

Funcionalización de Nanopartículas Superparamagnéticas; Modificación Química del Surfactante

F. Herranz Rabanal^{1,2}, B. Salinas^{1,2}, M. Desco Menéndez^{2,3}, J. Ruiz-Cabello Osuna¹

¹ CIBERES. Dpto de Química-Física II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid. fherranz@ieeb.ucm.es

² Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid .

³ Departamento de Bioingeniería e Ingeniería Aeroespacial, Universidad Carlos III de Madrid, Madrid.

Resumen

En este trabajo se presenta una nueva metodología para la funcionalización de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro. A diferencia de los métodos empleados actualmente nuestra aproximación modifica la composición química del surfactante original, ácido oléico, permitiendo la obtención de materiales listos para su empleo en imagen por resonancia magnética así como para su funcionalización mediante enlaces covalentes. Se presentan varios ejemplos en los que se lleva a cabo dicha aproximación mediante el empleo de dos tipos de reacciones diferentes. Esta nueva metodología permite la funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro de forma reproducible, con radios hidrodinámicos pequeños y monodispersas.

1. Introducción

El empleo de nanopartículas (NPs) superparamagnéticas de óxido de hierro (magnetita; Fe_3O_4 y maghemita; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) para aplicaciones biomédicas está cada vez más extendido. Dichos compuestos se emplean como agentes de contraste en distintas técnicas de imagen, como transportadores de fármacos, en la purificación de proteínas, en terapia génica, etc. A la hora de obtener las partículas activas para una aplicación biomédica hay dos aspectos fundamentales a tener en cuenta. Uno es la síntesis del núcleo de magnetita o maghemita. Para lo cual el mejor método consiste en la descomposición de precursores orgánicos en disolventes de alto punto de ebullición. De esta forma se obtienen NPs con un radio hidrodinámico de entre 5 y 15 nm, según las condiciones empleadas, con muy buena cristalinidad y propiedades magnéticas [1,2]. El segundo aspecto es que las NPs obtenidas de esta forma son estables únicamente en disolventes orgánicos con lo que hay que llevar a cabo una segunda etapa para transferir dichos materiales a la fase acuosa y, de esta forma, poder emplearlas en aplicaciones biomédicas. Este segundo paso es, sin duda, el más complicado a la hora de obtener NPs de radio hidrodinámico pequeño y funcionalizadas en la superficie. Dicha complejidad se debe principalmente a tres aspectos; 1- La necesidad de obtener partículas estables en agua y que muestren estabilidad por largos períodos de tiempo, 2- Funcionalizar las partículas con moléculas orgánicas o biomoléculas de forma estable y duradera, sin que se

produzca la desorción de las nuevas moléculas con el tiempo o por cambio en las condiciones fisicoquímicas, y 3- Obtener NPs de radio hidrodinámico pequeño y monodispersas después de cada una de las reacciones de funcionalización.

Hasta ahora todos estos requisitos se intentaban conseguir por dos métodos sintéticos. Uno consiste en la formación de micelas alrededor de la NP mediante el empleo de moléculas o polímeros anfifílicos. El otro método, de intercambio de ligando intenta sustituir, al menos parcialmente, el surfactante hidrófobo con otra molécula hidrófila. Ambos métodos están representados en la figura 1.

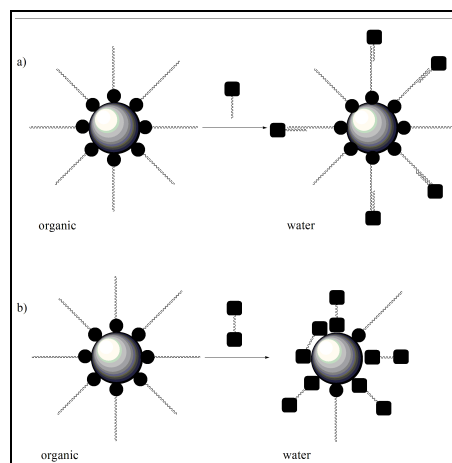


Figura 1. Síntesis de nanopartículas hidrófilas a) mediante la formación de micelas y b) por intercambio de ligando.

Estos dos métodos, si bien han permitido la síntesis de partículas de buena calidad para determinadas aplicaciones, sufren de una serie de desventajas muy importantes. La principal de todas ellas es la débil unión entre los nuevos surfactantes y la NP. Esta unión, mediante enlaces de van der Waals, da lugar a la desorción del surfactante con el tiempo así como a complicaciones en las sucesivas funcionalizaciones que se quieran llevar a cabo sobre ellas [3]. Resultando en NPs poco estables con una composición en la superficie habitualmente mal definida.

La aproximación que aquí se presenta es totalmente diferente ya que se hace uso de las posibilidades de

funcionalización química del surfactante que presentan originalmente las NPs, el ácido oléico. La principal funcionalidad de esa molécula radica en el doble enlace que presenta en su estructura. Por ello se han empleado dos de las principales reacciones que se pueden llevar a cabo sobre un alqueno, la oxidación mediante el empleo de permanganato potásico (KMnO_4) y la metátesis de olefinas. Ambos métodos representan dos formas nuevas de abordar la síntesis de NPs hidrófilas de forma reproducible, sencilla y mediante enlaces covalentes.

2. Métodos

Síntesis de nanopartículas hidrófobas; NP-ácido oléico.

Las nanopartículas de magnetita fueron sintetizadas empleando acetilacetato de hierro $[\text{Fe}(\text{acac})_3]$ como precursor y fenil éter como disolvente. Una mezcla de $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (0.71 g, 2 mmol), 1,2-hexadecanodiol (2.38 g, 10 mmol), ácido oléico (1.69 g, 6 mmol), oleilamina (1.60 g, 6 mmol) y fenil éter (20 ml) se añadieron a un matraz de tres bocas. La mezcla de reacción fue calentada, bajo agitación mecánica y flujo de N_2 , hasta alcanzar los 200°C . Esta temperatura se mantuvo durante 120 minutos y a continuación se subió la temperatura a reflujo (254°C) durante 30 minutos en atmósfera de N_2 . Finalmente la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Para eliminar los subproductos de la mezcla de reacción se añadió etanol y se centrifugó a 8500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, las nanopartículas se dispersaron en 20 mL de hexano.

Síntesis de nanopartículas hidrófilas por oxidación; NP-ácido azelaico (1).

Se preparó una disolución de KMnO_4 (0.3 g, 1.9 mmol) y Cloruro de benciltrimetilamonio (BTACl) (0.8 g, 4.3 mmol) en cloroformo (60 mL). Esta disolución se añadió sobre una disolución concentrada de nanopartículas recubiertas con ácido oléico en una mezcla hexano/cloroformo (20/20 mL). La disolución fue agitada mecánicamente y calentada a reflujo durante 4 h. Pasado ese tiempo se añadieron 50 mL de tampón AcOH/AcO (pH 2.9) y la agitación y calefacción se mantuvieron durante 20 h. Después de enfriar la disolución se añadió NaHSO_3 (3 x 2 mL) para eliminar el exceso de permanganato, finalmente la disolución se lavó varias veces con agua hasta obtener una dispersión estable en tampón fosfato (pH 7.1, 10 mM).

Funcionalización de nanopartículas por metátesis, metodología general.

Una dispersión de NP-oléico (5 mL, 11 mg/mL) se mezcló con la correspondiente olefina (5-10 mmol) en CHCl_3 y se calentó a 55°C . A continuación se añadió el catalizador (5% mol) disuelto en 1 mL de CHCl_3 y se dejó a esa T y agitación mecánica durante 18 h. Pasado ese tiempo las NPs se precipitaron con MeOH o Acetona, según la olefina, y se separaron con imán. Las NPs fueron lavadas al menos tres veces en ese mismo disolvente y redispersadas en CHCl_3 o en H_2O según sustrato.

3. Resultados y Discusión

Mediante la descomposición de acetilacetato de hierro en fenil éter se sintetizaron nanopartículas con ácido oléico como surfactante de 10 nm (PDI 0.2) de radio hidrodinámico y carácter superparamagnético. Estas nanopartículas fueron las empleadas en la modificación química del surfactante mediante los dos tipos de reacción.

Oxidación del surfactante. El doble enlace presente en el ácido oléico fue oxidado mediante el empleo de KMnO_4 en una reacción bifásica. De esta forma se creó un ácido carboxílico terminal, además del que sirve de unión a la NP. Obteniéndose partículas, NP-azelaico, de 30 nm en intensidad (PDI 0.17) con una gran estabilidad en agua, mostrando un valor de potencial zeta de -50 mV a pH fisiológico. En la figura 1 se pueden apreciar las imágenes TEM, a dos aumentos, de las NP-azelaico sintetizadas de esta manera [3,4].

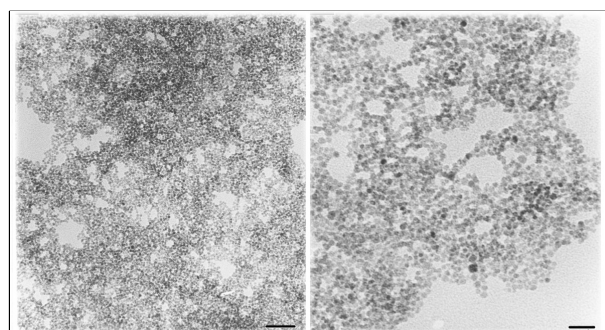


Figura 1. Imágenes TEM de las NP-azelaico a dos aumentos, 50 nm y 20 nm.

Además, se midió la magnetización de saturación de estas NPs obteniéndose un valor de $77\text{ emu g}^{-1}\text{ Fe}$, mostrando un carácter superparamagnético (Figura 2). Por último, se caracterizaron las partículas como agentes de contraste para imagen por resonancia obteniéndose unos valores de r_1 y r_2 de 4 mM s^{-1} y 115 mM s^{-1} , respectivamente. Las dos grandes ventajas de esta aproximación es que se obtienen NP estables en agua listas para su empleo como agentes de contraste en resonancia. Además, debido a la funcionalización con grupos carboxílicos en la superficie, están listas para realizar las correspondientes modificaciones superficiales mediante enlaces covalentes.

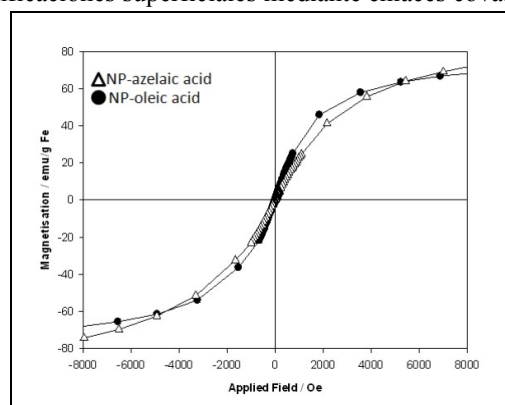


Figura 2. Curvas de magnetización a 298 K para las NP hidrófobas (●), e hidrófilas (▲)

Se está aprovechando estas características para funcionalizar las partículas de distintas formas y con diferentes aplicaciones. Por ejemplo, se han sintetizado NP de magnetita fluorescentes. Para ello, en primer lugar, se modificó la superficie con biotina mediante su unión covalente a los grupos ácidos. A continuación, se hicieron reaccionar las NP-biotina con el producto comercial Streptavidina-Alexa670 de forma que, debido a la unión selectiva entre la proteína y la biotina, se funcionalizó la superficie de las NPs. Se obtuvieron de esta forma NPs de 60 nm (PDI 0.18), activas tanto para imagen por resonancia como para fluorescencia (Figura 3). Esta vía de funcionalización, además de ser rápida y reproducible, tiene la ventaja de que, al introducir la streptavidina, se aleja el fluoróforo de la superficie de la NP lo suficiente como para evitar el quenching de la fluorescencia, como se ha observado en otros casos.

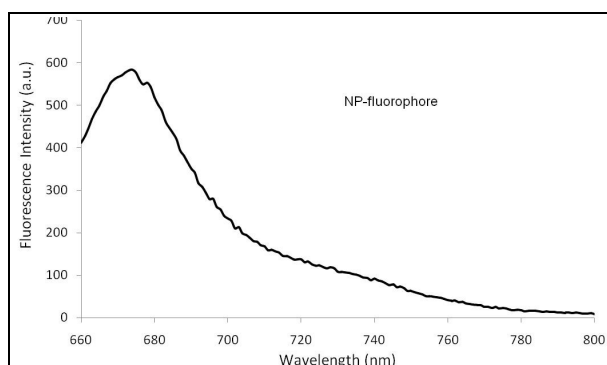


Figura 3. Señal de fluorescencia de las NP-streptavidina-alexa (λ_{ex} 650nm).

Otra aplicación que se está desarrollando es el empleo de estas NP para experimentos de terapia génica. En este caso se han sintetizado bioconjugados NP-lentivirus que son capaces de mejorar la eficacia de la transducción y, además, permiten realizar imagen por resonancia y fluorescencia de las células tratadas de esta forma.

Modificación del surfactante mediante la metátesis de olefinas. La metátesis de olefinas es una de las reacciones más útiles en síntesis química. Es una reacción que permite la formación de enlaces carbono-carbono con altos rendimientos y selectividades, gracias a la introducción de nuevos catalizadores [5,6]. Su uso es extensivo en la síntesis de polímeros y moléculas orgánicas de distintos pesos moleculares. Una de sus principales características es el empleo de catalizadores comerciales de fácil manejo (entre los que destacan los catalizadores específicos Hoveyda-Grubbs de segunda generación [7]), un alto rendimiento de reacción en condiciones suaves así como una alta tolerancia a la presencia de distintos grupos funcionales. El esquema general de la funcionalización de las NP-oléico mediante esta nueva aproximación se puede ver en la figura 4.

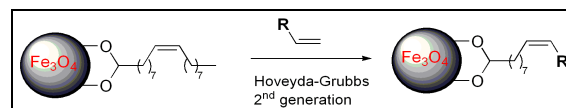


Figura 4. Esquema general de la funcionalización de nanopartículas de óxido de hierro mediante la metátesis de olefinas.

Como se ve la aplicación de esta reacción permite introducir distintos grupos (R) unidos a una olefina, normalmente comercial. Con la elección de las condiciones de reacción adecuadas se consiguen altos rendimientos, habitualmente superiores al 70%. Un resumen de las NPs que se han sintetizado se recoge en la tabla 1.

olefina	Tamaño (nm)	PDI	disolvente
metilacrilato	10	0,21	CHCl ₃
5-hexenonitrilo	11	0,19	CHCl ₃
3-aliloxi-1,2-propanodiol	13	0,22	H ₂ O

Tabla 1. Nanopartículas sintetizadas mediante la metátesis de olefinas.

Las propiedades de las NPs así sintetizadas dependen de la naturaleza del grupo R. De tal forma que se han obtenido partículas estables en agua o hidrófobas y con distintos grupos funcionales. Además se puede apreciar cómo con esta metodología se obtienen partículas con un radio hidrodinámico muy pequeño, monodispersas y con alta estabilidad. Estas NPs han sido totalmente caracterizadas estructuralmente, mediante el empleo de la espectroscopia FT-IR (Figura 5), RMN, microscopía electrónica de transmisión, etc.

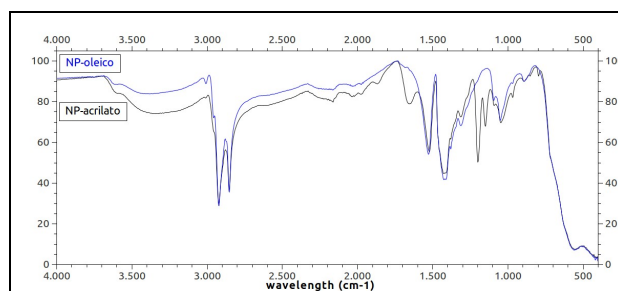


Figura 5. Espectros FT-IR de las NP-oleico (azul) y NP-acrilato (negro).

Los resultados aquí mostrados para la metátesis de las NP-oléico constituyen la primera aplicación de esta reacción a la funcionalización de NPs. Estos resultados muestran el potencial de esta metodología como nueva herramienta en la síntesis de NPs activas.

4. Conclusiones

En nuestro grupo se lleva un tiempo desarrollando una nueva aproximación para la funcionalización y síntesis de nanopartículas hidrófilas para imagen. Dicha metodología

consiste en aprovechar el surfactante para llevar a cabo modificaciones químicas en su estructura. Esta aproximación presenta varias ventajas. En primer lugar se consiguen altos porcentajes de conversión, el 100% en el caso de la oxidación, asegurando la conversión total del ácido oléico en la molécula deseada. En segundo lugar con estas modificaciones se consigue la funcionalización covalente de las partículas, asegurando la persistencia de dicha funcionalización incluso en condiciones cambiantes de pH, T o salinidad. Y, por último, se minimiza el aumento del radio hidrodinámico ya que en ningún momento la nanopartícula se encuentra desprovista de un surfactante que la estabilice. De los dos tipos de reacciones que se han presentado para la funcionalización de las partículas la oxidación es un método totalmente desarrollado y con muy buena reproducibilidad que ha sido aplicada ya a una gran variedad de funcionalizaciones. En el caso de la metátesis los resultados aquí mostrados constituyen la “proof of concept” de esta aproximación, en la actualidad se está extendiendo esta metodología a distintas moléculas y grupos funcionales.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia e Innovación y a la Comunidad de Madrid por el apoyo económico (SAF2008-05412, MAT2008-01489 y CCG08-UCM/MAT-4039)

Referencias

- [1] Hyeon T, Su SL, Park J, Chung Y, Hyon BN. Journal American Chemical Society, vol 123, 2001, pp 12798-2801.
- [2] Rockenberger J, Scher EC, Alivisatos AP. Journal American Chemical Society, vol 121, 1999, pp 11595-11596.
- [3] Herranz F, Morales MP, Roca AG, Desco M, Ruiz-Cabello J. Chemistry- A European Journal, vol 14(30), 2008, pp 9126-9130.
- [4] Herranz F, Morales MP, Roca AG, Vilar R, Ruiz-Cabello J. Contrast Media & Molecular Imaging, vol 3(6), 2008, pp 215-222.
- [5] Connon SJ, Blechert S, Angewandte Chemie, vol 42, 2003, pp 1900-23.
- [6] Astruc D. New Journal of Chemistry, vol29, 2005, 42-56.
- [7] Rybak A, Meier M A, Green Chemistry 2008, pp 1099-1104.