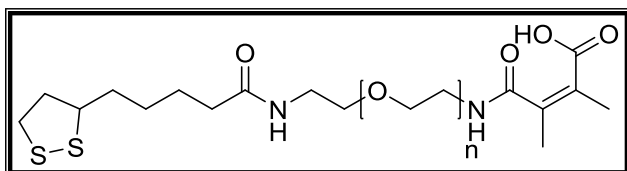
El producto se obtuvo como un aceite amarillo (0.46 g, 0.5 mmol, Rdto: 81%).

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 6.99 (s, 1H) 3.52-3.74 (m, 56H, O- CH_2 - CH_2 -O), 3.57-3.55 (m, 4H, NH- CH_2 - CH_2 -O), 3.43-3.47 (m, 4H, HN- CH_2 - CH_2), 3.06-3.19 (m, 2H, S- CH_2), 2.61-2.69 (m, 4H, CO- CH_2 - CH_2 -CO), 2.41- 2.48 (m, 1H, S-S-CH-), 2.32- 2.34 (m, 2H, S- CH_2 - CH_2 .CH-S), 1.85- 1.94 (m, 1H, S-S-CH- CH_2) 1.60- 1.76 (m, 4H, CH- CH_2 . CH_2 - CH_2 - CH_2 -CO), 1.37- 1.54 (m, 2H, CH- CH_2 . CH_2 - CH_2 - CH_2 -CO).

IR: 3319 (tensión O-H); 2867 (tensión C_{SP^3} -H); 1652 (tensión C=O); 1095 (tensión C-O).

MS: 875.1, 899.5, 915.5 calculado para $\text{C}_{38}\text{H}_{71}\text{O}_{16}\text{N}_2\text{S}_2\text{H}$ (M+H) = 876,43; $\text{C}_{38}\text{H}_{71}\text{O}_{16}\text{N}_2\text{S}_2\text{Na}$ (M+ Na^+) = 898.43; $\text{C}_{38}\text{H}_{71}\text{O}_{16}\text{N}_2\text{S}_2\text{K}$ (M+ K^+) = 915.43.

4.7 Síntesis de TA-PEG-NH-DMMA (3)



Se disolvió **1** (100 mg, 0.13 mmol) en 2 ml de NaOH (0.1 M), se fue añadiendo el DMMA (17.6 mg, 0.14 mmol) poco a poco controlando el pH. Una vez adicionado, se fue adicionando NaOH (0.1 M) para mantener el pH en torno a 11; en

distintas fracciones se añadió un total de 3 ml de NaOH (0.1 M). Se dejó toda la noche agitando; el pH final fue de 11.5.

El producto obtenido se dividió en dos fracciones iguales, solo se purificó una de ellas. La fracción que no fue purificada se liofilizó durante la noche.

El producto se purificó en columna Sephadex, obteniéndose 5 fracciones. De estas fracciones hay producto en la fracción 2, que se liofilizó durante la noche.

El producto se obtiene como un aceite amarillo (22 mg, 0.02 mmol, Rdto: 44 %).

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ : 3.71-3.74 (m, 56H, O- CH_2 - CH_2 -O), 3.63-3.67 (m, 4H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 3.40- 3.43 (m, 2H, O- CH_2 - CH_2 -NH), 3.20-3.26 (m, 1H, S-CH- CH_2), 2.27-2.31 (m, 2H, S-S- CH_2), 2.25 (t, CH_2 -CO), 1.83- 1.8 (dd, 2H, S- CH_2 - CH_2 - CH_2 -S) 1.613-1.70 (m, 4H, S-CH- CH_2 - CH_2 - CH_2), 1.41- 1.48 (m, 2H, CH- CH_2 . CH_2 - CH_2 - CH_2 -CO).

IR: 3494 (tensión O-H); 2866 (tensión C_{SP3}-H); 1649 (tensión C=O); 1094,4 (tensión C-O).

MS: 777.5; 799.5 calculado para C₃₄H₆₉O₁₃N₂S₂H (M+H) = 777.42; C₃₄H₆₉O₁₃N₂S₂Na (M+Na⁺) = 799.41.

En el espectro de masas, se observa que la molécula se ha desprotegido, probablemente debido a la matriz de análisis y, por tanto, el espectro que se ve es el del compuesto: TA-PEG-NH₂.

4.8 Síntesis de nanoesferas con citrato

La síntesis se llevó a cabo en un matraz de dos bocas de 500 ml previamente lavado con agua regia y posteriormente homogeneizado con agua MiliQ. Se envolvió el matraz en papel de aluminio para protegerlo de la luz a lo largo del proceso sintético y se conectó a un sistema de reflujo para garantizar que las concentraciones de todos los solutos sean constantes.

Se disolvió HAuCl₄ (80 mg; 0.23 mmol) en H₂O-MiliQ (195 ml) y se colocó el matraz en un baño de aceite que se calentó a temperatura de reflujo. Alcanzado el punto de ebullición se agregó al sistema citrato de sodio tribásico (C₆H₅Na₃O₇) (240.0 mg; 0.93 mmol) previamente disuelto en H₂O-MiliQ (5 ml) y la disolución se mantuvo con agitando a ebullición durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Caracterización:

UV-Vis: Pico máximo a 520 nm

Pico: 450.06 nm; Abs = 0.555

La absorbancia a 450 nm permite calcular la concentración de nanoesferas en disolución mediante la aplicación de la Ley de Lambert Beer.

$$C = \frac{Abs_{450}}{l \cdot \epsilon_{450}} * fd = \frac{0.555}{1 \times 1.76 \times 10^8} \times 4 = 1.26 \times 10^{-8} \text{ M}$$

4.9 Nanoesferas oro con polímero 2

En un tubo de centrifuga de 50 ml, se trasvasaron 19.5 ml de la disolución de nanoesferas con citrato que previamente habían sido sintetizadas. Se añadió una disolución acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS) (10 % w/w) (62.5 µL), **2** (5 mg disueltos en 5 ml H₂O-MiliQ), NaOH 2 M (337 µL) y H₂O-MiliQ (4.7 ml). El tubo de centrifuga se recubrió con papel de aluminio para protegerlo de la luz y se dejó agitando sobre rodillos durante 24 horas. Finalizando el tiempo de espera, se centrifugó a 4 °C y 12700 rpm durante 40 minutos por triplicado, intercalando lavados con H₂O-MiliQ. Finalmente, el precipitado se resuspendió en H₂O-MiliQ. Se caracterizó mediante espectro de UV-Vis.

UV-Vis: Pico máximo a 520 nm

Pico: 450 nm; Abs = 0.761

$$C = \frac{\text{Abs}_{450}}{1 \times 10^4} * fd = \frac{0.761}{1 * 1.76 * 10^8} \times 21 = 9.08 \times 10^{-8} \text{ M}$$

4.10 Nanoesferas oro con polímero 3

En un tubo de centrifuga de 50 ml estéril, se trasvasaron 19,5 ml de la disolución de nanoesferas con citrato previamente habían sido sintetizadas. Se añadió una disolución acuosa de dodecilsulfato de sodio (SDS) (10 % w/w) (62.5 µL), TA-PEG-DMMA no purificado, (75 mg disueltos en 1 ml H₂O-MiliQ), NaOH 2M (337 µL) y H₂O-MiliQ (4.7 ml). El tubo de centrifuga se recubrió con papel de aluminio para protegerlo de la luz y se dejó agitando sobre rodillos durante 24 horas. Finalizando el tiempo de espera, se centrifugó a 4 °C y 12700 rpm durante 40 minutos por triplicado, intercalando lavados con NH₃ (10⁻³ M). Finalmente, el precipitado se resuspendió en NH₃ (10⁻³ M). Se caracterizó mediante espectro de UV-Vis.

UV-Vis: Pico máximo a 520 nm

Pico: 450 nm; Abs = 0.687

$$C = \frac{\text{Abs}_{450}}{1 \times 10^4} * fd = \frac{0.687}{1 * 1.76 * 10^8} \times 21 = 8.2 \times 10^{-8} \text{ M}$$

4.11 Electroforesis en gel de agarosa.

El gel de agarosa se preparó disolviendo agarosa (1 g) en tampón tris(hidroximetil)aminometano-borato- ácido etilendiaminotetraacético (TBE) 0,5% (50 ml). La mezcla se introdujo en el microondas durante 90 segundos, hasta llevarla a ebullición. Después se depositó sobre una cama en la cual se dejó gelificar. Cuando el gel estaba totalmente formado, se colocó la cama con el gel sobre la cubeta de electroforesis y se sumergió en una disolución conductora de TBE. Posteriormente, se depositaron todas las muestras de nanopartículas sintetizadas a lo largo del trabajo en la zona próxima al cátodo. Debido a la carga de las nanopartículas, que están cargadas negativamente, tienden a correr hacia el ánodo. Por último, se conectó el sistema a la fuente de alimentación en condiciones de 100 mV durante 1 hora.

4.12 Caracterización de las muestras por DLS

Para medir las muestras por la técnica DLS, se introdujo en el instrumento una dilución de 50 µl de las nanopartículas correspondientes, junto con 1.8 ml de H₂O MiliQ. Esta disolución antes de introducirla en la cubeta, fue necesario filtrarla puesto que sin el filtro las medidas eran muy inestables. Posiblemente debido a pequeñas partículas de polvo que había en la disolución.

Para las medidas a pH ácido o básico, se adicionaron en lugar de 1.8 ml de H₂O MiliQ, 1.8 ml de HCl (10⁻³ M) y NH₃ (10⁻³ M) respectivamente.

4.13 Caracterización de las muestras por medida de potencial Z

Las medidas de potencial Z se llevaron a cabo con el mismo equipo que se usó para medir DLS. La diferencia fue la disolución utilizada, así como la utilización de un electrodo, que fue introducido en la disolución.

En la cubeta se introdujo 1.6 ml de KCl (1 mM) y 20 μ l de las nanopartículas correspondientes.

Para la obtención de las medidas a pH ácido y básico se adicionó además del KCl y las nanopartículas, 20 μ l de HCl (10^{-3} M) en el primer caso y NH_3 (10^{-3} M) en el segundo.

4.14 Análisis termogravimétrico de las nanoesferas de oro estabilizadas con polímero.

Esta técnica permite determinar la cantidad de materia orgánica que recubre la nanoesfera. Para ello, se liofilizaron 3 mg de cada una de las muestras que se habían sintetizado y se realizaron las medidas bajo una atmósfera de aire, incrementando la temperatura a una velocidad de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta que se alcanzó la temperatura final de 800 $^{\circ}\text{C}$. Las mediciones se llevaron a cabo mediante el instrumento *Universal V4.5 de TA Instruments*, el cual consta de una balanza analítica sumamente sensible que registra pequeñas variaciones en el peso de la muestra. La balanza se calienta con un horno con la atmósfera y la velocidad previamente configuradas.

Se realiza una continua medición de la masa de la muestra en función de la temperatura. La materia orgánica se quema a una temperatura inferior a la inorgánica liberándose gases de combustión que desembocan en una pérdida de la masa, lo cual permite conocer la cantidad de materia orgánica que había en la muestra.

5. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado, se ha llevado a cabo la síntesis de tres polímeros, que posteriormente se han utilizado para funcionalizar unas nanopartículas de oro. Estas nanopartículas son preparadas en primer lugar con un ligando citrato. Posteriormente se lleva a cabo un intercambio de ligando entre el citrato y cada uno de los polímeros sintetizados.

Para llevar a cabo esta funcionalización con los polímeros, se han seguido dos estrategias diferentes. Una de ellas consiste en formar la amida sobre la propia nanopartícula; mientras que en la otra la amida se forma antes de la unión con la nanopartícula. Se concluye que la primera estrategia, llevada a cabo con el polímero **1**, no es eficaz. Puesto que las nanopartículas agregaban al ser sintetizadas. Mientras que las nanopartículas funcionalizadas mediante la segunda estrategia, eran estables.

Por otro lado, se quería estudiar el comportamiento, de las nanopartículas estabilizadas con los polímeros **2** y **3**, con el pH. La diferencia entre estos polímeros es que el polímero **3** tiene un grupo funcional lábil al pH (el grupo anhídrido del ácido 2,3-dimetilmaleico), mientras que el polímero **2** no es dependiente de pH.

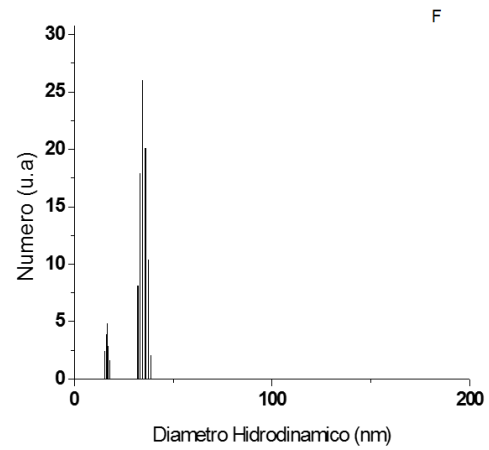
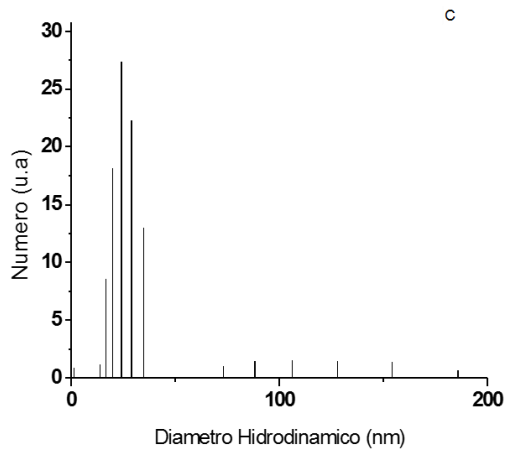
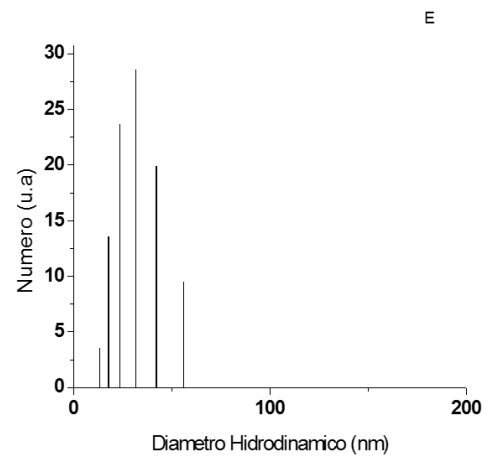
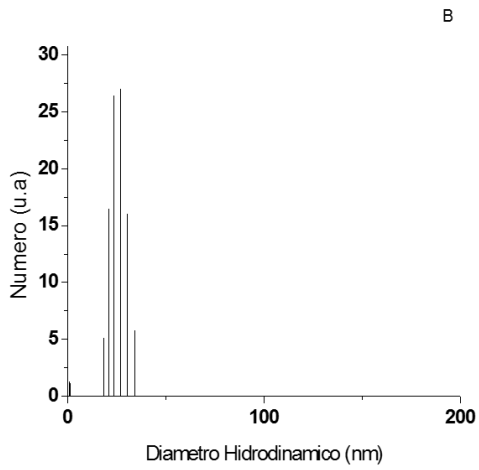
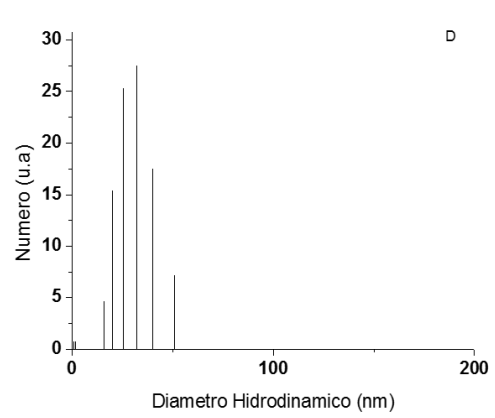
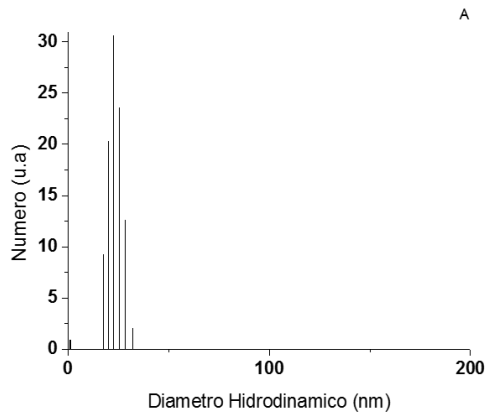
De los resultados obtenidos de este estudio, se concluye que las nanopartículas funcionalizadas con el polímero **3** no presentan gran estabilidad, puesto que agregan con mucha facilidad, a pesar de ser conservadas en frío y tapadas de la luz. Además, a pH neutro ya se produce la desprotección del grupo amino, como se ha podido comprobar mediante las medidas de potencial Z, y de DLS. Por otro lado, las nanopartículas estabilizadas con el polímero **2**, sí presentan estabilidad en el tiempo, y un comportamiento similar a cualquier pH.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. C. Burda, X. Chen, R. Narayanam, M. A. El-Sayed, *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1025-1102.
2. R. Feynman, *Eng. And Sci.* **1960**, *23*, 22-36.
3. <http://elfaronanotec.blogspot.com/2016/10/que-es-la-nanotecnologia-el-tamano-si.html.20/06/2018>
4. Dykman, N. Khlebtsov, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2256-2282.
5. Y. Murali, L. Kyungjae, P. Thathan G. E. Kurt, *Polymer.* **2007**, *48*, 158-164.
6. P. Gosh, G. Han, M. De, C. Kyu, V. Rotello, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, 1307-1315.
7. N. Dung, K. Dong-Joo, K. Kyo-Seon, *Micron.* **2011**, *42*, 201-221.
8. R. van Sluis, Z. M. Bhujwalla, N. Raghunand, P. Ballesteros, J. Alvarez, J. P. Galons, R. J. Gillies. *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41*, 743-750.
9. M. P. Monopoli, C. Alberg, A. Salvati, K. A. Dawson, *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 779-786.
10. C. D. Walkey, W. C. W. Chan. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2780-2799.
11. C. D. Grande, F. Zuluaga, *Rev. Iberoam. Polímeros* **2010**, *11*, 339-359.
12. J. Xie, C. Xu, N. Kohler, M. Q. Zhang. *Biomaterials* **2002**, *23*, 1553-1561.
13. B. Pelaz, P. del Pino, P. Maffre, R. Hatmann, M. Gallego, S. Rivera-Fernández, J. M. de la Fuente, G. U. Nienhaus, W. J. Parack. *ACS Nano*, **2015**, *97*, 6996-7008.
14. J. Z. Du, T. M. Sun, W. J. Song, J. Wu, J. Wang. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3621-3626.
15. J. Z. Du, C. Q. Mao, Y.Y. Yuan, X. Z. Yang, J. Wang. *Biotechnology Adv.* **2014**, *32*, 789-803.
16. J. Z. Du, X. J. Du, C. Q. Mao, J. Wang. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17560-17563
17. H. Deng, J. Liu, X. Zhao, Y. Zhang, J. Liu, S. Xu, L. Deng, A. Dong, J. Zhang. *Biomacromolecules* **2014**, *15*, 4281-4292.
18. H. Mattoussi, B. C. Mei, K. Susumu. *Nature Publishing Group* **2009**, *4*, 424-436.
19. W. Haiss, N. T. K. Thanh, J. Aveyard, D. G. Fernig. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4215-4221.

ANEXOS

1. Anexo correspondiente al apartado 3.2.5 de la memoria: Histogramas de distribución de diámetro hidrodinámico caracterizado por DLS.



A: NPs 2 – medio ácido

B: NPs 2 – medio básico

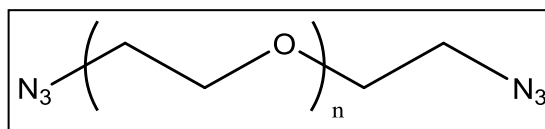
C: NPs 2 - medio neutro

D: NPs 3 – medio ácido

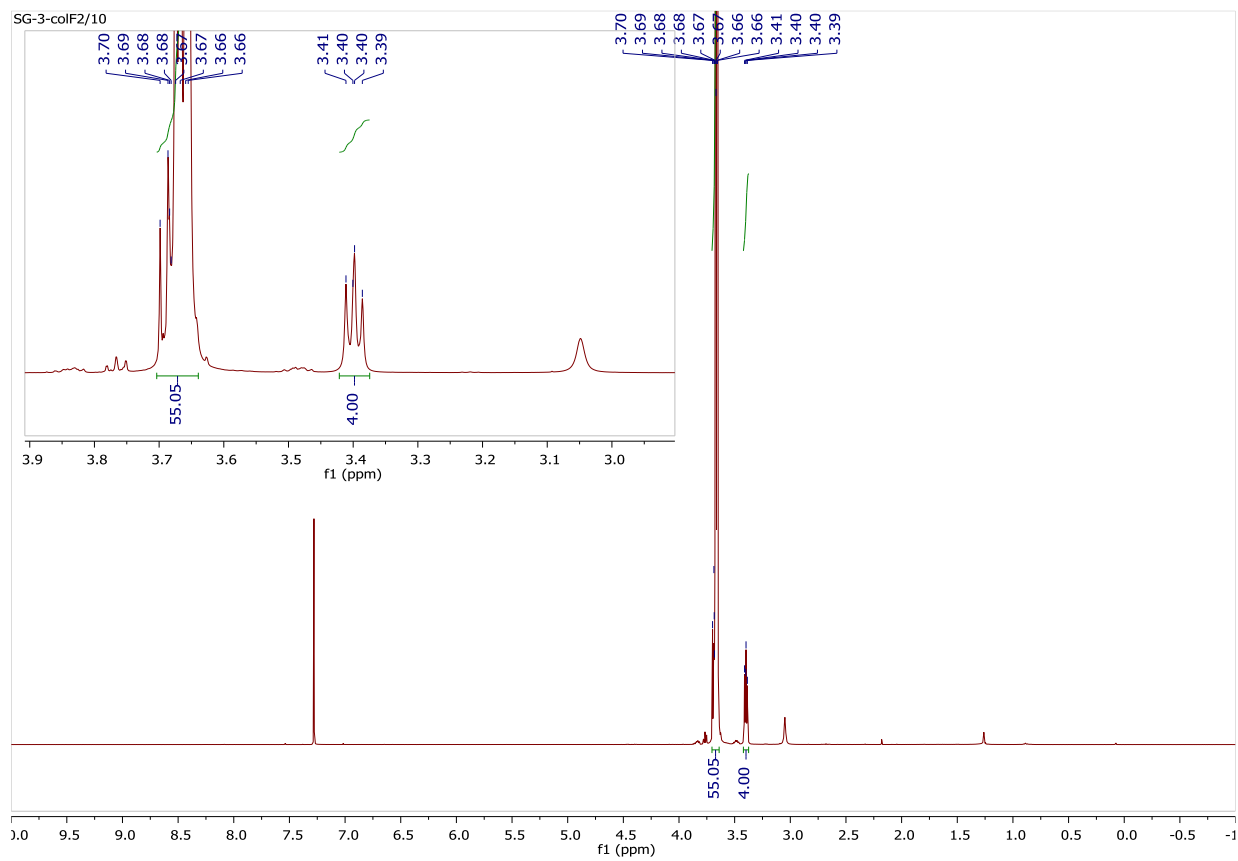
E: NPs 3 – medio básico

F: NPs 3 - medio neutro

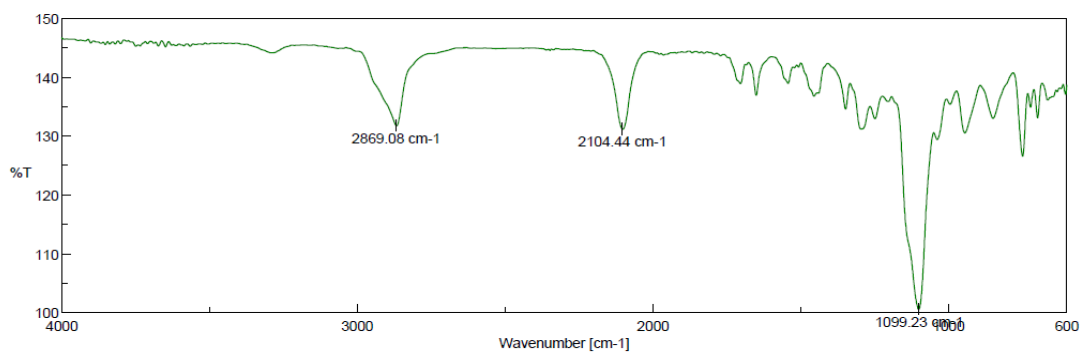
2. Espectros que caracterizan los diferentes compuestos orgánicos:



Polímero 4



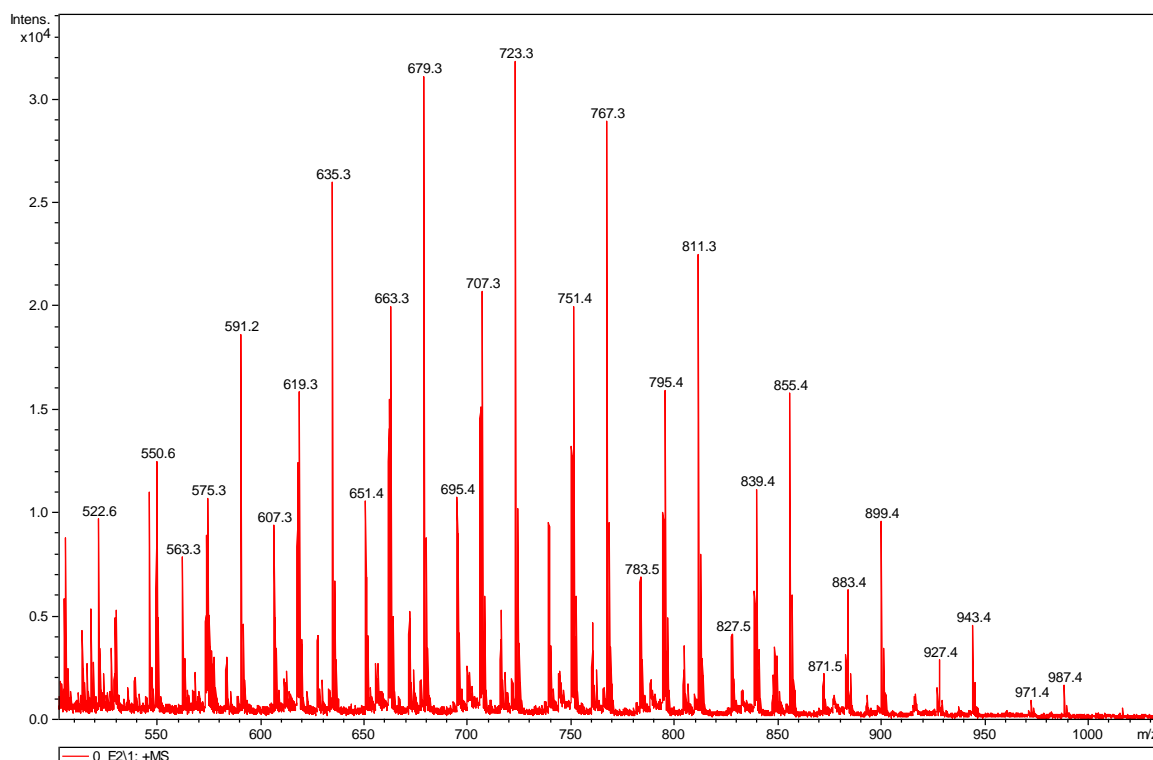
^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)



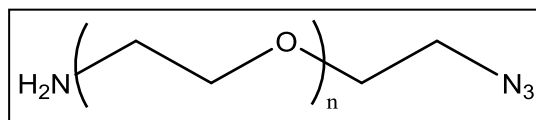
[Comments]		[Measurement Information]	
Sample name		Model Name	FT/IR-4100typeA
Comment		Serial Number	B167861016
User		Measurement Date	23/01/2018 10:08
Division		Light Source	Standard
Company	Universidad de Zaragoza	Detector	TGS
[Detailed Information]		Accumulation	32
Creation date	23/01/2018 10:10	Resolution	2 cm-1
Data array type	Linear data array	Zero Filling	On
Horizontal axis	Wavenumber [cm-1]	Apodization	Cosine
Vertical axis	%T	Gain	Auto (16)
Start	599.753 cm-1	Aperture	Auto (5 mm)
End	4000.12 cm-1	Scanning Speed	Auto (2 mm/sec)
Data interval	0.482117 cm-1	Filter	Auto (30000 Hz)
Data points	7054		

— SG-3-COLF2-PEAKS.jws

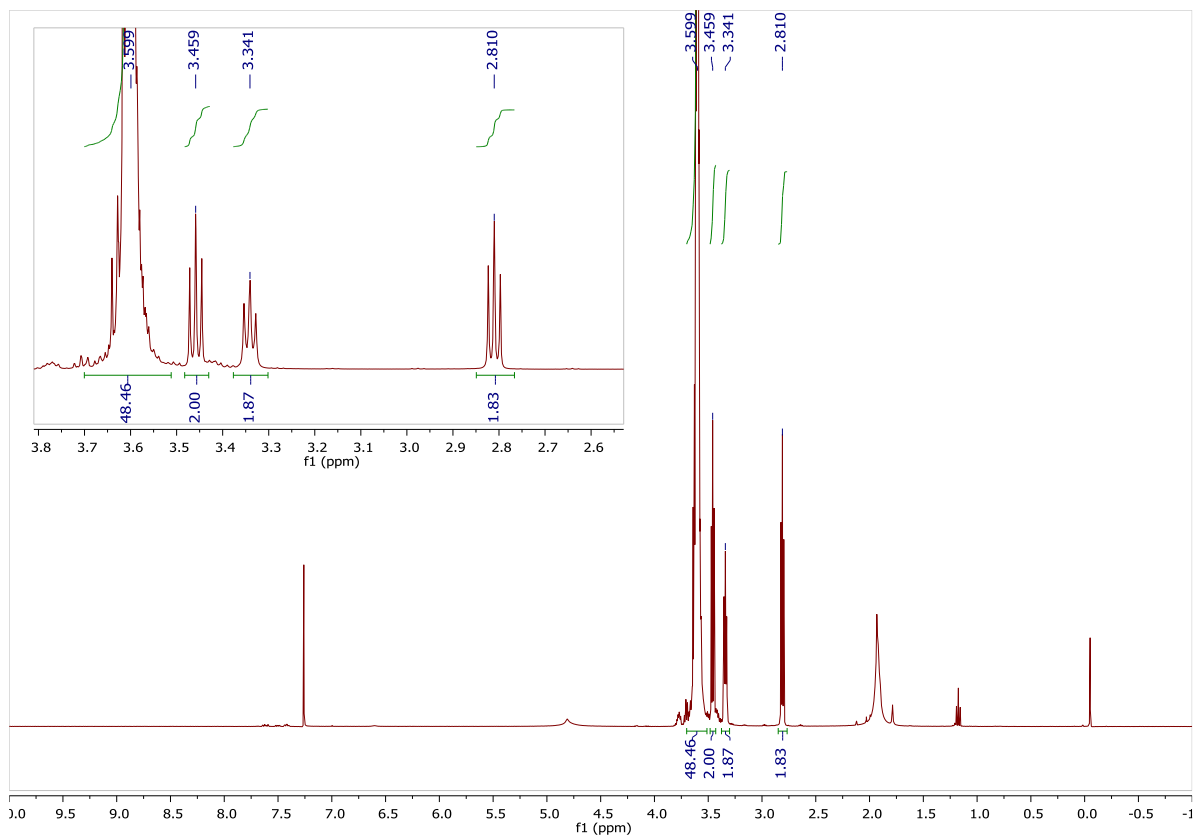
Espectro Infrarrojo (IR)



Ampliación de Espectro Masas (MS)

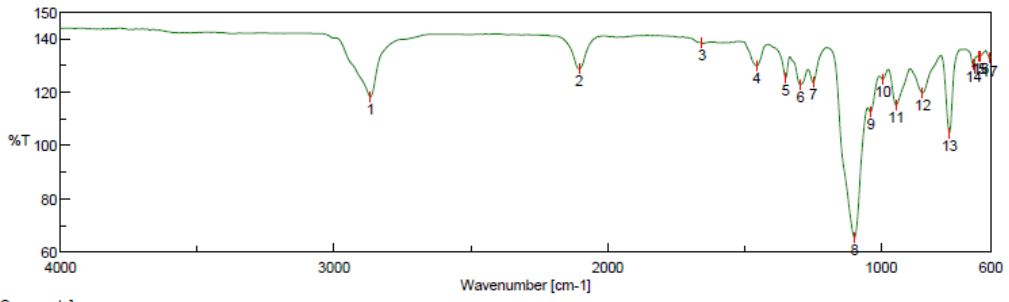


Polímero 5



^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3)

Peak Find - SG-NH2-PEG-N3.jws



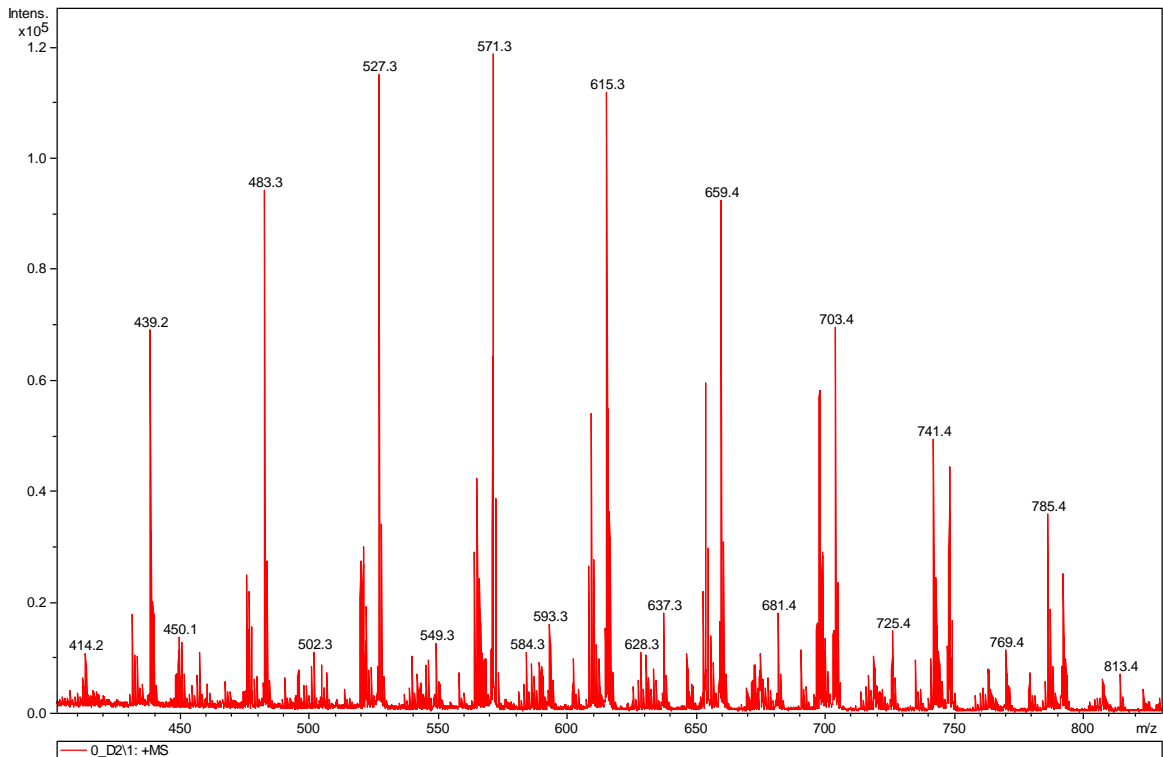
[Comments]
 Sample name
 Comment
 User
 Division
 Company

Universidad de Zaragoza

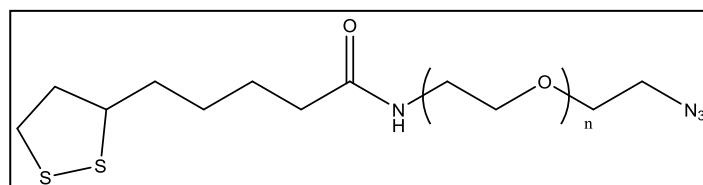
[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	2866.67	118.191	2	2104.44	128.699
3	1655.59	138.352	4	1455.03	129.76
5	1349.44	125.123	6	1295.45	122.865
7	1249.16	123.614	8	1097.78	65.5148
9	994.607	124.894	9	1038.96	112.56
10	945.913	115.174	11	849.008	119.646
12	750.656	104.724	12	849.008	119.646
13	750.656	104.724	13	750.656	104.724
14	662.428	130.188	14	662.428	130.188
15	645.554	133.38	15	645.554	133.38
16	636.394	133.66	16	636.394	133.66
17	604.574	132.648	17	604.574	132.648

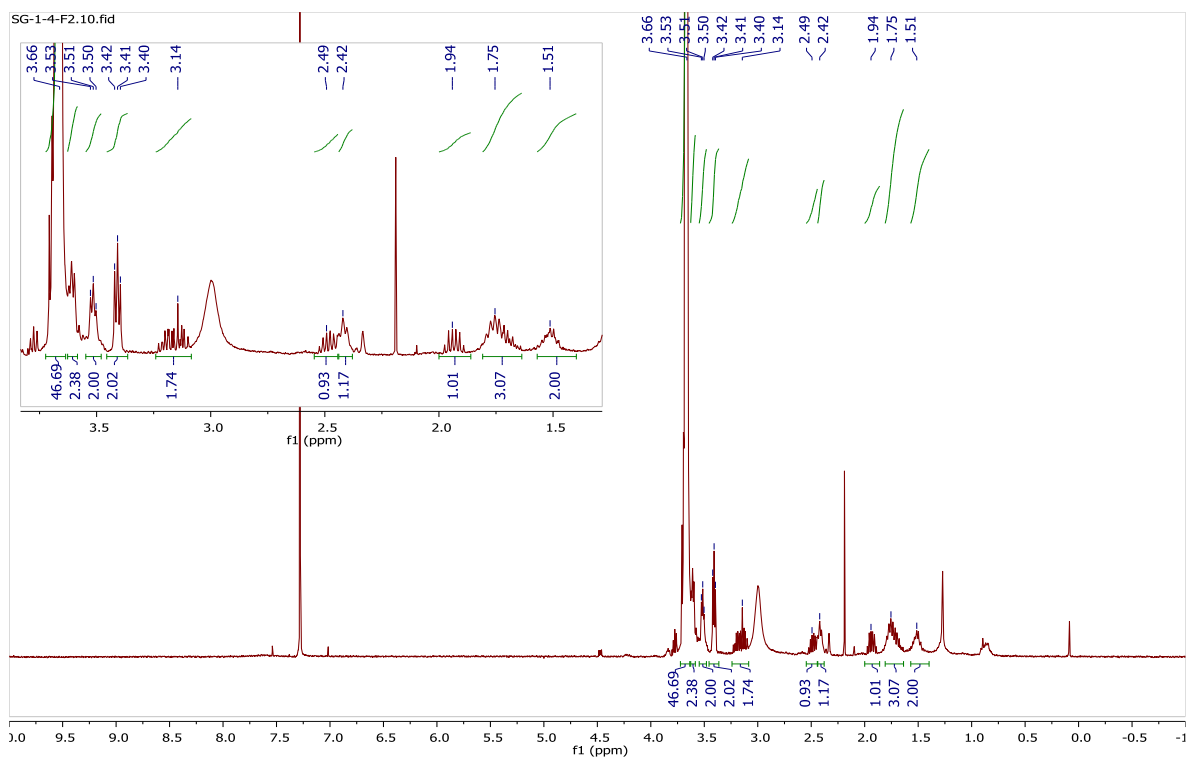
Espectro Infrarrojo (IR)



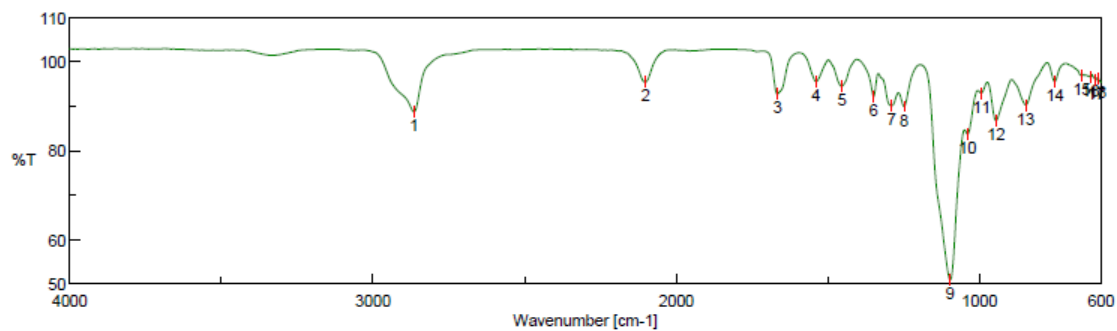
Ampliación de Espectro Masas (MS)



Polímero 6



¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃)



[Comments]

Sample name

Comment

User

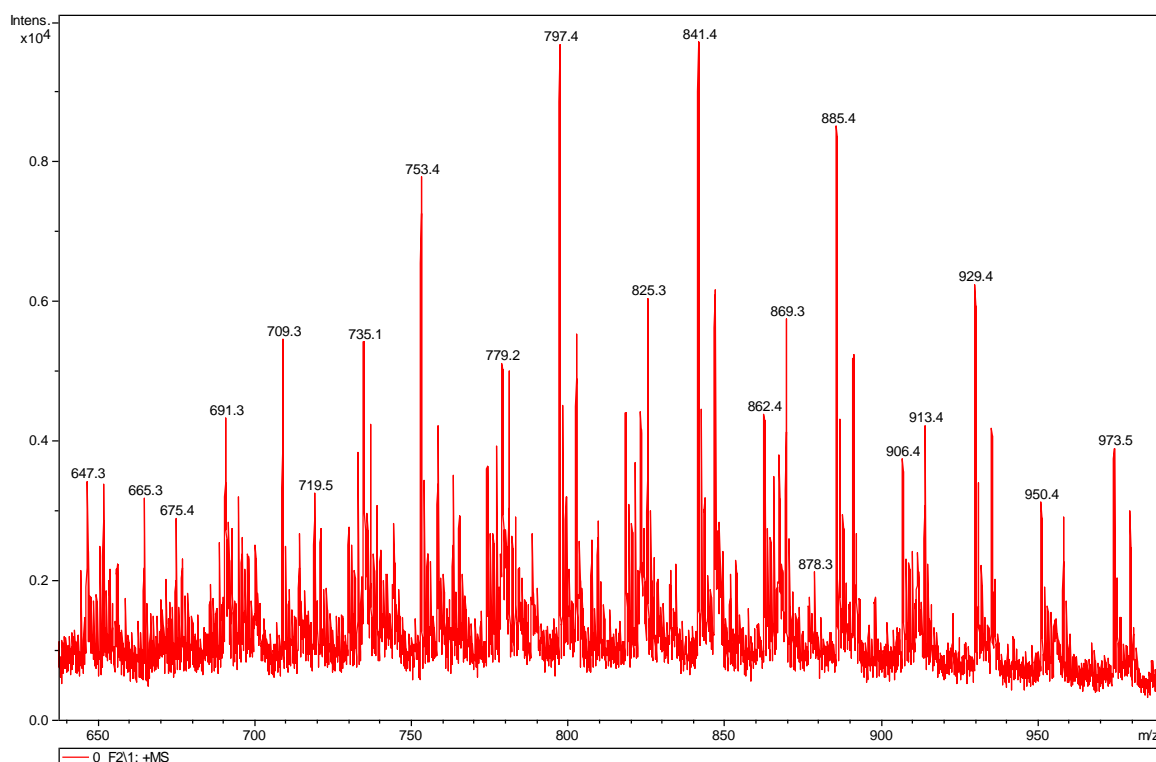
Division

Company Universidad de Zaragoza

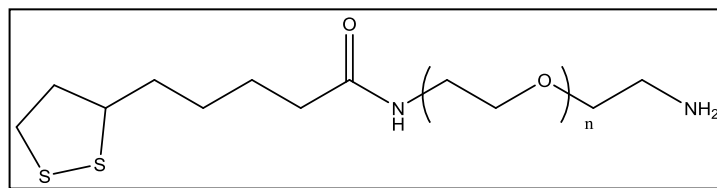
[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	2864.74	88.7187	2	2101.55	95.4326	3	1666.68	92.7377
4	1538.43	95.5557	5	1454.55	94.4909	6	1349.44	92.1537
7	1290.63	90.1134	8	1248.68	89.9647	9	1096.82	50.8495
10	1039.44	83.7304	11	994.125	92.9754	12	945.913	86.7694
13	848.043	90.2848	14	752.102	95.5231	15	663.393	96.8424
16	633.984	96.5562	17	616.627	95.8346	18	610.842	96.2221

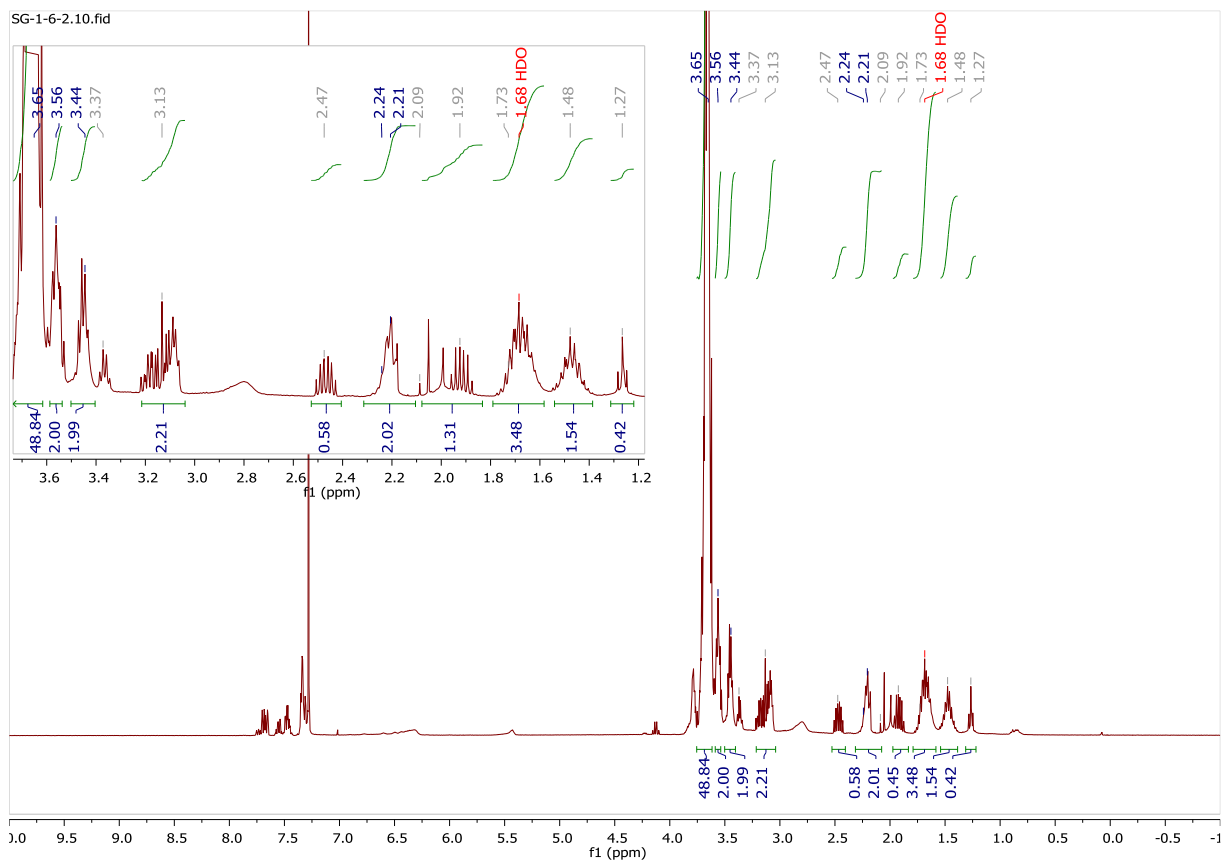
Espectro Infrarrojo (IR)



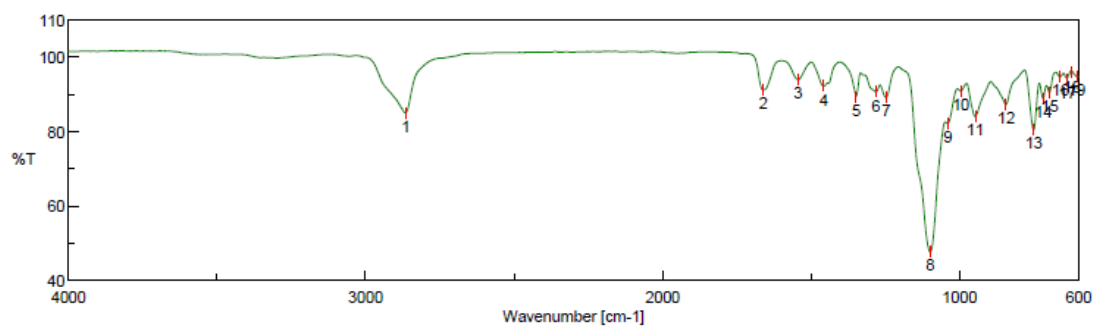
Ampliación de Espectro Masas (MS)



Polímero 1



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

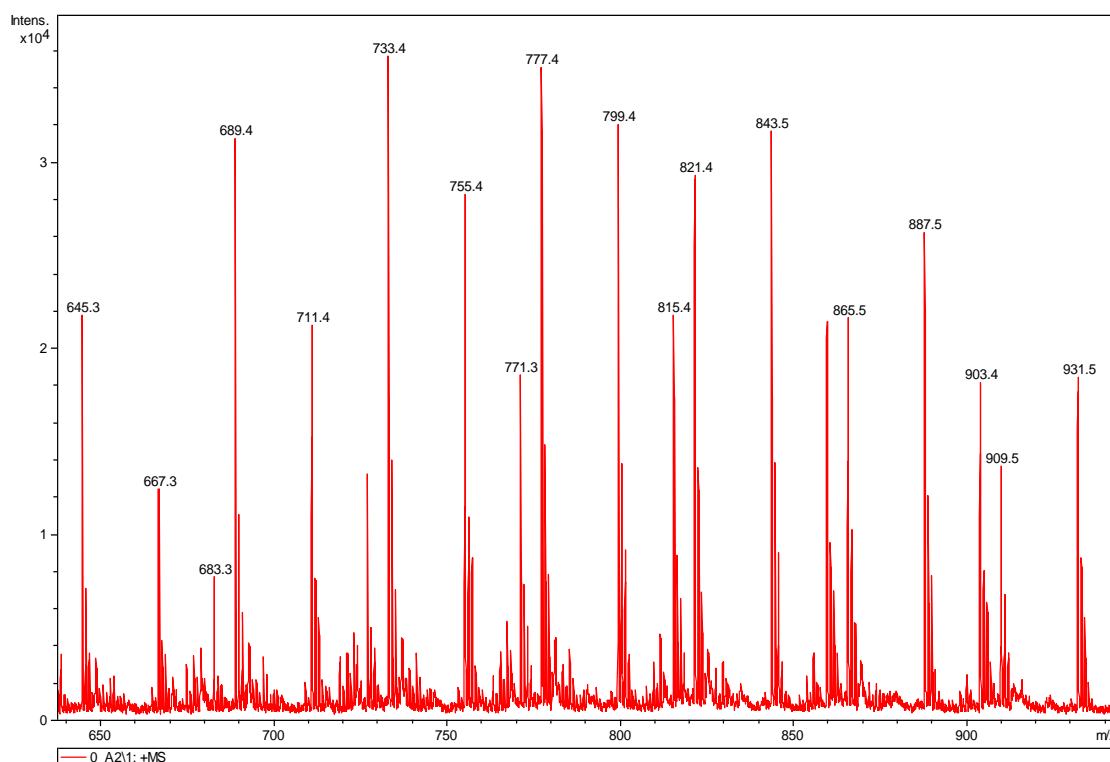


[Comments]
 Sample name
 Comment
 User
 Division
 Company Universidad de Zaragoza

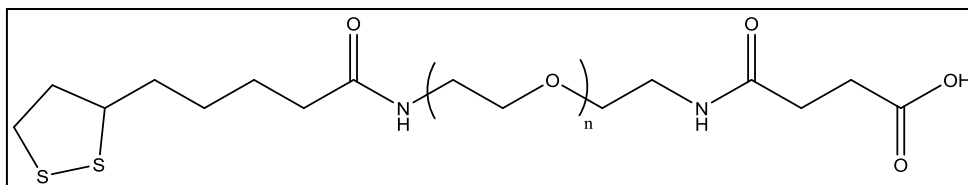
[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	2865.7	85.0272	2	1661.86	91.1153	3	1543.74	93.8812
4	1457.92	92.1938	5	1348.48	89.401	6	1281.47	90.5965
7	1247.72	89.1086	8	1098.74	47.6229	9	1040.41	82.0998
10	996.053	90.8042	11	947.359	84.0023	12	844.186	87.182
13	750.656	80.3874	14	718.836	88.811	15	697.623	90.4181
16	661.464	94.5925	17	638.323	94.1337	18	622.895	95.7336
19	605.539	94.6286						

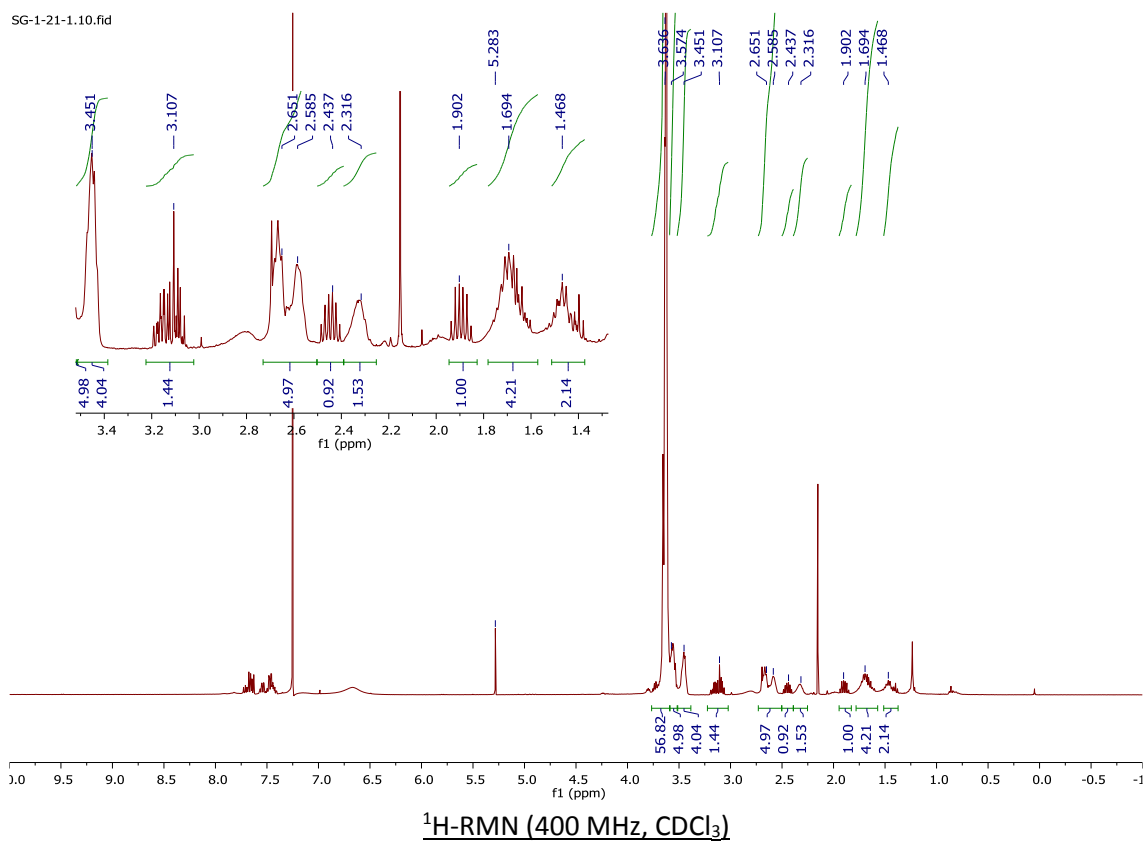
Espectro Infrarrojo (IR)

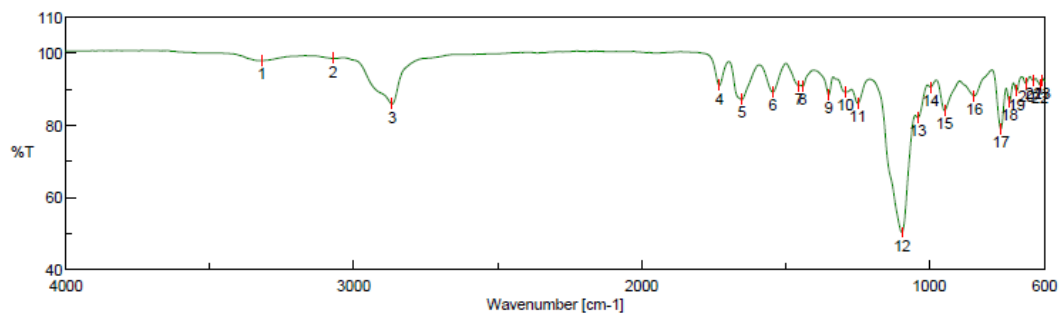


Ampliación de Espectro Masas (MS)



Polímero 2





[Comments]

Sample name

Comment

User

Division

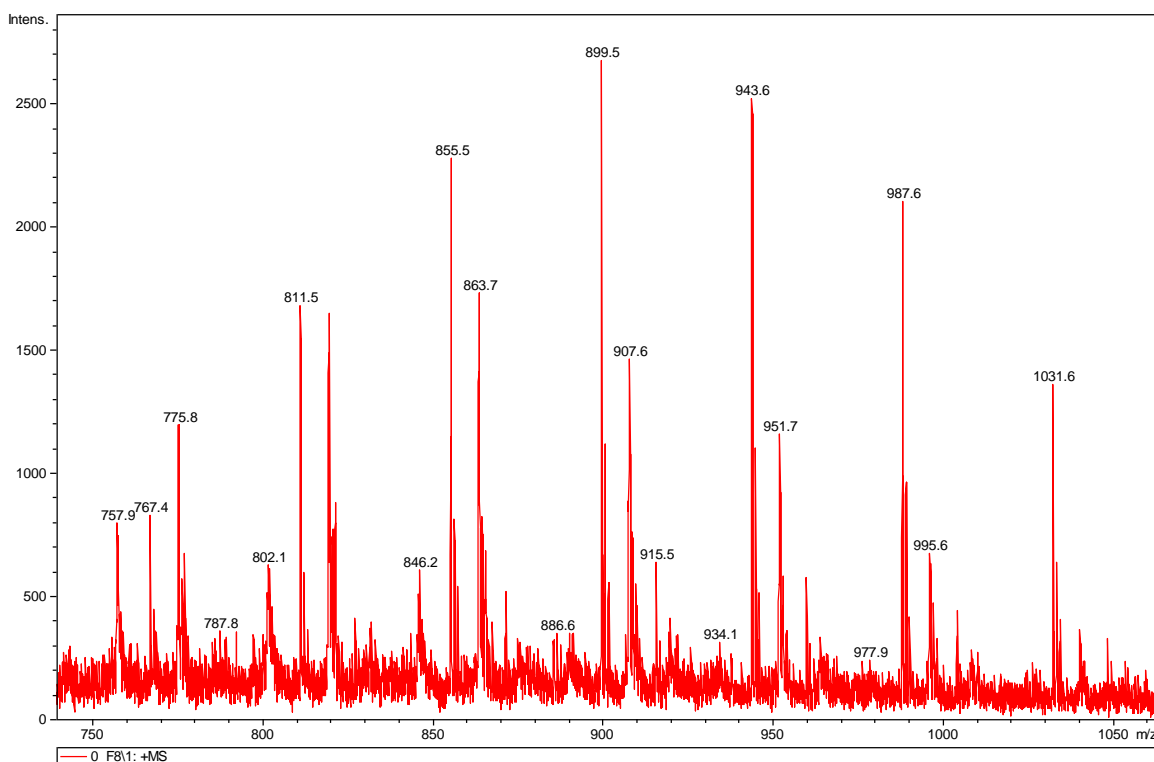
Company

Universidad de Zaragoza

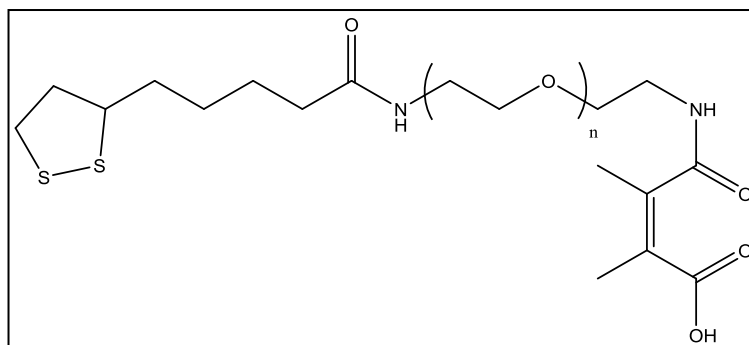
[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	3319.37	97.8724	2	3073.01	96.4899	3	2866.67	85.8442
4	1729.35	90.9923	5	1652.21	87.1061	6	1543.74	89.144
7	1454.06	90.9525	8	1440.08	90.7565	9	1349.44	88.3268
10	1291.59	89.1901	11	1248.68	86.0523	12	1095.37	50.3213
13	1039.93	82.0902	14	995.571	90.5748	15	947.359	84.0544
16	844.669	88.1027	17	751.138	78.9613	18	721.729	86.5933
19	696.659	89.4291	20	663.393	91.5145	21	638.323	92.3586
22	616.145	91.1767	23	607.949	92.3876			

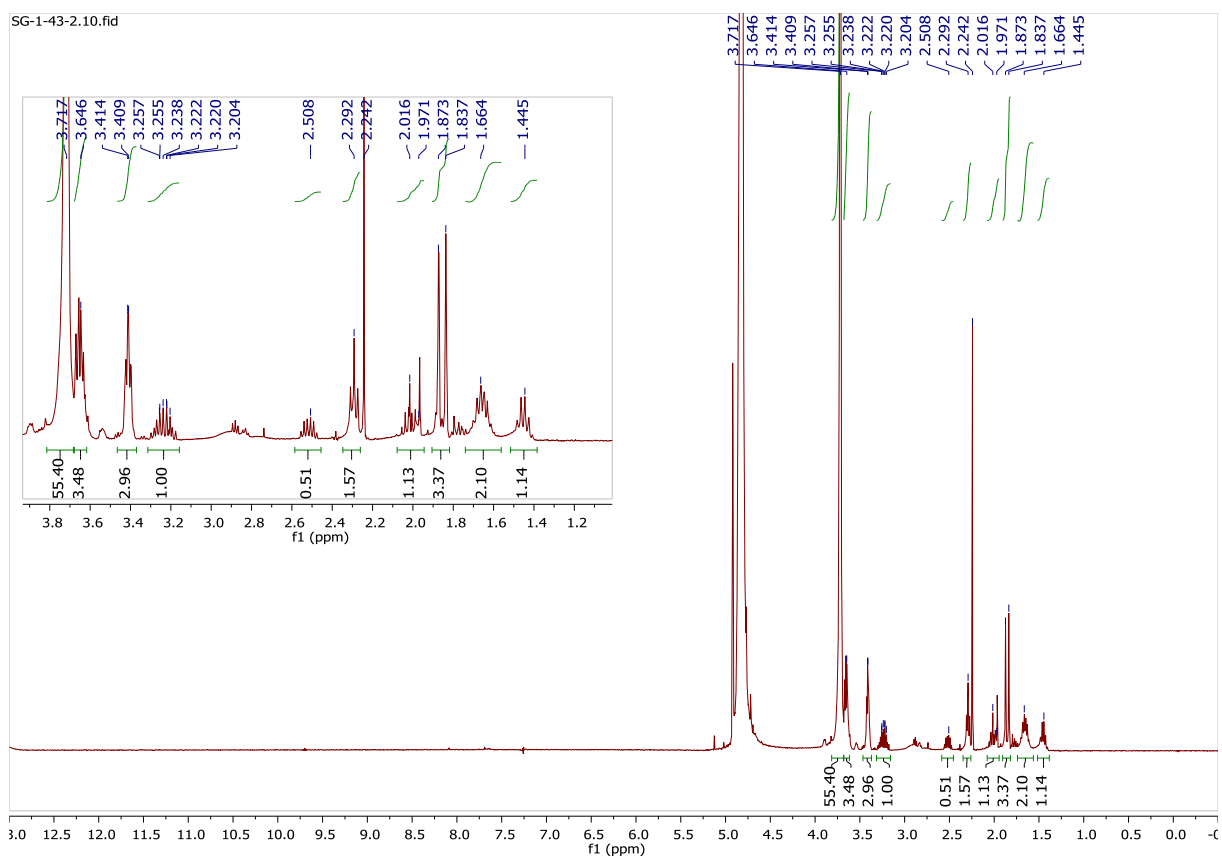
Espectro Infrarrojo (IR)

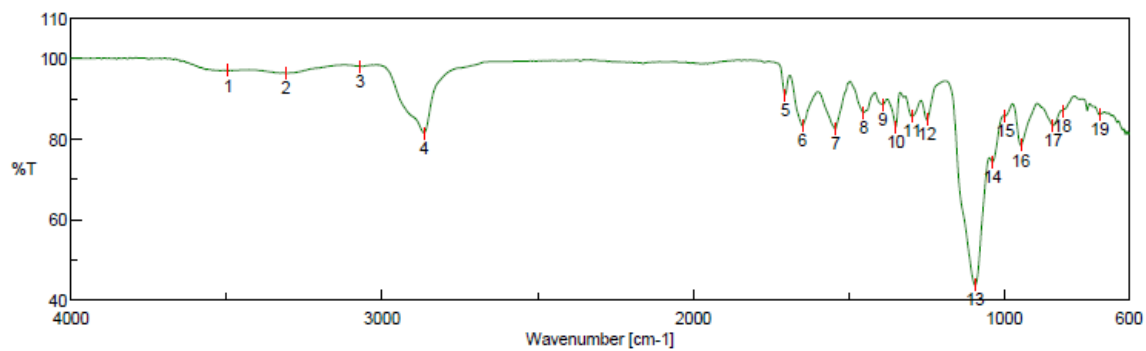


Ampliación de Espectro Masas (MS)



Compuesto 3





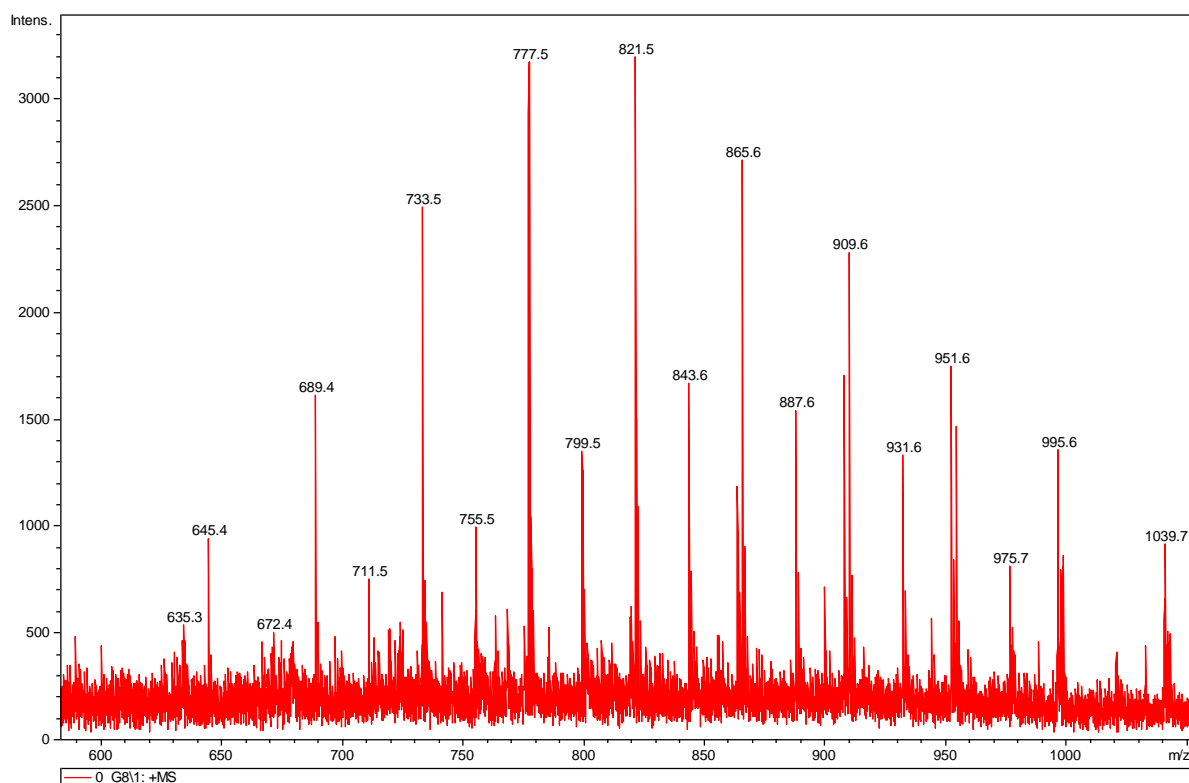
[Comments]
 Sample name
 Comment
 User
 Division
 Company

Universidad de Zaragoza

[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	3494.38	96.8912	2	3309.25	96.305	3	3070.12	98.0136
4	2865.7	81.4928	5	1704.76	90.9692	6	1648.84	83.2908
7	1542.77	82.4281	8	1452.14	86.5977	9	1390.42	88.5474
10	1348.96	83.0621	11	1296.89	85.6144	12	1248.68	84.7497
13	1094.4	43.6943	14	1038.48	74.3159	15	997.017	85.6631
16	946.877	78.3867	17	843.704	83.3308	18	813.813	86.8724
19	694.248	86.0029						

Espectro Infrarrojo (IR)



Ampliación de espectro de masas (MS)

