



**Universidad**  
Zaragoza

# Trabajo Fin de Grado

**Nanopartículas magnéticas alargadas  
(*nanoworms*) para transporte y liberación  
controlada de fármacos a través de la  
barrera hematoencefálica**

Autor

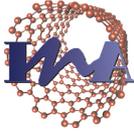
**Francisco Javier Idiago López**

Director

**Raluca Maria Fratila**

**Facultad de Ciencias  
2015**





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

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

INFORMA:

Que FRANCISCO JAVIER IDIAGO LÓPEZ ha realizado en el Instituto de Nanociencia de Aragón bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado descrito en la presente memoria, que lleva por título *“Nanopartículas magnéticas alargadas (nanoworms) para transporte y liberación controlada de fármacos a través de la barrera hematoencefálica”* y que el trabajo realizado cumple los objetivos recogidos en las Directrices TFG en Biotecnología.

Zaragoza, 2015-06-18

Firmado:

Director

Raluca Maria Fratila

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 Introducción a la nanotecnología y los nanomateriales .....	2
1.2 Aplicaciones en biomedicina .....	3
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
2.1 Barrera hematoencefálica .....	4
2.2 Nanoworms o nanocadenas.....	5
<b>3. PLANTEAMIENTO</b> .....	<b>7</b>
3.1 Métodos de síntesis .....	7
3.1.1 Coprecipitación .....	7
3.1.2 Descomposición térmica.....	8
3.2 Transferencia a agua.....	8
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>11</b>
5.1 Síntesis .....	11
5.1.1 Descomposición térmica.....	11
5.1.1.1 Montaje experimental .....	11
5.1.1.2 Proceso de síntesis .....	11
5.1.1.3 Lavado de nanopartículas.....	12
5.1.1.4 Transferencia a agua.....	13
5.1.1.5 Purificación del exceso de polímero y electroforesis .....	13
5.1.2 Coprecipitación .....	13
5.1.2.1 Montaje experimental .....	13
5.1.2.2 Proceso de síntesis .....	13
5.2 Técnicas de caracterización.....	14
5.2.1 Caracterización química.....	14
5.2.1.1 Determinación de la concentración de hierro .....	14
5.2.1.2 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	15
5.2.2 Caracterización estructural .....	15
5.2.2.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS).....	15
5.2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	16
5.2.2.3 Criomicroscopía electrónica de transmisión (cryoTEM).....	16
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>17</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>23</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>24</b>
<b>9. ANEXO</b> .....	<b>26</b>

## RESUMEN

La nanotecnología es hoy en día una de las áreas de investigación con mayor proyección y numerosas disciplinas científicas se benefician de ella. Entre estas disciplinas una de las más prometedoras es la medicina, dónde la aplicación de la nanotecnología abre nuevos horizontes en el campo de la terapia y el diagnóstico. En este sentido, en el presente trabajo se plantea como objetivo la síntesis de *nanoworms* o nanocadenas. Esta modalidad de nanomaterial debido a su morfología alargada presenta propiedades anisotrópicas que lo hacen atractivo para una amplia gama de aplicaciones biomédicas, dónde cabe resaltar la liberación controlada de fármacos. Para ello, se ha llevado a cabo la evaluación de dos métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas: *descomposición térmica* y *coprecipitación*, utilizando distintas condiciones de reacción. Mediante su posterior caracterización, se puede observar como el método de descomposición térmica bajo determinadas condiciones de reacción permite obtener agregados lineales de hasta 5 nanopartículas, sin embargo, mediante el método de coprecipitación se obtienen agregados con heterogeneidad de tamaños y carentes de una buena tendencia lineal. Todo esto lleva a pensar que una optimización del protocolo de síntesis por descomposición térmica permitirá obtener *nanoworms* a gran escala con un buen control de la forma y sus propiedades magnéticas.

## ABSTRACT

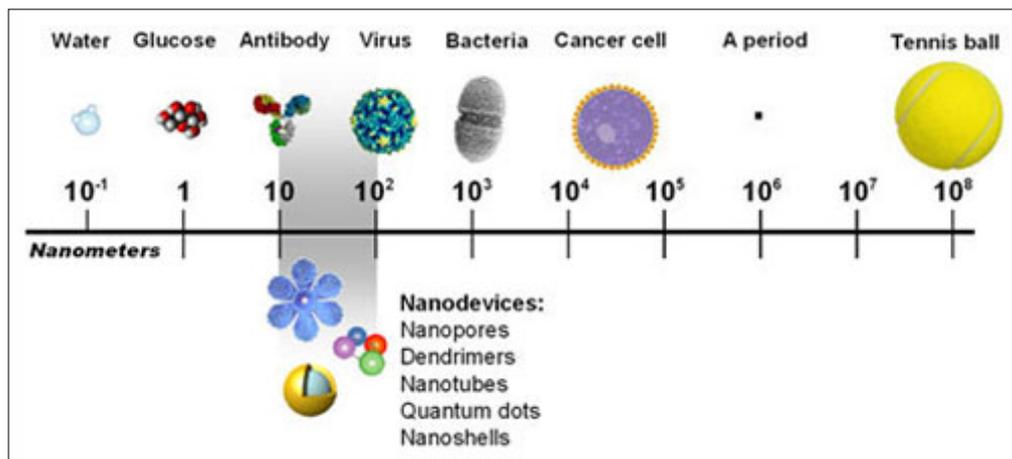
Nanotechnology is nowadays one of the most active research fields and there are many scientific disciplines that could benefit from advances in this field. Among all these disciplines medicine is one of the most promising, where the application of nanotechnology could open new ways of therapy and diagnosis. Accordingly, the objective of this project is to synthesize chain- or worm-like (elongated) nanomaterials. Due to its shape anisotropy, this type of nanomaterial possesses anisotropic properties that make them attractive for biological applications, in particular for targeted drug delivery. For this purpose two methods of synthesis of magnetic nanoparticles have been evaluated: *thermal decomposition* and *coprecipitation*, using different reaction conditions. With a subsequent characterization, it was observed that the thermal decomposition method under specific conditions of reaction could generate assemblies of about 5 nanoparticles, however, when using the coprecipitation method, large aggregates without a clear linear tendency and with a wide range of sizes were obtained. These results indicate that the optimization of the thermal decomposition method would allow for large-scale synthesis of nanoworms with good control over their shape and magnetic properties.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Introducción a la nanotecnología y los nanomateriales

Los orígenes de la nanotecnología se remontan a la conferencia histórica que, en 1959, pronunció Richard Feynman en el Instituto de Tecnología de California: “There’s Plenty of Room at the Bottom”, traducido como “en el fondo hay espacio de sobra”. En su ponencia esboza la idea de crear objetos a partir de átomos individuales. Sin citar el término “nano”, Feynman hablaba de la manipulación y control de objetos a muy pequeña escala.

La definición convencional de nanotecnología se recoge en la página web de la NNI (Iniciativa Nacional en Nanotecnología de los Estados Unidos) que la describe como “la ciencia, ingeniería y tecnología llevadas a cabo en la nano escala, que a su vez se define entre 1 y 100 nm”. En realidad, esta puede considerarse una definición poco exigente, porque lo que de verdad interesa en nanotecnología es que, por operar en esas dimensiones, aparezcan fenómenos nuevos, capaces de sustentar nuevas propiedades. En este sentido, muchos autores amplían la definición como la explotación de la capacidad para controlar la materia a dimensiones entre 1 y 100 nm, de forma que dé origen a funcionalidades únicas.



**Figura. 1.** Escala nanométrica. Adaptado de NCI (National Cancer Institute, [nano.cancer.gov](http://nano.cancer.gov))

Hoy en día, la nanotecnología es una de las áreas de investigación más prometedoras del siglo XXI, y se afirma que va a revolucionar diversas áreas del conocimiento entre las que se encuentra la medicina, hasta el punto de originar una nueva disciplina: la Nanomedicina.

Actualmente existe una gran variedad de nanomateriales, que incluyen nanotubos de carbono, nanopartículas orgánicas (liposomas, dendrímeros, materiales poliméricos) y nanopartículas inorgánicas (óxido de hierro, oro, plata, sílica), así como mezcla de ellos. Todos estos nanomateriales poseen propiedades fisicoquímicas únicas, que difieren considerablemente del material a escala macroscópica, ya que la relación de los átomos es distinta **(1)**. Estas nuevas propiedades químicas, ópticas, electrónicas o

magnéticas se han aplicado en distintos campos, desde la optoelectrónica y dispositivos magnéticos hasta catálisis y biomedicina. Teniendo en cuenta que la mayoría de las moléculas y estructuras biológicas relevantes poseen dimensiones que entran dentro de la escala nanométrica (p. ej. la hemoglobina, la proteína portadora de oxígeno a través de la sangre, tiene 5,5 nanómetros de diámetro y una hebra de DNA tiene un diámetro de solo 2 nm y una longitud de 10-100 nm) **(2)**, no es de extrañar que la interconexión de los nanomateriales con la biología y la medicina traiga consigo una de las aplicaciones más prometedoras de la nanotecnología en las últimas dos décadas.

## 1.2 Aplicaciones en biomedicina

Fruto de la gran variedad de propiedades y posibilidades que ofrecen los nanomateriales, son muchas las aplicaciones que se pueden encontrar en el campo de la medicina.

Algunas de sus principales aplicaciones son el uso como agentes de contraste en resonancia magnética de imagen (RMI)**(3)**, tratamientos tumorales por hipertermia magnética **(4)**, como biosensores **(5)** y para la liberación de fármacos en el sitio deseado de manera controlada **(6)**.

Por lo que respecta a este trabajo, destacar sobretodo la última de las aplicaciones citadas. Desde la aprobación en 1995 de un liposoma con doxorubicina (Doxil®), muchos otros nanomateriales como dendrímeros, micelas o nanopartículas inorgánicas entre otras, están ya en ensayos clínicos o comercializadas para diversas patologías, especialmente cáncer **(7)**. El uso de nanopartículas para el transporte o la vectorización de fármacos conlleva varias ventajas: i) el aumento de la biodisponibilidad del fármaco por aumento de su solubilidad acuosa y protección del medio, ii) potenciación de la interacción con membranas celulares y células por su tamaño similar, iii) alta área superficial para conjugar grandes dosis de fármacos, iv) multifuncionalización, es decir, posibilidad de modificar la superficie del sistema para incluir moléculas con distintas funciones como el aumento de tiempo de residencia en el torrente sanguíneo, ligandos específicos dirigidos hacia determinadas células, etc.

La nanotecnología ha irrumpido con fuerza en este terreno para intentar solucionar otra de las mayores limitaciones de los fármacos existentes a día de hoy, es decir, su falta de selectividad para llegar únicamente al área patológica **(8)**. Hay que tener en cuenta que para llegar al sitio de acción, el fármaco tiene que cruzar muchas barreras biológicas, donde puede ser inactivado o puede dar lugar a efectos indeseados en otros órganos o tejidos que no estén implicados en el proceso patológico. Todos estos hechos hacen necesario el uso de mayores dosis del fármaco para llegar a alcanzar la dosis local óptima con la consecuente aparición de efectos secundarios no deseados **(9)**. En este sentido, la vectorización de fármacos con nanomateriales podría aumentar la concentración del mismo en el área de interés, maximizando la respuesta terapéutica y por tanto disminuyendo la frecuencia de administración, los efectos adversos y el coste de la terapia **(10)**.

A pesar de los grandes logros que se han conseguido en el campo de la nanomedicina, son muchos los retos que todavía hay que superar para que se convierta en algo disponible para todos y en un avance para la sociedad **(11)**.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Barrera hematoencefálica

En las últimas décadas ha habido un importante avance en el desarrollo de fármacos con un gran potencial para el tratamiento de patologías asociadas al sistema nervioso central (SNC). Desafortunadamente, un gran número de moléculas activas farmacológicamente no ejercen efecto *in vivo* debido a la presencia de la barrera hematoencefálica (BH) que impide su transporte al foco de acción.

La barrera hematoencefálica, formada por una capa de células endoteliales que constituyen los capilares cerebrales, permite mantener la homeostasis cerebral ya que restringe el acceso al cerebro de agentes tóxicos o infecciosos en circulación, filtra sustancias dañinas del cerebro a la sangre y facilita el acceso de nutrientes esenciales para el metabolismo (12). Sin embargo, la barrera hematoencefálica es también un formidable obstáculo para la liberación de alrededor del 98% de todos los agentes terapéuticos y diagnóstico del SNC (13).

Debido a su estructura anatómica así como la presencia de barreras metabólicas (proteínas de eflujo, degradación enzimática, etc.) (14)(15), solo unas pocas moléculas pueden atravesar la barrera hematoencefálica en concentraciones farmacológicamente relevantes.

Las moléculas pequeñas (<400 Da), apolares y lipofílicas atraviesan la barrera por *difusión pasiva*; el transporte de fármacos hidrofílicos y polares, así como compuestos de alto peso molecular es mediado por *mecanismos de transporte activo*: proteínas transportadoras, endocitosis mediada por receptor y endocitosis adsorptiva (Fig.2) (16).

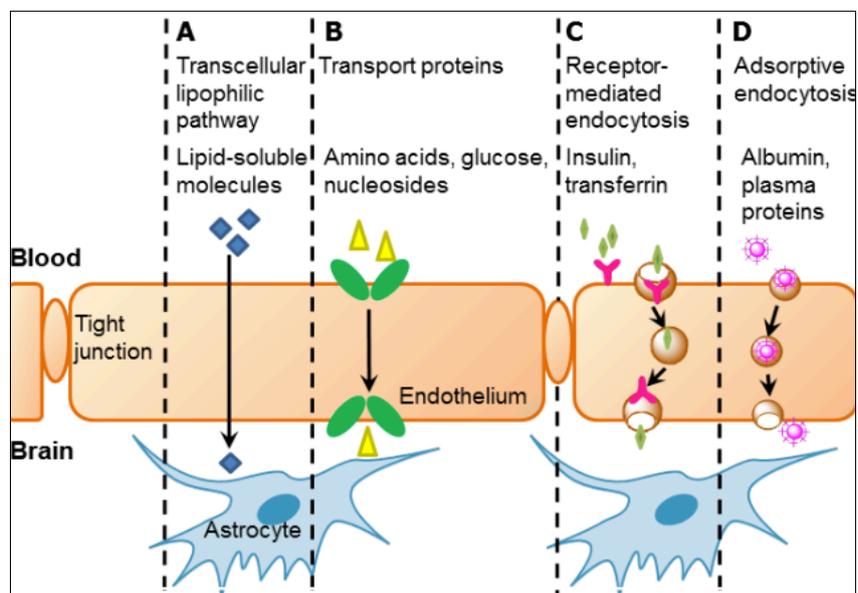


Figura. 2. Mecanismos de transporte a través de la BH (adaptado de la ref.16)

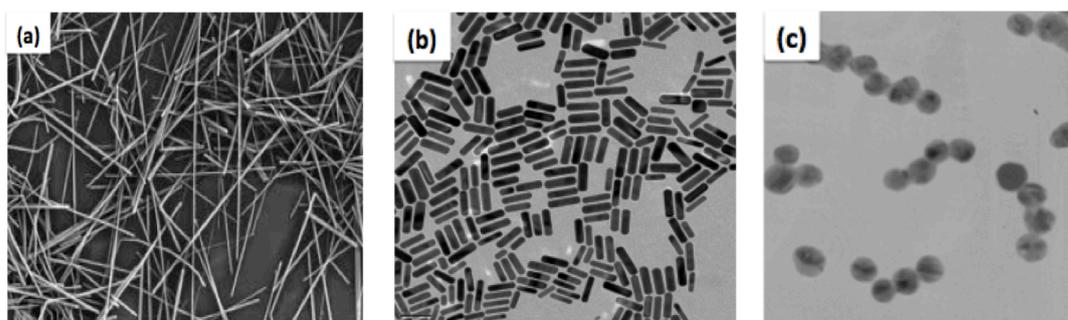
Los métodos tradicionales para superar la BH incluyen la alteración de la BH mediante métodos químicos, bioquímicos u ósmóticos (17) y la administración de altas dosis de fármaco directamente en el cerebro vía catéteres e implantes (14). Estos

métodos implican alto riesgo de infección y toxicidad, son altamente invasivos, pueden dar lugar a efectos secundarios irreversibles o permiten una distribución muy limitada de fármaco en el cerebro. Otra opción es aumentar el carácter lipofílico del fármaco; sin embargo, esto puede favorecer la absorción por otros órganos, disminuyendo la concentración en sangre **(18)(19)**. La utilización de proteínas transportadoras que se expresan en la BH y que permiten el flujo de ciertos sustratos ha surgido como una solución atractiva, y se han obtenido resultados satisfactorios en la liberación de varios agentes terapéuticos en el cerebro **(14)(16)(20)**; sin embargo, estos fármacos deben ser específicos para cada proteína, lo que limita su diversidad estructural y características moleculares.

Los avances en el campo de la nanotecnología abren nuevas posibilidades para el diseño de nanomateriales que puedan superar la BH vía endocitosis mediada por receptor **(Fig. 2C)**, y su apropiada funcionalización permitiría combinar el direccionamiento específico, la liberación controlada y funciones de contraste de imagen en una sola nanoplataforma.

## 2.2 Nanoworms o nanocadenas

Históricamente, la investigación en nanomateriales para aplicaciones biomédicas se ha centrado en nanomateriales esféricos (nanopartículas de oro, quantum dots y nanopartículas magnéticas). Recientemente, se ha comenzado a poner atención en nanomateriales de geometría alargada como son los nanohilos, los nanorods o los *nanoworms* o nanocadenas **(Fig.3)**. Esta morfología puede inducir anisotropía magnética, óptica, eléctrica y química en el nanomaterial **(21)**.



**Figura. 3.** *Nanomateriales de geometría alargada:(a) Nanohilos, (b) Nanorods, (c) Nanoworms.*

Como consecuencia de sus propiedades anisotrópicas, estos nuevos nanomateriales pueden establecer interacciones biológicas de una forma completamente diferente a como lo hacen sus homólogos esféricos. Se ha demostrado que los nanomateriales alargados tienen un tiempo de vida medio en sangre mayor que las nanopartículas esféricas, esto tiene una consecuencia importante en las aplicaciones biomédicas ya que un mayor tiempo de circulación en el torrente sanguíneo es un factor clave para la vectorización a tejidos diana, la liberación controlada de fármacos y el contraste de imagen *in vivo*, usando nanomateriales **(22)(23)**. Además, la forma anisotrópica ofrece nuevas posibilidades para la funcionalización dirigida a aplicaciones

biomédicas ya que presentan una mayor área de superficie que posibilita un mayor número de interacciones ligando - receptor diana, facilitando la internalización celular **(24)**. Por último, los nanomateriales magnéticos alargados presentan una relajatividad magnética superior a las formas esféricas, lo que les hace buenos candidatos para mejorar la sensibilidad de la Resonancia Magnética de Imagen (RMI) **(24)(25)**.

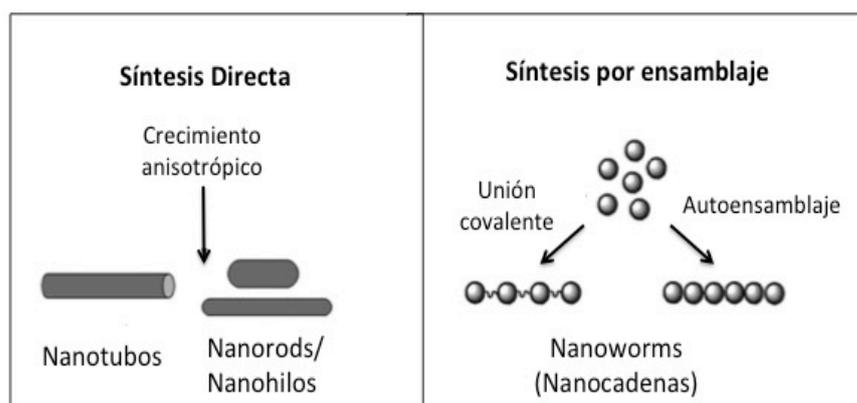
### 3. PLANTEAMIENTO

Teniendo en cuenta los antecedentes, en este trabajo se plantea la síntesis de nanopartículas de geometría alargada para posibles aplicaciones en biomedicina, en particular para la liberación controlada de fármacos a través de la barrera hematoencefálica. Además, dado que los nanomateriales magnéticos presentan una serie de propiedades únicas que los hacen muy útiles de cara a las aplicaciones en medicina, como son el hecho de poder ser manipulados por un campo magnético externo, se plantea trabajar con nanopartículas de óxido de hierro.

#### 3.1 Métodos de síntesis

Los métodos de síntesis de nanomateriales alargados se pueden clasificar en dos grupos: *síntesis directa* y *síntesis por ensamblaje*.

Los métodos de síntesis directa son aquellos en los que la morfología del nanomaterial resultante se consigue mediante la modificación de las condiciones o mediante el uso de materiales porosos que actúan a modo de plantilla. Por su parte, los métodos de síntesis por ensamblaje se basan en el diseño del nanomaterial a partir de piezas más pequeñas, ya sea directamente durante la síntesis o introduciendo modificaciones post-sintéticas (21).



**Figura. 4.**  
*Métodos de síntesis de nanomateriales alargados (ref. 21)*

Son numerosos los trabajos que han descrito métodos para la síntesis controlada en forma, estable, biocompatible y monodispersa de nanopartículas esféricas de óxido de hierro. Entre los métodos más comunes se incluyen la descomposición térmica, coprecipitación, síntesis hidrotermal, microemulsión y síntesis sonoquímica (26). A partir de estas nanopartículas, en el presente trabajo se plantea el ensamblaje de *nanoworms* y para ello se analizará la viabilidad de los métodos de coprecipitación y descomposición térmica.

##### 3.1.1 Coprecipitación

Este método consiste en mezclar una sal de Fe (II) con una sal de Fe (III) en una disolución fuertemente básica a temperatura ambiente. En estas condiciones los iones  $Fe^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ , presentes en una relación molar 1: 2, precipitan formando el núcleo de óxido

de hierro (magnetita, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) de la nanopartícula. La reacción que se establece es la siguiente:



Dado que la magnetita es sensible a la oxidación, la reacción se lleva a cabo en atmósfera inerte para evitar la formación de maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), que tiene propiedades magnéticas inferiores a la magnetita.

El tamaño y la forma de las nanopartículas de óxido de hierro dependen de diversos factores como pueden ser: el tipo de sal utilizada (cloruros, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), la relación molar de iones férricos y ferrosos, la temperatura de reacción, el valor de pH, la fuerza iónica del medio y otros parámetros de la reacción (p.ej. la velocidad de agitación, la velocidad de adición de la disolución básica).

La principal ventaja de este método es la sencillez experimental y el hecho de que las nanopartículas puedan producirse a gran escala y con carácter hidrofílico; sin embargo, la calidad y homogeneidad de tamaño de las nanopartículas no es la más óptima. En este sentido, la adición en el medio de reacción de surfactantes como por ejemplo el dextrano, permiten controlar y estabilizar el tamaño de nanopartícula.

### 3.1.2 Descomposición térmica

Se trata de un método de síntesis de nanopartículas magnéticas basado en la descomposición térmica de precursores orgánicos de hierro a altas temperaturas. Algunos de estos precursores son por ejemplo, el acetilacetonato de hierro [Fe(acac)<sub>3</sub>], el oleato de hierro [Fe(oleato)<sub>3</sub>], pentacarbonilo de hierro [Fe(CO)<sub>5</sub>], etc., que se descomponen térmicamente disueltos en una mezcla de surfactantes (p.ej. ácido oleico y oleilamina) y un disolvente apolar (p.ej. bencil éter).

Esta síntesis permite la obtención de nanopartículas monodispersas y muy cristalinas. Además, se trata de una técnica con gran versatilidad ya que la elección del disolvente de la reacción, el precursor de hierro, la relación Fe:surfactante, la concentración inicial de los reactivos y la temperatura de reacción son parámetros clave para controlar el tamaño final, la distribución y la forma de las nanopartículas.

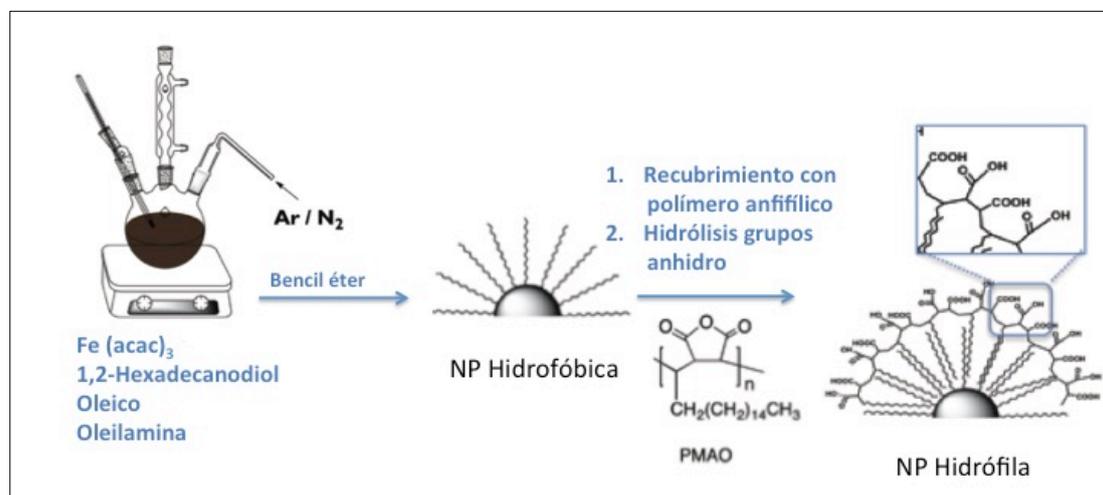
Como desventaja tiene que el rendimiento de síntesis es bajo, con una pequeña cantidad de nanopartículas sintetizadas. Además, la interacción con los surfactantes otorga un carácter apolar a las nanopartículas, por lo que se requiere de un paso adicional para transferir las nanopartículas a agua.

## 3.2 Transferencia a agua

Uno de los pilares fundamentales de cara a la utilización de nanomateriales en aplicaciones biomédicas es asegurar la biocompatibilidad y estabilidad del nanomaterial en medios fisiológicos. Para alcanzar estos requerimientos es necesario llevar a cabo una modificación química de su superficie, lo cual permite a su vez diseñar la función biológica del mismo.

Las nanopartículas sintetizadas por el método de descomposición térmica presentan un carácter apolar (no biocompatible) ya que han incorporado surfactantes

(p.ej. oleico y oleilamina) con la parte polar unida a la nanopartícula y la parte apolar orientada hacia el exterior. Es por esto, que hay que llevar a cabo lo que se conoce como un “paso a agua” o transferencia a medio polar (biocompatible), esquematizado en la siguiente figura.



**Figura. 5.** Esquema de la síntesis por descomposición térmica y posterior transferencia a agua utilizando polímeros anfílicos. (NP: nanopartícula).

Para conseguir esta biocompatibilización se pueden emplear diversos polímeros, uno de los más utilizados es el PMAO [poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)]. Este polímero se caracteriza por presentar una parte hidrofóbica basada en cadenas de 18 átomos de carbono que interactúan hidrofóticamente con las cadenas de ácido oleico que cubren la nanopartícula. La parte hidrofílica de este polímero, el anhídrido maleico, queda expuesta hacia la parte exterior de la nanopartícula confiriéndole estabilidad.

La hidrólisis de los grupos anhídrido es otro paso clave para la solubilización de las nanopartículas en agua. De este modo se consigue que cada uno de los grupos anhídrido genere dos grupos carboxilo, aumentando la polaridad de la nanopartícula. Así mismo, estos grupos carboxilo resultan fundamentales para conjugación de diversas moléculas biológicas, ya sean estructuras peptídicas (p. ej. anticuerpos, enzimas), ácidos nucleicos, carbohidratos, etc., con el objetivo de dotar al nanomaterial de las propiedades requeridas o mejorar las ya existentes.

## 4. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado consiste en la síntesis y caracterización de nanopartículas magnéticas alargadas o *nanoworms* como posible nueva generación de nanomateriales para aplicaciones biomédicas.

Para ello, se evaluarán dos métodos de síntesis de nanopartículas magnéticas:

- *Síntesis por coprecipitación de sales de hierro*
- *Síntesis por descomposición térmica de precursores*

A partir de los resultados obtenidos, se realizará un análisis comparativo basado en el estudio del tamaño, forma y estabilidad, con vistas a la optimización de un protocolo de síntesis para futuros ensayos *in vitro*.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

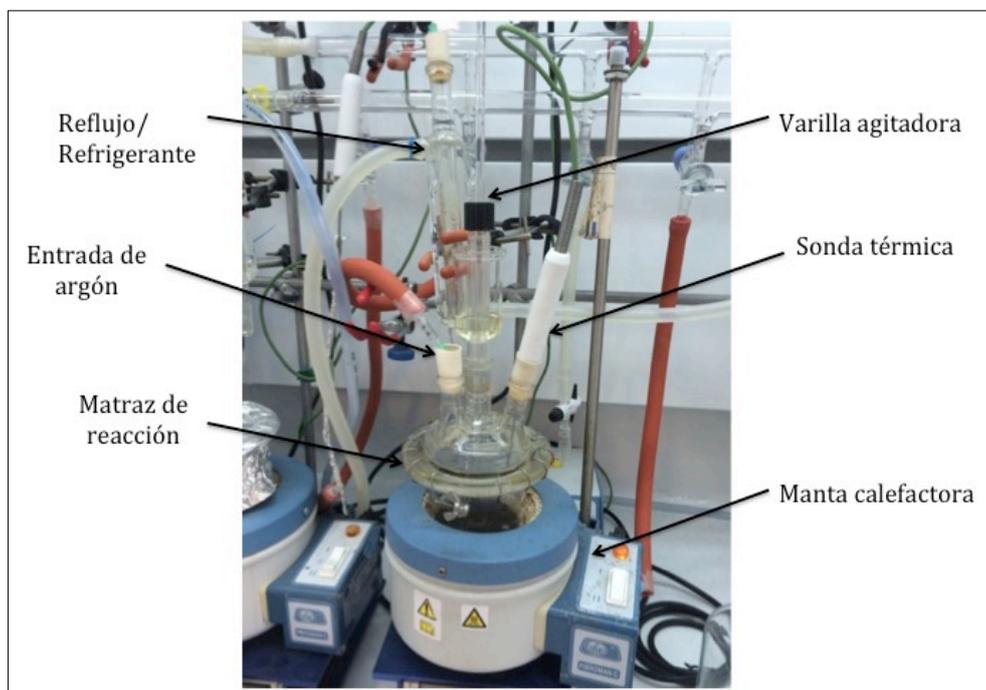
### 5.1 Síntesis

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

#### 5.1.1 Descomposición térmica

##### 5.1.1.1 Montaje experimental

El montaje experimental (**Fig. 6**) empleado a escala de laboratorio consta de una manta calefactora, un matraz de tres bocas de 250 mL, un agitador mecánico, una sonda térmica y un refrigerante. La síntesis se lleva a cabo en atmósfera inerte de argón.



**Figura.6.** Montaje experimental de la síntesis de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  mediante el método de descomposición térmica.

##### 5.1.1.2 Proceso de síntesis

Se llevan a cabo tres modalidades de síntesis, utilizando como precursor el acetilacetonato de hierro ( $Fe(acac)_3$ ):

- 1) Relación molar 1:8 de ácido oleico: oleilamina y temperatura 280 °C.
- 2) Relación molar 1:8 de ácido oleico: oleilamina y temperatura 305 °C.
- 3) Relación molar 1,33:1 de ácido oleico: oleilamina y adición de óxido de trioctilfosfina (TOPO) a 200 °C.

En el caso de las dos primeras modalidades, los reactivos se mezclan en el matraz siguiendo las cantidades recogidas en la **tabla 1**. El matraz se coloca sobre la manta calefactora, se coloca el agitador mecánico y cada una de las bocas del matraz se conectan con la entrada de argón, el refrigerante y la sonda térmica. A continuación, se llevan a cabo tres ciclos de vacío y argón de cinco minutos para generar una atmósfera inerte de reacción. Bajo agitación continua, se calienta la muestra hasta alcanzar 200 °C. Tras mantener esa temperatura durante 2h 30 min, en la **modalidad 1** se eleva hasta el punto de ebullición del disolvente 280 °C, y en la **modalidad 2** hasta 305 °C y se mantiene a reflujo durante 1 h. Finalizado ese tiempo, se deja enfriar la muestra hasta alcanzar temperatura ambiente.

Reactivo	Eq	mmol	PM (g/mol)	g	$\rho$ (g/mL)	mL
Fe(acac) <sub>3</sub> (99%)	1	1	353,18	0,353	-	-
1,2-hexadecanodiol (90%)	4,5	4,5	258,44	1,29	-	-
Ácido oleico (90%)	0,3	0,3	282,46	0,094	0,887	0,11
Oleilamina (70%)	2,4	2,4	267,49	0,917	0,813	0,89
Bencil éter	-	-	-	-	-	40

**Tabla 1.** Proporciones de los reactivos empleados en las modalidades de síntesis con relación molar 1: 8 de ácido oleico y oleilamina.

Respecto al procedimiento de síntesis de la **modalidad 3**, varían las cantidades de reactivos empleados (**Tabla 2**) y se lleva a cabo la adición de una disolución de TOPO en 5 mL de bencil éter al inicio de la fase isoterma de 200 °C. Esta adición supone un cambio instantáneo del color de la síntesis, pasando de un tono anaranjado a un gris oscuro. Además, se modifican ligeramente los tiempo de isoterma, siendo de 2 h a 200 °C y otras 2 h a 305 °C con reflujo.

Reactivo	Eq	mmol	PM (g/mol)	g	$\rho$ (g/mL)	mL
Fe(acac) <sub>3</sub> (99%)	1	2,01	353,18	0,71	-	-
1,2-hexadecanodiol (100%)	4,5	9,98	258,44	2,58	-	-
Ácido oleico (90%)	2,8	5,65	282,46	1,773	0,887	2
Oleilamina (70%)	2,1	4,22	267,49	1,613	0,813	2
TOPO	0,7	1,41	386,63	0,544	-	-
Bencil éter	-	-	-	-	-	40

**Tabla 2.** Proporciones de los reactivos empleados en las modalidades de síntesis con relación molar 1,33: 1 de ácido oleico: oleilamina y TOPO.

### 5.1.1.3 Lavado de nanopartículas

Con el objetivo de eliminar los excesos de reactivo de la síntesis, se añaden 50 mL de etanol 96% produciendo una desestabilización del sistema y a continuación, mediante un imán se separa el sobrenadante de las nanopartículas. El sobrenadante, compuesto por el disolvente y los surfactantes no unidos se elimina por decantación. Las nanopartículas separadas se resuspenden de nuevo con 50 mL de hexano y se vuelven a

tratar con etanol, efectuando el mismo procedimiento anterior hasta que el sobrenadante queda claro. Finalmente, las nanopartículas se resuspenden en una disolución de hexano, ácido oleico y oleilamina (90:5:5) y se almacenan a 4 °C para su posterior caracterización o transferencia a agua.

#### 5.1.1.4 Transferencia a agua

Las nanopartículas se precipitan con etanol, 3 veces, para eliminar el exceso de oleico y oleilamina en el que se habían almacenado. A continuación, sobre un matraz de 500 mL y bajo agitación magnética, se añaden 198 mL de  $\text{CHCl}_3$  y 155 mg de PMAO [poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno)]. Sobre esta mezcla se adicionan gota a gota mediante una pipeta Pasteur, una disolución de 6,6 mg de nanopartículas en 2 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Esta mezcla se mantiene en agitación magnética a baja velocidad durante 2 h. Finalizado este tiempo, se evapora el cloroformo sin llegar a sequedad utilizando un rotavapor a 40 °C. Posteriormente, elevando la temperatura a 70 °C, se inyectan a presión 10 mL de NaOH 0,1 M y 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  para hidrolizar los grupos anhídrido del PMAO. La mezcla se mantiene en rotación a 70 °C hasta que finaliza la reacción de hidrólisis. Finalmente, se evapora el cloroformo restante aplicando vacío y la mezcla resultante se recoge previo paso por un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  de acetato de celulosa (Millipore) para eliminar posibles impurezas y agregados de mayor tamaño.

#### 5.1.1.5 Purificación del exceso de polímero y electroforesis

Para eliminar el exceso de polímero empleado en la transferencia a agua, se llevan a cabo 3 centrifugaciones a 24.000 rpm, 18 °C y durante 2 h. Tras cada uno de estas centrifugaciones, el sobrenadante se recupera mediante una pipeta Pasteur y las nanopartículas precipitadas se resuspenden en agua.

La verificación del proceso de purificación se lleva a cabo mediante una electroforesis en gel de agarosa (0,8% en TBE 0,5x). Se cargan 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los sobrenadantes recogidos y de las nanopartículas finales, junto con 1  $\mu\text{L}$  de TBE/glicerol (4:1). La electroforesis corre durante 30 min a 150 mA y 90 V.

### **5.1.2 Coprecipitación**

#### 5.1.2.1 Montaje experimental

El montaje experimental consta únicamente de un matraz redondo de 50 mL y un agitador magnético.

#### 5.1.2.2 Proceso de síntesis

La síntesis se basa en el procedimiento descrito por Nath *et al* (27). A una disolución de HCl ( 88,7 $\mu\text{L}$  de HCl 12 N en 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) se añaden 0,203 g de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y 0,488 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A continuación, esta disolución se mezcla en agitación con una disolución de hidróxido de amonio (830 $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{OH}$  en 15 mL de agua MilliQ), observando un cambio instantáneo a color negro. Tras unos pocos segundos de agitación, se adiciona una solución de dextrano (peso molecular 10 kDa), 5

g en 10 mL de agua MilliQ. La disolución resultante se mantiene en agitación durante 1 h y posteriormente se procede a realizar una centrifugación de 30 minutos a 13.000 rpm, de este modo se recolecta el sobrenadante, se somete a una par de lavados con agua destilada y posteriormente se concentra a través de un Amicon (Ultra-15 centrifugal filter - 30 KDa).

## 5.2 Técnicas de caracterización

La caracterización de las nanopartículas sintetizadas supone una parte muy importante del proceso experimental ya que nos permite valorar y analizar el efecto y resultado de los distintos parámetros con los que se ha llevado a cabo el proceso de síntesis. Son numerosos los parámetros y propiedades que se pueden utilizar para caracterizar las nanopartículas. En el presente trabajo únicamente se va a llevar a cabo una caracterización química y estructural con miras a la identificación de nanocadenas o *nanoworms*.

### 5.2.1 Caracterización química

La caracterización química ofrece una visión del rendimiento de la síntesis y de la composición superficial de las nanopartículas. Comprende la determinación de la concentración de hierro y el análisis termogravimétrico.

#### 5.2.1.1 Determinación de la concentración de hierro

La determinación de la concentración de hierro da una visión del rendimiento obtenido en el proceso de síntesis ya que aporta un valor de la cantidad de hierro y consecuentemente, de nanopartículas que se han generado y se han recogido en la muestra.

*Fundamento.* La medición de concentración de hierro se basa en la formación un complejo coloreado entre Fe (III) – Tiron (1,2-dihydroxy-3,5-sulfonato de benceno), medible espectrofotométricamente a 480 nm.

*Preparación de la muestra.* Se trabaja por triplicado con la muestra cuya concentración se quiere determinar y con una serie de muestras estándar de concentración de Fe(III) conocida, elaboradas a partir de una solución stock de Fe(III). Las concentraciones empleadas son 200, 400, 600, 800 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ . 50  $\mu\text{L}$  de todas ellas se tratan con 100  $\mu\text{L}$  de *aqua regia* ( $\text{HCl:HNO}_3$ , 3:1) durante 15 minutos a 60  $^\circ\text{C}$ , de esta forma se consigue una digestión de la capa orgánica de la nanopartícula quedando únicamente el núcleo de hierro. Tras una dilución en 350  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q para detener la digestión, se toma una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras y se depositan en una placa de 96 pocillos. Por último, se añaden 60  $\mu\text{L}$  de una disolución 1:5 de Tiron 0,25 M y KOH 4N y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (pH 9,7; 0,2M). Tras 15 minutos de incubación se mide la absorbancia a 480 nm en un espectrofotómetro (*Thermo Scientific Multiskan GO*). Con los datos de los estándares se realiza una recta de calibrado que se utilizará para interpolar el dato de absorbancia de la muestra y obtener de esta forma la concentración en hierro de ésta.

### 5.2.1.2 Análisis termogravimétrico (TGA)

Esta técnica permite determinar la cantidad de materia orgánica (ligandos o polímeros) que cubre las nanopartículas.

*Fundamento.* Se basa en la continua medición de la masa de una muestra en función de la temperatura y/o el tiempo bajo una atmósfera adecuada.

*Preparación de la muestra.* Se liofilizan entre 2 y 5 mg de la muestra y las medidas se realizan bajo atmósfera de aire aumentando la temperatura a una velocidad de 10 °C/min hasta una temperatura final de 800 °C. Para llevar a cabo estas mediciones se emplea el equipo: *Universal V4.5A de TA Instruments*. El equipo consta de una balanza analítica muy sensible para registrar las pequeñas variaciones del peso de la muestra y un horno donde se lleva a cabo el calentamiento de la muestra a una velocidad controlada.

## **5.2.2 Caracterización estructural**

La caracterización estructural permite valorar parámetros de gran relevancia como la distribución de tamaños, dispersidad, la forma de las nanopartículas, etc. Todo esto es posible debido al desarrollo de técnicas y equipos de gran valor como es el caso del microscopio electrónico de transmisión (TEM) que permite la obtención de imágenes a nivel nanométrico. Además, otras técnicas como la dispersión dinámica de la luz o DLS (*Dynamic light scattering*) son de gran relevancia tal y como se verá a continuación.

### 5.2.2.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz permite determinar la distribución de tamaños de una muestra de nanopartículas en suspensión.

*Fundamento.* Las nanopartículas en suspensión poseen un movimiento Browniano o movimiento aleatorio debido a la interacción con otras nanopartículas o con moléculas del solvente. El principio básico de esta técnica consiste en medir la variación de la dispersión de un haz de luz laser en la muestra, teniendo en cuenta que ésta varía debido al movimiento de las nanopartículas en el solvente. Esta variación en la dispersión de la luz con el tiempo es medida por el equipo de DLS y se correlaciona mediante algoritmos matemáticos con el tamaño de las partículas dado que las partículas de menor tamaño se mueven más rápido que las que forman agregados o son de mayor tamaño.

*Preparación de la muestra.* Las muestras se preparan a una concentración de 0,1 mg de Fe/mL, se filtran en una cubeta de plástico mediante un filtro de 0,22 µm (Millipore) y posteriormente se diluyen con KCl 0,01M, también filtrado.

*Condiciones de medida.* Las mediciones se llevan a cabo en un equipo *Brookhaven Zeta PALS*. Las muestras se irradian con un láser de helio - neón a una longitud de onda de 660 nm y el detector analiza el patrón de dispersión de la luz a 90 °. Se llevan a cabo 10 medidas o “runs” para cada muestra con el objetivo de obtener una aproximación estadística más real.

#### 5.2.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica permite llevar a cabo un análisis de la distribución de tamaños y de la morfología de las muestras.

*Fundamento.* Se trata de aplicar un haz de electrones de alta energía a través de la muestra. Al interactuar con la muestra parte de los electrones chocarán y el resto atravesarán la muestra, siendo proyectados sobre una pantalla fluorescente. Detectando las diferencias entre la energía inicial y final del haz y mediante un sistema de lentes proyectoras, se forma una imagen ampliada de la muestra.

*Preparación de la muestra.* La preparación de las muestras a analizar depende del tipo de nanopartícula, solubles o no solubles en agua. En ambos casos hay que realizar una buena dilución de las muestras para que no se superpongan nanopartículas en la imagen. En el caso de las nanopartículas no solubles en agua, la dilución se hace con hexano y en el caso de las solubles con acetona. Se toma una gota de la suspensión con una pipeta Pasteur, se deposita sobre una rejilla-TEM de cobre recubierta de carbono y se deja evaporar durante 24 h para evitar interferencias del disolvente en el microscopio. Las imágenes de TEM fueron adquiridas en un microscopio Tecnai T20 (FEI), dotado de un cañón termoiónico y voltaje acelerador de hasta 200 kV.

*Análisis de imagen.* Las imágenes obtenidas se analizan mediante el software *Digital Micrograph*, a través del cual se mide el diámetro de aproximadamente 200 nanopartículas en distintas regiones de la muestra. La representación de la distribución de tamaño se realiza mediante un histograma (Excel).

#### 5.2.2.3 Criomicroscopía electrónica de transmisión (cryoTEM)

En esta versión de la microscopía electrónica de transmisión la muestra se prepara y analiza en condiciones criogénicas. De esta manera es posible estudiar la morfología real de las nanopartículas en suspensión ya que al preparar la muestra en condiciones criogénicas se eliminan posibles artefactos de secado de la misma sobre la rejilla de cobre.

Para preparar la muestra, una gota de disolución acuosa de nanopartículas se deposita sobre la rejilla y se vitrifica mediante inmersión en etano líquido. Todas las manipulaciones posteriores de la rejilla se llevan a cabo en nitrógeno líquido y las imágenes de TEM se adquieren también en condiciones criogénicas.

La preparación de la muestra fue llevada a cabo por el Dr. Rodrigo Fernández-Pacheco en el Laboratorio de Microscopías Avanzadas (Instituto de Nanociencias de Aragón, Universidad de Zaragoza).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número de métodos desarrollados para la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro ha crecido sustancialmente en los últimos años. Entre todos ellos, los más usados de cara a aplicaciones biomédicas son el de coprecipitación y el de descomposición térmica. El primero de ellos aporta como principal ventaja que las nanopartículas generadas son directamente hidrofílicas y, por lo tanto, estables en medios acuosos. Sin embargo, presenta algunos factores limitantes como son: la distribución de tamaños, el control de la forma y la cristalinidad. En cambio, el método de descomposición térmica a pesar de que requiere un tratamiento secundario de transferencia a agua, permite ejercer un gran control sobre el tamaño de las nanopartículas, así como obtener una buena cristalinidad y homogeneidad de formas. En este sentido, se decidió abordar en primer lugar este segundo método para evaluar la formación de *nanoworms*. Como consecuencia de los resultados obtenidos, posteriormente se abordó una síntesis por coprecipitación.

La principal técnica que nos permite llevar a cabo una caracterización de la forma, tamaño y estructura de los nanomateriales sintetizados es la microscopía electrónica de transmisión (TEM). A continuación, en la **figura 7** se recogen cuatro imágenes representativas de TEM obtenidas para cada una de las pruebas experimentales de síntesis evaluadas:

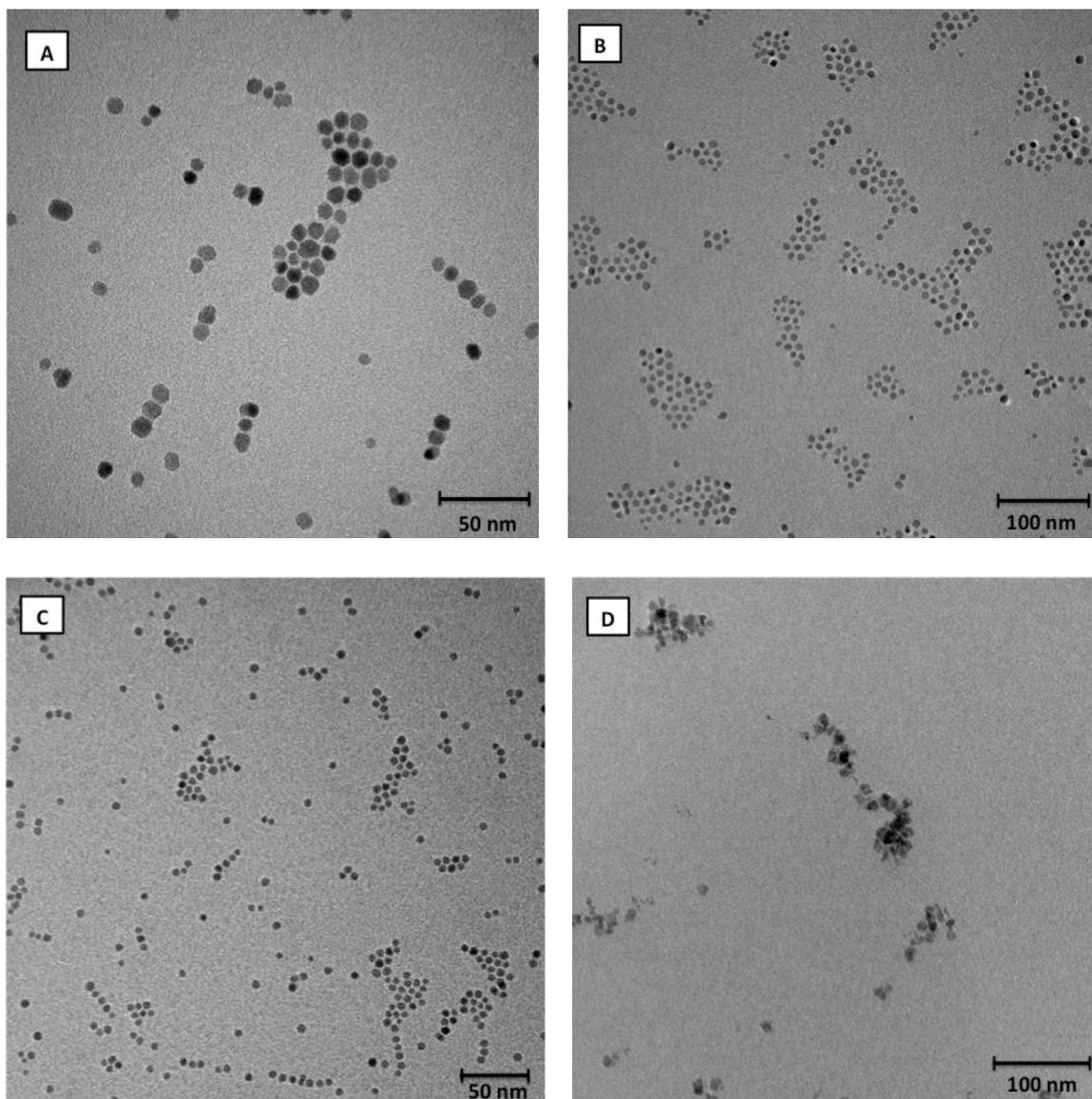
- **Síntesis A:** Descomposición térmica: relación molar **1:8** de ácido oleico : oleilamina y temperatura **280 °C**.
- **Síntesis B:** Descomposición térmica: relación molar **1:8** de ácido oleico : oleilamina y temperatura **305 °C**.
- **Síntesis C:** Descomposición térmica: relación molar **1,33:1** de ácido oleico : oleilamina y adición de óxido de trioctilfosfina (TOPO) a **200 °C**.
- **Síntesis D:** Coprecipitación.

Tal y como se puede apreciar en las imágenes de la **figura 7**, el tamaño y la morfología es significativamente diferente en función del método de síntesis empleado. Haciendo un primer análisis de las imágenes y centrándonos únicamente en el aspecto morfológico, se aprecia como en el caso del método de descomposición térmica se generan principalmente nanopartículas esféricas con una distribución estrecha de tamaños. Sin embargo, en el caso de la coprecipitación se vislumbran formas cercanas a la esfericidad y con una mayor distribución de tamaños.

Utilizando el software informático *Digital Micrograph* se llevó a cabo una medición del tamaño de las formas esféricas obtenidas por descomposición térmica. En el caso de la síntesis D no se pudo determinar debido a la falta de homogeneidad morfológica de la muestra. Además, se llevó a cabo la determinación de la concentración de hierro de las muestras. En el **anexo 1 y 2** se recogen los histogramas y la recta de calibrado para la determinación de hierro respectivamente.

Muestra	[Fe <sup>3+</sup> ] (mg/mL)	Tamaño medio (nm)
Síntesis A	1,1	8,28 ± 1,17
Síntesis B	1,3	7,98 ± 1,08
Síntesis C	1,6	5,56 ± 0,61
Síntesis D	0,84	-

**Tabla 3.** Valores de la concentración de Fe<sup>3+</sup> y el tamaño medio para las cuatro síntesis evaluadas.



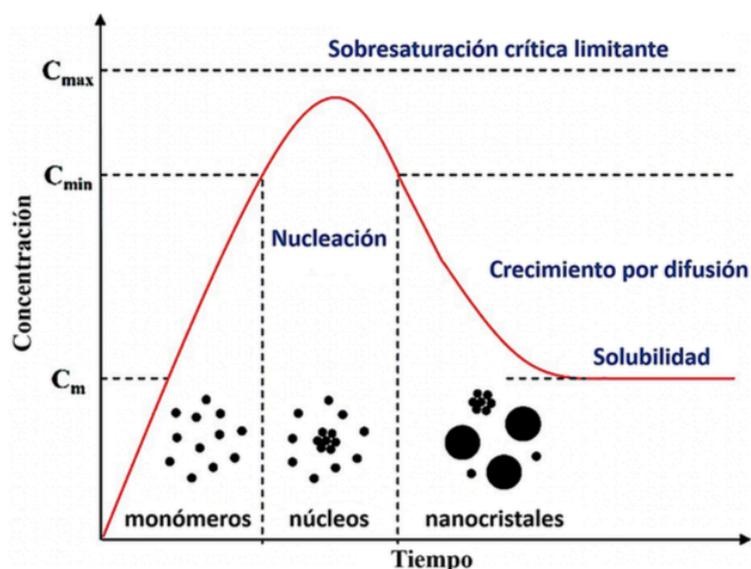
**Figura. 7.** Imágenes de TEM de las cuatro síntesis evaluadas.

El objetivo planteado es la síntesis de *nanoworms* o nanocadenas, es por ello que es necesario pasar a hacer un análisis estructural. En este sentido, se observan distintas tendencias de agregación o generación de estructuras alargadas en función del método de síntesis y los parámetros de temperatura y relación de ácido oleico: oleilamina empleados. A continuación se detallan los mismos.

En el caso de la **síntesis A** se aprecia cierta tendencia de agregación lineal de 3 a 5 nanopartículas. En cambio, en la **síntesis B** no se aprecia ninguna tendencia clara de agregación, se forman agregados de mayor tamaño pero no lineales. La variable introducida en la **síntesis C** (adición de TOPO) refleja la aparición de agregados similares a los obtenidos en la síntesis A. Por último, en la **síntesis D** se aprecia la formación de agregados de una morfología parecida a la descrita en la bibliografía para la síntesis de nanopartículas magnéticas mediante coprecipitación en presencia de dextrano y con una distribución de tamaños amplia.

Para tratar de interpretar estos resultados hay que situarnos en el mecanismo propuesto por LaMer para la síntesis de nanopartículas (28); y sobre el mismo ver como la variación de los parámetros de la temperatura y la relación de surfactantes empleados deriva en las formas obtenidas.

El mecanismo propuesto por LaMer establece que, para que tenga lugar la formación de las nanopartículas tienen que darse dos procesos, la nucleación y el crecimiento. Antes de que se produzca la nucleación, los reactivos se mezclan y empieza a calentarse la mezcla, llevando a reacciones que generarán las especies precursoras de los núcleos. La nucleación tiene lugar cuando estas especies precursoras llegan a una concentración de saturación ( $C_{min}$ ), que se conoce como sobresaturación. Una vez ocurrida la nucleación, el número de precursores que forma los núcleos disminuye y por tanto, ya no se formarán más núcleos. Las especies en disolución entonces difundirán a la superficie de los núcleos, dando lugar al crecimiento de los mismos (29).



**Figura. 8.** Diagrama de LaMer para la síntesis de nanopartículas (ref. 29)

Durante el crecimiento, los surfactantes ejercen un efecto estabilizante y coordinador de los distintos núcleos permitiendo de esta forma la generación de agregaciones de los mismos. Además, el punto de ebullición del disolvente empleado también va a jugar un papel importante ya que en función del mismo la reacción se podrá realizar a mayor o menor temperatura (30).

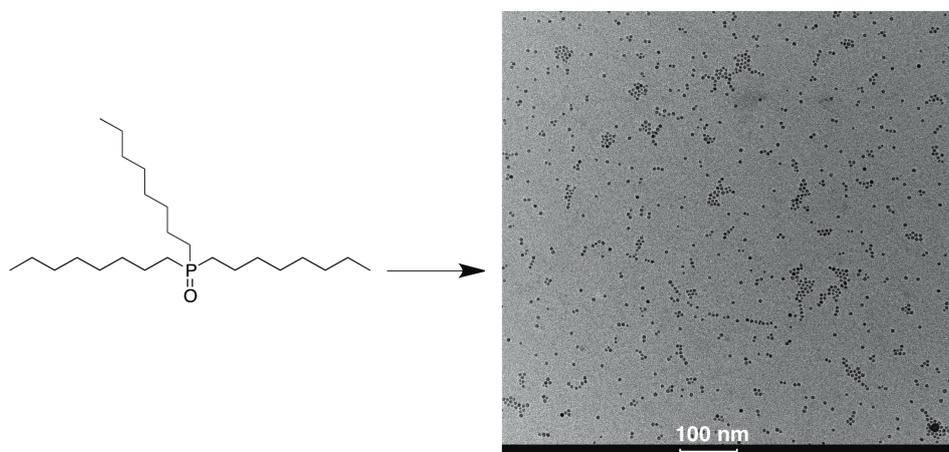
En las tres síntesis de descomposición térmica se emplea como precursor el acetilacetonato de hierro ( $\text{Fe}(\text{acac})_3$ ). Este se caracteriza por presentar su máxima descomposición a 200 °C, es por ello que en todas síntesis se lleva a cabo una etapa inicial de elevación de la temperatura hasta 200 °C y una isoterma de 2-2:30 h a esa temperatura para así garantizar la concentración de saturación ( $C_{\text{min}}$ ).

Las próximas etapas vienen diferenciadas en cada una de las síntesis en función de los siguientes parámetros:

- a) La temperatura final alcanzada.
- b) La relación molar ácido oleico : oleilamina.
- c) La adición de un surfactante adicional.

El disolvente empleado en las tres síntesis es bencil éter, cuyo punto de ebullición es de 298 °C. Analizando las síntesis A y B podemos ver como la temperatura final alcanzada puede influir en la tendencia de agregación, así como en la forma de las nanopartículas. En la **síntesis A** se alcanza una temperatura final inferior a la del punto de ebullición del disolvente, pudiéndose apreciar una cierta tendencia de agregación con un patrón de agregación de 3-5 nanopartículas. Sin embargo, en la **síntesis B** en la que se usa la misma relación molar de ácido oleico y oleilamina, la superación de la temperatura de ebullición del disolvente conlleva a la formación de agregados no lineales.

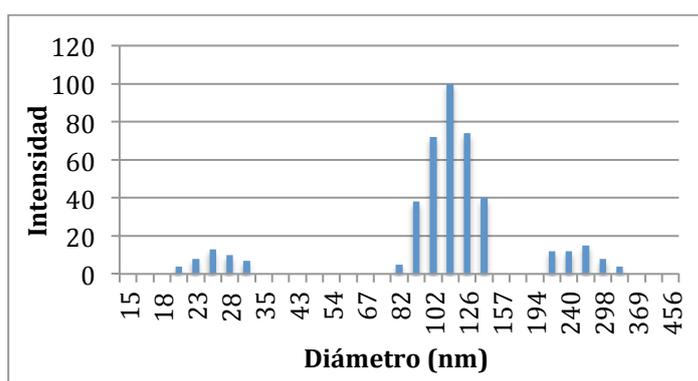
En la **síntesis C** se adiciona óxido de trioctilfosfina (TOPO) justo al inicio de la etapa de crecimiento. El óxido de trioctilfosfina es un surfactante con una capacidad de unión a las nanopartículas inferior a la que tienen el ácido oleico y la oleilamina. A elevadas temperaturas, va a presentar un comportamiento dinámico de unión y desunión que facilitaría la agregación de nanopartículas vecinas. Palchoudhury *et al.* observaron que al llevar a cabo la síntesis de nanopartículas magnéticas mediante la descomposición térmica de oleato de hierro en presencia de TOPO obtenían cadenas de nanopartículas (**31**). En nuestro caso, observamos que el patrón de agregación lineal era bastante parecido al de la síntesis llevada a cabo en ausencia de TOPO y a 280 °C (**Fig.9**).



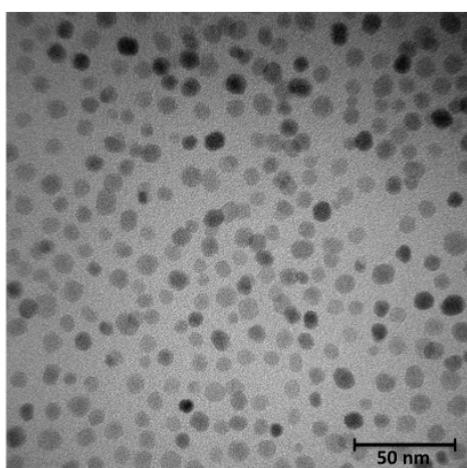
**Figura. 9.** Estructura química de la trioctilfosfina (TOPO) y su influencia en la agregación de las nanopartículas.

Con todo este análisis y viendo que la **síntesis A** es la que mejor se aproxima al objetivo planteado ya que presentan un cierto patrón de agregación lineal de hasta 5 nanopartículas, se lleva a cabo la **transferencia a agua** para posteriormente realizar una caracterización más amplia. A su vez, en la transferencia a agua se pretendía que el PMAO reforzara las uniones entre las nanopartículas, estabilizando de este modo la agregaciones lineales. En el **anexo 3** se incluye una imagen de la purificación del exceso de polímero tras la transferencia a agua.

Aunque las medidas de DLS indican la formación de agregados (diámetro medio de 124 nm) (**Fig.10**), en las imágenes de TEM únicamente se aprecian nanopartículas esféricas individuales, como se puede ver en la **figura 11**.



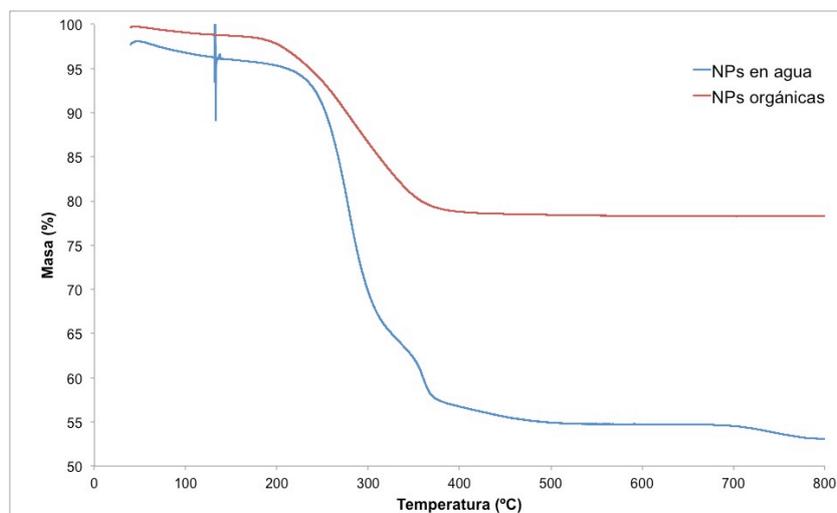
**Figura. 10.** Representación gráfica de los valores de diámetro obtenidos por DLS para la muestra transferida a agua correspondiente a la síntesis A.



**Figura. 11.** Transferencia a agua de las nanopartículas obtenidas mediante el método de síntesis B

Para evaluar la cantidad de surfactantes, respectivamente polímero en la superficie de las nanopartículas, se llevaron a cabo el análisis termogravimétricos de las muestras (**Fig. 12**). En la muestra de nanopartículas sintetizadas por la vía A la pérdida de peso observada fue de aproximadamente 22 %, mientras que en la muestra de nanopartículas transferidas a agua la pérdida de peso aumentó hasta 45%. Como las cadenas del PMAO se intercalan con las de ácido oleico sin reemplazarlo, se puede

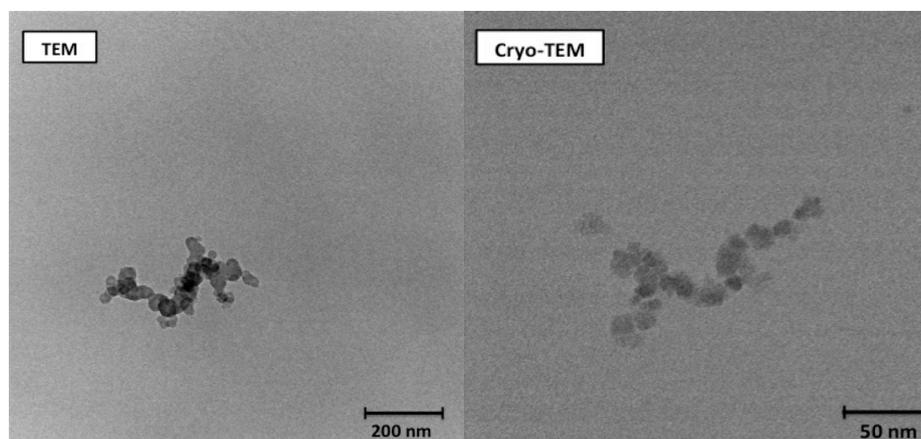
calcular la cantidad de polímero unido a la superficie de las nanopartículas restando las dos pérdidas de peso (23%).



**Figura. 12.** Análisis termogravimétrico de las nanopartículas recubiertas de ácido oleico (rojo) y de PMAO (azul).

En vista de las dificultades de obtener las estructuras deseadas mediante el método de descomposición térmica, se decidió abordar la **síntesis D** por coprecipitación en presencia de dextrano como polímero estabilizante. En este caso, las imágenes de TEM indican la formación de agregados con una estructura no muy bien definida. Además, se observan poblaciones de distintos tamaños cuya separación resulta complicada. Estos resultados son similares a los anteriormente descritos para la síntesis por coprecipitación en presencia de dextrano (**Ref. 22 y 24**).

Sin embargo, la observación de agregados en las imágenes de TEM puede ser una consecuencia del mismo proceso de preparación y secado de la muestra. Para contrastar esta hipótesis, se llevó a cabo la preparación de una muestra de Cryo-TEM. Esta técnica permite observar la muestra en su estado nativo en disolución, llevando a cabo una congelación espontánea de la misma. Los resultados reportados verifican que la morfología de las estructuras obtenidas es independiente del secado, tal y como se refleja en la **figura 13**.



**Figura. 13.** Imágenes de TEM y cryo-TEM de la síntesis D.

## 7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

1. El método de síntesis por descomposición térmica del precursor acetilacetonato de hierro [Fe(acac)<sub>3</sub>] permite obtener agregados lineales de hasta 5 nanopartículas bajo determinadas condiciones específicas de reacción.
2. La temperatura de reacción es un parámetro decisivo a la hora de obtener nanocadenas. Temperaturas de reacción inferiores al punto de ebullición del solvente empleado favorecen el proceso de ensamblaje.
3. El uso de surfactantes de bajo grado de interacción con las nanopartículas de óxido de hierro (p.ej. TOPO) no mejora el ensamblaje de las nanocadenas.
4. Los agregados lineales obtenidos mediante el método de descomposición térmica pierden su estabilidad durante el proceso de biocompatibilización o transferencia a agua.
5. El método de síntesis por coprecipitación de sales de hierro permite obtener agregados con una distribución amplia de tamaños y carentes de una tendencia lineal bien definida.
6. Los estados de agregación observados mediante TEM corresponden a la forma nativa en disolución, tal y como se ha podido constatar mediante la técnica de cryo-TEM.

## CONCLUSIONS

The main conclusions based on the results obtained in this project are resumed as follows:

1. Chain- or worm-like assemblies of 5 nanoparticles can be obtained with the thermal decomposition method under specific reaction conditions.
2. The reaction temperature is a crucial parameter in order to obtain nanochains. The assembly chains are favoured under temperatures lower than the boiling point of the solvent.
3. The use of surfactants that have a weaker binding to the iron oxide nanoparticles (e.g. TOPO) don't improved the chain assemblies.
4. There is a loss of stability of the chain assemblies during the water transfer protocol.
5. The coprecipitation method allows obtaining assemblies with a wide size distribution and without a well-defined morphology.
6. The native structure of the assemblies in solution is the same as the structure observed with TEM as it could be confirmed with cryo-TEM experiments.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

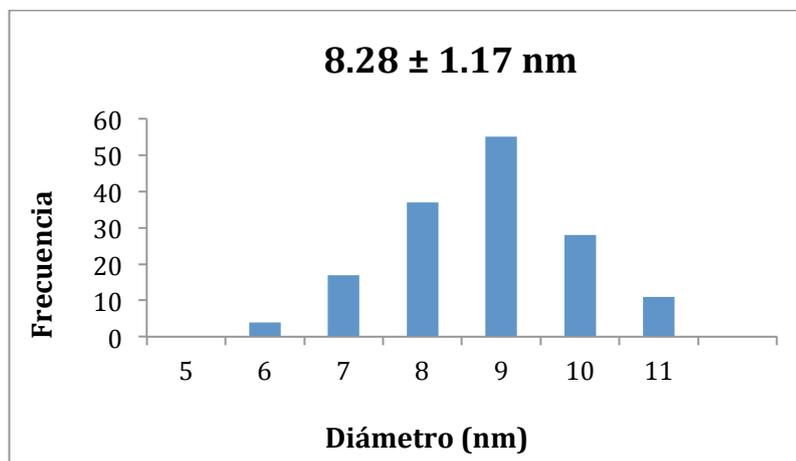
- (1). Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, 35(7), 583-592.
- (2). Mann, S. (2008). Life as a nanoscale phenomenon. *Angewandte Chemie International Edition*, 47(29), 5306-5320.
- (3). Barakat, N. S. (2009). Magnetically modulated nanosystems: a unique drug-delivery platform. *Nanomedicine*, 4(7), 799-812.
- (4). Kobayashi, T. (2011). Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. *Biotechnology journal*, 6(11), 1342-1347.
- (5). Tamanaha, C. R., Mulvaney, S. P., Rife, J. C., & Whitman, L. J. (2008). Magnetic labeling, detection, and system integration. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(1), 1-13.
- (6). 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.
- (7). Duncan, R., & Gaspar, R. (2011). Nanomedicine (s) under the microscope. *Molecular pharmaceutics*, 8(6), 2101-2141.
- (8). Kaplun, A. P., Bezrukov, D. A., & Shvets, V. I. (2011). Rational design of nano-and micro-size medicinal forms of biologically active substances. *Applied biochemistry and microbiology*, 47(8), 711-717.
- (9). Davis, M. E., & Shin, D. M. (2008). Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *Nature reviews Drug discovery*, 7(9), 771-782.
- (10). Torchilin, V. P. (2010). Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. *Drug delivery*, 197, 3-53.
- (11). Rivera Gil, P., Oberdörster, G., Elder, A., Puentes, V., & Parak, W. J. (2010). Correlating physico-chemical with toxicological properties of nanoparticles: the present and the future. *Acs Nano*, 4(10), 5527-5531.
- (12). Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1), 3-14.
- (13). Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of disease*, 37(1), 13-25.
- (14). Gabathuler, R. (2010). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of disease*, 37(1), 48-57.
- (15). Deeken, J. F., & Löscher, W. (2007). The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clinical Cancer Research*, 13(6), 1663-1674.
- (16). Malakoutikhah, M., Teixidó, M., & Giralt, E. (2011). Shuttle-Mediated Drug Delivery to the Brain. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(35), 7998-8014.
- (17). Fortin, D., Gendron, C., Boudrias, M., & Garant, M. P. (2007). Enhanced chemotherapy delivery by intra-arterial infusion and blood-brain barrier disruption in the treatment of cerebral metastasis. *Cancer*, 109(4), 751-760.

- (18). Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., & Allen, D. D. (2002). Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug development and industrial pharmacy*, 28(1), 1-13.
- (19). Pardridge, W. M. (2006). Molecular Trojan horses for blood-brain barrier drug delivery. *Current opinion in pharmacology*, 6(5), 494-500.
- (20). Pardridge, W. M. (2002). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1 (2), 131-139
- (21). Fratila, R. M., Rivera-Fernández, S., & Jesús, M. (2015). Shape matters: synthesis and biomedical applications of high aspect ratio magnetic nanomaterials. *Nanoscale*, 7(18), 8233-8260.
- (22). Park, J. H., von Maltzahn, G., Zhang, L., Derfus, A. M., Simberg, D., Harris, T. J., ... & Sailor, M. J. (2009). Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting. *Small*, 5(6), 694-700.
- (23). Veiseh, O., Gunn, J. W., & Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*, 62(3), 284-304.
- (24). Park, J. H., von Maltzahn, G., Zhang, L., Schwartz, M. P., Ruoslahti, E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. (2008). Magnetic iron oxide nanoworms for tumor targeting and imaging. *Advanced Materials*, 20(9), 1630-1635.
- (25). Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chemical reviews*, 108(6), 2064-2110.
- (26). Jadhav, S. A., & Bongiovanni, R. (2012). Synthesis and organic functionalization approaches for magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles. *Adv Mat Lett*, 3(5), 356-361.
- (27). Nath, S., Kaittanis, C., Ramachandran, V., Dalal, N. S., & Perez, J. M. (2009). Synthesis, magnetic characterization, and sensing applications of novel dextran-coated iron oxide nanorods. *Chemistry of Materials*, 21(8), 1761-1767.
- (28). LaMer, V. K., & Dinegar, R. H. (1950). Theory, production and mechanism of formation of monodispersed hydrosols. *Journal of the American Chemical Society*, 72(11), 4847-4854
- (29). Chang, J., & Waclawik, E. R. (2014). Colloidal semiconductor nanocrystals: controlled synthesis and surface chemistry in organic media. *RSC Advances*, 4(45), 23505-23527.
- (30). Park, J., Joo, J., Kwon, S. G., Jang, Y., & Hyeon, T. (2007). Synthesis of monodisperse spherical nanocrystals. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(25), 4630-4660.
- (31). Palchoudhury, S., Xu, Y., Goodwin, J., & Bao, Y. (2011). Synthesis of iron oxide nanoworms. *Journal of Applied Physics*, 109(7), 07E314.

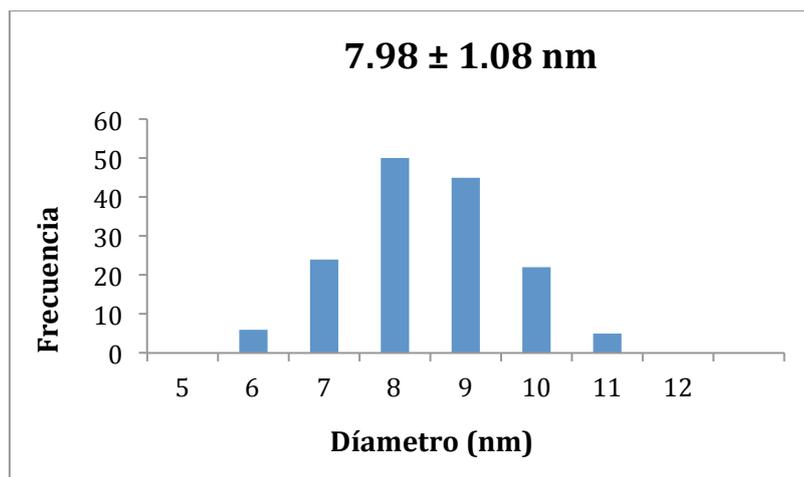
## 9. ANEXO

**Anexo 1.** Histogramas de representación del tamaño medio de la nanopartículas, elaborados a partir de las imágenes de TEM y usando los software Digital Micrograph y Excel.

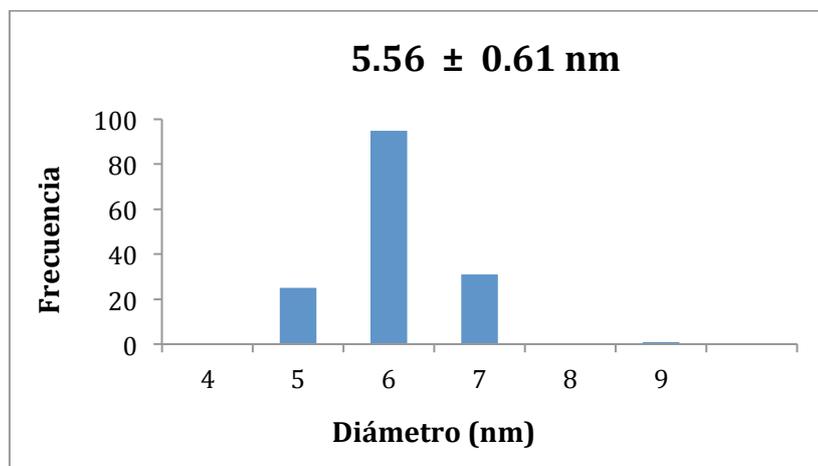
### Síntesis A:



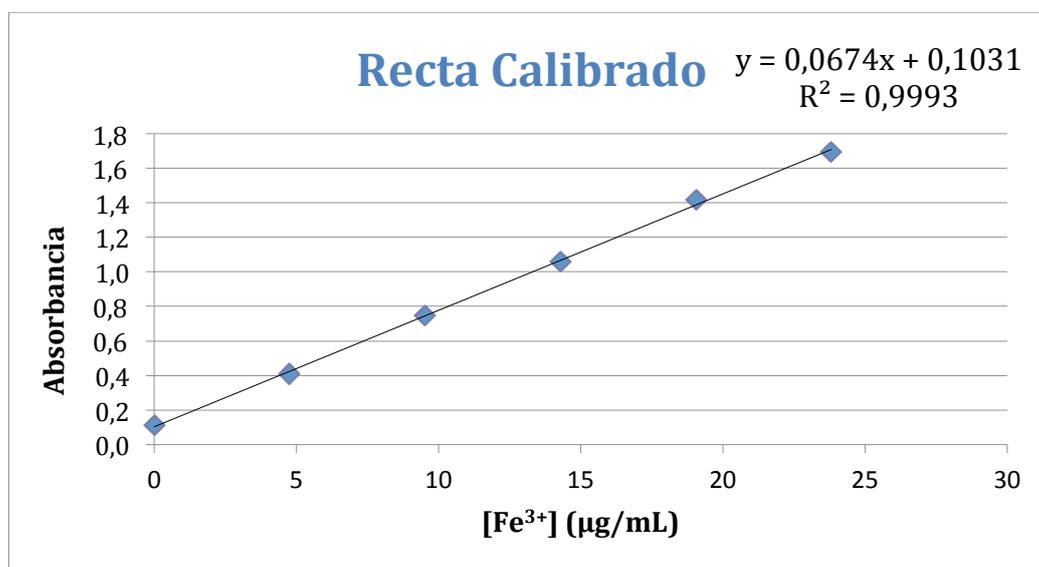
### Síntesis B:



### Síntesis C:



## Anexo 2. Recta de calibrado para el cálculo de las concentraciones de hierro.



Las muestras estándar a partir de las cuales se lleva a cabo la construcción de la recta de calibrado, se muestran a continuación:

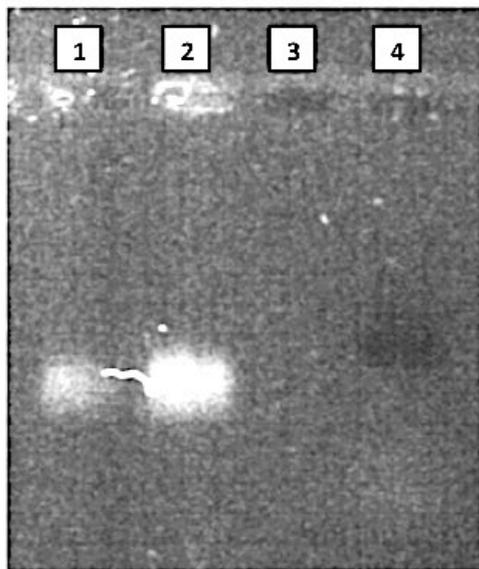
[Fe <sup>3+</sup> ](µg/mL)	Absorbancia a 480 nm
200	4,76
400	9,52
600	14,29
800	19,05
1000	23,81

Interpolando sobre la recta la absorbancia media a 480 nm de la muestra y aplicando las diluciones realizadas durante el proceso de preparación de la muestra (apartado 5.2.1.1), se determina la concentración:

$$y = 0,0674 \cdot X_f + 0,1031$$

$$¿X_i? \cdot \frac{20 \cdot 10^{-3} \text{ mL}}{1} \cdot \frac{1}{0,5 \text{ mL}} \cdot \frac{50 \cdot 10^{-3} \text{ mL}}{1} \cdot \frac{1}{0,21 \text{ mL}} = X_f (\mu\text{g/mL})$$

**Anexo 3. Electroforesis correspondiente a los sobrenadantes del proceso de purificación del exceso de polímero en la transferencia a agua de la síntesis A.**



El carril 1 corresponde al sobrenadante obtenido tras el primer lavado, el carril 2 al segundo lavado, el carril 3 al tercer lavado y en el carril 4 se carga la muestra de nanopartículas, verificando la eliminación del exceso de polímero. Se puede apreciar como para el tercer lavado ya se ha conseguido eliminar el exceso de polímero. En este sentido, se puede apreciar como en el carril 4 se encuentran las nanopartículas en ausencia de polímero ya que no se aprecia la banda blanquecina visible en los dos primeros carriles.