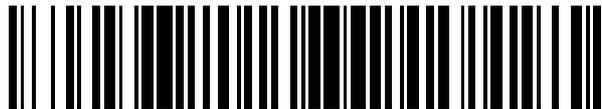


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 993**

51 Int. Cl.:

H01F 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2010 E 10744897 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2596506**

54 Título: **Nanopartículas de maghemita y método para preparar las mismas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA (25.0%)
Via VIII Febbraio 1848 N. 2
35122 Padova, IT;
VIANELLO, FABIO (25.0%);
MAGRO, MASSIMILIANO (25.0%) y
VALLE, GIORGIO (25.0%)

72 Inventor/es:

VIANELLO, FABIO;
MAGRO, MASSIMILIANO;
VALLE, GIORGIO;
RUSSO, UMBERTO y
NODARI, LUCA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 531 993 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nanopartículas de maghemita y método para preparar las mismas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de hierro de maghemita estequiométrica pura, a las propias nanopartículas que pueden obtenerse con el método y al uso de las mismas.

10

Antecedentes de la invención

Con el rápido desarrollo de la nanotecnología, actualmente se están estudiando ampliamente nanopartículas magnéticas. Se conoce desde hace mucho tiempo que las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas magnéticas pueden ser considerablemente diferentes de las del material a granel correspondiente (Selvan, S.T. *et al.*, 2002, *Phys. Chem. B*, 106, 10157-10162).

15

Como resultado, las nanopartículas magnéticas presentarán superparamagnetismo, lo que significa que, dependiendo de la temperatura y las dimensiones, las partículas resultan atraídas por un campo magnético, pero no conservan magnetismo residual una vez eliminado el campo (Stavroyiannis, S. *et al.*, 1998, *Appl. Phys. Lett.*, 73, 3453-3458). Por tanto, pueden retirarse partículas superparamagnéticas suspendidas de la suspensión mediante un imán externo, pero no se aglomeran (es decir, permanecen suspendidas) tras la eliminación del campo magnético externo. Estos materiales nanoparticulados a menudo presentan propiedades eléctricas, ópticas, magnéticas y químicas muy interesantes, que no pueden lograrse por sus homólogos a granel (Ashoori, R.C., 1996, *Nature*, 379, 413-419).

20

25

Se propusieron nanopartículas magnéticas de óxido de hierro como pigmentos magnéticos en medios de almacenamiento magnético y grabación, catálisis, fluidos magnéticos, dispositivos magneto-ópticos, administración de fármaco controlada, agentes de intensificación de la imagen para imágenes de resonancia magnética nuclear y terapia contra el cáncer inducida magnéticamente (Machala, L. *et al.*, 2007, *J. Phys. Chem. B*, 111, 4003-4018). La ventaja percibida de usar partículas de tamaño nanométrico en lugar de tamaño micro- o sub-micrométrico es su área superficial mayor para la unión de las enzimas, lo que permite la preparación de biomaterial nanoestructurado con una alta carga de bioelementos por unidad de masa. Las otras ventajas consisten en la posibilidad sencilla y rápida de inmovilizar bioelementos, que pueden implementarse justo antes de realizar un experimento de biodetección, y el ajuste directo de la cantidad de anticuerpo depositado magnéticamente sobre la superficie del electrodo.

30

35

Se ha perseguido intensamente el desarrollo de partículas de tamaño de nanómetro uniforme debido a su importancia científica tecnológica y fundamental.

40

Se han desarrollado varios métodos para la preparación de nanopartículas paramagnéticas (Mornet, S. *et al.*, 2004, *J. Mater. Chem.*, 14, 2161-2175; Laurent, S. *et al.* 2008, *Chem Rev.*, 108, 2064-2110). Entre los métodos químicos indicados en la bibliografía y usados actualmente para sintetizar nanopartículas magnéticas para aplicaciones médicas, pueden encontrarse los siguientes: tecnología de microemulsión, síntesis de sol-gel, reacciones sonoquímicas, reacciones hidrotérmicas, hidrólisis y termólisis de precursores de complejos de hierro, síntesis de inyección de flujo y síntesis de electropulverización (Laurent, S. *et al.* 2008, *Chem Rev.*, 108, 2064-2110).

45

El protocolo usado lo más comúnmente implica la co-precipitación de iones ferrosos y férricos en disoluciones básicas. En la mayoría de los casos, con el fin de evitar la agregación de partículas durante la síntesis, para optimizar la homogeneidad de las dimensiones, y para permitir la inmovilización de bioelementos, se usa una suspensión de micelas inversas de agua en aceite, con la ayuda de una molécula tensioactiva (Capek, I., 2004, *Adv. Coll. Interf. Sci.*, 110, 49-74). Se añadieron polímeros tales como dextrano, poli(alcohol vinílico) y dietil-aminoetil-almidón para recubrir las partículas para obtener una mejor estabilidad, antes o después de la formación de partículas de óxido de hierro (Lee, J. *et al.*, 1996, *J. Coll. Interf. Sci.*, 177, 490-494; Bergemann, C. *et al.*, 1999, *J. Magn. Magn. Mater.* 194, 45-52).

50

55

Además, partículas tales como óxido de hierro reticulado (CLIO) (Wunderbaldinger, P. *et al.*, 2002, *Acad. Radiol.*, 9, S304-S306; Schellenberger, E.A. *et al.*, 2002, *Mol. Imaging*, 2, 102-107), óxido de hierro superparamagnético ultrapequeño (USPIO) (Kooi, M.E. *et al.*, 2003, *Circulation*, 107, 2453-2458; Keller, T.M. *et al.*, 2004, *Eur. Radiol.*, 14, 937-944) y nanopartículas monocristalinas de óxido de hierro (MION) (Funovics, M.A. *et al.*, 2004, *Magn. Reson. Imaging*, 22, 843-850; Krause, M.E. *et al.*, 2004, *Magn. Reson. Imaging*, 22, 779-787) se han desarrollado todas ellas como agentes de obtención de imágenes en imágenes de resonancia magnética (IRM). Dependiendo de las funcionalidades de superficie introducidas en la superficie de la partícula, es probable que algunas de las partículas se capten por macrófagos y células inmunitarias, y pueden usarse para obtener imágenes de ganglios linfáticos y tejidos inflamatorios. En otros estudios, se unieron ligandos específicos sobre la superficie de la partícula, con el fin de obtener imágenes del patrón de localización de las moléculas diana (Schellenberger, E.A. *et al.*, 2002, *Mol.*

60

65

Imaging, 2, 102-107).

Por lo demás, las nanopartículas magnéticas pueden recubrirse con sílice y la superficie de sílice hidrolizada contiene una alta cobertura de grupos silanol, que pueden anclarse fácilmente con químicas de superficie genéricas y definidas (Laurent, S. *et al.* 2008, *ref. cit.*).

Sin embargo, la síntesis de nanopartículas superparamagnéticas es un procedimiento complejo debido a la naturaleza coloidal de sus dispersiones. El primer reto químico principal consiste en encontrar las condiciones experimentales que conducen a una población monodispersa de granos magnéticos de tamaño adecuado. El segundo punto crítico es identificar un procedimiento reproducible que pueda industrializarse sin ningún procedimiento de purificación complejo, tal como ultracentrifugación, cromatografía de exclusión molecular, filtración magnética o gradiente de campo de flujo. Además, las nanopartículas no deben agregarse en agua y deben formar suspensiones estables en agua.

Sumario de la invención

Para hacer frente a los inconvenientes de las técnicas anteriores para obtener nanopartículas monodispersas de óxido de hierro en agua, la presente invención proporciona un método de preparación de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro de maghemita y las propias nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro de maghemita. Se ha mostrado que el método y las nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro de maghemita pueden cumplir las necesidades indicadas anteriormente. Además, el método de la invención proporciona nanopartículas de maghemita que pueden unirse a moléculas, tales como sondas y/o biomoléculas, sin ninguna modificación de superficie, de manera fácil y reversible. Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un método sencillo y económico para preparar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro de maghemita.

Aún, otro objeto de la presente invención es proporcionar nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro de maghemita, donde dichas nanopartículas son altamente monodispersables en suspensión acuosa y adecuadas para unirse a moléculas orgánicas y/o biológicas sin ninguna modificación de superficie.

Por tanto, en un primer aspecto un objeto de la presente invención es un método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que comprende las etapas de:

a) reducir iones $\text{Fe}^{(3+)}$ tratando a temperatura ambiente disoluciones acuosas de sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ con una disolución acuosa en amoníaco de borohidruro de sodio (NaBH_4) y luego calentando la mezcla de reacción hasta 100°C y manteniendo la misma a esta temperatura durante un tiempo comprendido entre 0,5 y 5,0 horas, produciendo una composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$;

b) oxidar la composición a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ obtenida en a) envejeciendo con agitación, a temperatura ambiente, una suspensión acuosa de dicha composición durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas, lo que conduce a una composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro;

c) envejecer la composición de materia a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ que comprende las nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro con agitación a temperatura ambiente de una suspensión acuosa de las mismas durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas, obteniendo composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color marrón rojizo;

d) separar y lavar las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométrica obtenidas.

Todo el procedimiento se realiza bajo una atmósfera de aire y luego, en presencia de oxígeno, siendo el oxígeno un elemento necesario para las etapas de envejecimiento. Opcionalmente, con el fin de aislar los productos intermedios de la composición de materia a base de Fe del procedimiento que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ y/o la composición de materia a base de Fe que consiste esencialmente en nanopartículas de maghemita a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro, puede añadirse una primera etapa de separación y lavado entre las etapas a) y b) logrando un material de nanopartícula amorfa que contiene $\text{Fe}^{(0)}$, siendo este material un producto intermedio caracterizado por una alta estabilidad a temperatura ambiente en condiciones secas, pudiendo añadirse una segunda etapa de separación y lavado entre las etapas b) y c) logrando un material de nanopartícula de maghemita sustancialmente pura a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro.

Además opcionalmente, la etapa c) puede sustituirse alternativamente por una etapa de recocido que consiste en calentar la composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas de maghemita a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro obtenida en la etapa b) a temperaturas comprendidas entre 350 y 450°C durante un tiempo comprendido entre 20 min y 2 horas. Con el método de preparación dado a conocer en el presente documento, pueden obtenerse nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura.

Por tanto, en un segundo aspecto, un objeto adicional de la presente invención son nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ caracterizadas por:

5 - la fórmula estequiométrica de $(\text{Fe}^{3+})_T(\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{O}_{1/3})_H\text{O}_4$, en la que "o" significa huecos, y T y H la disposición tetraédrica y octaédrica, tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer de campo cero y en campo (5 T) en el intervalo de temperatura de 5 – 300°K;

- una distribución de tamaños comprendida en un intervalo de desde 5 hasta 50 nm.

10 Las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ estequiométricamente pura de la invención presentan una característica de magnetización típica de la maghemita y su propia característica de potencial de superficie.

15 Por tanto, las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ estequiométricamente pura se caracterizan adicionalmente por:

- una magnetización máxima y una mínima (a + 7 y - 7 T) a 2°K de 77 y - 77 Am²/kg (emu/g), respectivamente, una coercitividad, en las mismas condiciones, de 2,76 y -2,76 A/m (220 y -220 Oe) y una magnetización residual de 21 y - 21 Am²/kg (emu/g); y

20 - un potencial de superficie zeta (ζ) (como potencial electrocinético en sistemas coloidales), medido en tampón fosfato de potasio a pH 7,4, en un intervalo de -10 a -30 mV).

25 Estas nanopartículas de maghemita preparadas con el método de la invención tienen, en particular, un tamaño medio de desde 10 hasta 12 nm, un índice de polidispersidad comprendido entre 1,02 y 1,05 y están caracterizadas por un comportamiento químico específico, tal como la capacidad para formar suspensiones coloidales estables en agua y para unirse de manera reversible a moléculas orgánicas y biológicas.

30 Características principales adicionales de las nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura mencionadas anteriormente son: i) la propiedad de formar suspensiones estables en agua sin ninguna modificación de superficie para estabilizar dichas nanopartículas obtenidas; y ii) la alta capacidad de formar monodispersiones en agua que tienen el índice de polidispersidad indicado anteriormente, tal como se muestra mediante microscopía electrónica de transmisión. Estas nanopartículas desnudas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométrica pueden unirse de manera reversible a numerosas moléculas orgánicas y biológicas, de nuevo sin ninguna modificación de superficie protegiendo la macromolécula. En particular, muestran alta afinidad hacia grupos amino, fosfato y carboxílico. Este tipo de nanopartículas desnudas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) es estequiométrica son estables en suspensión y, al presentar un alto momento magnético promedio, pueden dirigirse fácilmente por un imán.

40 Estas propiedades de las nanopartículas superparamagnéticas a base de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométrica pura según la invención hacen que las mismas sean particularmente útiles como nanoportadores que pueden dirigirse magnéticamente *in situ* para moléculas orgánicas y/o biomoléculas y una combinación de las mismas, tal como sondas detectables, en particular sondas fluorescentes, ATP, ADP, AMP, ácidos nucleicos (secuencias seleccionadas de ADN y ARN), péptidos, proteínas, enzimas y anticuerpos.

45 En lo que respecta al uso, de hecho, las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura de la invención pueden unirse de manera reversible, sin ninguna modificación de superficie, a varias moléculas, tanto orgánicas como biológicas, que tienen grupos funcionales amino, fosfato y carboxílico uniéndose a la(s) molécula(s) seleccionada(s), mediante enlaces de coordinación.

50 Por tanto, las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura de la invención can pueden usarse para desarrollar reactivos y procedimientos obtenidos por ejemplo para: i) detectar y/o aislar fácilmente moléculas biológicas, y en particular ADN, péptidos, proteínas, enzimas y anticuerpos de muestras biológicas; ii) preparar un nanoportador magnético para ligandos de enzimas, tales como sustratos o inhibidores; iii) preparar un portador de unión por afinidad para la purificación de enzimas de muestras biológicas; iv) preparar enzimas fluorescentes, que pueden dirigirse magnéticamente, inmovilizadas como catalizador; v) unirse a ATP del medio tamponado; vi) eliminar contaminantes medioambientales del agua y el suelo. Por tanto, las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura de la invención pueden usarse como: reactivos para la detección y la unión de moléculas orgánicas y/o inorgánicas; nanoportadores y/o nanocatalizadores, que pueden dirigirse incluso magnéticamente *in situ*; medios de amplificación magnética para detección piezoeléctrica.

60 Otras características y ventajas de la presente invención se describirán en la siguiente descripción detallada de realizaciones posibles, pero no exclusivas, de nanopartículas superparamagnéticas a base de óxido de hierro y de un método preparar las mismas. Las nanopartículas superparamagnéticas a base de óxido de hierro y el método de preparación de las mismas según la presente invención se proporcionan en el presente documento para fin ilustrativo y entonces no limitativo.

65

Breve descripción de las figuras

5 Figura 1: la figura muestra un ejemplo de un espectro de Mössbauer de composición de materia a base de hierro obtenida en la etapa a) del método de preparación de la invención tras la separación y los lavados (el producto 1 en la figura se indica como FeNV H₂). Se registró el espectro de Mössbauer de campo cero a 298 (temperatura ambiente) y 13°K en un modo de aceleración constante con una fuente de ⁵⁷Co(Rh) de 50 mCi. Los valores del desplazamiento de isómero se indican con respecto a α-Fe a temperatura ambiente.

10 Figura 2: la figura muestra un experimento de difracción de rayos X de polvo (XRD) llevado a cabo en la composición de materia a base de hierro obtenida en la etapa a) del método de preparación de la invención tras separación y lavados (producto 1). Se realizó el experimento con un instrumento X'Pert PRO de PANalytical (radiación K_α de Co) equipado con un detector X'Celerator. Se extendieron muestras en portaobjetos de Si de fondo cero y se examinaron por etapas en el intervalo de 2θ de 10-100° en etapas de 0,017° durante 720 s por etapa.

15 Figura 3: la figura muestra un ejemplo de una imagen representativa de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas superparamagnéticas de maghemita de color negro preparadas en la etapa b) según el método de la invención tras la separación y los lavados codificadas como producto 2.

20 Figura 4: la figura muestra un ejemplo de un espectro de Mössbauer de nanopartículas de óxido de hierro codificadas como producto 2 (en la figura se indican como FeNV-black). Se registró el espectro de Mössbauer de campo cero a 298 (temperatura ambiente) y 13°K en un modo de aceleración constante con una fuente de ⁵⁷Co(Rh) de 50 mCi. Los valores del desplazamiento de isómero se indican con respecto a α-Fe a temperatura ambiente.

25 Figura 5: la figura muestra un experimento de difracción de rayos X de polvo (XRD) llevado a cabo en nanopartículas de óxido de hierro codificadas como producto 2. Se realizó el experimento con un instrumento X'Pert PRO de PANalytical (radiación K_α de Co) equipado con un detector X'Celerator. Se extendieron las muestras sobre portaobjetos de Si de fondo cero y se examinaron por etapas en el intervalo de 2θ de 10-100° en etapas de 0,017° durante 720 s por etapa.

30 Figura 6: la figura muestra un ejemplo de una imagen representativa de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de nanopartículas superparamagnéticas de maghemita de color marrón rojizo, preparadas en la etapa d) según el método de la invención, codificadas como producto 3.

35 Figura 7: la figura muestra un ejemplo de una distribución dimensional representativa del producto 3, tal como se determina mediante análisis de imágenes mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

40 Figura 8: la figura muestra un ejemplo de un espectro de Mössbauer de nanopartículas de óxido de hierro codificadas como producto 3. Se registró el espectro de Mössbauer de campo cero y en campo (5 T) a 5°K en un modo de aceleración constante con una fuente de ⁵⁷Co(Rh) de 50 mCi. Los valores del desplazamiento de isómero se indican con respecto a α-Fe a temperatura ambiente.

45 Figura 9: la figura muestra un experimento de difracción de rayos X de polvo (XRD) llevado a cabo en nanopartículas de óxido de hierro codificadas como producto 3 (en la figura se indica como Fe_NV). Se realizó el experimento con un instrumento X'Pert PRO de PANalytical (radiación K_α de Co) equipado con un detector X'Celerator. Se extendieron las muestras sobre portaobjetos de Si de fondo cero y se examinaron por etapas en el intervalo de 2θ de 10-100° en etapas de 0,017° durante 720 s por etapa.

50 Figura 10: la figura muestra un ejemplo de un espectro de FTIR adquirido en la región de 400-800 cm⁻¹, en KBr de nanopartículas de óxido de hierro codificadas como producto 3.

Figura 11: esquema de un método para la detección de un antígeno por medio de las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita de la invención indicadas como FeN.

55 Definiciones

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en toda la descripción de la presente invención tienen los mismos significados tal como entiende dichos términos un experto habitual en la técnica a la que se refiere esta invención.

60 Por tanto, tal como se usa en el presente documento, las palabras "nanopartícula(s)" tienen el significado ampliado definido anteriormente.

65 Con el método de la presente invención se obtienen composiciones de materia a base de Fe que comprenden nanopartículas a base de Fe, en las que el hierro tiene estados de oxidación diferentes. Por tanto, por motivos de

claridad, las nanopartículas a base de Fe obtenidas mediante dicho método en la etapa a), la etapa b) y las etapas c) y d), se identifican en el presente documento haciendo referencia al estado de oxidación química de Fe más abundante.

5 En detalle, la composición de materia a base de hierro obtenida en la etapa a) comprende principalmente nanopartículas en estado metálico, es decir con estado de oxidación 0 (Fe^0) y hierro (III) (Fe^{3+}), tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer. Por tanto, estas nanopartículas se indican en el presente documento como nanopartículas que contienen (Fe^0) o como "producto 1".

10 En cuanto a la composición de materia a base de hierro obtenida en la etapa b), y también codificada en el presente documento como producto 2, tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer, consiste únicamente en maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) parcialmente cristalizada. Por tanto, para este producto se usan en el presente documento las definiciones "nanopartículas de maghemita a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro" o "nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro" o definiciones equivalentes o "producto 2".

15 En cuanto al producto a base de hierro de color marrón rojizo obtenido en la etapa c), también codificado en el presente documento como producto 3, tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer, consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita estequiométricamente pura caracterizadas por la fórmula estequiométrica de $(\text{Fe}^{3+})^T(\text{Fe}^{3+}_{5/3}\text{O}_{1/3})^H\text{O}_4$, en la que "o" significa huecos, y T y H disposición tetraédrica y octaédrica. Por tanto, para estas nanopartículas, pueden usarse las siguientes definiciones en el presente documento: "nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color marrón rojizo", "nanopartículas de maghemita de color marrón rojizo", "nanopartículas de maghemita estequiométrica" o "nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) es estequiométrica" o definiciones equivalentes o "producto 3".

25 El término "nanoportador/es" tiene en el presente documento el significado de "nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométrica pura" que se unen de manera reversible adicionalmente, sin ninguna modificación de superficie, a moléculas orgánicas y/o biomoléculas que pueden formar con las nanopartículas de maghemita enlaces de coordinación. En particular, preferiblemente las moléculas orgánicas y/o biomoléculas se seleccionan de sondas, lo más preferiblemente fluorescentes, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, anticuerpos, enzimas. Por tanto por ejemplo, se propone, pero sin limitarse a, uno de los significados siguientes:

30 - nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura que pueden portar ácidos nucleicos y en particular ADN o ARN monocatenario o bicatenario;

35 - nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura que pueden portar una enzima y que pueden usarse luego como portador de enzimas para nanocatalizadores que pueden dirigirse magnéticamente;

40 - nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura que pueden portar sondas fluorescentes, tales como por ejemplo isotiocianato de rodamina B (pero no fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina 110), y por tanto pueden producir un portador fluorescente que puede dirigirse magnéticamente, detectable por fluorescencia para que se administren específicamente *in situ* otras biomoléculas, por ejemplo para purificación de ADN o para nanoportador de enzimas;

45 - nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura que pueden portar anticuerpos para el reconocimiento y la detección de antígenos macromoleculares, tales como antígenos de cáncer.

El término "suspensión" indica un fluido heterogéneo que contiene partículas sólidas que son suficientemente grandes para sedimentación. La fase interna (sólido) se dispersa por toda la fase externa (fluido) a través de agitación mecánica. A diferencia de los coloides, las suspensiones finalmente sedimentan.

50 El término "coloide" indica una mezcla química en la que una sustancia sólida (*fase dispersa*) se dispersa uniformemente por todo un disolvente (*fase continua*).

55 El término "índice de polidispersidad" representa la medida de la distribución de tamaños de muestras de nanopartículas. El índice de polidispersidad (PDI) se calcula como el "tamaño promedio en peso" (M_w) dividido entre el "tamaño promedio en número" (M_n): $\text{PDI} = M_w/M_n$, en el que el "tamaño promedio en peso se define como $M_w = (\sum_i N_i \cdot M_i^2)/(\sum_i N_i \cdot M_i)$ y el "tamaño promedio en número" es $M_n = (\sum_i N_i \cdot M_i)/(Z_i N_i)$.

Descripción

60 La presente invención se refiere a un método sencillo y de bajo coste de preparación de nanopartículas superparamagnéticas de hierro altamente monodispersas, que consisten en maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) puramente estequiométrica, y caracterizado por la capacidad para formar un coloide estable en agua. Estas nanopartículas presentan la capacidad de interactuar con y unirse a numerosas moléculas orgánicas y biológicas sin ninguna modificación de superficie de la superficie de la partícula. El procedimiento de preparación objeto de la invención, tal

como se da a conocer anteriormente en el presente documento, es muy sencillo, económico y no requiere el uso de disolventes contaminantes, en comparación con otros métodos de preparación descritos en la bibliografía, que son bastante engorrosos, que necesitan reactivos o instrumentos costosos y grandes cantidades de disolventes orgánicos. Además, los métodos ya descritos en la bibliografía no informan sobre la posibilidad de preparar una suspensión estable de nanopartículas sin modificación de superficie de las nanopartículas, lo que aumenta la complicación de síntesis. En cuando a las nanopartículas de hierro disponibles comercialmente, hasta ahora sus dimensiones están en el intervalo de micrómetros, más que en el de nanómetros.

La presente invención dada a conocer en el presente documento proporciona un procedimiento químico novedoso para sintetizar nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura, dimensionalmente homogéneas, que superan las propiedades de los nanomateriales a base de maghemita descritos anteriormente.

Método de preparación de nanopartículas de maghemita

El método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) según la invención se caracteriza por una etapa de reducción de iones $\text{Fe}^{(3+)}$ realizada en condiciones apropiadas y esencialmente adecuada para obtener un material a base de Fe que comprende nanopartículas que contienen (Fe^0), siendo este material el producto intermedio clave para lograr las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ estequiométricamente pura perseguidas. En realidad, este material es muy estable y sometido adicionalmente a tratamientos de envejecimiento o recocido puede producir las nanopartículas a base de Fe ya mencionadas.

Por tanto, en una realización, el método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), según la invención, comprende las etapas de:

a) reducir iones $\text{Fe}^{(3+)}$ tratando a temperatura ambiente disoluciones acuosas de sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ con una disolución acuosa en amoníaco de borohidruro de sodio (NaBH_4) (intervalo de pH 7 - 9), y luego calentando la mezcla de reacción hasta 100°C y manteniendo la misma a esta temperatura durante un tiempo comprendido entre 0,5 y 5,0 horas obteniendo una composición de material a base de Fe que comprende nanopartículas que contienen (Fe^0) (producto 1);

b) oxidar la composición de material a base de Fe obtenido en a) envejeciendo con agitación a temperatura ambiente en una atmósfera que consiste en aire una suspensión acuosa de dicha composición durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas, lo que conduce a la oxidación de nanopartículas que contienen Fe^0 comprendidas en dicha composición para dar nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro (producto 2);

c) oxidar las "nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro" (producto 2) envejeciendo con agitación a temperatura ambiente una suspensión acuosa de las mismas durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas, o curando las "nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro" (producto 2) calentando las mismas a temperaturas comprendidas entre 350 y 450°C durante un tiempo comprendido entre 20 min y 2 horas, obteniendo una composición de material a base de Fe que comprende nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) esquequiométrica de color marrón rojizo (producto 3);

c) separar y lavar las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ estequiométricamente pura obtenidas en la etapa anterior.

En detalle, considerando estas etapas esenciales y las etapas de separación opcionales de los productos intermedios obtenidos en las etapas a) y b) el método es como se describe a continuación en el presente documento.

La primera etapa y clave del método según la invención es la etapa de reducción a) de sales de $\text{Fe}^{(3+)}$, en la que se seleccionan sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ de cloruro, sulfato, nitrato o perclorato y mezclas de las mismas. Las sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ son preferiblemente cloruros férricos y las sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ más preferidas para la etapa de reducción a) es $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Tras la disolución de las sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ en agua ultrapura, se añade NaBH_4 (1,3 - 1,6 moles de NaBH_4 /mol de $\text{Fe}^{(3+)}$) en amoníaco (4,5 - 5,0 moles de NH_3 /mol de $\text{Fe}^{(3+)}$). Una vez producida la reacción de reducción, el material a base de Fe se vuelve inmediatamente de color negro. Se aumenta la temperatura del sistema hasta 100°C y se mantiene constante durante 0,5 - 5 horas y preferiblemente durante 2 horas, dando tras la separación y los lavados un producto (producto 1) caracterizado por alta estabilidad y que puede almacenarse a temperatura ambiente, en condiciones secas, durante meses, manteniendo un fuerte comportamiento magnético y conteniendo nanopartículas de Fe^0 tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer. Si esta reducción se lleva a cabo a temperatura ambiente, el producto resultante es inestable en aire y tiende a oxidarse dando un material a base de hierro de color marrón no magnético en el plazo de pocas horas.

Al tener propiedades magnéticas, el producto 1 obtenido en la etapa a) puede aislarse fácilmente mediante la aplicación de un campo magnético externo y el material aislado puede lavarse a fondo con agua destilada. El material que consiste en nanopartículas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ puede almacenarse en condiciones secas.

- 5 Entonces, el producto 1, o la composición de materia a base de hierro que comprende el mismo, puede envejecerse, para la oxidación del hierro contenido en el material, durante 24-96 horas (y preferiblemente 48 horas) en agua a temperatura ambiente, dando una composición que consiste en nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ estables de color negro (producto 2). Opcionalmente, este producto de color negro oxidado envejecido puede separarse mediante la imposición de un imán externo. Puede desecharse el sobrenadante incoloro (que contiene sales). Se lavan las nanopartículas varias veces con agua. Las nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro, obtenidas tras el primer envejecimiento como tales, o aisladas tal como se describió anteriormente, pueden transformarse en un sistema de nanopartículas de color marrón rojizo denominado "producto 3" mediante un segundo tratamiento de envejecimiento en agua a temperatura ambiente durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas (y preferiblemente durante 48 horas). Alternativamente, el producto 3 puede producirse secando y curando el "producto 2" preferiblemente a 400°C durante 20 min - 2 horas. Al tener propiedades magnéticas dicho producto 3, se separa tal como se describió anteriormente para el producto 1 y se almacena para los usos previstos anteriormente en el presente documento.

Si se selecciona el envejecimiento como procedimientos adecuados para la(s) oxidación/es de las composiciones a base de Fe en el procedimiento de preparación de la maghemita estequiométricamente pura, pueden volver a unirse las etapas a) y b) en una única etapa que tiene una duración de tiempo de desde 3 hasta cinco 5 días (y preferiblemente durante 4 días).

Este procedimiento de síntesis es el preferido y una realización adicional de la invención, que es la que consume menos tiempo, mientras que el método, en el que se realizan dos etapas de oxidación, se usa en caso de que se persiga la separación del producto intermedio, el producto 2. Por tanto, manteniendo las mismas condiciones de funcionamiento mencionadas anteriormente, aún en una realización adicional, el método de preparación de nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ comprende:

- a) reducir iones $\text{Fe}^{(3+)}$ obteniendo una composición de material a base de Fe que comprende nanopartículas que contienen ($\text{Fe}^{(0)}$) (producto 1);
- b) separar y lavar el material a base de Fe que comprende nanopartículas que contienen ($\text{Fe}^{(0)}$) (producto 1) obtenido;
- c) oxidar las nanopartículas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ obtenidas en b) lo que conduce a nanopartículas de maghemita a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro (producto 2);
- d) separar y lavar las nanopartículas de maghemita a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro (producto 2) obtenidas;
- e) oxidar las nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro obteniendo una composición a base de hierro que comprende nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de color marrón rojizo (producto 3);
- f) separar y lavar las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura obtenidas en la etapa anterior.

Además, en la realización más preferida, el método de preparación de nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$:

- a) reducir iones $\text{Fe}^{(3+)}$ obteniendo una composición de material a base de Fe que comprende nanopartículas que contienen ($\text{Fe}^{(0)}$) (producto 1);
- b) oxidar las nanopartículas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ obtenidas en b) lo que conduce a la oxidación de nanopartículas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ para dar nanopartículas de maghemita a base de hierro $\text{Fe}^{(3+)}$ de color marrón rojizo (producto 3);
- c) separar y lavar las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) esquequiométrica obtenidas en la etapa anterior.

Caracterización de las nanopartículas a base de Fe obtenidas en las diferentes etapas del método de la invención

Los productos a base de hierro obtenidos en las diferentes etapas de la preparación tal como se describió anteriormente (es decir, productos 1, 2 y 3) se han caracterizado por medio de metodologías bien establecidas, tales como microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X de polvo (XRD) y espectroscopia de Mössbauer y los resultados obtenidos se comentan brevemente a continuación en el presente documento con referencia a las figuras adjuntas en el presente documento.

Producto 1: Según el espectro de Mössbauer adquirido a temperatura ambiente (figura 1) este material resultó

contener sustancialmente Fe⁽⁰⁾ y aleaciones del mismo y un residuo de material a base de Fe⁽³⁺⁾. Este producto 1 responde a un campo magnético aplicado externamente. El análisis de difracción de rayos X de polvo mostró que el material que contiene Fe⁽⁰⁾ presenta baja cristalinidad (figura 2). La lista de picos del difractograma mostrado en la figura 2 se indica a continuación en el presente documento en la tabla 1:

5

Tabla 1

Posición [°2Th.]	Altura (cuentas)	FWHM izquierda (°2Theta)	Separación d (Å)	Intensidad relativa Int. (%)
18,416230	3402,453000	0,389664	4,81772	25,56
23,724630	1701,102000	0,779328	3,75041	12,78
30,163310	3641,852000	0,454608	2,96292	27,36
35,746400	11552,84000	0,292248	2,51192	86,80
43,258260	6536,125000	0,389664	2,09154	49,11
44,929340	13310,39000	0,129888	2,01756	100,00
53,524310	1353,820000	0,649440	1,71210	10,17
57,226860	2929,332000	0,259776	1,60982	22,01
62,825700	4018,063000	0,584496	1,47915	30,19
65,076000	702,0669000	0,090000	1,43334	5,27
71,445000	854,8746000	0,090000	1,32041	6,42
74,415000	1352,768000	0,090000	1,27490	10,16
82,779640	2077,715000	0,649440	1,16600	15,61
90,189000	1011,127000	0,090000	1,08848	7,60

Producto 2: se caracterizó este producto mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) mostrando nanopartículas caracterizadas por un tamaño medio de desde 10 hasta 12 nm (figura 3). El análisis mediante espectroscopia de Mössbauer (figura 4) y difracción de rayos X de polvo (figura 5) indican que el producto 2 resultó estar constituido por nanopartículas de maghemita caracterizadas por baja cristalinidad.

10

Producto 3: se caracterizó mediante microscopía electrónica de transmisión, mediante espectroscopia infrarroja y de Mössbauer, mediante difracción de rayos X y mediciones de magnetización.

15

La figura 6 representa una microscopía electrónica de transmisión (TEM) del producto obtenido al final del procedimiento de síntesis objeto de la invención y la distribución dimensional del producto 3 se indica en la figura 7, en la que se muestra una a distribución del tamaño de dichas nanopartículas entre 7 y 15 nm. Además, se caracterizó el producto 3 mediante difracción de rayos X de polvo y mediante espectroscopia de Mössbauer. La difracción de rayos X de polvo se indica en la figura 9 y la lista de picos del difractograma mostrado en la figura 9 se indica a continuación en el presente documento en la tabla 2.

20

Tabla 2

Posición [°2Theta]	Altura (cuentas)	FWHM izquierda (°2Theta)	Separación d (Å)	Intensidad relativa Int. (%)
18,416460	1763,243000	0,382616	4,81368	5,87
18,429860	1583,721000	0,461266	4,81021	5,27
26,166680	1511,923000	0,472391	3,40286	5,03
30,292700	8341,333000	0,390781	2,94811	27,78
30,326260	9810,363000	0,480046	2,94493	32,67
30,369760	4147,272000	0,390848	2,94811	13,81
30,369760	2301,814000	0,480132	2,94811	7,66
30,403410	4876,945000	0,480199	2,94493	16,24
35,681900	30031,59000	0,395960	2,51423	100,00
35,689160	29585,56000	0,491702	2,51374	98,51
35,747180	13429,13000	0,491839	2,50979	44,72
35,773540	14928,02000	0,396056	2,51423	49,71
35,780810	14703,39000	0,491919	2,51374	48,96

35,839000	6673,969000	0,492057	2,50979	22,22
37,325460	2231,193000	0,397736	2,40721	7,43
37,353380	1749,323000	0,495740	2,40547	5,82
43,368640	6208,777000	0,405106	2,08475	20,67
43,467210	2469,025000	0,512353	2,08025	8,22
43,481870	3085,094000	0,405257	2,08475	10,27
53,811250	2587,297000	0,421270	1,70223	8,62
53,832230	3079,752000	0,547345	1,70162	10,26
53,895140	1547,382000	0,547585	1,69978	5,15
53,976810	1528,958000	0,547898	1,70162	5,09
57,366760	5926,141000	0,427888	1,60489	19,73
57,371790	6110,586000	0,561436	1,60476	20,35
57,412000	2123,650000	0,561603	1,60374	7,07
57,492350	3112,374000	0,561937	1,60169	10,36
57,522580	2942,866000	0,428193	1,60489	9,80
57,527620	3033,121000	0,562084	1,60476	10,10
57,648580	1544,886000	0,562588	1,60169	5,14
63,002770	11185,92000	0,439698	1,47420	37,25
63,078770	10158,09000	0,586694	1,47261	33,82
63,177330	5554,150000	0,440091	1,47420	18,49
63,253590	5041,223000	0,587520	1,47261	16,79
74,557930	2121,942000	0,469823	1,27176	7,07
74,597440	1923,467000	0,648531	1,27118	6,40
90,385200	2112,687000	0,528270	1,08572	7,03

La caracterización mediante espectroscopia de Mössbauer se realizó en el intervalo de temperaturas 5 – 300°K y los espectros de Mössbauer representativos se indican en la figura 8. El espectro de Mössbauer, adquirido a 5°K y en un campo de 5 T, está compuesto por dos componentes de sextete, que difieren en los parámetros de hiperfinos (es decir los valores del campo magnético hiperfino efectivo y desplazamiento de isómero). Los parámetros hiperfinos de Mössbauer de ambos sextetes, derivados del espectro de Mössbauer en campo a 5°K, corresponden a los parámetros indicados para maghemita, cuando el sextete 1 se atribuye a los iones Fe³⁺ en una configuración de estado de alto spin (es decir S = 5/2) que ocupa los sitios octaédricos de la estructura cristalográfica, mientras que el sextete 2 surge a partir de los iones Fe³⁺ en una configuración de estado de alto spin que se sitúa en los sitios tetraédricos de la estructura de espinela de la maghemita. La razón del área espectral del sextete octaédrico con respecto al área espectral de sextete tetraédrico es igual a 5:3, lo que refleja perfectamente la ocupación de sitios individuales mediante los iones Fe³⁺, que satisface la fórmula estequiométrica de (Fe³⁺)_T(Fe³⁺)_{5/3}(O_{1/3})_O₄, en la que "o" significa huecos. En otras palabras, tal como se muestra también mediante el patrón de difracción de rayos X de polvo (figura 9), la maghemita preparada es puramente estequiométrica.

El resumen de los resultados de Mössbauer obtenidos en los tres productos se indica a continuación en el presente documento en la tabla 3.

Tabla 3

Muestra	IS	QS	H	LW	A (%)	atribución
Producto 1	0,02	-0,01	32,30	0,27	6	Fe ⁽⁰⁾
	0,45	-0,10	42,60	1,56	18	Maghemita
	0,21	-0,09	16,10	2,33	74	Fe ⁽⁰⁾
	0,24	0,99	-	0,24	2	Fe ⁽⁰⁾
Producto 2	0,33	-0,00	49,20	0,59	60	Maghemita
	0,36	-0,02	45,00	0,97	40	Fe(III)
Producto 3	0,33	-0,04	47,53	0,62	41	Fe(III)
	0,37	-0,10	42,13	1,49	32	Maghemita
	0,35	0,68	-	0,71	27	

Se registró el espectro de Mössbauer de campo cero a 298°K en un modo de aceleración constante con una fuente de ⁵⁷Co(Rh) de 50 mCi. IS: desplazamiento de isómero, indicado con respecto a α-Fe a temperatura ambiente. QS: fraccionamiento en cuadrupolo; H: fraccionamiento de hiperfinos; LW: ancho de línea de pico; A (%): área de pico.

5 En la figura 10 se presenta el espectro de FTIR adquirido en la región de 400-800 cm⁻¹, del producto 3 granulado en KBr, que muestra las bandas de IR características de maghemita. Los espectros de infrarrojos de estas nanopartículas de maghemita estequiométrica, adquiridos en la región de 400-800 cm⁻¹, mostraron los rasgos característicos de maghemita (a 445 y 630 cm⁻¹) indicando los huecos de cationes (Roca, A.G. *et al.*, 2007, J. Phys. Chem. 111, 18577-18584; Daou, T.J. *et al.*, 2008, Chem. Mater. 20, 5869-5875).

10 Las características principales de las nanopartículas de hierro obtenidas con el método según la invención se resumen en la siguiente tabla 4.

Tabla 4

Muestra	Composición	Espectroscopia de Mössbauer	Cristalinidad (difracción de rayos X)
Producto 1	Composición de materia a base de Fe que comprende Fe ⁽⁰⁾ amorfo	Sustancialmente Fe ⁽⁰⁾ y aleaciones del mismo y un residuo de material a base de Fe ⁽³⁺⁾	Amorfa
Producto 2	Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas a base de Fe ⁽³⁺⁾ de color negro	Nanopartículas de maghemita	Baja cristalinidad
Producto 3	Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas a base de Fe ⁽³⁺⁾ de color marrón rojizo	Nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura.	Altamente cristalina

15 En lo que respecta a las mediciones de magnetización, un resumen de los resultados obtenidos mediante las mediciones de magnetización por SQUID (dispositivo superconductor de interferencia cuántica) en el producto 3 se indican en la tabla 7. La curva de magnetización isotérmica, adquirida a 2°K, muestra histéresis con parámetros de histéresis (es decir coercitividad y magnetización residual) característicos para maghemita a granel. El valor de la magnetización máxima a 7 T es ligeramente inferior que el indicado para maghemita a granel, lo que se produce por el tamaño nanométrico de las partículas (Fiorani, D., *et al.* 2002, Physica B, 320, 122-126).

Tabla 7

Muestra	T (K)	M _{máx+} (7 T) (Am ² /kg (emu/g))	M _{máx-} (7 T) (Am ² /kg (emu/g))	H _{C+} (A/m(Oe))	H _{C-} (A/m(Oe))	M _{R+} (Am ² /kg (emu/g))	M _{R-} (Am ² /kg (emu/g))
Producto 3	2	77,0685	-77,0685	2,76 (220)	2,85 (227)	20,6921	-21,0906
	300	71,3944	-71,3944	0,31 (25)	0,31 (25)	3,0324	-3,2147

25 Parámetros de bucles de histéresis de las nanopartículas de hierro, medidos a una temperatura de 2°K y 300°K, donde M_{máx+} (7 T) es una magnetización máxima a 7 T, M_{máx-} (7 T) des una magnetización máxima a -7 T, H_{C+} es una coercitividad positiva, H_{C-} es coercitividad negativa, M_{R+} es una magnetización residual positiva y M_{R-} es una magnetización residual negativa.

30 Las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita (γ-Fe₂O₃) esquequiométrica de la invención pueden derivatizarse superficialmente mediante simple incubación en agua, en el intervalo de pH 2-10, en presencia de la molécula seleccionada. Dependiendo de la concentración de las nanopartículas y de las moléculas seleccionadas, el proceso de unión llega a completarse en el plazo de pocas decenas de minutos (30-180 minutos). De esta forma, estas nanopartículas de maghemita estequiométrica pueden unirse a moléculas orgánicas y/o biomoléculas tales como ADN, proteínas (albúminas, peroxidasas) y fluoróforos (isotiocianato de rodamina). En el caso de biomoléculas que no pueden unirse directa y espontáneamente a dichas nanopartículas, puede usarse isotiocianato de rodamina como brazo separador, presentando la funcionalidad de isotiocianato a la que pueden unirse covalentemente grupos amino primarios de la molécula seleccionada.

40 Es posible funcionalizar la superficie de las nanopartículas con una baja cantidad de isotiocianato de rodamina B con el fin de garantizar una partícula fluorescente medible o de cubrir la nanopartícula completamente. En el primer caso, la superficie de la nanopartícula puede unirse a otras macromoléculas, tales como ADN y enzimas, mediante sus propiedades químicas de superficie peculiares. Mientras que en el segundo caso, el grupo isotiocianato del isotiocianato de rodamina B puede conducir a la formación de enlaces covalentes con otras sustancias (por ejemplo anticuerpos). De esta forma, en ambos casos, puede prepararse un nanoportador fluorescente, que puede dirigirse magnéticamente con una reacción fácil y rentable.

45 A continuación se describe un ejemplo típico del procedimiento de funcionalización: Se suspenden las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura de la invención (producto 3) en agua de calidad MilliQ a

una concentración de 10 - 200 mg/l mediante el tratamiento en un baño ultrasónico a 48 kHz, 50 W, durante al menos 3 horas. Como ejemplo, una disolución de 200 mg/l de nanopartículas se une a isotiocianato de rodamina 800 nM tras la incubación en presencia de rodamina 10 μ M durante 1 hora a temperatura ambiente. Alternativamente, las nanopartículas se unen a isotiocianato de rodamina 30 μ M tras la incubación en presencia de rodamina 300 μ M durante 3 horas.

Si es necesario, la molécula unida puede desprenderse fácilmente y liberarse en el medio, cambiando las características de la disolución. En particular, las moléculas unidas pueden liberarse en presencia de amoníaco (NH_3 0,5 M en agua) o en etanol al 96%. Dependiendo de la naturaleza de la biomolécula, estas nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura pueden usarse como nanoportador para:

- unión a ADN y ARN: las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura pueden usarse como sistema de purificación para ácidos nucleicos (ADN y ARN) de muestras biológicas y desprenderse fácilmente para la secuenciación o el análisis posterior. Además, aprovechando el proceso endocitótico celular, dichas nanopartículas que portan ADN unido pueden usarse como vector de transfección que puede dirigirse magnéticamente;

- unión a proteínas: las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita estequiométricamente pura pueden usarse para purificar y/o concentrar proteínas de disoluciones biológicas para el análisis posterior;

- unión a enzimas: las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura pueden usarse para la preparación de nanocatalizadores que pueden recuperarse magnéticamente.

En lo que respecta a la aplicación de las nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura de la invención para unirse a proteínas de muestras biológicas y para su purificación y análisis posteriores, resultan particularmente interesantes para la industria de enología. Las proteínas no son los componentes principales del vino, aunque son compuestos esenciales, contribuyendo a su calidad. De hecho, las proteínas del vino están implicadas en las propiedades de espumación de los vinos espumosos, en la estabilización de la precipitación de sal de ácido tartárico, en la interacción con compuestos volátiles del vino, en la disminución de la astringencia y la estabilidad de color del vino, y, desgraciadamente, en la formación de turbidez en vinos blancos.

Los estudios han demostrado que las proteínas del vino se originan principalmente a partir de la uva y las levaduras.

En la bibliografía, se logra un perfil de proteínas del vino según varios métodos para la preparación y la detección de proteínas del vino. Estos incluyen diálisis, ultrafiltración, precipitación, cromatografía de exclusión, electroforesis uni o bidimensional, electroforesis capilar, isoelectroenfoque, cromatografía de afinidad, inmunodetección, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida rápida de proteínas. Estos estudios indican que la mayoría de las proteínas del vino están en el intervalo de masa molecular de 20-30 kDa, y quedan por caracterizar las proteínas que son menos abundantes. Las nanopartículas de maghemita estequiométrica de la invención pueden usarse para unirse rápida y selectivamente a proteínas del vino para su detección e identificación mediante espectrometría de masas.

Adicionalmente, las nanopartículas de maghemita estequiométrica pueden usarse como *sistema de protección frente a mutágenos* contra todos los compuestos de cromo hexavalente, tales como $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, que es un potente carcinógeno. Las nanopartículas de maghemita pueden unirse a $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ disminuyendo la concentración en disolución del mutágeno, de este modo ejercer una protección contra la toxicidad del anión dicromato sobre este efecto se reveló en *Salmonella typhimurium* mediante la prueba de Ames.

Un uso adicional de estas nanopartículas de maghemita estequiométrica es la aplicación de las mismas como sistema de amplificación para inmunosensores de cristal de cuarzo.

Los inmunosensores de cristal de cuarzo se basan en la inmovilización de antígenos o anticuerpos en la superficie de un material piezoeléctrico. Entonces se modula la frecuencia de vibración intrínseca del soporte, tras la reacción de reconocimiento inmunológico. El inmunosensor piezoeléctrico, denominado microbalanza de cristal de cuarzo (QCM), es una técnica sensible y cuantitativa para la detección de la reacción química entre un anticuerpo y un antígeno en la superficie del cristal (Janshoff, A. y Steinem, C., 2005, *Methods Mol. Biol.*, 2005, 305, 47-64). La frecuencia resonante depende de la masa oscilante total y por tanto una masa adsorbida sobre la superficie puede detectarse como una disminución de la frecuencia. La aplicación de la técnica de QCM en el análisis de interacción de biomoléculas podría proporcionar una caracterización cuantitativa y dinámica precisa.

En los últimos años, se han aplicado ampliamente varios nanomateriales, con propiedades físicas, químicas y magnéticas únicas, en biotecnología para la inmovilización del anticuerpo secundario. La inmovilización de moléculas bioactivas sobre las superficies de nanopartículas magnéticas es de gran interés a este respecto, porque las propiedades magnéticas de estos bioconjugados prometen mejorar enormemente la administración y recuperación de biomoléculas en aplicaciones biomédicas. Se han propuesto nanopartículas superparamagnéticas de óxido de hierro, estabilizadas generalmente mediante una cubierta externa orgánica o inorgánica. Basándose en sus propiedades físicas, químicas, térmicas y mecánicas únicas, las nanopartículas compuestas

superparamagnéticas ofrecen oportunidades únicas en este campo.

5 El desarrollo de amplificación de inmunosensor que puede dirigirse por nanopartículas de hierro se logra mediante la conjugación de restos de selección como diana (anticuerpos) con la superficie de la partícula. Debido a la alta razón de área superficial con respecto al volumen de las nanopartículas, pueden unirse muchas copias de los ligandos. Si una partícula puede unirse a más de una molécula de anticuerpo, la afinidad de unión de las nanopartículas para la superficie de QCM aumenta espectacularmente.

10 La aplicación en este campo de la tecnología de las nanopartículas de maghemita estequiométrica de la invención proporciona una nueva generación de sistemas de amplificación para inmunosensores basados en QCM: el desarrollo de un inmunosensor basado en un transductor piezoeléctrico para determinar marcadores tumorales en sangre humana. El biosensor estará constituido por un anticuerpo primario inmovilizado en un cuarzo piezoeléctrico. Una vez que se ha hecho reaccionar el antígeno presente en la muestra con el anticuerpo primario, se añadirá un anticuerpo secundario unido a una nanopartícula a la disolución de prueba para potenciar la señal del sensor. En este caso, las nanopartículas de hierro magnéticas de la invención se usan con el fin de amplificar la señal.

15 Las nanopartículas superparamagnéticas de hierro estequiométricas (FeN) según la invención pueden usarse adicionalmente para desarrollar un nuevo método para detectar antígenos en disolución. El método implica la presencia de un anticuerpo primario unido a la superficie de un cristal piezoeléctrico y un segundo anticuerpo unido en nanopartículas magnéticas de hierro (FeN). En presencia del antígeno específico, se forma un sándwich (véase el esquema en la figura 11).

25 La señal de respuesta de la detección piezoeléctrica se amplificará imponiendo un campo magnético externo que, al interactuar con las nanopartículas magnéticas unidas a la superficie del cristal piezoeléctrico, amortiguarán las oscilaciones del cristal. La señal adquirida dependerá de la cantidad de nanopartículas magnéticas unidas a la superficie del cristal, lo que dependerá de la concentración de antígeno en disolución, y de la intensidad del campo magnético externo. En este último caso, la intensidad del campo puede variarse para adaptar la sensibilidad del dispositivo con el fin de optimizar la sensibilidad del sistema en el intervalo de concentración de analito específico.

30 Pueden extraerse algunas consideraciones sobre la ventaja de la síntesis de nanopartículas según la presente invención.

Economía

35 El procedimiento de síntesis propuesto es muy rentable. La mayoría de los procedimientos ya propuestos dirigidos a la síntesis de nanopartículas de hierro implican la utilización de disolventes orgánicos de alta pureza y/o un entorno libre de oxígeno, tensioactivos de alto coste o instrumentos caros. En el presente caso, la síntesis se lleva a cabo en agua, sin productos químicos específicos y caros y en condiciones atmosféricas.

40 *No se producen materiales peligrosos durante la síntesis*

La síntesis de nanopartículas se desarrolla en un entorno líquido (agua) y se evita la liberación de polvo fino, incluyendo nanopartículas, al aire.

45 *Materiales y síntesis más seguros*

Toda la síntesis se lleva a cabo en agua, evitando el empleo de disolventes orgánicos inflamables y, al mismo tiempo, se concibió con el fin de evitar la generación de desechos.

50 *Uso reducido de reactivos y derivados*

Los procedimientos de auto-montaje ascendente no requieren el uso de técnicas de protección/desprotección y otras asociadas usadas en la química orgánica tradicional. Toda la síntesis es muy sencilla.

55 Los siguientes ejemplos se facilitan para una comprensión más completa de la presente invención y se exponen para ilustrar la invención y no pretenden limitar el alcance de la misma, porque son posibles variaciones de la presente invención.

Ejemplos

60 *Ejemplo 1: preparación de nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura*

65 Se disolvió $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10,0 g, 37 mmol) en agua de calidad MilliQ (800 ml) con agitación vigorosa a temperatura ambiente. Entonces se añadió rápidamente disolución de NaBH_4 (2 g, 53 mmol) en amoníaco (3,5%, 100 ml) a la mezcla. El sistema se volvió inmediatamente de color negro. Poco después de que se produjera la reacción de reducción, se aumentó la temperatura de la mezcla de reacción hasta 100°C y se mantuvo constante durante 0,5 - 5

horas. Se obtuvo un primer producto (codificado como producto 1) que contenía nanopartículas a base de $\text{Fe}^{(0)}$. Se envejeció el producto 1, tal como se preparó, durante 24-96 horas en agua a temperatura ambiente, lo que dio una preparación de nanopartículas que contenía $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro (producto 2). Se separó este producto de color negro envejecido mediante la imposición de un imán externo. Se desechó el sobrenadante incoloro (que contenía sales). Se lavaron las nanopartículas que contenían Fe de color negro varias veces con agua. Se transformó la preparación de nanopartículas de color negro denominada "producto 2" en nanopartículas de color marrón rojizo denominadas "producto 3" mediante envejecimiento en agua a temperatura ambiente durante un tiempo de 24-96 horas.

10 Se separó el producto 3 mediante la imposición de un campo magnético y se lavó a fondo con agua. El polvo resultante mostró una respuesta magnética con la exposición a un campo magnético. La masa final del producto 3 fue de 2 g (12,5 mmol) de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y se calculó un rendimiento del 68%.

15 *Ejemplo 2: preparación de nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura*

Alternativamente, puede aplicarse el mismo procedimiento del ejemplo 1 hasta que pueda producirse la preparación de producto 2 y producto 3 mediante el secado y el curado del producto 2 a 400°C durante 20 min - 2 horas. Durante el procedimiento de curado a alta temperatura, el producto se volvió de color marrón rojizo. El polvo resultante mostró una respuesta magnética con la exposición a un campo magnético. La masa final del producto 3 fue de 2,0 g (12,5 mmol) de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ y se calculó un rendimiento del 68%.

20 *Ejemplo 3: preparación de isotiocianato de rodamina B unido a nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura*

25 Pueden derivatizarse nanopartículas de maghemita (producto 3) superficialmente y de manera reversible mediante simple incubación en agua, en el intervalo de pH 2-10, en presencia de isotiocianato de rodamina B. Dependiendo de la concentración de nanopartículas e isotiocianato de rodamina B, el proceso de unión llega a completarse en el plazo de 30 de minutos.

30 Como ejemplo, una suspensión (50 ml) de 100 mg/l de nanopartículas se une a isotiocianato de rodamina B $2,5 \mu\text{M}$ (125 nmol) tras la incubación en presencia de isotiocianato de rodamina B $10 \mu\text{M}$ (500 nmol) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un experimento representativo, mediante espectrofotometría. Alternativamente, una suspensión (50 ml) de nanopartículas (100 mg/l) se une a isotiocianato de rodamina B $30 \mu\text{M}$ ($1,5 \mu\text{mol}$) tras la incubación en presencia de rodamina $300 \mu\text{M}$ ($15 \mu\text{mol}$) durante 3 horas. El isotiocianato de rodamina B unido a nanopartículas de maghemita (producto 3) puede liberarse completamente en disolución mediante la adición de amoníaco $0,5 \text{ M}$ (pH 8,0), concentración final.

35 *Ejemplo 4: preparación de glucosa oxidasa unida a nanopartículas de maghemita funcionalizadas con isotiocianato de rodamina B.*

40 En el caso de la glucosa oxidasa, la reacción de unión se realiza añadiendo $5 \mu\text{mol}$ de glucosa oxidasa a 50 ml de una suspensión que contiene nanopartículas de maghemita 200 mg/l unidas a isotiocianato de rodamina B $2,5 \mu\text{M}$ en NaHCO_3 $0,1 \text{ M}$ y agitando la suspensión durante 2 h a temperatura ambiente. Se eliminó la enzima no unida mediante lavado a fondo de las nanopartículas mediante la aplicación de un campo magnético externo. La enzima unida a las nanopartículas de maghemita funcionalizadas con isotiocianato de rodamina B dio como resultado $100 - 150 \text{ mg/g}$ de nanopartículas. La actividad catalítica de la enzima inmovilizada, medida monitorizando la producción de peróxido de hidrógeno durante la oxidación enzimática de glucosa mediante espectrofotometría es del 20 - 30% con respecto a la actividad mostrada por la enzima libre en disolución. Pueden usarse nanopartículas de maghemita que portan glucosa oxidasa inmovilizada para la preparación de nanocatalizadores que pueden recuperarse magnéticamente.

45 *Ejemplo 5: preparación de ADN unido a nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura*

50 Pueden derivatizarse nanopartículas paramagnéticas de maghemita superficialmente y de manera reversible mediante simple incubación en agua, en el intervalo de pH 2-10, en presencia de ADN. De esta forma, puede prepararse un nanoportador que puede dirigirse magnéticamente.

55 Como ejemplo, una suspensión (1 ml) de 200 mg/l de nanopartículas (producto 3) en tampón fosfato de potasio $0,1 \text{ M}$ a pH 7,0, se une a $6,2 \mu\text{g}$ de ADN, tras la incubación en presencia de $10 \mu\text{g}$ de ADN durante 1 hora a temperatura ambiente. Se determinó la concentración de ADN mediante espectrofotometría. El ADN unido puede eliminarse de la superficie de la nanopartícula mediante la adición de amoníaco $0,5 \text{ M}$ (pH 8,0).

60 Unión a ADN y ARN: las nanopartículas pueden usarse como sistema de purificación para ácidos nucleicos (ADN y ARN) de muestras biológicas y desprenderse fácilmente para la secuenciación o el análisis posterior. Además, aprovechando el proceso endocitótico celular, las nanopartículas que portan ADN unido pueden usarse como vector

de transfección que puede dirigirse magnéticamente.

Ejemplo 6: preparación de un sistema de purificación de proteínas basado en nanopartículas de maghemita estequiométricamente pura

5 Como ejemplo de purificación de proteínas: se incubaron 100 ml de vino tinto durante la noche en presencia de 200 mg de nanopartículas de maghemita (producto 3). Tras el periodo de incubación, se lavaron las nanopartículas 3 veces en agua (en el plazo de 9 horas) con el fin de eliminar el material no unido, y luego se trataron a 100°C en presencia de NH₃ 0,5 M durante 30 min. Diferentes proteínas (11 proteínas diferentes tal como se reveló mediante análisis de espectrometría de masas) se unen a las nanopartículas. Estas proteínas pueden desprenderse de la superficie de la nanopartícula mediante tratamiento con amoníaco. Las proteínas pueden determinarse e identificarse mediante análisis de espectrometría de masas.

Ejemplo 7: aplicación como sistema de amplificación para microbalanza de cristal de cuarzo

15 Se usó una microbalanza de cristal de cuarzo, QCMagic, de Elbotech (Italia) interconectada a un PC de control por medio del puerto USB, equipada con cámara de reacción de flujo continuo de volumen bajo, que aloja el cristal oscilador. El recipiente unitario se ajustó para trabajar a 10 MHz.

20 Como ejemplo, se derivatizó la superficie de oro, que constituye el contacto eléctrico del cristal oscilador, mediante su incubación en presencia de una disolución etanólica de mercaptoetilamina 10 mM con el fin de inmovilizar una monocapa de mercaptoetilamina sobre la superficie de cristal de oro según Chaki (Chaki N. K. y Vijayamohan K., Bios. Bioelectron, 2002, 17, 1-12). Se derivatizó la superficie de oro modificada del cuarzo que porta grupos amino terminales, mediante química de carbodiimida (Nakajima, N. y Ikada, Y, Bioconjug Chem., 1995, 6, 123-128), con el fin de inmovilizar la biotina sobre la superficie del cristal.

30 Se conectó el cristal de cuarzo modificado a la microbalanza de cristal de cuarzo, QCMagic (de Elbotech, Italia) y se insertó en una celda de flujo que funcionaba a 1 ml/h mediante el uso de una bomba de jeringuilla, usando tampón potasio 0,1 M, pH 7,0, como disolución portadora. Se conectó la celda de flujo a una válvula de inyección, equipada con un bucle de muestra de 100 µl. Se trató el cristal de cuarzo derivatizado con biotinilo con una disolución de avidina (5 µg/ml) con el fin de unirse a la biotina inmovilizada sobre la superficie del cristal. Se reconoció la biotina mediante avidina, siendo la constante de disociación $K_D \approx 10^{-15}$ M, que lo convierte en uno de los enlaces no covalentes conocidos más fuertes. La avidina es una proteína tetramérica que contiene cuatro subunidades idénticas (homotetrámero), pudiendo unirse cada una de ellas a una molécula de biotina con alto grado de afinidad y especificidad. Tras la inyección de la disolución de avidina, la frecuencia de resonancia cambió en aproximadamente 2-5 Hz. En presencia de una disolución de nanopartículas superparamagnéticas de maghemita derivatizadas con biotinilo preparada previamente, las partículas de maghemita modificadas se unieron a la avidina inmovilizada sobre la superficie del cristal, lo que condujo a un cambio en la frecuencia de resonancia del cristal piezoeléctrico de 40 – 50 Hz. La respuesta del cristal con la unión de la nanopartícula puede amplificarse mediante la aplicación de un campo magnético externo. En las condiciones descritas, se amplificó la variación de frecuencia de resonancia del cristal 3 veces mediante la aplicación de un imán externo a 2 cm.

Ejemplo 8: aplicación como sistema de protección frente a mutágenos

45 El cromo es un material industrial vital para el que no hay un sustituto disponible. Se ha detectado ampliamente cromo en aguas subterráneas y suelos, particularmente en sitios asociados con revestimiento metálico, procesamiento de madera, curtido, inhibición de la corrosión metálica y producción de pigmentos. El cromo existe en aguas naturales principalmente en los estados de valencia +3 y +6. El cromo hexavalente (Cr (VI)), tal como cromato [CrO₄²⁻, HCrO₄⁻] es un reactivo altamente soluble y móvil en sistemas acuáticos. En comparación con las especies de Cr (III) mucho menos solubles, las especies de Cr (VI) son mucho más móviles, tóxicas y carcinogénicas.

El saneamiento de suelo y aguas subterráneas contaminadas con cromo ha seguido en gran medida la ruta de reducción y precipitación/inmovilización.

55 Las nanopartículas de maghemita estequiométrica, debido a su alta razón de superficie con respecto a volumen, pueden inmovilizar el Cr (VI) y pueden usarse como sistema de protección contra el efecto mutagénico del ion dicromato.

60 Como ejemplo, cuando se añade Cr₂O₇²⁻ (40 µM) a un cultivo de *Salmonella typhimurium* (cepa TA 100), induce directamente mutaciones génicas. Un efecto mutagénico de este tipo de K₂Cr₂O₇, medido mediante una prueba de Ames, puede invertirse de manera dependiente de la dosis en función de la concentración de nanopartículas de maghemita. A una dosis por encima de 4,5 mg/l, las nanopartículas inhiben completamente el efecto mutagénico del dicromato de potasio, lo que sugiere su utilización como un sistema de protección contra esta sustancia mutagénica en el entorno.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) que comprende las etapas de:

a) reducir iones $\text{Fe}^{(3+)}$ para dar una composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ tratando a temperatura ambiente disoluciones acuosas de sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ con una disolución acuosa en amoniaco de borohidruro de sodio (NaBH_4) y luego calentando la mezcla de reacción hasta 100°C y manteniendo la misma a esta temperatura durante un tiempo comprendido entre 0,5 y 5,0 horas;

b) oxidar la composición a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ obtenida en a) para dar una composición de materia a base de Fe que comprende las nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro envejeciendo con agitación, a temperatura ambiente, una suspensión acuosa de dicha composición durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas;

c) envejecer la composición de materia a base de Fe que comprende las nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro obtenida en b) para dar nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura con agitación a temperatura ambiente de una suspensión acuosa de las mismas durante un tiempo comprendido entre 24 y 96 horas; o recociendo mediante calentamiento la composición de materia a base de Fe que comprende las nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro obtenida en b) a temperaturas comprendidas entre 350° y 450°C durante un tiempo comprendido entre 20 min y 2 horas;

d) separar y lavar las nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) estequiométricamente pura obtenidas.

2. Método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) según la reivindicación 1, en el que, cuando la etapa c) es una etapa de envejecimiento, se combinan las etapas b) y c) en una única etapa de envejecimiento realizada durante un tiempo comprendido entre 3 y 5 días.

3. Método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) según la reivindicación 1, en el que se añaden etapas adicionales de separación y lavado para aislar los productos intermedios composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ y/o composición de materia a base de Fe que consiste en las nanopartículas de maghemita que contienen $\text{Fe}^{(3+)}$ de color negro.

4. Método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) según la reivindicación 1, en el que la razón $\text{NaBH}_4/\text{Fe}^{(3+)}$ es de desde 1,3 hasta 1,6 mol de NaBH_4/mol de $\text{Fe}^{(3+)}$ y la razón $\text{NH}_3/\text{Fe}^{(3+)}$ es de desde 4,5 hasta 5,0 mol de NH_3/mol de $\text{Fe}^{(3+)}$.

5. Método para preparar nanopartículas superparamagnéticas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) según la reivindicación 1, en el que las sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ son cloruros.

6. Composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ obtenidas reduciendo iones $\text{Fe}^{(3+)}$ tratando a temperatura ambiente disoluciones acuosas de sales de $\text{Fe}^{(3+)}$ con una disolución acuosa en amoniaco de borohidruro de sodio (NaBH_4) y luego calentando la mezcla de reacción hasta 100°C y manteniendo la misma a esta temperatura durante un tiempo comprendido entre 0,5 y 5,0 horas, en la que la razón $\text{NaBH}_4/\text{Fe}^{(3+)}$ es de desde 1,3 hasta 1,6 mol de NaBH_4/mol de $\text{Fe}^{(3+)}$ y la razón $\text{NH}_3/\text{Fe}^{(3+)}$ es de desde 4,5 hasta 5,0 mol de NH_3/mol de $\text{Fe}^{(3+)}$.

7. Composición de materia a base de Fe que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ según la reivindicación 6, en la que dicha composición que comprende nanopartículas amorfas que contienen $\text{Fe}^{(0)}$ se caracteriza por un espectro de Mössbauer de campo cero de:

Desplazamiento de isómero	Fraccionamiento en cuadrupolo	Fraccionamiento de hiperfinos	Ancho de línea de pico	Área de pico (%)	Atribución
0,02	-0,01	32,30	0,27	6	$\text{Fe}^{(0)}$
0,45	-0,10	42,60	1,56	18	Maghemita
0,21	-0,09	16,10	2,33	74	$\text{Fe}^{(0)}$
0,24	0,99	-	0,24	2	$\text{Fe}^{(0)}$.

8. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obtenidas con el método de preparación según una de las reivindicaciones 1 a 5.

9. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según la reivindicación 8, caracterizada por:
- 5 - la fórmula estequiométrica de (Fe³⁺)^T(Fe³⁺_{5/3}o_{1/3})^HO₄, en la que "o" significa huecos, y T y H disposición tetraédrica y octaédrica, tal como se determina mediante espectroscopia de Mössbauer de campo cero y en campo (5 T) en el intervalo de temperatura de 5 – 298°K;
- una distribución de tamaños comprendida en un intervalo de desde 5 hasta 50 nm.
- 10 10. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según la reivindicación 9, caracterizada adicionalmente por:
- un tamaño medio de desde 10 hasta 12 nm;
- 15 - un índice de polidispersidad en agua comprendido entre 1,02 y 1,05.
11. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según la reivindicación 9, caracterizada adicionalmente por:
- 20 - una magnetización máxima y una mínima (a + 7 y - 7 T) a 2°K de 77 y - 77 (Am²/kg (emu/g)), respectivamente, una coercitividad, en las mismas condiciones, de 2,76 y -2,76 A/m (220 y -220 Oe) y una magnetización residual de 21 y - 21 (Am²/kg (emu/g)); y
- 25 - un potencial de superficie zeta (ζ) (como potencial electrocinético en sistemas coloidales), medido en tampón fosfato de potasio a pH 7,4, en un intervalo de -10 a -30 mV).
12. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según una de las reivindicaciones 8-11, para su uso como reactivos para la detección y/o la unión de moléculas orgánicas y/o inorgánicas.
- 30 13. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según una de las reivindicaciones 8-11, para su uso como nanoportadores y/o nanocatalizadores.
- 35 14. Composición de materia a base de Fe que consiste en nanopartículas superparamagnéticas de maghemita γ -Fe₂O₃ según una de las reivindicaciones 8-11, para su uso como medios de amplificación magnética para detección piezoeléctrica.

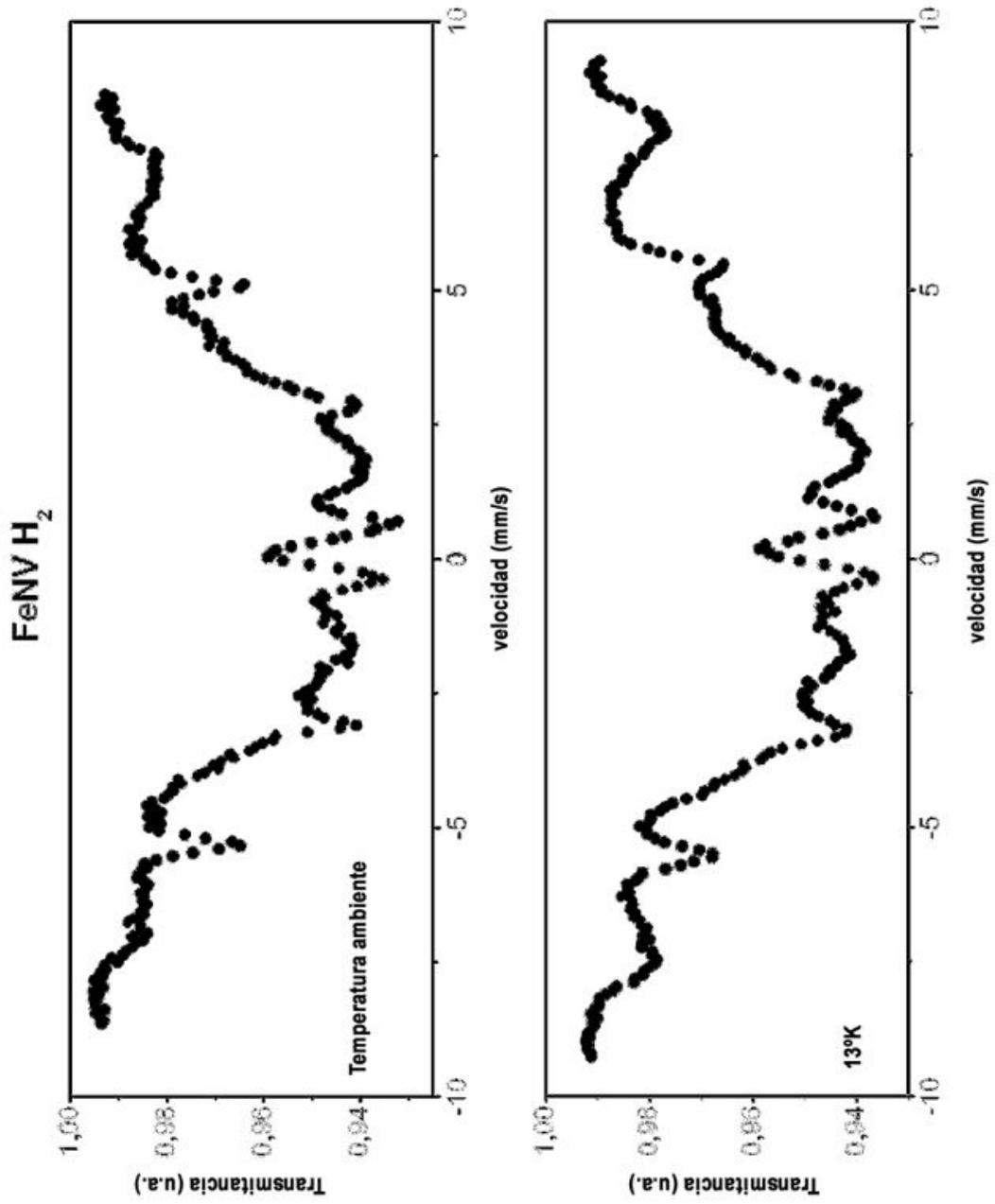


Figura 1

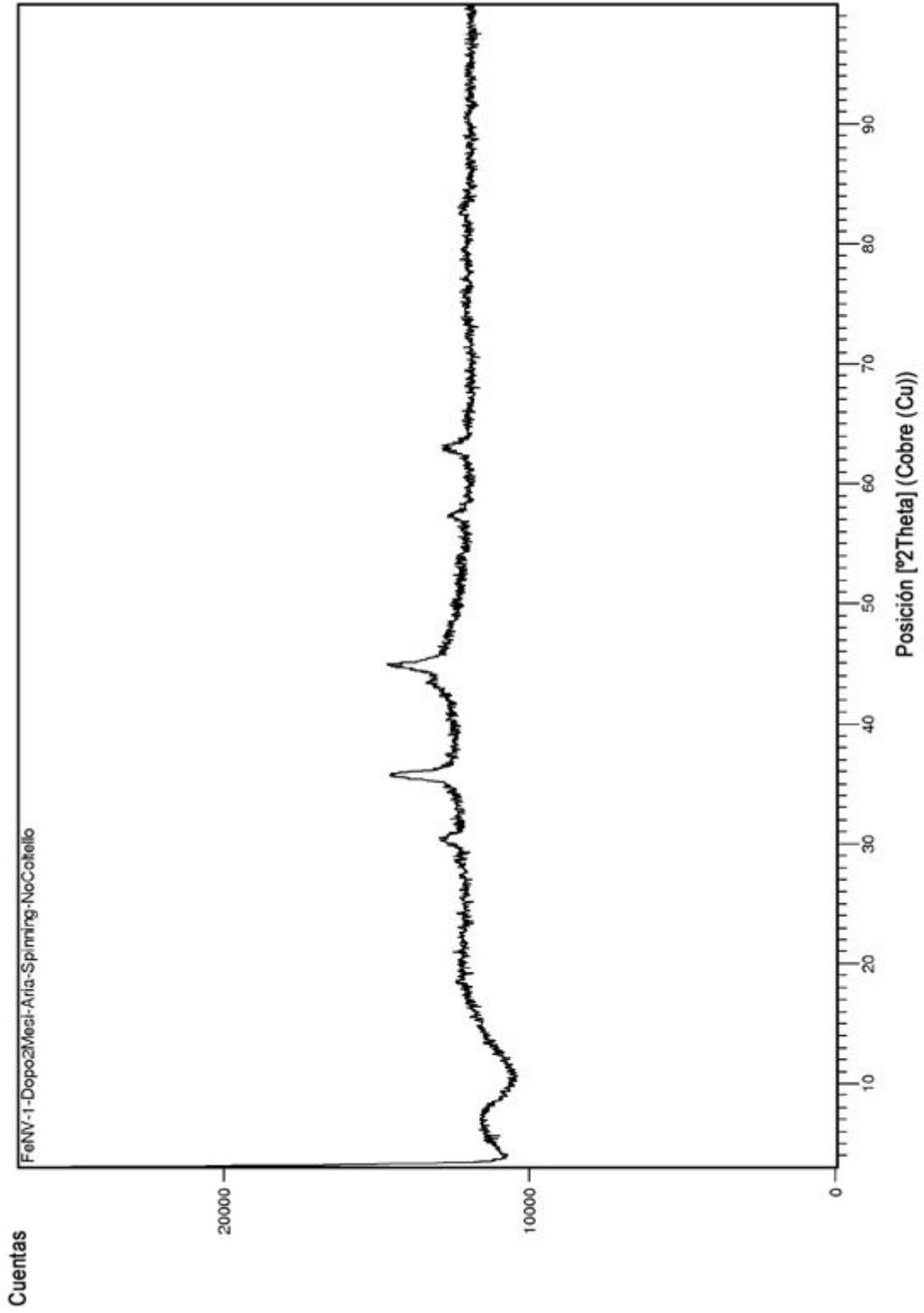


Figura 2

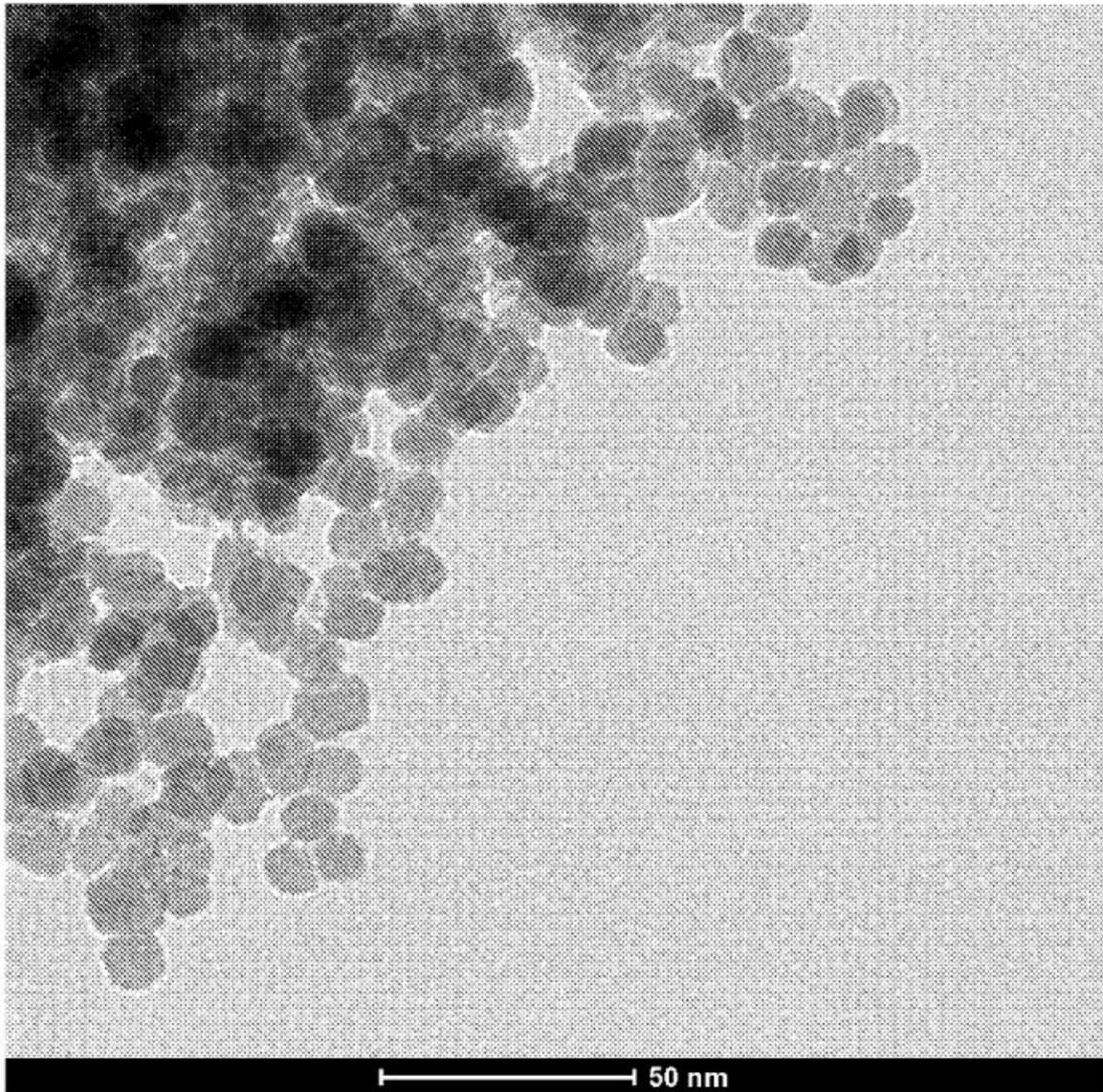


Figura 3

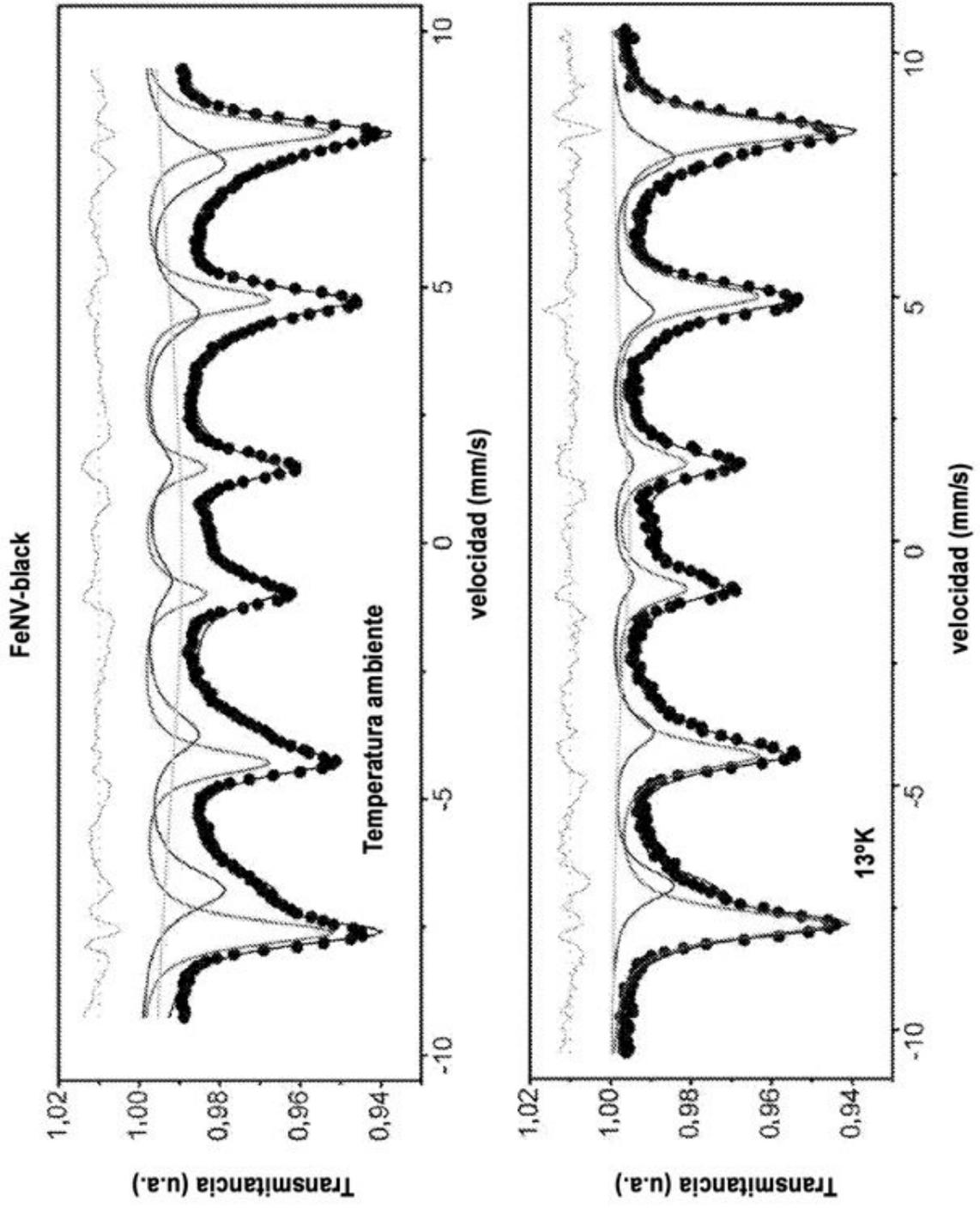


Figura 4

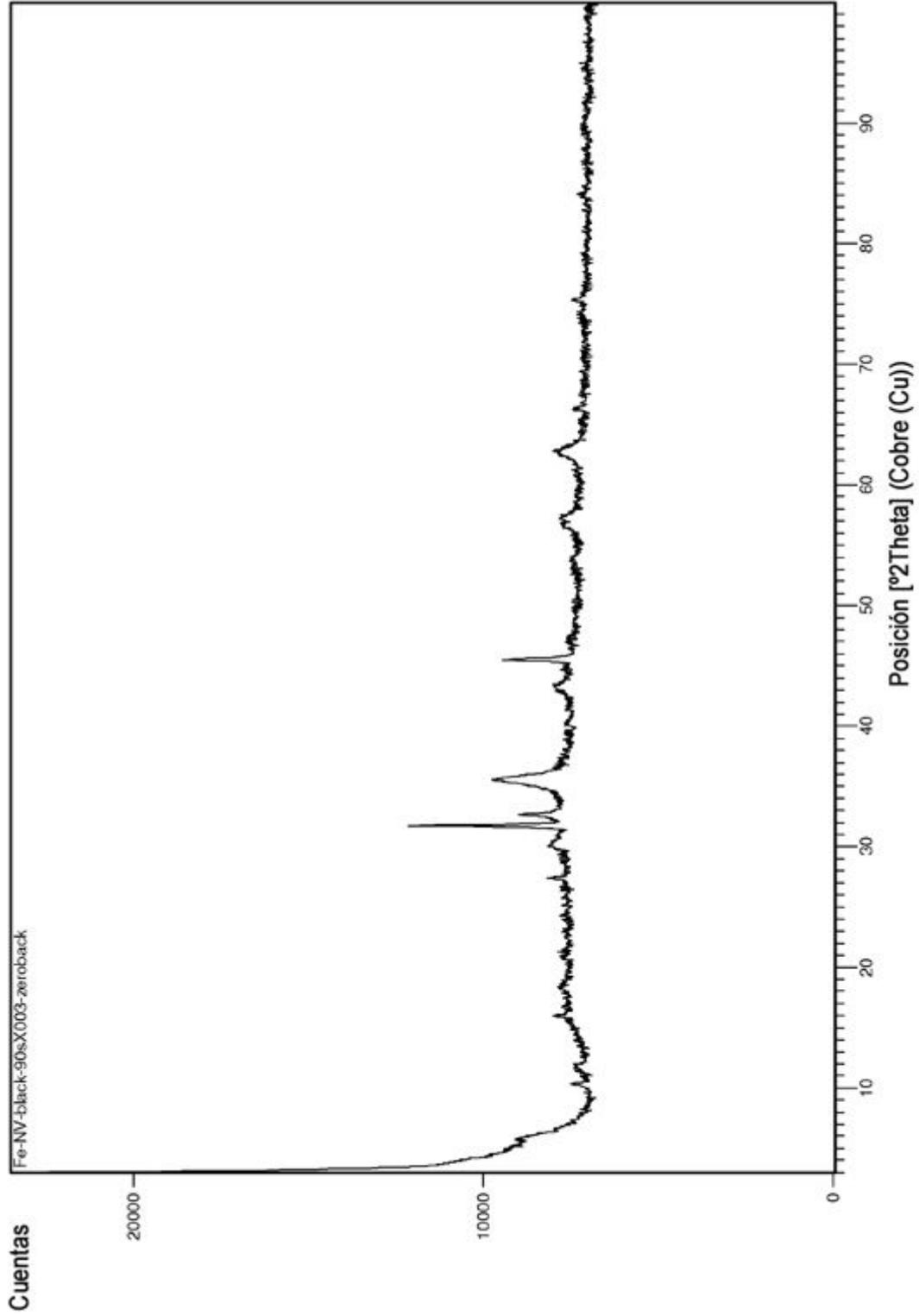


Figura 5

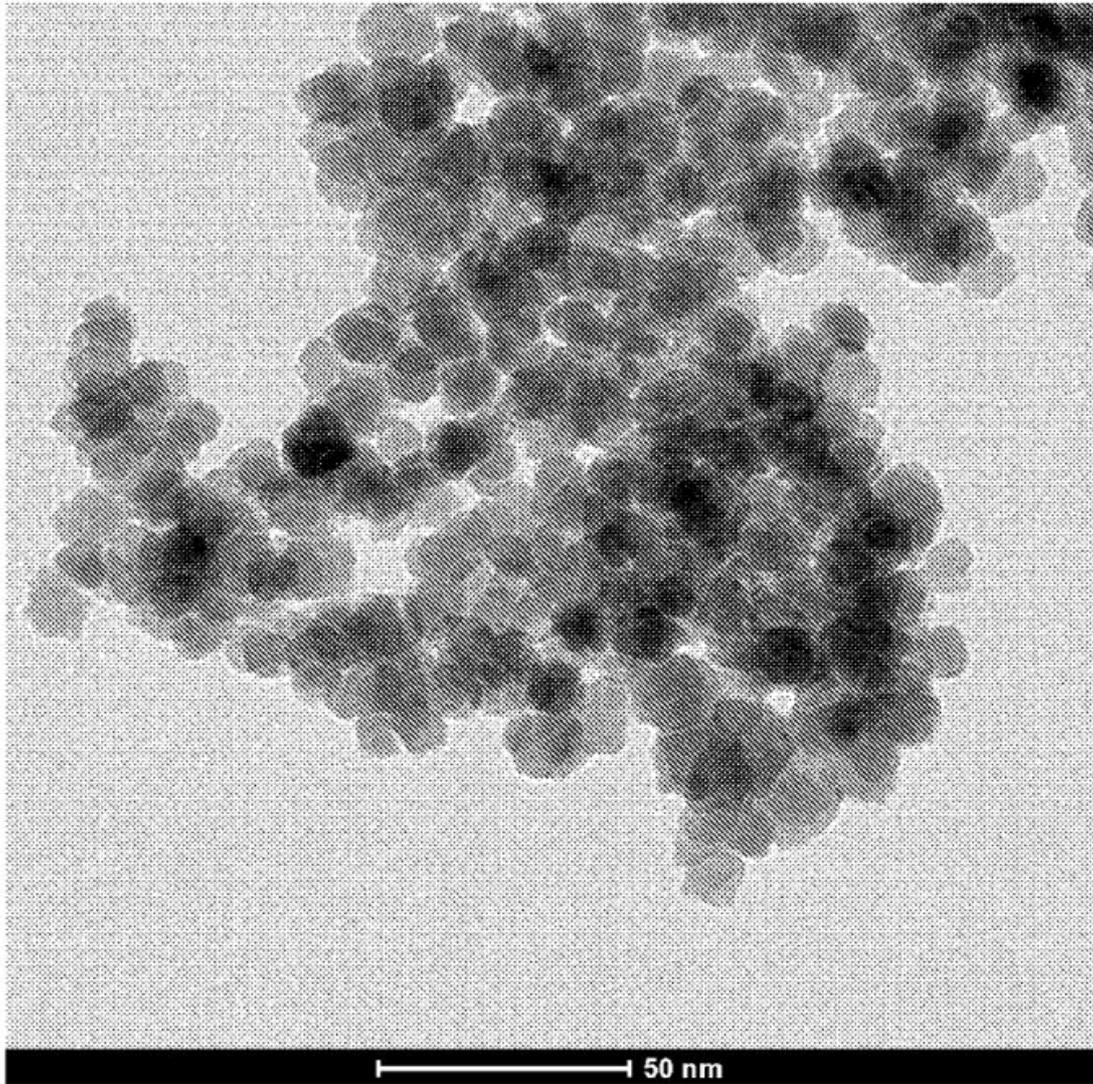


Figura 6

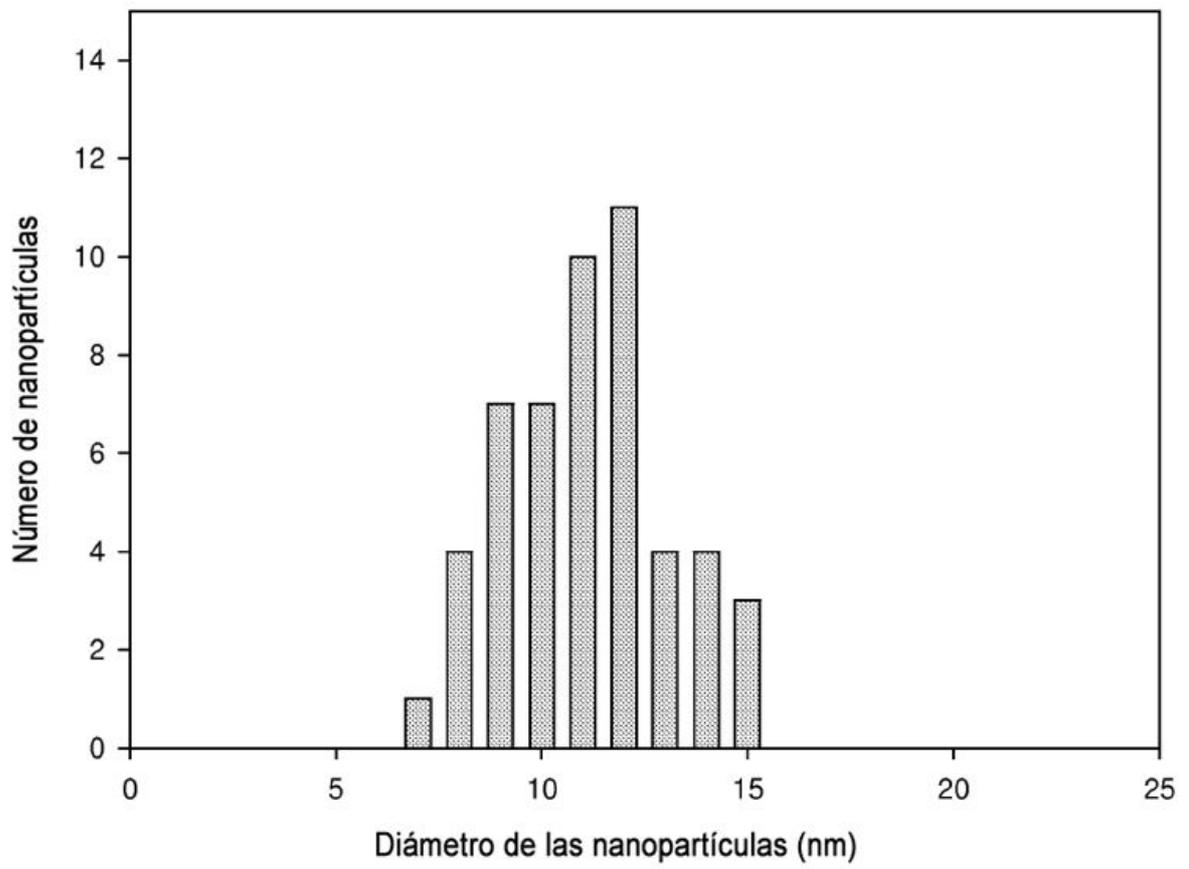


Figura 7

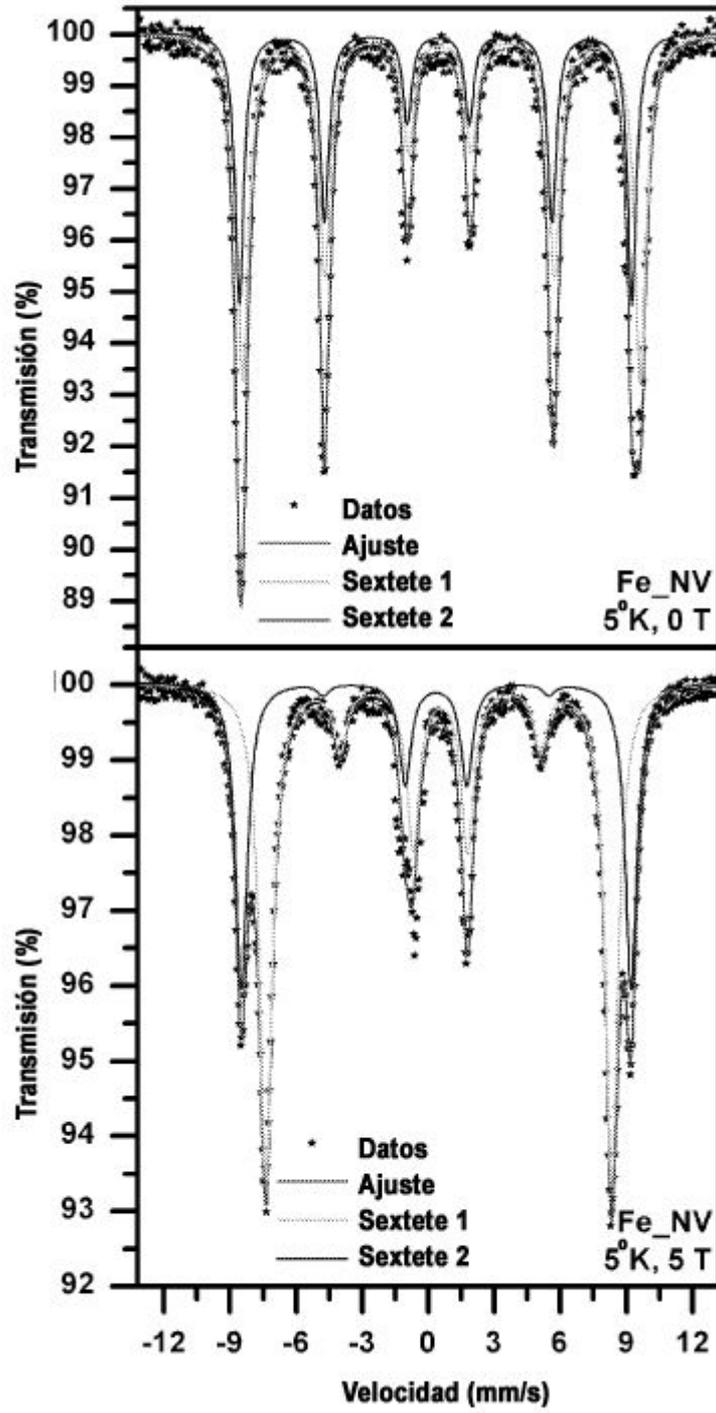


Figura 8

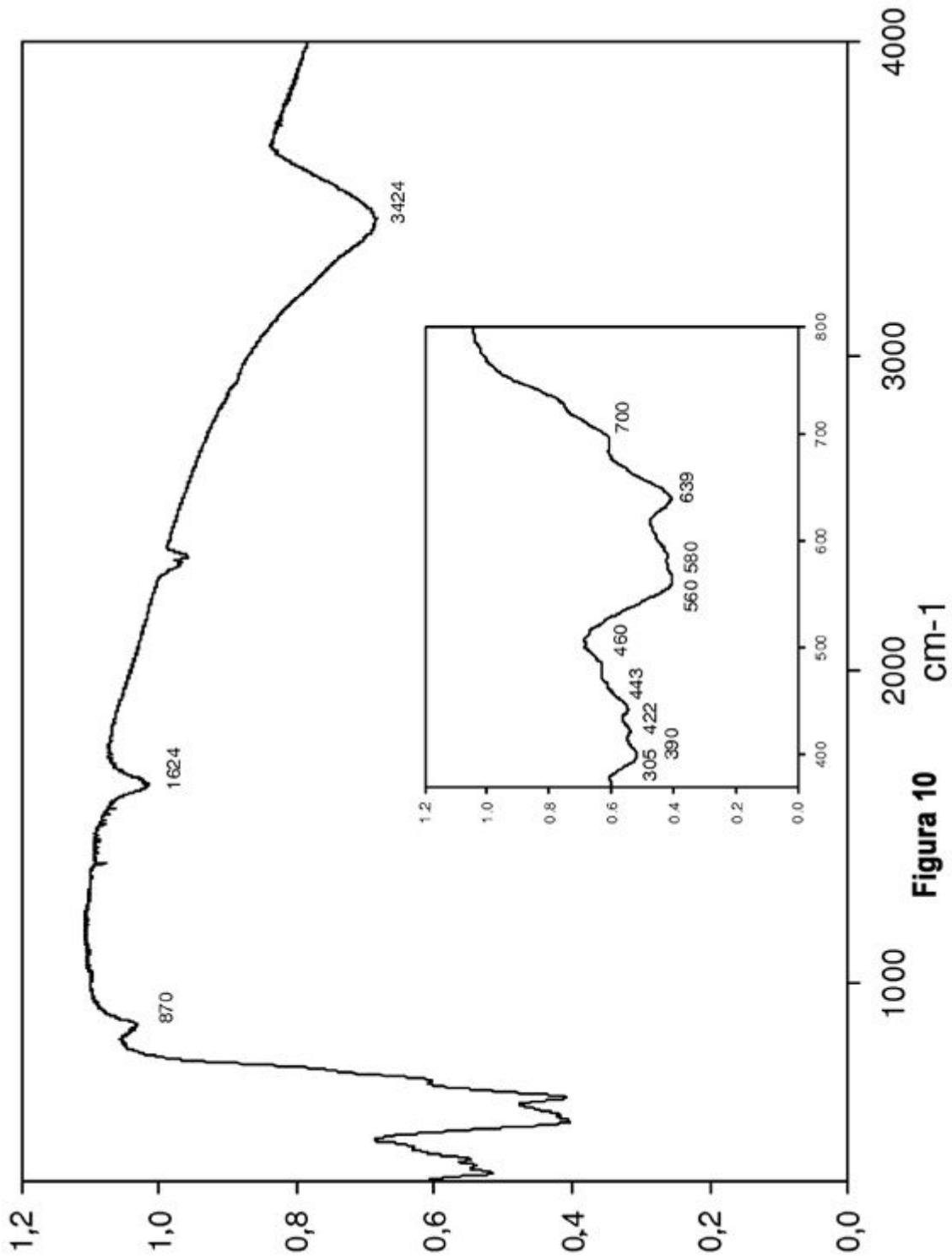


Figura 10 CM-1

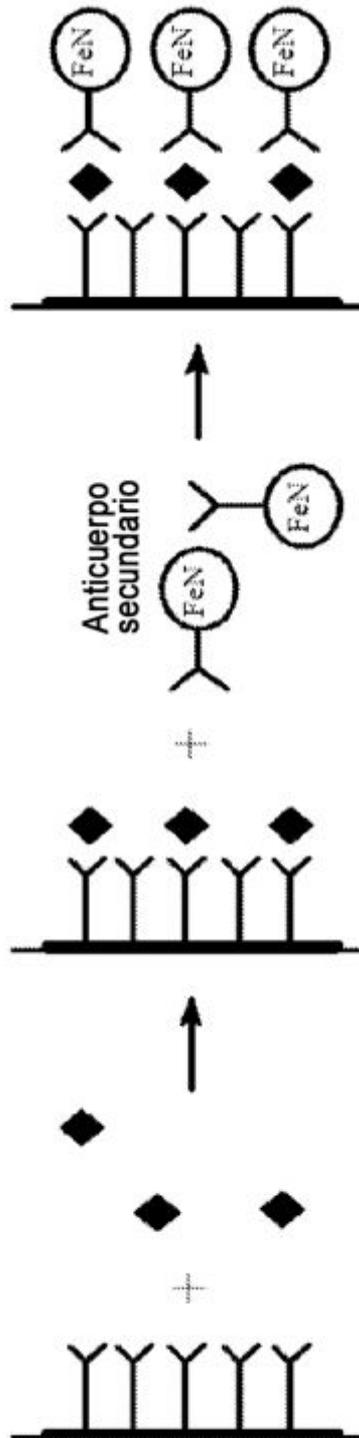


Figura 11