



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERIA DE MATERIALES

**NANOPARTÍCULAS NÚCLEO-CORAZA DE MAGNETITA-SÍLICE PARA
SEPARACIÓN MAGNÉTICA DE ADN**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA
E INGENIERÍA DE MATERIALES**

PRESENTA:

MITCHEL ABRAHAM RUIZ ROBLES

**TUTOR:
DRA. AMELIA PORTILLO LÓPEZ
CENTRO DE NANOCIENCIAS Y NANOTECNOLOGÍA,
PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIA E INGENIERÍA
DE MATERIALES**

MÉXICO, D. F. JUNIO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

I – Introducción.....	6
1.1 Antecedentes.....	6
1.2 Objetivo	7
1.3 Hipótesis	7
II - Marco Teórico	8
2.1 Nanomateriales y Nanopartículas.....	8
2.2 Materiales core-shell	10
2.3 Materiales Magnéticos.....	11
2.3.1 Nanopartículas Magnéticas.....	11
2.3.2 Generalidades de los materiales magnéticos.....	11
2.3.3 Magnetita.....	12
2.4 Sílices.....	13
2.4.1 Nanopartículas de sílice.....	14
2.4.2 Estructura de la sílice	14
2.4.3 Propiedades de la sílice.....	16
2.4.4 El papel del pH en solución.....	16
2.5 El ADN.....	17
2.6 Afinidad Sílice-ADN.....	18
2.7 Métodos de purificación de ADN.....	19
2.7.1 Protocolo Fenol-Cloroformo-Isoamil alcohol.....	19
2.7.2 Protocolo para purificación magnética de ADN.....	20
III - Método Experimental.....	21
3.1 Técnicas de caracterización.....	22
3.1.1 Difracción de Rayos X.....	22

3.1.2 TEM.....	24
3.1.3 SEM.....	25
3.1.4 XPS.....	26
3.1.5 Espectroscopía UV-vis.....	28
3.1.5.1 Determinación pureza del ADN por UV.....	29
3.1.6 Electroforesis.....	29
3.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas.....	30
3.2.1 Método de coprecipitación.....	30
3.3 Protección y estabilización de nanopartículas magnéticas.....	32
3.3.1 Surfactante y recubrimiento polimérico.....	33
3.3.2 Recubrimiento con Sílice.....	35
3.4 Método Sol-Gel para síntesis de sílice	35
3.5 Protocolo para la síntesis de magnetita (Fe ₃ O ₄).....	38
3.6 Protocolo para síntesis de nano partículas de Sílice.....	40
3.7 Protocolo para síntesis de nano partículas magnetita-sílice	41
3.8 Protocolo Fenol-Cloroformo-Isoamil alcohol para extracción de ADN bacteriano.....	42
3.9 Protocolo para purificación magnética de ADN	44
IV – Resultados	46
4.1 Caracterización de nano partículas de magnetita.....	46
4.1.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	46
4.1.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	47
4.1.3 Difracción de rayos X (XRD).....	49
4.1.4 Espectrometría de fotoelectrones dispersados por rayos X (XPS)	51
4.2 Partículas micrométricas esféricas de sílice.....	53
4.2.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM).....	53
4.2.2 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	54
4.2.3 Difracción de rayos X (XRD).....	55

4.2.4 Espectrometría de fotoelectrones dispersados por rayos X (XPS).....	56
4.3 Nanopartículas “núcleo-coraza” de magnetita-sílice.....	57
4.3.1 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	57
4.3.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	58
4.3.3 Difracción de rayos X (XRD).....	61
4.3.4 Espectrometría de fotoelectrones dispersados por rayos X (XPS).....	62
4.4 Extracción de ADN.....	63
V - Discusión de Resultados	66
VI – Conclusiones	69
6.1 Recomendaciones	70
VII – Bibliografía	71

I. Introducción

1.1 Antecedentes

La presente tesis trata sobre la síntesis y aplicación de un material para separar ADN. La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversos procesos de biología molecular. Por ejemplo para aplicaciones en el área de biotecnología, que involucra el mejoramiento de alimentos, industria farmacéutica, agricultura y biomedicina, entre otras. En los campos anteriores es fundamental contar con medios para obtener ADN. La técnica tradicional de purificación de ADN requiere de reactivos no amigables para el medio ambiente como lo es el Fenol y el Cloroformo, es necesario experiencia en la extracción y contar con los consumibles y equipo especializado. En el mercado existen alternativas de purificación diferentes a la tradicional, aun así se requiere desarrollar nuevos métodos más económicos para la purificación. Estos métodos deberán ser más rápidos y amigables para el ambiente y menos tóxicos para el usuario.

El método clásico se basa en la purificación de ácidos nucleicos por medio de solventes orgánicos tóxicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo/isoamil alcohol el más conocido y utilizado [30]. Este es un método económico en cuanto a los materiales empleados, pero al mismo tiempo lento y requiere de experiencia, ya que en algunos casos la purificación del ADN trae restos de proteína y/o ARN, lo que posteriormente dificulta procesos secundarios de utilización. Además de este método existen otros para purificar ácidos nucleicos, un ejemplo son las perlas magnéticas con afinidad al ADN. Éstas tienen poco tiempo siendo utilizadas y se encuentran disponibles comercialmente. Para obtenerlas basta con buscar en un catálogo comercial de laboratorios especializados. Las perlas pueden ser modificadas para unirse con objetivos específicos como ADN, ARN, proteínas y enzimas. Este segundo método de purificación de ADN es inicialmente costoso, pero a la vez rápido y fácil de utilizar. Dicha facilidad se debe a que este producto es comercializado junto con sus reactivos y materiales, lo cual hace más fácil cada purificación. Además se cuenta con un manual de uso relativamente sencillo de entender y por lo tanto no se necesita de mucha experiencia para obtener buenos resultados en la purificación. Las partículas son reutilizables y son inertes en presencia de ADN. Cabe mencionar que ambas opciones de purificación presentan buena calidad y cantidad de ADN purificado. Sin embargo al sopesar las ventajas de ambos, resulta que el método de perlas magnéticas tiene un costo de operación favorable a largo plazo en comparación al método fenol/cloroformo/isoamil alcohol, ya que son reutilizables.

En México las perlas magnéticas para separación de ADN son vistas como un producto comercial que cumple con su tarea específica, dejando en misterio el porqué de su funcionamiento y su método de síntesis. Es por ello la importancia de esta tesis. En este trabajo se da a conocer las razones de su funcionamiento, su método de síntesis, y un protocolo para extracción de ADN. Y así mismo se pretende dejar los cimientos para seguir investigando este tema más profundamente.

1.2 Objetivos

Objetivo principal:

- Sintetizar nanopartículas magnéticas con afinidad al ADN y comprobar estas propiedades mediante la purificación del mismo.

Objetivos particulares:

- Preparar un material que agilice la extracción de ADN, haciéndola más fácil y rápida.
- El material deberá tener respuesta magnética.
- El ADN purificado deberá tener un grado de pureza comparable al método fenol/cloroformo.
- Los resultados deberán ser reproducibles en condiciones controladas de separación.
- El método de extracción deberá ser menos demandante de materiales consumibles.

1.3 Hipótesis

Las nanopartículas magnéticas tienen afinidad con ADN y facilitan su purificación. La respuesta magnética la dará un núcleo de magnetita y el recubrimiento de sílice, bajo ciertas condiciones, tiene afinidad con ADN. Sintetizando nuestras nanopartículas con estructura core-shell de magnetita-sílice, se logra la purificación de ADN.

II. Marco Teórico

En capítulo anterior hemos planteado como hipótesis que un material con estructura núcleo - coraza será el idóneo para realizar la función de separación de ADN. En presente capítulo nos daremos a la tarea de dar los fundamentos teóricos para justificar esta hipótesis. Para lo cual, en las siguientes subsecciones, se definirán los siguientes conceptos generales:

- ❖ Nanomateriales y Nanopartículas.
- ❖ Materiales núcleo-coraza.
- ❖ Materiales Magnéticos.
 - Nanopartículas magnéticas.
 - Generalidades de los materiales magnéticos.
 - La magnetita.
- ❖ Sílices.
 - Nanopartículas de sílice.
 - Estructura de las sílices.
 - Propiedades de las sílices.
 - El papel del pH en solución.
- ❖ El ADN.
- ❖ Afinidad SiO₂-ADN y SiO₂-ARN
- ❖ Métodos de separación de ADN
 - Cómo funciona el método tradicional para purificación de ADN: Protocolo Fenol-Cloroformo-Isoamil
 - Cómo funciona el Protocolo para purificación magnética de ADN

2.1 Nanomateriales y Nanopartículas

Los nanomateriales pueden definirse como una clase de materiales en donde, por lo menos, una de sus dimensiones se encuentra en el orden de los nanómetros (1×10^{-9} m), son materiales en los cuales se empieza a apreciar en sus propiedades el comportamiento discreto (valor no continuo) de la energía y estructura atómica que los constituyen. Cabe mencionar que definir a los nanomateriales simplemente por sus dimensiones, no es una manera correcta de definirlo, ya que hay que tomar en cuenta también las propiedades del mismo. En los nanomateriales se aprecia una modificación de sus propiedades en comparación de éstos en mayor volumen [1]. Una amplia

variedad de materiales y productos mejorados dependen del cambio de las propiedades físicas cuando los tamaños característicos de estos son disminuidos.

La integración de los nanomateriales con biología ha llevado al desarrollo de dispositivos de diagnóstico: agentes de contraste, nanopartículas magnéticas unidas a un anticuerpo específico son utilizadas como etiquetadores de moléculas, estructuras o microorganismos específicos, directamente en señales electrónicas, nanopartículas de oro etiquetadas con pequeños segmentos de ADN pueden ser utilizadas para la detección de secuencias genéticas en una muestra, herramientas analíticas, aplicaciones de terapia física, ingeniería de tejidos y vehículos de direccionamiento de fármacos. Los efectos secundarios de los fármacos pueden ser disminuidos depositando el agente activo solamente en la región patológica y con la dosis requerida [2].

Entre los nanomateriales se encuentran las nanopartículas (NPs), que son partículas con un diámetro aproximado a 100 nm o menor. Tienen un área superficial alta en relación con su volumen y por lo tanto las propiedades de transferencia de masa y de calor son mejores que las de los mismos materiales pero de dimensiones. Las nanopartículas son nanomateriales de forma generalmente esférica. Las nanopartículas toman ventaja de su incremento en el área superficial en proporción con el volumen, generando así un cambio en sus propiedades ópticas como la fluorescencia, la cual depende del diámetro de la partícula. Estos nanomateriales permiten un incremento en la estabilidad y funcionalidad las cuales pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones [2].

La obtención de nanopartículas metálicas estables en solución ha sido un área muy activa de investigación. Las más comúnmente sintetizadas y estudiadas son las de metales nobles. Aunque el interés de éstas ha surgido fuertemente en las últimas décadas, éstas han existido desde hace varios siglos. Los egipcios utilizaban nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mantener la buena salud. Los chinos además de utilizarlas como medios curativos, también las empleaban como colorantes inorgánicos en porcelana. En 1857, Faraday realizó el primer análisis sistemático de nanopartículas presentando un estudio de síntesis y propiedades de coloides de oro. Desde esa época a la fecha, se han logrado avances en el conocimiento de las nanopartículas [2]. Stober, en 1968, informó de un método revolucionario para la síntesis de nanopartículas de sílice esféricas monodispersas a partir de soluciones acuosas de alcohol de silicio alcóxido en presencia de amoníaco como un catalizador, dando como resultado diferentes tamaños de nanopartículas de sílice que van de 50 nm a 1 μ m con una distribución de tamaño estrecha; a partir de Stober, se han desarrollado diversos métodos de síntesis químicos y

físicos con la finalidad de poder controlar su comportamiento frente a diversos estímulos: magnetismo, afinidad electrónica, entre otros [3][4] [5].

2.2 Materiales core-shell

Actualmente se ha puesto mucha atención sobre los materiales nanoestructurados, sin embargo, trabajos recientes involucran no sólo a estos materiales de dimensiones nanométricas sino a nuevas estructuras que consisten en nanocristales inorgánicos recubiertos por una capa de algún compuesto orgánico, inorgánico o un polímero [6]. A este nuevo tipo de nanoestructuras se les ha denominado nanopartículas core-shell (núcleo-coraza), es decir un centro o núcleo inorgánico nanométrico, rodeado por una coraza o recubierta de otro material [7]. Recientemente, las nanopartículas core-shell han llegado a tener una amplia gama de aplicaciones [8].

Las propiedades de las nanopartículas core-shell están estrechamente relacionadas con el tamaño, forma y la relación superficie/volumen. Este tipo de nanoestructuras tienen potenciales aplicaciones como sensores químicos [9], en electrocatálisis y en la detección de iones, así como marcadores fluorescentes de biomoléculas [10]. Materiales con estructuras compuestas, con estas partículas de incrustadas en el material matriz, están siendo muy utilizados en la actualidad. El objetivo de cambiar la estructura de las nanopartículas core-shell es la mejora en sus propiedades térmicas, electrónicas, magnéticas, ópticas, etc. Teniendo en cuenta el tamaño de las nanopartículas, el material de la cubierta puede ser elegido de tal manera que la aglomeración de las partículas pueda prevenirse. Esto implica que la monodispersidad de las partículas también puede ser mejorada. La estructura core-shell mejora la estabilidad térmica y química de las nanopartículas, mejora la solubilidad y permite la unión de otras moléculas a estas partículas. La coraza también puede prevenir la oxidación del material del núcleo [11].

Cuando una nanopartícula del núcleo es recubierta con una capa polimérica o una capa inorgánica, como sílice, es posible alcanzar una estructura híbrida con unas funciones y propiedades adicionales a la de la partícula del núcleo [12]. Los métodos de síntesis para estas estructuras dependen básicamente del tipo de núcleo que se quiera recubrir, en el caso de la coraza de SiO₂ el método más difundido, es el método sol-gel (Stober) que involucra, esencialmente, la hidrólisis de alquilsilicatos (TEOS) en EtOH/NH₃ [13][14].

2.3 Materiales Magnéticos

2.3.1 Nanopartículas Magnéticas

Las nanopartículas magnéticas son partículas sintéticas de óxidos metálicos con un tamaño de partícula medible en nanómetros, las cuales pueden ser acompañadas de un recubrimiento orgánico o inorgánico. El óxido de Hierro es el material más investigado para fines biomédicos, gracias a su gran compatibilidad con respecto a otros materiales magnéticos, tanto en su estado puro como oxidado. Existen varios tipos de óxidos de hierro en la naturaleza y que pueden ser preparados en el laboratorio, hoy en día solo la maghemita (γ -Fe₂O₃) y magnetita (Fe₃O₄) son capaces de cumplir las necesidades requeridas para las aplicaciones biomédicas. Estos requerimientos incluyen momentos magnéticos suficientemente altos, estabilidad química en condiciones fisiológicas y baja toxicidad sin mencionar lo fácil y económico de los procedimientos de síntesis disponibles para la preparación de estos materiales. El grado cristalinidad, así como la dispersibilidad en términos de tamaño y forma de la nanopartícula son parámetros críticos que afectan su rendimiento en técnicas terapéuticas y de diagnóstico, como la obtención de imágenes por resonancia magnética e hipertermia [15].

2.3.2 Generalidades de los materiales magnéticos

Los materiales magnéticos son caracterizados por la presencia de dipolos magnéticos generado por el espín de sus electrones. Cada uno de estos electrones polarizados puede estar alineado de forma paralela o anti paralela con respecto a sus vecinos de la red cristalina y este tipo de interacción es lo que da lugar al efecto magnético macroscópico. Dependiendo de la respuesta magnética observada, podemos clasificar a los materiales magnéticos como paramagnetos, ferromagnetos, ferrimagnetos o antiferromagnetos. Sin embargo, dicho comportamiento es altamente dependiente del tamaño del material y de la temperatura ya que a una temperatura particular el comportamiento magnético de cualquier material puede ser alterado por un ajuste en su tamaño [16].

2.3.3 Magnetita

La magnetita es un mineral ferrimagnético constituido por óxido ferroso-di férrico (Fe_3O_4) con fórmula química $\text{Fe}^{2+}(\text{Fe}^{3+})_2\text{O}_4$. El nombre IUPAC del producto químico es óxido de hierro (II, III). La fórmula para magnetita también puede ser escrita como $\text{FeO}(\text{Fe}_2\text{O}_3)$, que es una parte de Wustite (FeO) y una parte de hematita (Fe_2O_3). Ésto se refiere a los estados de oxidación de las diferentes especies de hierro en una estructura, no en una solución. La temperatura de Curie de la magnetita es de 858 K (585 °C, 1085 °F).

La magnetita es un mineral de color negro o marrón con un brillo metálico. Debe su nombre a la ciudad griega de Magnesia. Su fuerza se debe a un fenómeno de ferrimagnetismo: los momentos magnéticos de los distintos cationes de hierro del sistema se encuentran fuertemente acoplados, por interacciones antiferromagnéticas pero de forma tal que en cada celda unitaria resulta un momentos magnético no compensado. La suma de estos momentos magnéticos no compensados fuertemente acoplados entre sí, es la responsable de que la magnetita sea un imán.

La magnetita es el mineral más magnético de todos los que existen naturalmente en la Tierra. Trozos de magnetita naturalmente magnetizados, llamados piedra imán, atraían pequeños pedazos de hierro y así fue como los antiguos pobladores notaron por primera vez la propiedad del magnetismo. Las magnetitas fueron utilizadas como una forma temprana de las brújulas magnéticas. La magnetita normalmente forma parte de las rocas, por lo que ha sido una herramienta fundamental en el paleomagnetismo, una ciencia importante en el descubrimiento para la magneto-hidrodinámica y otros campos científicos. Las relaciones entre la magnetita y otros minerales ricos en óxidos de hierro como la ilmenita, hematita y ulvoespinela han sido muy estudiadas, así como las complicadas reacciones entre los minerales y el oxígeno influyen en el cómo y cuándo la magnetita conserva registros de los campos magnéticos de la Tierra.

La magnetita reacciona con el oxígeno para producir hematita. Por lo general, las rocas ígneas contienen los granos de dos soluciones sólidas, una entre magnetita y ulvoespinela, y la otra entre ilmenita y hematita. Las composiciones de pares de minerales se utilizan para calcular la cantidad oxidante del magma y una serie de condiciones oxidantes se encuentran en los magmas y el estado de oxidación ayuda a determinar cómo podrían evolucionar los magmas por cristalización fraccionada.

A temperatura ambiente y presión atmosférica normal, la magnetita se cristaliza en una estructura de espinela cúbica centrada en las caras, que se ilustra en la figura 1 (a). Curiosamente, esta es la única estructura de cristales de magnetita en la que se conocen con certeza las posiciones

de los átomos. Cuando se enfría, la magnetita se somete a la transición Verwey alrededor de 122 K, que se caracteriza por una fuerte caída en la conductividad en dos órdenes de magnitud que se acompaña de una distorsión del enrejado con menor simetría de la espinela cúbica.

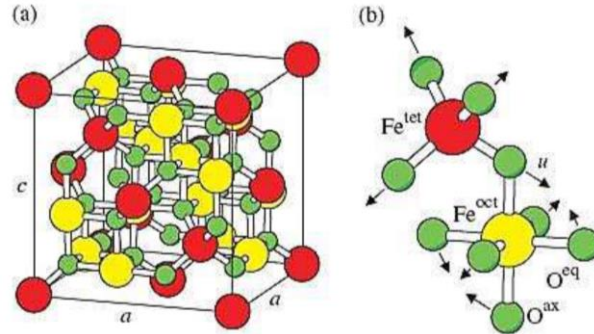


Fig. 2.1 (a) Estructura de espinela cúbica centrada en las caras de la magnetita. b) Ampliación de un tetraedro y un octaedro adyacentes que comparten un átomo de oxígeno. Grandes esferas marcadas por Fe^{tet} (rojo) y Fe^{oct} (amarillo) representan los átomos de hierro en subredes tetraédricas y octaédricas coordinadas, respectivamente. Los átomos de oxígeno se muestran como pequeñas esferas verdes [17].

2.4 Sílices

El término sílice se emplea para denominar a todo grupo de compuestos de dióxido de silicio (SiO_2), así como sus respectivas formas incluyendo las sílices cristalinas, por ejemplo el cuarzo, las sílices micro cristalinas, sílices vítreas y también a las sílices amorfas .

Se han encontrado trabajos que proponen un método fácil para desagregar sílice y zeolitas en glicerol [18], incluso a partir de la ceniza de la cascarilla de arroz [19]. En la desagregación del SiO_2 en alcoholes, se obtiene un alcóxido de silicio muy ramificado que proviene de una reacción de condensación entre los grupos silanol y la función alcohol, liberando agua como subproducto. [19].

2.4.1 Nanopartículas de sílice

Las nanopartículas de sílice, ya sea utilizado como cubierta o interior de la nanopartícula compuesta, ocupan un lugar destacado y se utilizan en diversas aplicaciones industriales tales como la catálisis [20], pigmentos [21], farmacia [22], electrónica[23], sustratos de película delgada, aisladores electrónicos, térmicos y sensores de humedad [24]. La calidad de algunos de estos productos es altamente dependiente en la distribución de su tamaño.

2.4.2 Estructura de la sílice

Las formas de las sílices amorfas pueden ser clasificadas a su método de manufactura como sílices de proceso húmedo y sílices pirogénicas. Estas últimas se obtienen a altas temperaturas a partir de una disolución acuosa, y generalmente son conocidas comercialmente con el término en inglés *fumed silica* (figura 2.2) [25].

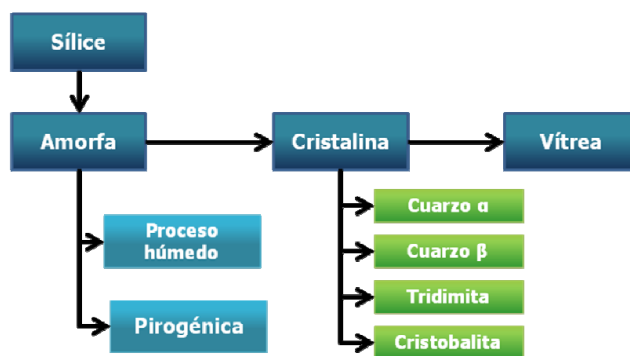


Figura 2.2. Clasificación de algunas sílices.

Las sílices amorfas pueden hallarse en forma natural o bien, sintetizarse. En éstas, el átomo de Si se encuentra enlazado covalentemente a, por lo menos, un átomo de silicio para formar un grupo funcional siloxano (-Si-O-Si) o silanol (-Si-OH).

Las longitudes de enlace y ángulos de enlace en las sílices amorfas son similares a los valores de la cristobalita. Las distancias del enlace Si - O son aproximadamente de 0.16 nm, y el ángulo de Si - O - Si es de alrededor de 148 grados. Los grupos silanol pueden ser: aislados, vecinales o geminales (Fig. 2.3). Inicialmente se forman especies de bajo peso molecular que se condensan para formar estructuras anilladas que maximizan los grupos siloxanos y minimizan los silanoles.

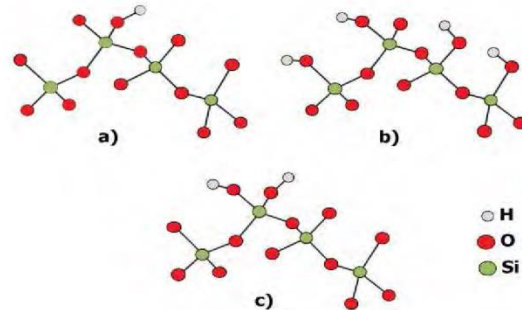


Fig. 2.3. Arreglo de grupos silanol en la sílice amorfa a) aislado b) vecinal y c) geminal.

La cristalinidad de las sílices es usualmente determinada por la difracción de rayos X estableciendo la presencia o ausencia de líneas definidas. En la figura 2.4 se presentan los difractogramas de rayos X para una muestra de (a) cuarzo cristalino (arena) y (b) una cristobalita; ambos exhiben patrones de difracción que pueden ser empleados para su identificación. Además, se muestra el difractograma de (c) sílice comercial pirogénica [25].

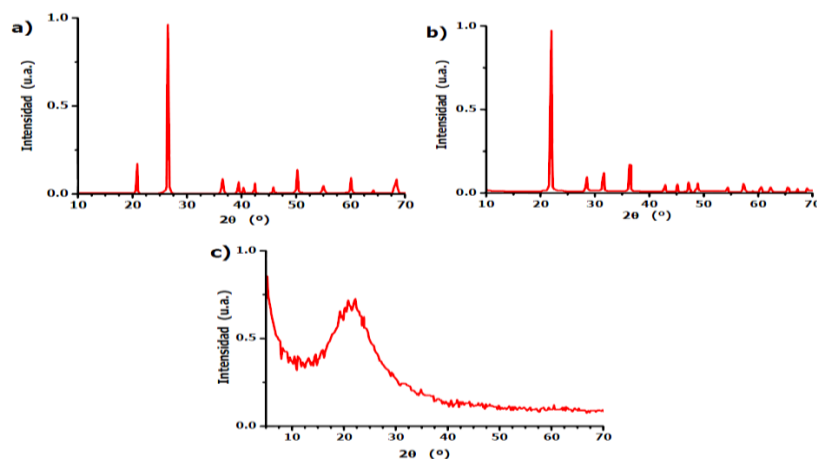


Figura 2.4. Difractogramas de Rayos X de a) cuarzo, y b) Cristobalita, y c) una muestra comercial de sílice pirogénica (Wacker HDK) [25].

2.4.3 Propiedades de la sílice

Las sílices amorfas se caracterizan por el pequeño tamaño de partícula y su enorme área superficial específica. Sus superficies pueden encontrarse anhidras o pueden contener grupos silanol (-SiOH). Estos compuestos son generalmente vistos como condensados poliméricos de ácido salicílico (H_4SiO_4) o ácido orto silícico (H_2SiO_3).

Las sílices pirogénicas pertenecen al subgrupo de sílices amorfas ricas en SiO_2 (con más de 99% de SiO_2) y se caracterizan por ser polvos blancos de muy baja densidad y de gran pureza. Comúnmente se encuentran estos tipos de sílice con un diámetro promedio de partícula de entre 2 μm y 100 nm.

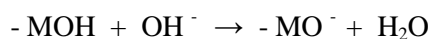
2.4.4 El papel del pH en solución

Una de las propiedades más importantes de los óxidos metálicos insolubles, como la titania, zirconia, alúmina y sílice es su punto isoelectrico. El punto isoelectrico de un sólido es definido como el punto en el que su potencial zeta es cero, esto es, que su carga superficial neta es cero. Esto se logra ajustando el pH a un valor apropiado.

La superficie del óxido responde volviéndose más positiva cuando el pH es disminuido mediante la siguiente reacción:



Si el pH llega a sobrepasar el punto isoelectrico se vuelve más negativo:



Donde M es un metal, en nuestro caso es silicio. Por lo tanto, la carga tiende a ser más negativa cuando se aumenta el pH y más positiva cuando el pH disminuye. En algún pH intermedio, el potencial zeta será cero y en ese valor de pH se entiende como punto isoelectrico.

Los óxidos tienen puntos isoeléctricos definidos. La tabla 2.5 muestra los valores para algunos óxidos [26].

Oxide	pH of i.e.p.
Silica (SiO ₂)	2 - 3
Titania (TiO ₂)	5.8
Haematite (Fe ₂ O ₃)	6.5
Alumina (Al ₂ O ₃)	9.1

Figura 2.5. Valores de punto isoeléctrico de algunos óxidos.

2.5 El ADN

El ácido desoxirribonucleico, abreviado como ADN, es un tipo de ácido nucleico, una macromolécula que forma parte de todas las células. Contiene información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los organismos vivos y de algunos virus, y es responsable de la transmisión de la información hereditaria. Desde el punto de vista químico, el ADN es un polímero de nucleótidos, es decir, un polinucleótido. Un polímero es un compuesto formado por muchas unidades repetitivas conectadas entre sí. En el ADN, cada unidad simple es un nucleótido, y cada nucleótido, a su vez, está formado por un azúcar (la desoxirribosa), una base nitrogenada (que puede ser adenina→A, timina→T, citosina→C o guanina → G) y un grupo fosfato que actúa como unión de cada unidad simple con el siguiente. Lo que distingue a una unidad simple (nucleótido) de otra es la base nitrogenada y por ello la secuencia del ADN se especifica nombrando sólo la secuencia de sus bases. La disposición secuencial de estas cuatro bases a lo largo de la cadena es la que codifica la información genética. En los organismos vivos, el ADN se presenta como una doble cadena de nucleótidos, en la que las dos hebras están unidas entre sí por puentes de hidrógeno.

La química molecular, nos ha ayudado a conocer más del proceso de autoensamblaje de los componentes de sistemas vivos. De esta manera se proporciona una plataforma tecnológica para aplicaciones en diferentes áreas como el bioprocesamiento en la industria, la investigación del efecto en salud, mejoramiento de alimentos y sistemas de agricultura, en medicina molecular, como es la detección y tratamiento de enfermedades, remplazo de partes del cuerpo, medicina regenerativa, cirugías a nano escala, síntesis y direccionamiento de fármacos, localización y direccionamiento de fármacos para el tratamiento de tumores por sistemas a nano escala y que son

especialmente diseñados y actualmente están siendo probados, entre otros. A su vez, se están desarrollando sistemas con grupos funcionales de superficie que son capaces de conjugar una variedad de biomoléculas, entre ellas ADN, ARN, proteínas y virus. Todo esto antes mencionado son algunos de los avances que se han llevado a cabo en el campo de nanociencia y nanotecnología [2].

2.6 Afinidad SiO₂-ADN

El ADN tiene una carga negativa neta debido a su grupo fosfato de su estructura. La sílice tiene la peculiaridad de que a pH menor a 3 su superficie obtiene una carga positiva, como se muestra en la figura 2.6, y a valores de pH mayores su carga se vuelve negativa debido a que está por encima de su punto isoeléctrico. Si juntamos ADN en medio líquido con sílice, cuya carga neta superficial es positiva, se van unir a causa de las fuerza de atracción electrostática.

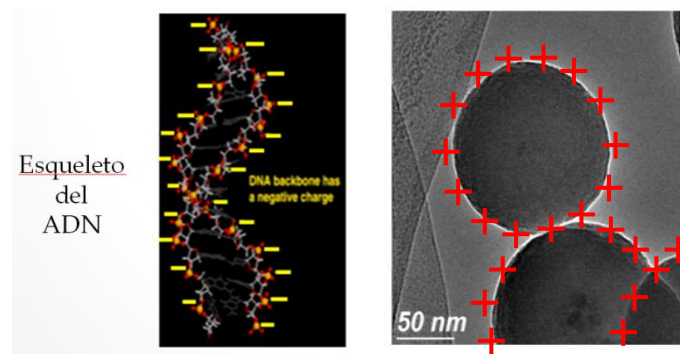


Figura 2.6. Estructura del ADN con su carga negativa debida a los grupos fosfatos (izquierda) y nanopartículas de sílice con carga neta superficial positiva en pH menor a 3 (derecha).

El ADN a valores de pH menores de 4 el ADN se desnatura, es recomendable utilizar algún recubrimiento, adicional a nuestra recubierta de sílice, en nuestras nanopartículas para lograr obtener una carga positiva en la superficie en el rango de valores de pH donde el ADN no se desnaturalice. Por ello se utiliza poli-etilenglicol (PEG) en la extracción magnética, como componente del buffer de unión.

2.7 Métodos de purificación de ADN

2.7.1 Protocolo Fenol-Cloroformo-Isoamil alcohol

La purificación de ácidos nucleicos es un requisito imprescindible para realizar diversas técnicas de biología molecular. El método clásico de purificación de ácidos nucleicos se basa en el uso de disolventes orgánicos, siendo la extracción mediante fenol/cloroformo/isoamil alcohol la más conocida [30] y se describe a continuación. Entre los materiales utilizados para una extracción de ADN bacteriano por medio del protocolo fenol/cloroformo/Isoamil alcohol están:

- TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) al 10%
- Proteinasa K (20 mg/ml)
- NaCl (5 M)
- Fenol/cloroformo/isoamil-alcohol (25:24:1)
- Isopropanol
- Etanol (70 %)
- Caldo LB (Luria Bertani) (Para el cultivo bacteriano) (5 gr extracto de Levadura, 10 gr Triptona, 10 gr NaCl, 1 litro de agua destilada)

El primer paso consiste en la lisis de las células cuyo ADN se desea purificar. Este paso consiste en romper las células de las cuales se extrae el ADN. El medio de extracción contiene un detergente, el SDS, que sirve para lisar y liberar el ADN, hecho que aumenta notablemente la viscosidad de la solución. El detergente inhibe también cualquier actividad de enzimas, como las nucleasas en la preparación. La desproteínización se logra en general agitando la mezcla con un volumen igual de fenol/cloroformo/isoamil alcohol. El fenol y el cloroformo son desnaturizadores activos de proteínas que suprimen la solubilidad de las proteínas en la preparación y las precipita.

Puesto que el fenol y la solución salina amortiguadora no se mezclan, solo se requiere centrifugar la suspensión para separar las fases, permaneciendo el DNA (y el RNA) en la solución dentro de la fase acuosa del sobrenadante y la proteína presente como un precipitado concentrado en la interfase. La fase acuosa se retira del tubo y se somete a ciclos repetidos de agitación con fenol y centrifugación hasta agotar toda la proteína de la solución. Añadiendo posteriormente etanol frío. El etanol frío sirve para precipitar el DNA de la solución. Luego de este primer paso de purificación, se disuelve el DNA y se trata con ribonucleasa para degradar el ARN presente.

2.7.2 Protocolo para purificación magnética de ADN

El primer paso de lisado consiste en lo mismo del método tradicional de extracción de ADN. Se rompen las paredes celulares para obtener una solución conteniendo ADN y demás proteínas. Paso seguido, agregamos las partículas magnéticas sintetizadas de magnetita-sílice junto con RNasa para digerir las moléculas de ARN presentes en la mezcla. Se agrega el buffer de unión que consiste de NaCl 1M (pH 7), PEG 8000 (10%) para la unión entre las nanopartículas y el ADN presente en la mezcla. Seguido, se separan las partículas, con ayuda de un imán de neodimio, las partículas tendrán adherido en su superficie el ADN y se descarta la fase líquida por inversión. Se agrega etanol al 70% para remover el sobrenadante. Después, se agrega el buffer de elusión, TE buffer, para cambiar el pH de la solución para lograr que la superficie de sílice tenga una carga neta negativa y con ello separar el ADN de las partículas debido a la repulsión electrostática. Por último, se coloca el imán cerca del tubo con la mezcla separando las partículas magnéticas y se remueve el sobrenadante conteniendo el ADN purificado.

III. Método Experimental

A continuación se presentarán los protocolos para la síntesis de partículas de magnetita y el protocolo para recubrir las nanopartículas de magnetita con sílice para conseguir la estructura core-shell con núcleo de magnetita y cubierta de sílice. Se anexarán los protocolos para la síntesis de partículas sub-micrométricas esféricas de sílice, además de los protocolos de separación magnética y tradicional de ADN para la bacteria *E. coli*.

En la figura 3.1 se muestra la metodología de trabajo a seguir durante este proyecto. Se comenzó desde la síntesis de magnetita (Fe_3O_4) y su correspondiente caracterización por medio de las técnicas de Difracción de rayos X (DRX), Espectrofotometría de electrones dispersados (XPS), Microscopía electrónica de barrido (SEM), Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis de área superficial por medio de adsorción de gas (BET). Acto seguido, se recubren las partículas de magnetita con sílice amorfo, dando lugar a las nanopartículas tipo core-shell (magnetita-sílice) y las mismas técnicas de caracterización que con la magnetita. Después, se purificó el ADN por medio del protocolo para separación magnética utilizando las nanopartículas magnéticas tipo core-shell. La pureza y cantidad de ADN separado se caracterizarán por medio de las técnicas de electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría ultravioleta.

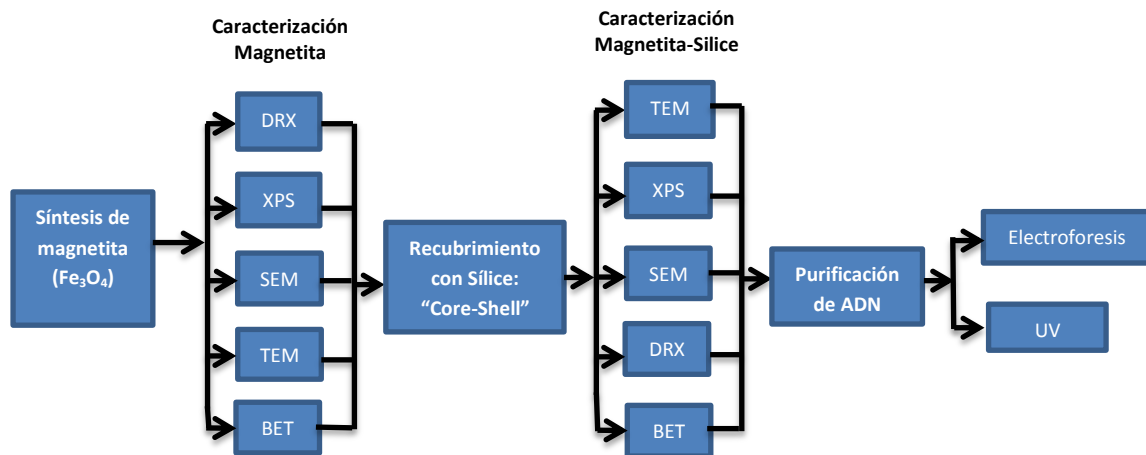


Figura 3.1: Metodología general de trabajo.

3.1 Técnicas de caracterización

Las técnicas utilizadas para la caracterización de las nanopartículas de magnetita, sílice y magnetita-sílice fueron las siguientes:

- Difracción de rayos X (XRD).
- Microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Microscopía electrónica de Barrido (SEM).
- Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).
- Espectroscopía UV-vis.
- Electroforesis.

3.1.1 Difracción de Rayos X

Al igual que otros tipos de radiación, la interacción entre el componente eléctrico de los rayos-X y los electrones de la materia que atraviesa da lugar a una dispersión. Cuando los rayos X son dispersados en el entorno ordenado de un cristal, tienen lugar interferencias entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación, a esto se le denomina difracción [27].

El fenómeno de la difracción de rayos X consiste básicamente en un proceso de interferencia constructiva de ondas de rayos X que se produce en determinadas direcciones de espacio. Significa que las ondas tienen que estar en fase, lo que ocurre cuando su diferencia de trayectoria es cero o un múltiplo entero de longitudes de onda [1].

Dado que, al menos en principio, cada material cristalino tiene un patrón de difracción único el estudio de los patrones de difracción de una fase desconocida ofrece una poderosa herramienta para el análisis cualitativo y de la identificación de fases.[28].

Los rayos X son generados por una fuente compuesta de un ánodo, un cátodo y una ventana de salida. La fuente es polarizada con un potencial de decenas de kV que producen un haz de electrones energéticos que salen del cátodo e impactan en el ánodo, generando radiación en forma de rayos X. El fenómeno de difracción está descrito por la ley de Bragg ($n\lambda=2d\text{Sen}\Theta$), la cual dice que al incidir un haz de electrones, neutrones o rayos X sobre un cristal, con un ángulo de incidencia Θ sobre la familia de los planos atómicos de dicho cristal los cuales están definidos por los índices de Miller $\{h,k,l\}$ y separados una distancia d , la difracción ocurre cuando las reflexiones del haz en los sucesivos planos atómicos paralelos entre sí interfieren de manera constructiva, es

decir, cuando la diferencia de las trayectorias de los rayos reflejados es múltiplo entero de longitud de onda (λ).

La difracción de rayos X en muestras de polvo cristalino o muestras policristalinas se puso de manifiesto primeramente en Alemania por P. Debye y P. Sherrer en 1916 y casi al mismo tiempo se desarrolló a través de los estudios de Hull en los Estados Unidos. La identificación de fases cristalinas constituye uno de los campos de aplicación más importantes del método de polvo cristalino [1]. El registro del espectro difractado puede realizarse empleando dos dispositivos experimentales con características bien diferenciadas: Métodos fotográficos (cámaras Debye-Sherrer) y difractómetro de polvo.

La diferencia radica en el registro, en las cámaras del polvo el espectro se registra en una película fotográfica, en la que la densidad de ennegrecimiento indica la intensidad de las radiaciones reflejadas. En el difractómetro de polvos, se obtiene un registro gráfico de las señales que las reflexiones originan en detectores electrónicos de radiación. El cristal a analizar es reducido a polvo de tal manera que forme un conjunto de pequeños cristales. Si se tuviese un cristal y en él se hiciera incidir un haz monocromático, el haz se difractaría a un ángulo en particular. Al hacer girar este cristal de 0 a 360 grados, el haz formará un cono cuyo eje coincide con el del haz incidente. La razón de utilizar múltiples cristales de la muestra, al reducirla a polvo, es poder formar este cono con las distintas orientaciones posibles de los diversos cristales. Normalmente el difractómetro posee una geometría de tipo Bragg-Brentano en el cual, el contador electrónico puede formar un ángulo variable ($2\theta = 3 - 110$ grados) con el haz incidente de rayos X. Cuando la muestra gira un ángulo θ el detector gira 2θ , este movimiento es el que hace que el difractómetro se denomine difractómetro de dos círculos (Figura 3.2). En un difractómetro comercial la muestra se sitúa en el centro de eje del goniómetro de precisión, cuya velocidad angular está sincronizada en la relación anterior 2:1 con el detector [1].

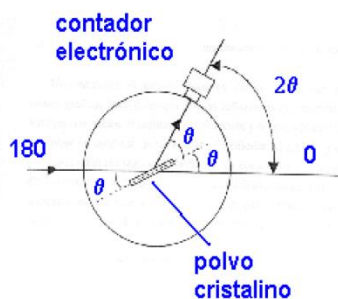


Figura 3.2. Esquema difractómetro de dos círculos.

3.1.2 TEM

El microscopio electrónico de transmisión, denominado TEM por sus siglas en inglés está constituido básicamente por una fuente de electrones y un conjunto ensamblado de lentes magnéticos. Su funcionamiento consiste en la irradiación de una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del rango de 100 a 200 keV. Parte de esos electrones son transmitidos, otros son dispersados y otros más dan lugar a interacciones que producen diversos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra (morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc.) El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. Los electrones muestran características tanto de onda como de partícula. Cuando se atiende a su comportamiento ondulatorio, se pueden observar variaciones tanto en la amplitud como en la fase de la onda al atravesar la muestra y ambos tipos de variación dan lugar al contraste en la imagen (se define el contraste como diferencias en intensidad entre zonas adyacentes). Así, en TEM se hace una distinción fundamental entre contraste de amplitud y contraste de fase. En la mayoría de situaciones ambos tipos contribuyen a la formación de la imagen pero uno de ellos tiende a dominar. En las imágenes de contraste de amplitud se obtienen imágenes de campo claro o campo oscuro seleccionando mediante diafragmas o aperturas, el haz directo o los haces dispersados, respectivamente. [1]

Esta técnica tiene aplicaciones muy amplias tanto en Ciencia de Materiales, como en Ciencia Biomédica:

- Determinación de la morfología (forma, dimensiones y posición de cristales o partículas observadas en la muestra).
- Determinación de la cristalografía (posición de los planos cristalinos, estudio de los defectos, etc.).
- Determinación de la composición (composición química de fases o mezcla de fases).

Un haz de electrones no solo ofrece información cristalográfica de la superficie de un material, sino que puede también ser utilizado para producir imágenes de la superficie. En un microscopio electrónico de transmisión, los electrones provenientes de una fuente entran en la muestra, son

dispersados en la medida en la que pasan a través de ella, y estos se enfocan, amplifican y finalmente producen la imagen deseada de la superficie de la muestra.

La microscopía es una herramienta muy poderosa al momento de visualizar muestras muy pequeñas ya que es capaz de mostrar imágenes con gran resolución. Permite también examinar a gran detalle imágenes de incluso de una columna de átomos [29].

3.1.3 SEM

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es la técnica más empleada de todos los instrumentos con haz de electrones. Su popularidad puede atribuirse a muchos factores: la versatilidad de sus distintos modos de imagen, la excelente resolución espacial, la facilidad en la preparación y condición de la muestra, la relativa simplicidad en la interpretación de las imágenes obtenidas, la accesibilidad de espectroscopía asociada y técnicas de difracción. Con la reciente generación de instrumentos de SEM, imágenes de alta calidad pueden ser obtenidas con una magnificación de la imagen tan baja como 5X y tan alta como 1000000X, este es un rango muy amplio de magnificación que nos permite ver las dimensiones nanométricas. Resolución de la imagen de alrededor de 0.5 nm puede ser alcanzada por la generación de SEM con disparador de emisión de campo (FEGSEM). El tamaño de la muestra puede ser tan grande como la producción a escala de láminas de silicio [1].

Cuando el haz de electrones interactúa con la muestra, se generan una variedad de señales (electrones, fonones, fotones, etc.) [1] como se muestra en la figura 3.3. Existen 3 tipos de electrones que pueden ser emitidos: electrones secundarios con energías menores a 50 eV, electrones Auger producidos por el decaimiento de los átomos excitados y electrones retro dispersados, los cuales tienen energías cercanas a las de los electrones incidentes.

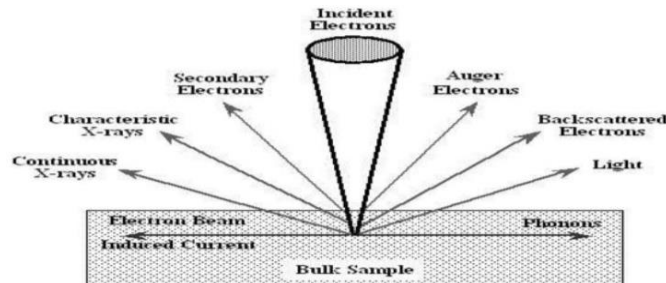


Figura 3.3. Dibujo esquemático de las señales generadas dentro de la cámara de SEM cuando el haz de electrones interactúa con el espécimen.

Todas estas señales pueden ser usadas para formar imágenes o patrones de difracción del espécimen o puede ser analizada para proveer información espectroscópica. La relajación de los átomos excitados por electrones primarios produce rayos X continuos y característicos al igual que la luz visible. Estas señales pueden ser utilizadas para obtener información cualitativa, semi cuantitativa y cuantitativa de los elementos o fases presentes en las regiones de interés. Todas estas señales son producto de las fuertes interacciones entre el haz de electrones y la muestra, las cuales dependen de la energía de los electrones incidentes y de la naturaleza de la muestra. [1]

3.1.4 XPS

Es una técnica utilizada para el análisis elemental de una muestra. Es una variante de la espectroscopía de fluorescencia de rayos X, la cual estudia los rayos X emitidos por la muestra cuando es bombardeada con partículas cargadas. La caracterización de los elementos es posible debido a que en principio cada elemento tiene una estructura atómica única, por lo que los rayos X emitidos son característicos de cada estructura atómica, diferenciando así un elemento de otro.

Para generar esta emisión de rayos X de una muestra, se bombardea con un haz de partículas cargadas, o con un haz de rayos X. Este haz incidente puede excitar un electrón de la capa interna de electrones, expulsando un electrón hacia una capa superior y generando un hueco en la capa interna. Este hueco se llena por un electrón procedente de alguna capa superior, y la diferencia de energía entre las capas involucradas puede ser liberada como rayos X [27].

Es una técnica basada en el efecto fotoeléctrico y en el análisis de los fotoelectrones emitidos por la superficie irradiada con rayos X. La superficie a analizar se irradia con fotones de rayos X blandos. Cuando un fotón de energía $h\nu$ interacciona con un fotón se transfiere completamente al electrón, con el resultado de la emisión de un fotoelectrón con una energía cinética:

$$\text{Ecuación (2)} \quad E_B = h\nu - E_k - W$$

Donde " $h\nu$ " es la energía de los fotones, E_k , la energía cinética del fotoelectrón producido, W , la función de trabajo del espectrofotómetro y E_B , la energía de ligadura (parámetro que identifica al electrón de forma específica, en términos del elemento y nivel atómico). Una vez se ha emitido el fotoelectrón, el átomo se relaja, emitiendo un fotón o un electrón (electrón Auger) [1].

Obviamente $h\nu$ debe ser mayor que E_B . El electrón emitido puede proceder de un nivel interno, o de una parte ocupada de la banda de valencia, pero en XPS la mayor atención se centra en los electrones de los niveles internos. Como no existen dos elementos que compartan el mismo conjunto de energías de ligadura electrónica, la medida de las energías cinéticas suministra el análisis elemental [1].

Mediante la técnica de XPS se pueden analizar todos los elementos de la tabla periódica con excepción del hidrogeno y el Helio. Aunque el XPS se relaciona con fotoelectrones y sus energías cinéticas, la salida de electrones por otros procesos también sucede. Un fotoelectrón emitido deja detrás de sí un hueco interno en el átomo. Por ejemplo, el hueco se ha creado en la capa interna K (1s), dando lugar a un fotoelectrón cuya energía cinética debe ser $h\nu - E_k$, y este hueco se ocupa mediante una transición electrónica desde la capa L2 (2p). La energía $E_k - E_{L2}$ asociada con la transición puede disiparse en forma de un foton de rayos X característico o perdiendo un electrón de una tercera capa. La segunda de las posibilidades se denomina proceso Auger en honor de su descubridor (Fig. 3.4) [1].

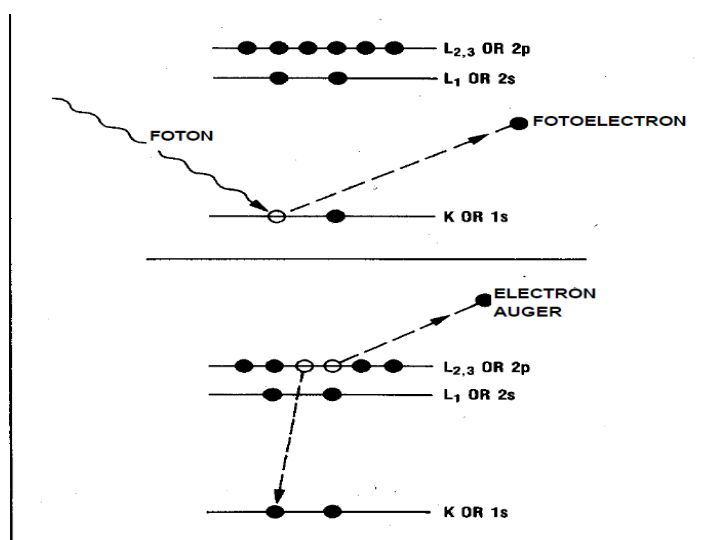


Figura 3.4. Diagrama esquemático del proceso de fotoemisión y de la subsiguiente emisión Auger.

Las áreas de conocimiento donde la técnica XPS encuentra aplicación son muy variadas y pueden citarse entre ellas análisis químico de superficies y mapas químicos de composición de materiales.

3.1.5 Espectroscopía UV-vis

La absorción de radiación ultra-violeta visible (UV-vis) por una especie se puede explicar en dos etapas. En la primera, ocurre una promoción de un electrón de valencia desde un estado basal hasta un estado excitado, llevando así a la formación de una especie excitada que sufre la segunda etapa, un proceso de relajación que generalmente conlleva conversión de la energía de excitación en calor.

La espectroscopia ultravioleta-visible es una técnica de análisis muy utilizada para la caracterización de materiales. Existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración absorbida, lo cual permite que con esta técnica se puedan realizar análisis cuantitativos. Dependiendo la naturaleza de la especie absorbente, la energía necesaria para llevar a cabo esta transición electrónica será diferente. De esta forma la absorción de radiación electromagnética es más intensa cuanto mayor sea la diferencia energética entre el estado basal y el excitado [27].

La longitud de onda (λ) utilizada en esta técnica tiene los valores comprendidos entre los 190 y los 800 nm. La luz visible o ultra-violeta es absorbida por los electrones de valencia, los cuales son promovidos a estados excitados, es decir de energía mayor. Al absorber radiación electromagnética de una frecuencia específica, ocurre una transición desde uno de estos orbitales a un orbital vacío. Las diferencias entre energías varían entre los diversos orbitales. Algunos enlaces, como los dobles, provocan coloración en las moléculas ya que absorben energía en el visible así como en el UV [1].

Cuando un haz de radiación UV-vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utiliza la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbe según la Ley de Beer-Lambert:

$$\text{Ecuación 3:} \quad A = \epsilon * I * c$$

Donde ϵ : coeficiente de absortividad molar, I : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente.

El espectro se registra como absorbancia vs. longitud de onda (λ), las bandas del espectro UV son anchas por que incluyen la estructura fina de transiciones vibracionales y rotacionales de menor energía [1].

3.1.5.1 Determinación pureza del ADN por UV

La espectroscopía ultravioleta-visible utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones visible, ultravioleta e infrarroja del espectro electromagnético [30]. Se utiliza de manera general en la determinación cuantitativa de los componentes de soluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos altamente conjugados. También es utilizada extensivamente en laboratorios de química y bioquímica para determinar pequeñas cantidades de ciertas sustancias, como las trazas de metales en aleaciones o la concentración de cierto medicamento que puede llegar a ciertas partes del cuerpo. Los métodos espectrofotométricos son los más populares porque son fáciles de ejecutar y proporcionan resultados confiables.

La radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro provoca transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas. La espectroscopia ultravioleta-visible se utiliza para identificar algunos grupos funcionales de moléculas y para determinar el contenido y fuerza de una sustancia. La cantidad de ADN en una solución puede ser determinada midiendo su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm.

3.1.6 Electroforesis

La calidad de las purificaciones de ácidos nucleicos se comprobará mediante espectrofotometría y electroforesis en geles de agarosa.

La electroforesis es un proceso que se utiliza para separar macromoléculas. La electroforesis en gel de agarosa permite separar moléculas de DNA. Estas son sometidas a un campo eléctrico y atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta. Hay dos fuerzas de acción opuesta que determinan la velocidad de la partícula. Primero, la fuerza eléctrica atrae el ADN hacia el electrodo y la intensidad de la atracción es directamente proporcional a la carga. Segundo, la fuerza de rozamiento se opone a la migración y su intensidad depende del tamaño y la forma de la partícula. El ADN tiene carga negativa por su grupo fosfato migrará hacia su carga opuesta. La diferencia en velocidad de migración estará dada por diferencias en la fuerza de rozamiento, o sea por la forma y tamaño de la molécula de ADN, esto debido al número de bases en que está constituido [31].

La agarosa es un polímero de residuos alternos de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glicosídicos, que forma geles con poros de gran tamaño. Para lograr una separación eficiente se utiliza un medio de soporte que aumenta la fricción recibida por las macromoléculas y reduce la difusión al mínimo. Las mezclas de DNA de diferentes tamaños se hacen migrar a través del gel durante cierto tiempo y se obtiene una separación en la que la distancia migrada por una molécula es inversamente proporcional a su longitud en pares de bases, es decir su tamaño. Los ácidos nucleicos que emigran a mayor velocidad en los geles de agarosa son los que encuentran menos resistencia en su avance: los de menor tamaño y de conformación más compacta. Para visualizar la molécula de ADN en un gel de agarosa se le añade bromuro de etidio, un compuesto fluorescente que se intercala en la doble hélice de los ácidos nucleicos y hace que florezcan cuando se ilumina con luz UV [31].

3.2 Síntesis de nanopartículas magnéticas

Las nanopartículas magnéticas (NPM) han sido sintetizadas con un gran número de composiciones y fases, incluyendo óxidos de hierro Fe_3O_4 y $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ [32]. En las últimas décadas se han desarrollado muchas investigaciones para la síntesis de nanopartículas magnéticas, especialmente durante los últimos años muchas publicaciones han descrito rutas eficientes en el control del tamaño y forma, alta estabilidad y partículas monodispersas. Algunos de los métodos más populares incluyen:

- Coprecipitación.
- Descomposición y/o reducción térmica.
- Microemulsión
- Síntesis hidrotérmica.

3.2.1 Método de coprecipitación

El método de coprecipitación es una forma fácil y conveniente de sintetizar óxidos de hierro a partir de soluciones acuosas de sales de Fe^{2+}/Fe^{3+} por la adición de una base en condiciones inertes a temperatura ambiente o a elevadas temperaturas. El tamaño, forma y composición de las nanopartículas magnéticas depende mucho del tipo de sales utilizadas (cloruros, sulfatos, nitratos), la relación de Fe^{2+}/Fe^{3+} , la temperatura de reacción, el pH de reacción y la fuerza iónica del medio. En esta síntesis, una vez que las condiciones han sido corregidas, la calidad de las nanopartículas magnéticas es altamente reproducible. Las nanopartículas magnéticas no son muy estables bajo condiciones normales, y son fácilmente oxidadas a maghemita. Desde que la maghemita se considera un ferrimagneto, la oxidación es el menor de los problemas. Por lo tanto, pueden ser sujetas a la oxidación deliberada para convertirlas en maghemita. Esta transformación se logra mediante la dispersión en medio ácido, además de nitrato de hierro (III). Las partículas de maghemita obtenidas son químicamente estables en medio ácido y alcalino.

Sin embargo, incluso las partículas de magnetita se convierten en maghemita después de su formación inicial, el desafío experimental en la síntesis de Fe_3O_4 por coprecipitación se encuentra en el control del tamaño de partículas y, por lo tanto, lograr una distribución de tamaño de partícula estrecha. Puesto que la temperatura de bloqueo depende del tamaño de partícula, una distribución amplia en el tamaño de partícula dará lugar a una amplia gama de temperaturas de bloqueo, además de un comportamiento magnético no ideal para muchas aplicaciones. Las partículas preparadas por el método de coprecipitación, por desgracia, tienden a ser bastante polidispersas. Es bien sabido que la presencia de una breve explosión de nucleación y crecimiento controlado posterior son cruciales para producir partículas monodispersas. El control de estos procesos es la clave en la producción de nanopartículas magnéticas de óxido de hierro monodispersas [33].

Los efectos de algunos aniones orgánicos, como los carboxilatos y los iones hidroxilo, en la formación de óxidos de hierro u oxihidróxidos han sido estudiados ampliamente [34]. Para la formación de complejos superficiales se requiere de ambos, grupos carboxi desprotonados así como grupos α -hidroxi desprotonados. Recientes estudios han mostrado que el ácido oleico es el mejor candidato para la estabilización de Fe_3O_4 [35].

3.3 Protección y estabilización de nanopartículas magnéticas

Después de la síntesis, mantener la estabilidad de las partículas durante mucho tiempo sin aglomeración o precipitación es una cuestión importante. La estabilidad es un requisito fundamental para casi cualquier aplicación de nanopartículas magnéticas, especialmente los metales puros, como el Fe, Co y Ni y sus aleaciones, los cuales son muy sensibles al aire. Por lo tanto la principal dificultad para el uso de metales puros o aleaciones surge de su inestabilidad frente a la oxidación con el aire, y la susceptibilidad a la oxidación se hace más alta cuando más pequeñas son las partículas. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias eficaces para mejorar la estabilidad química de nanopartículas magnéticas. El método más sencillo parece ser la protección con una capa que es impenetrable, de modo que el oxígeno no pueda llegar a la superficie de las partículas magnéticas (Fig. 3.5) a menudo, la estabilización y protección de las partículas están estrechamente vinculadas entre sí.

Todas las estrategias de protección dan como resultado nanopartículas magnéticas con la nanopartícula magnética recubierta para aislar el núcleo contra el medio ambiente.

Como alternativa, las nanopartículas magnéticas también se pueden dispersar en una matriz densa por lo general en polímeros, sílice o carbono para formar compuestos que también impidan, o al menos minimicen, la aglomeración u la oxidación. Sin embargo, las nanopartículas se fijan en el espacio una con respecto a la otra, lo que a menudo no se desea.

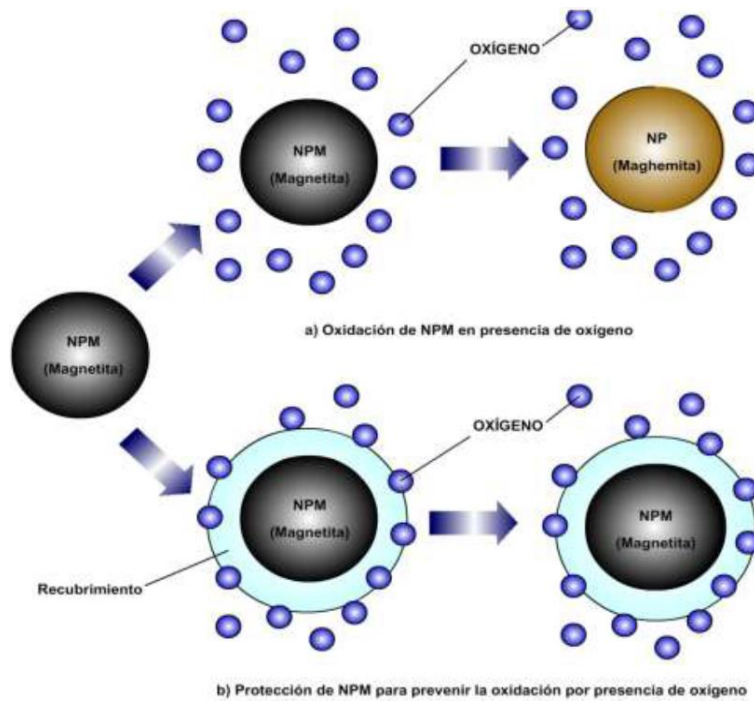


Fig. 3.5. Esquema representativo de la oxidación de NPM en presencia de oxígeno (a), así como la prevención de tal fenómeno por la protección de las NPM mediante la incorporación de un recubrimiento protector (b).

3.3.1 Surfactante y recubrimiento polimérico

Los surfactantes o polímeros se emplean a menudo para neutralizar la superficie de las nanopartículas durante o después de la síntesis para evitar la aglomeración. En general, la repulsión electrostática o repulsión estérica se puede utilizar para dispersar las nanopartículas y mantenerlas en un estado coloidal estable. Por ejemplo, las nanopartículas de magnetita sintetizada a través de co-precipitación de Fe^{2+} y Fe^{3+} en soluciones de amoníaco o hidróxido de sodio son generalmente cargadas negativamente, lo que resulta en aglomeración.

En general, los surfactantes o polímeros pueden ser anclados químicamente o físicamente adsorbidos en nanopartículas magnéticas para formar una capa simple o doble, que crea fuerzas de repulsión (principalmente estéricas) para equilibrar las fuerzas electromagnéticas de van der Waals atractivas que actúan sobre las nanopartículas. Por lo tanto, debido a la repulsión estérica las partículas magnéticas se estabilizan en suspensión. Los polímeros que contienen grupos funcionales, tales como ácidos carboxílicos, fosfatos y sulfatos, se pueden unir a la superficie de la magnetita (figura 3.6) [36].

Si recubrimos las nano partículas de magnetita con una capa polimérica, como PEG, podemos dispersar de manera adecuada las nano partículas en solvente, formando suspensiones homogéneas, llamadas ferro fluidos. El ferro fluido de magnetita puede interactuar con un campo magnético exterior y ser posicionado en algún área en específico, facilitando así la terapia contra el cáncer por medio de terapia de campo magnético asistido por corriente alterna. Aunque se dispersen de manera correcta en solución, se vuelven a aglomerar debido a las interacciones magnéticas dipolares entre ellas [37].

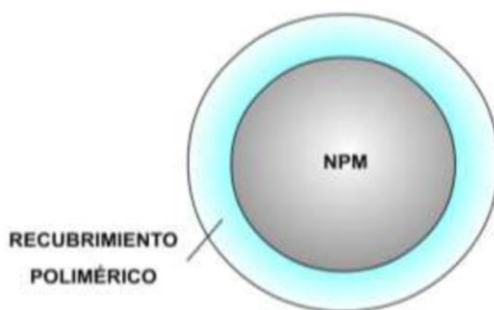


Fig. 3.6. Recubrimiento polimérico de NPM.

3.3.2 Recubrimiento con sílice

Una cubierta de sílice no solo protege a los centros magnéticos, sino también puede evitar el contacto directo del núcleo magnético con agentes adicionales vinculados a la superficie de la sílica evitando así las derivadas de su estabilidad en condiciones acuosas (por lo menos si el pH es suficientemente bajo) por su fácil modificación de su superficie como un fácil control de las interacciones entre partículas, tanto en la solución y dentro de las estructuras, a través de la variación del grosor de la capa externa de sílice (fig. 3.7). Sin embargo, la sílica es inestable en condiciones básicas además de que puede contener poros a través de los cuales el oxígeno u otras especies podrían difundir.

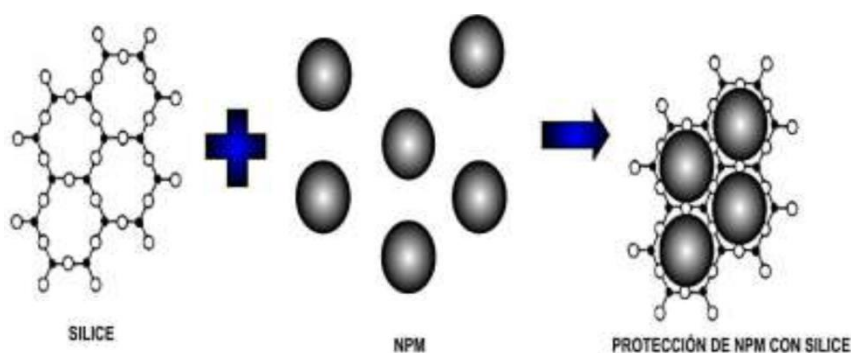


Fig. 3.7. Esquema representativo de una protección con sílice.

3.4 Método Sol-Gel para síntesis de sílice

Una suspensión coloidal de partículas sólidas, menores a 1 μm en tamaño recibe el nombre de sol [38]. Un gel, se forma cuando las partículas coloidales coalescen para formar una red continua entrecruzada de sólido con una fase líquida intersticial. En la técnica sol-gel para la formación de vidrios, generalmente se usan alcóxidos metálicos ($M(OR)_n$, R = grupo alquilo) y oxisales metálicas como precursores de óxidos. Estos compuestos se disuelven o se hidrolizan por reacción con el agua para formar un sol como primera etapa. Las partículas coloidales en el sol gradualmente se eslabonan y polimerizan para formar un gel en lugar de crecer independientemente para formar un precipitado. Para convertir el gel húmedo en un vidrio, posteriormente se deshidrata

y se remueve la fase líquida intersticial, además de someterlo a una síntesis mediante la aplicación de calor.

La ventaja principal del proceso sol-gel radica, básicamente, en que los reactivos generalmente se mezclan en fase líquida durante la hidrólisis por lo que se puede alcanzar una homogeneidad a nivel molecular. Como consecuencia de la homogeneidad, las transformaciones térmicas se dan a más bajas temperaturas para materiales obtenidos por este método que para los mismos materiales obtenidos por métodos cerámicos tradicionales. La única etapa en donde se aplica una cantidad significativa de calor es durante la síntesis, donde únicamente se necesita calentar ligeramente arriba de la temperatura de transición vítrea, T_g , del material. El uso de temperaturas bajas reduce el problema de alguna reacción química con el contenedor, junto con los reactivos de alta pureza, lo que virtualmente nos asegura un alto grado de pureza en el producto final. Además, es posible obtener fases meta estables que pueden obtenerse empleando el método cerámico, debido precisamente a que en este último, las temperaturas de reacción son significativamente más altas [39].

Sin embargo, hay tres desventajas asociadas a la técnica de sol-gel:

- La producción de agrietamientos durante las etapas de secado, lo que hace extremadamente difícil la preparación de piezas monolíticas.
- El ciclo total de producción es demasiado lento para muchas aplicaciones comerciales.
- El alto costo de los materiales utilizados que solamente alcanza a compensar parcialmente el ahorro de energía derivado del procesamiento a baja temperatura.

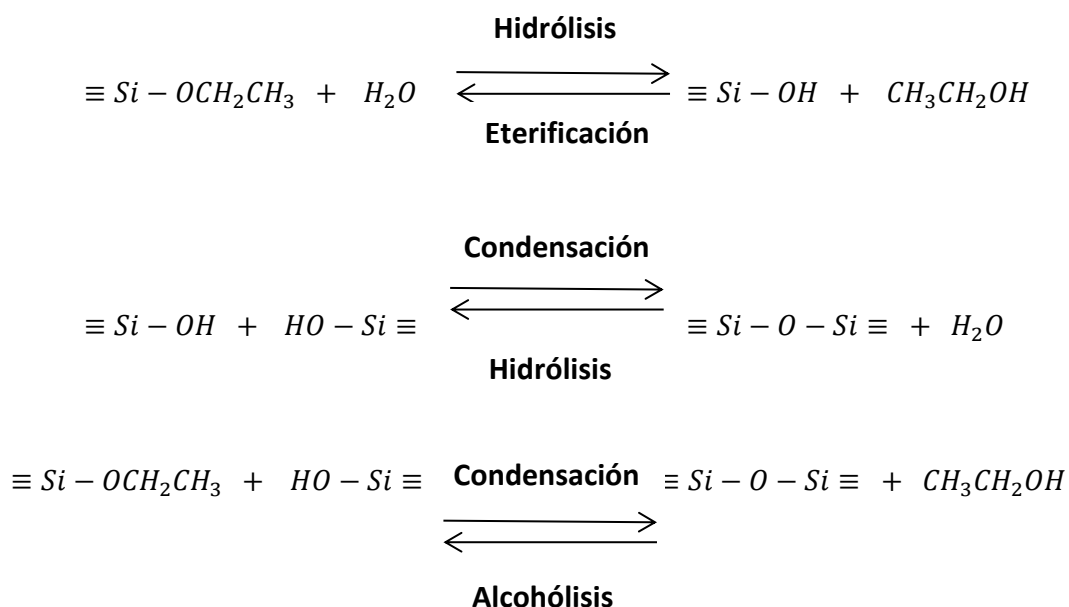
A pesar de ello, el método sol-gel es una de las vías de síntesis más atractivas para la preparación de matrices vítreas basadas en SiO_2 , especialmente para la preparación de polvos finos, fibras y películas de óxidos metálicos, tanto en el caso de materiales policristalinos como vítreos. Para la preparación de materiales cristalinos por este método se requiere incluir procesos de cristalización y/o transformación, dado que los geles son de naturaleza amorfa. La obtención de diferentes microestructuras en el producto final es posible mediante la selección adecuada de los precursores, controlando la reacción de hidrólisis y las condiciones de reacción del proceso. El proceso sol-gel, se puede utilizar también para producir una gran variedad de geles de óxidos porosos variando no únicamente la composición química sino además la textura, lo cual incluye la variación del área superficial, el volumen de poro, distribución de tamaño de poro, etc. [39].

Para la obtención de geles de silicio, destacan por su amplio uso el tetrametoxilano (TMOS), el tetraetoxilano (TEOS) y el silicato de sodio mientras que generalmente se utilizan los ácidos nítrico

o clorhídrico, HNO₃, HCL, para sus hidrólisis en medio ácido y el hidróxido de amonio, NH₄OH en medio básico.

Los alcóxidos de silicio como el Si(OCH₃)₄, o como el Si(OCH₂CH₃)₄, (TMOS y TEOS por sus siglas en inglés) y el agua son inmiscibles por lo que, para hacer más eficiente su hidrólisis, se utilizan disolventes comunes generalmente alcoholes como metanol, CH₃OH, o etanol, CH₃CH₂OH. Esta dilución provoca una disminución inevitable en la densidad del gel seco, resultando un material de alta porosidad como consecuencia de la eliminación del disolvente [40].

La síntesis de geles de dióxido de silicio amorfo (a-SiO₂) por el método sol-gel, se lleva a cabo mediante una secuencia de reacciones de hidrólisis y de condensación, además de las reacciones inversas; eterificación y despolimerización alcohólica e hidrolítica [38] [40].



Las reacciones anteriores (hidrólisis y condensación) conducen a la gelificación, donde la evaporación posterior del disolvente tiende a producir sólidos con altas áreas superficiales 200 a ~ 1000 m²/g. Las superficies terminan con grupos OH o bien OR, donde R representa un grupo alquilo (en este caso R=CH₂CH₃). La concentración de ellos, depende de la relación molar H₂O/Si(OR)₄ y, además de la concentración del alcohol, ROH (utilizados generalmente para favorecer la hidrólisis de los alcóxidos), además de las condiciones catalíticas específicas, etc. [38][41]. Durante los tratamientos térmicos empleados para la densificación, algunos sustituyentes orgánicos atrapados durante la condensación se pirolizan a temperaturas menores a 450 °C. Los silanoles continúan la condensación hasta una completa consolidación. Si el calentamiento se lleva a

temperaturas próximas a los 1000 °C, el resultado es un material completamente denso, el cual es difícil de diferenciar de una que se haya obtenido por el método convencional a partir de sílice fundida [42].

3.5 Protocolo para la síntesis de magnetita (Fe₃O₄)

Procedimiento descrito por ZHAO Yuanbi et al. (2008) “Preparation and analysis of Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles used as targeted – Drug carriers” (fig. 3.8):

Reactivos:

- Hidróxido de amonio (28%, w)
 - FeCl₃*H₂O (99.99%,w)
 - FeCl₂*4H₂O (99.99%, w)
 - PEG₈₀₀₀ (99.8%),
 - H₂O desionizada
 - Nitrógeno gas
-
- Se mezclan los siguientes reactivos en solución bajo agitación vigorosa:
 - ❖ 7.03 g de FeCl₃*H₂O (Esperando a que se disuelva completamente)
 - ❖ 2.584 g de FeCl₂*4H₂O (Esperando a que se disuelva completamente)
 - ❖ 2.85 g de PEG₈₀₀₀ (Esperando a que se disuelva completamente)
 - ❖ Aforando a 285 con H₂O desionizada.

 - 15 ml de solución de amoniaco ”gota a gota” (5-7 gotas * *min*⁻¹ a los 285 ml de mezcla acuosa bajo agitación vigorosa.

 - La mezcla fue agitada hasta que la solución de amoniaco quedó totalmente disuelta en la mezcla de reacción, a temperatura ambiente con una constante depuración con corriente lenta de nitrógeno (fase gaseosa).

 - Se traslada la mezcla de reacción a un baño maría en agua a 50 °C con un poco de agitación durante 30 minutos.

 - La muestra se somete a ultrasonido durante 30 minutos.

 - La mezcla se madura a 80 °C durante 1 hora.

 - Se traslada la muestra a un recipiente grande, y se separa con el magneto.

 - Se lavan las partículas con agua destilada hasta que su pH sea 7.

- Son dejadas secar al vacío, a 60 °C durante 4 horas.

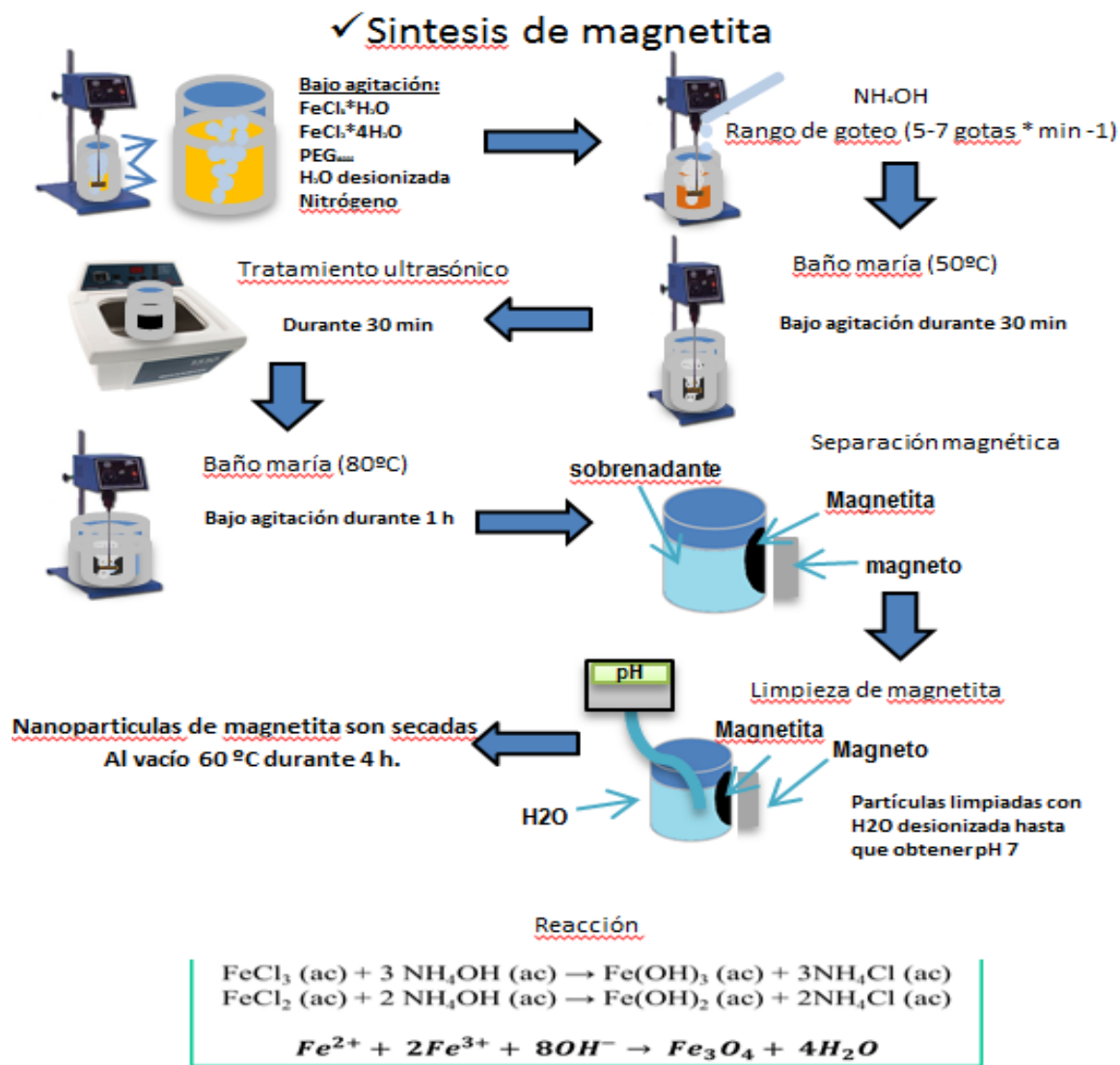


Fig. 3.8 Protocolo para la síntesis de magnetita por medio del método de coprecipitación

3.6 Protocolo para síntesis de nanopartículas de Sílice.

Partiendo de la muestra 1 del artículo con dispersión de 4.2 nm mostrado en la figura 3.9. [43]

	Etanol (mol L ⁻¹)	Etanol (mL)	TEOS (mol L ⁻¹)	TEOS (mL)	H ₂ O/TEOS	H ₂ O (mL)	NH ₄ OH (mol L ⁻¹)	NH ₄ OH (mL)	P size (nm)	SD +- nm
1	8	466.53	0.045	10.04	66.7	670.20	14	545.22	224.2	4.2

Tabla 1: Reactivos y sus cantidades necesarias para la síntesis de partículas de sílice esféricas.

Pasos de síntesis:

1. Etanol junto con Agua son sometidos a ultrasonido durante 10 min.
2. TEOS es agregado durante el ultrasonido.
3. Ultrasonido durante 20 minutos.
4. Hidróxido de Amonio (28%) es agregado como catalizador para promover la reacción de condensación.
5. Ultrasonido durante otros 60 minutos hasta obtener una suspensión blanca turbia.

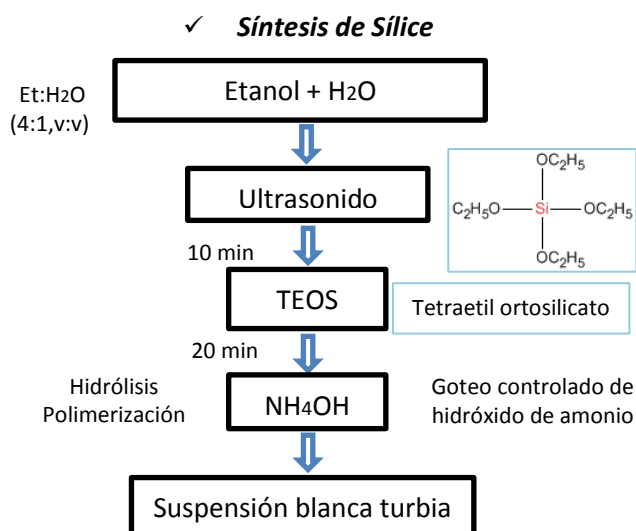


Fig. 3.9. Protocolo para la síntesis de partículas esféricas de sílice.

3.7 Protocolo para síntesis de nanopartículas de magnetita-sílice

	Etanol (mol L ⁻¹)	Etanol (mL)	TEOS (mol L ⁻¹)	TEOS (mL)	H ₂ O / TEOs	H ₂ O (mL)	NH ₄ OH (mol L ⁻¹)	NH ₄ OH (mL)	P size (nm)	SD +- nm
1	8	466.5	0.045	10.0	66.7	670.2	14	545.2	224.2	4.2
2	8	466.5	0.067	14.9	45	673.2	14	545.2	243.03	60.3
3	4	233.2	0.012	2.6	1167	3126.9	14	545.2	251.9	19.5

Tabla 2: Reactivos y sus cantidades necesarias para la síntesis de partículas de magnetita-sílice núcleo-coraza.

Pasos de Síntesis:

1. Etanol junto con agua son sometidos a ultrasonido durante 5 min.
2. Se agregan 0.0107 g de “Fe₃O₄” (para un volumen de TEOs de 0.374 mL) y son sometidos a ultrasonido durante 15 min.
3. 0.374 mL TEOs es agregado durante el ultrasonido .
4. Ultrasonido durante 20 minutos.
5. 1.36 mL de hidróxido de amonio (28%) es agregado como catalizador para promover la reacción de condensación.
6. Ultrasonido durante otros 60 minutos hasta obtener una suspensión blanca turbia.

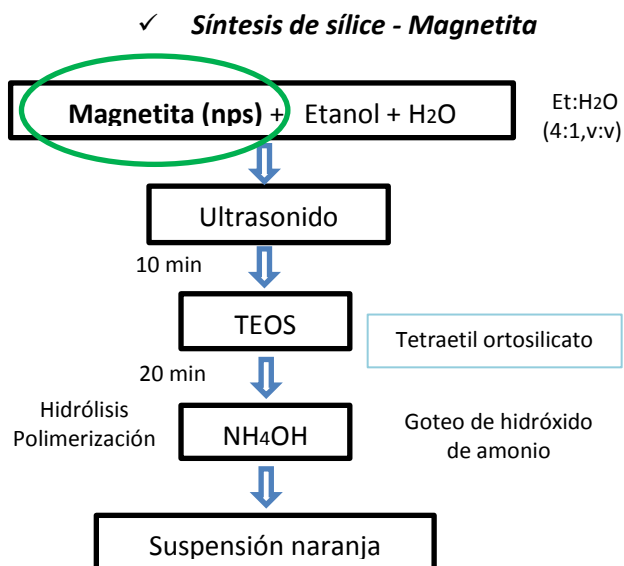


Fig. 3.10. Protocolo para la síntesis de nanopartículas de magnetita-sílice

3.8 Protocolo fenol-cloroformo para extracción de ADN bacteriano, *E. coli*.

Material y reactivos:

- TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8)
- SDS (sodium dodecyl sulfate) al 10%
- Proteinasa K (20 mg/ml)
- NaCl (5 M)
- Fenol/cloroformo/isoamil-alcohol (25:24:1)
- Isopropanol
- Etanol (70 %)
- Caldo LB (Luria Bertani) (Para cultivo) (5 gr extracto de Levadura, 10 gr Triptona, 10 gr NaCl, 1 litro de agua destilada)
- CTAB/NaCl solución (Disolver 4.1 g de NaCl en 80 mL de agua destilada y despacio añada 10 g de CTAB mientras mezcla con agitador. Si es necesario caliente a 65 C, ajuste a 100 mL.
- Cloroformo/isoamil alcohol (24:1)

Procedimiento (figura 3.11):

1. Inocular 5 mL de caldo LB con la cepa bacteriana de interés, dejar crecer hasta que sobresature el medio (o dejar crecer toda la noche).
2. Tomar 1.0 mL y colocarlos en un eppendorf y centrifugar 5 min a 6000 rpm.
3. Re-suspender el botón en 567 microlitros de TE buffer y re-pipetee, subiendo y bajando el volumen.
4. Añadir 30 µL de SDS al 10 % y 3 µL (20 mg/mL) de proteinasa K. Mezclar e incubar 1 hr a 37 C. (La solución se tornara viscosa)
5. Añadir 100 µL de NaCl 5 M y mezclar, NO VORTEX.
6. Añadir 80 µL de solución de CTAB/NaCl, mezclar (NO VORTEX) en incubar 10 min a 65°C.
7. Añadir un volumen aproximadamente igual (0.7 a 0.8 mL) de 24:1 cloroformo / isoamilalcohol , mezcle con agitación vórtex y centrifugar 10 min en una micro centrífuga a máxima velocidad.

8. Remueva el sobrenadante o fase líquida donde está el ADN a un tubo nuevo, evitando la capa blanca de interfaz.
9. Añadir un volumen aproximadamente igual (0.7 a 0.8 mL) de 25:24:1 fenol/cloroformo/isoamil alcohol, mezcle vigorosamente y centrifugar 10 minutos en una micro centrifuga a máxima velocidad.
10. Remueva el sobrenadante o fase líquida donde está el ADN a un tubo nuevo, evitando la capa blanca de la interfaz.
11. Anadir 60% de su volumen de isopropanol y mezclar por inversión, observará un precipitado blanco, centrifugar 5 min a máxima velocidad y decantar el sobrenadante.
12. Al precipitado o botón de ADN, lavar con 1 mL de etanol al 70% y centrifugar 5 min a máxima velocidad, decantar el sobrenadante y escurrir sobre papel secante, dejar secar 5 min y resuspender en 50 0 100 micro litros de agua libre de DNAsas o TE buffer.

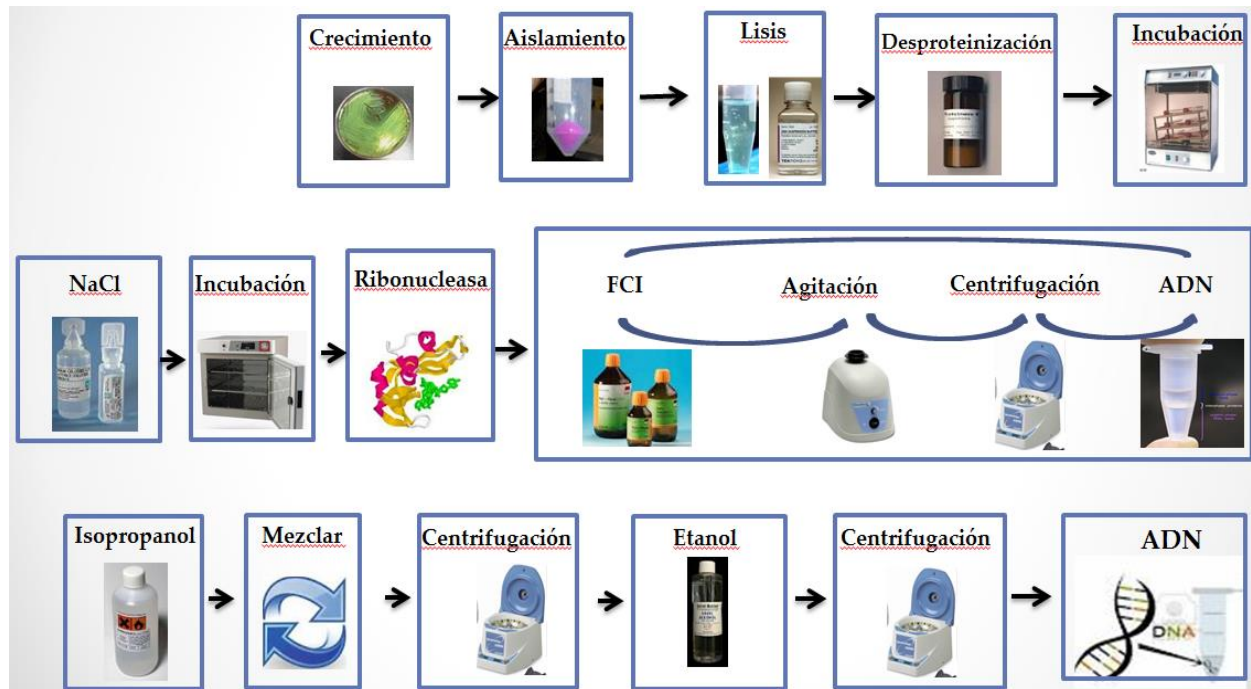


Fig. 3.11 Protocolo Fenol-Cloroformo para la extracción de ADN bacteriano.

3.9 Protocolo para purificación magnética de ADN

Este protocolo de extracción magnética fue elaborado por nosotros. Basándonos en varios protocolos existentes [44][45][46][31] y optimizándolos a nuestras necesidades. En la figura 3.12 puede apreciarse gráficamente el procedimiento de este protocolo.

Buffer de unión: NaCl 1M (pH 7), PEG 8000 (10%).

Buffer de lisis: 4.1 mL TE, 0.2 mL SDS (10%), 0.5 mL NaCl (0.7 M)/CTAB (10)%, 0.2 mL NaCl 5M.

1. 1 mL de cultivo de *E. coli*, se centrifuga a 7500 rpm por 5 minutos.
2. Resuspender el botón de *E. coli* en 180 μ L de **buffer de lisis**.
3. Mezclar por inversión e incubar a 50 °C por 1 hr.
4. Agregar 4 μ L de RNAsa, y dejar incubar a 37 °C durante 10 min.
5. Añadir 40 μ L de **partículas** (25 mg/mL).
6. Añadir 200 μ L de **buffer de unión**.
7. Mezclar por inversión e incubar por 5 min a temperatura ambiente.
8. Separar las micropartículas con el magneto.
9. Remover el sobrenadante.
10. Añadir 200 μ L de **etanol al 95%**.
11. Mezclar por inversión y separar con magneto.
12. Remover el sobrenadante
13. Añadir 200 μ L de **etanol al 70%**.
14. Mezclar por inversión y separar con magneto.
15. Remover el sobrenadante y dejar secar al aire por 10 minutos.
16. Añadir 30 o 50 μ L de buffer TE y poner a 65 °C con agitación.
17. Separar las micropartículas con magneto y remover el sobrenadante (conteniendo el ADN)
18. Centrifugar sobrenadante a 3000 rpm x 3 minutos.
19. Remover el sobrenadante (conteniendo el ADN).

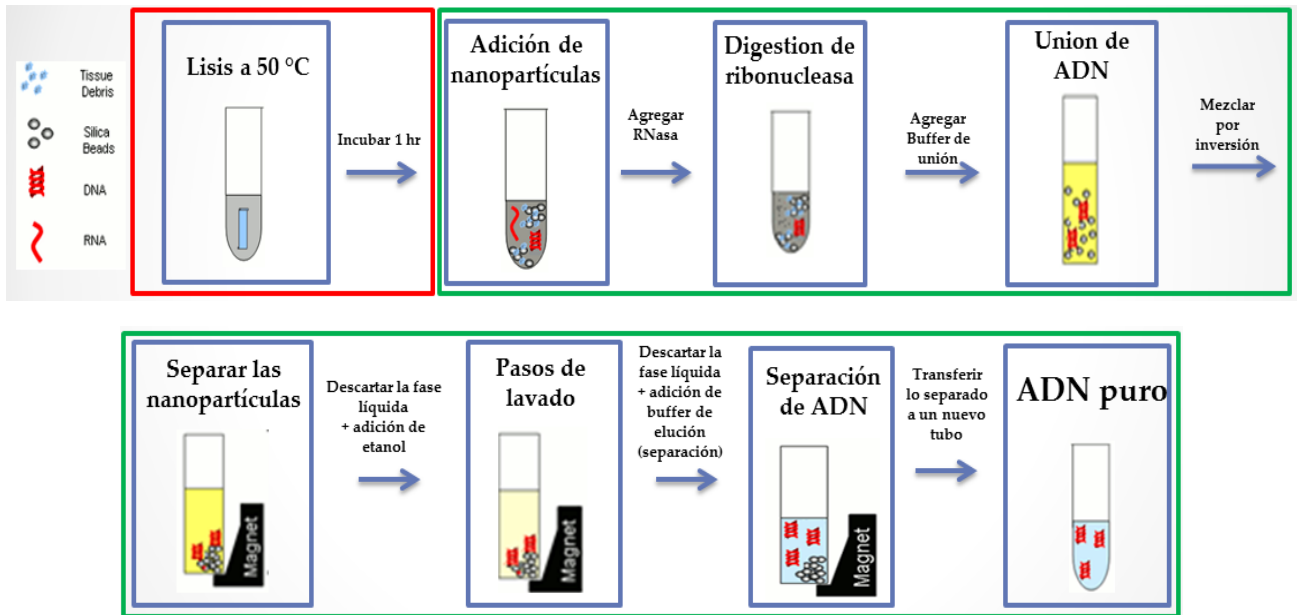


Figura 3.12: Protocolo para purificación de ADN magnéticamente.

IV. Resultados

El objetivo principal de este trabajo fue sintetizar nanopartículas capaces de purificar ADN magnéticamente. Esto se logra a partir de nanopartículas con un núcleo magnético y una cubierta de sílice. Con el fin de asegurar que obtuvimos nanopartículas, con estructura core-shell, magnéticas fue necesario caracterizar las muestras obtenidas. A continuación se presentarán los resultados de la caracterización de las partículas de magnetita, sílice y magnetita-sílice. Para la morfología y el tamaño de partícula con SEM y TEM; la estructura cristalina con difracción de rayos-X; la composición química fue caracterizada por medio de XPS; la cantidad de ADN purificado con absorbancia de los productos de la separación magnética de ADN con espectroscopia UV, así como con electroforesis en gel de agarosa.

4.1 Caracterización de nanopartículas de magnetita

Las partículas de magnetita obtenidas fueron puestas en solución acuosa para ser caracterizadas por las técnicas de microscopía electrónica de barrido y de transmisión. Así mismo, fueron secadas para las técnicas de XPS y XRD.

4.1.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM): magnetita

Las imágenes de las partículas de magnetita (Fe_3O_4) sintetizadas por el método de coprecipitación se muestran en la figura 4.1. La muestra fue dejada madurar en baño maría durante dicha muestra presenta forma granular indefinida. La muestra fue presionada en cinta adhesiva.

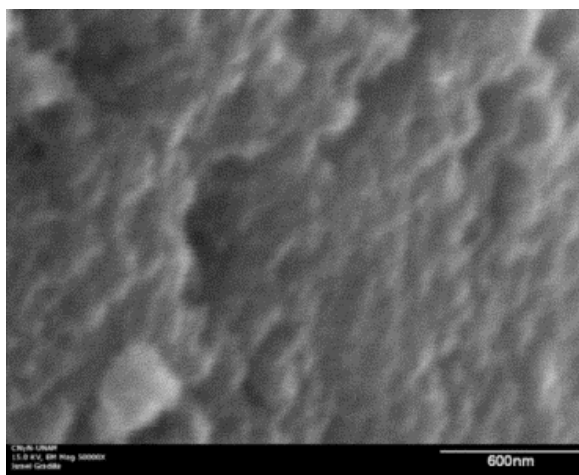


Figura 4.1. Imagen SEM del polvo de partículas de magnetita (Fe_3O_4).

4.1.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM): magnetita

Para poder apreciar la morfología de las partículas de magnetita fue necesario utilizar el microscopio electrónico de transmisión. Las imágenes de TEM de las partículas de magnetita, mostradas en la figura 4.2, tienen superficie granular y forma indefinida. Las imágenes a) y b) son de nuestras muestras sintetizadas por nuestro protocolo de síntesis sin ser sometidas al ultrasonido, las muestras de c) y d) sí fueron sometidas al ultrasonido mientras las muestras e) y f) además de ser sometidas al ultrasonido también fueron dejadas madurar a una temperatura de 50 °C en baño maría. Se observa aglomeración y superficie granular en todas las muestras. No hay una forma definida para las partículas. La forma de los granos es más definida y grande en las muestras que fueron sometidas a maduración, como puede apreciarse en las muestras e y f. La muestra g) son partículas de magnetita reportadas [37] maduras a 80 °C con diámetros de 5-30 nm. La muestra h) son partículas de magnetita reportadas [37] recubiertas con polietilenglicol (PEG) en medio básico (pH 11, hidróxido de amonio) y maduras a 50 °C con diámetros de 10-40 nm. La imagen i,j) son partículas de magnetita sintetizadas por medio del método de coprecipitación a 80 °C; barra de escala en “j” mide 50 nm [47]. La imagen k) son partículas de magnetita sintetizadas en medio básico (pH 11, hidróxido de amonio, sometidas a ultrasonido y maduras a 80 °C, obteniendo diámetro promedio de 8 nm. La imagen l) es de nanopartículas de magnetita sintetizadas con rango molar de $Fe^{3+}:Fe^{2+}$ - (2:1) utilizando como precursor NaOH, con pH 10 en la solución de síntesis y dejando madurar a 90 °C por 60 minutos [48].

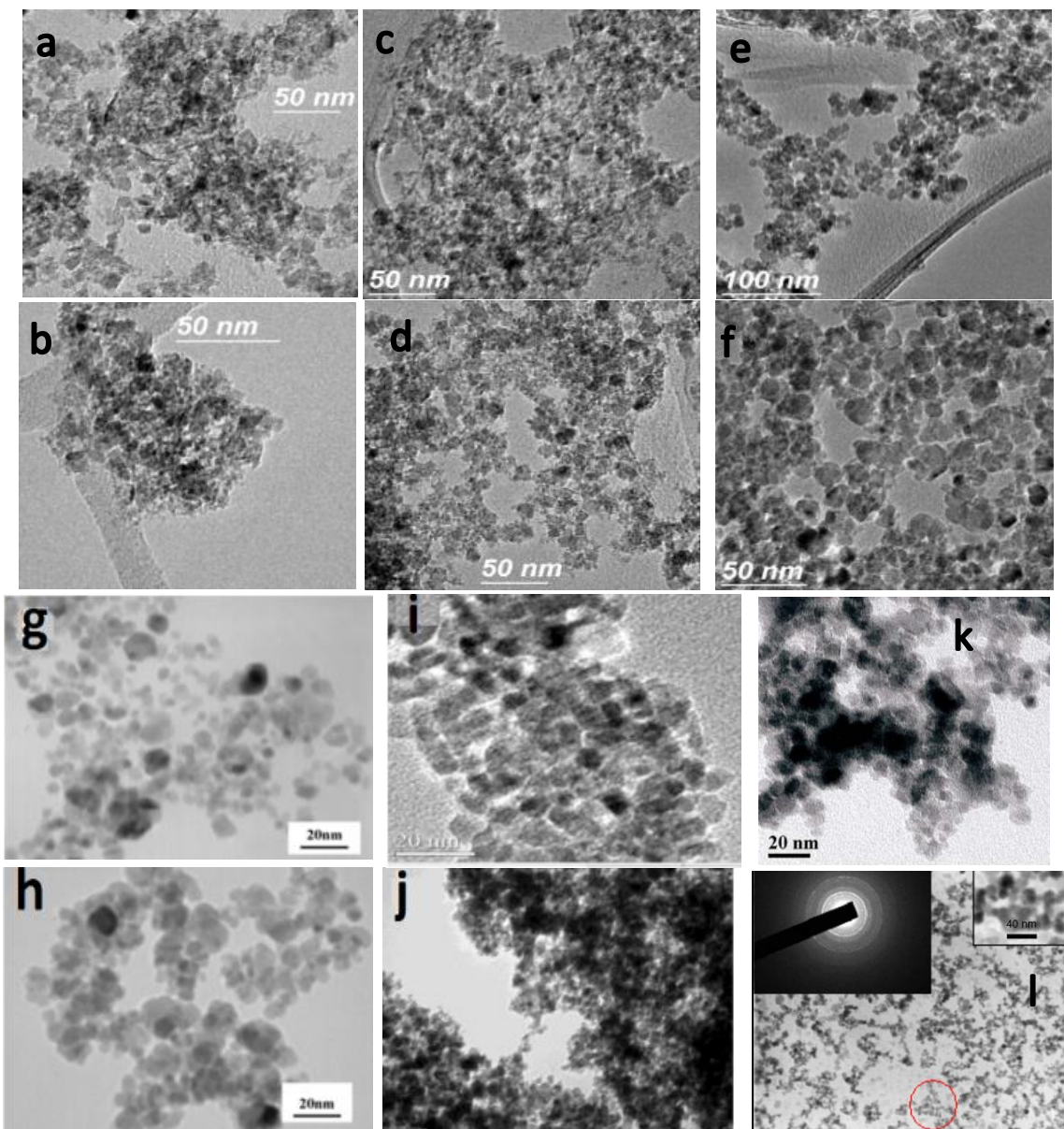


Figura. 4.2 Imágenes TEM de partículas de magnetita (Fe_3O_4) con diferentes condiciones de síntesis.

En la figura 4.3 se muestra la distribución de tamaño de grano en las partículas de magnetita sintetizadas después de ser sometidas a ultrasonido. Se puede observar una distribución de tamaños unimodal teniendo una media entre 15 y 17 nm. Tamaños menores de grano se pueden apreciar.

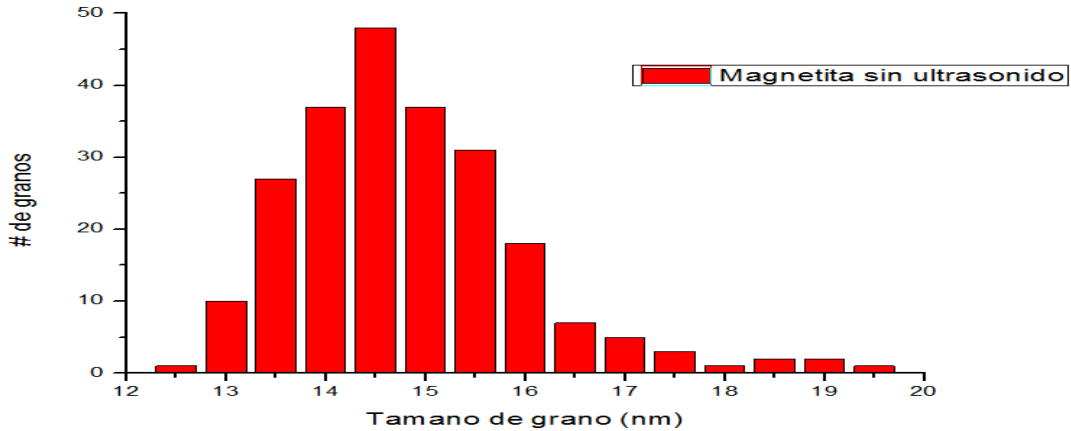


Figura 4. 3. Distribución de tamaño de grano en las partículas (~215 granos) de magnetita después de ser sometidas a ultrasonido. Se observa distribución de tamaño unimodal y media en 14.5 nm.

En la figura 4.4 se muestra la distribución de tamaño de grano en las partículas de magnetita sintetizadas después de ser sometidas al ultrasonido y ser sometidas a maduración durante 30 minutos a 50 °C. Se puede observar una distribución de tamaños unimodal teniendo una media entre 15 y 17 nm. Tamaños menores de grano se pueden apreciar. El análisis de área superficial BET arrojó los resultados de 93.3143 m²/g.

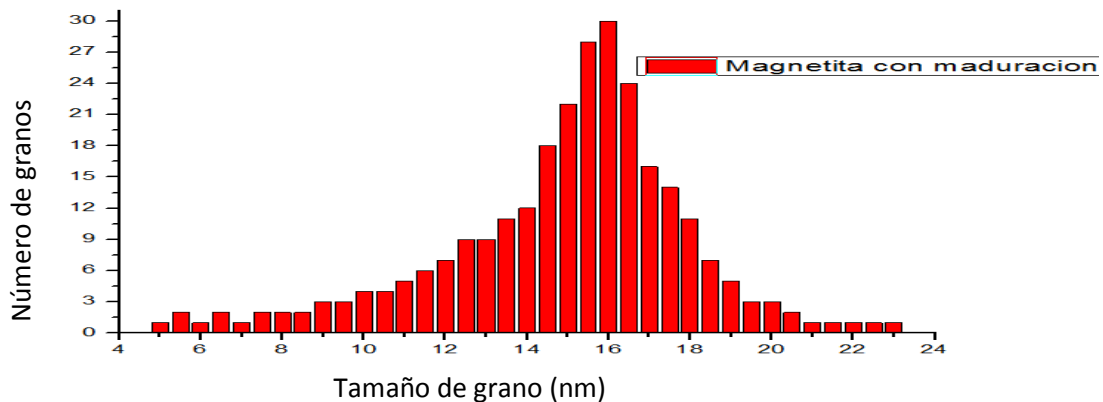


Figura 4.4. Dispersión de tamaño de partículas de magnetita con maduración.

4.1.3 Difracción de rayos X (XRD): magnetita

El patrón de difracción de rayos X de la muestra de magnetita antes de ser sometida al ultrasonido es presentado en la figura 4.5. En este se observa un tamaño de partícula promedio: 9.19 ± 1.63 nm (calculado con la fórmula de Scherrer). El difractograma fue comparado con las fichas cristalográficas de magnetita número 89 – 4319 (Fe_3O_4 cubica) y 89-6466 (Fe_3O_4 ortorrómbica). Se demuestra que la estructura cristalográfica de nuestra magnetita es cúbica.

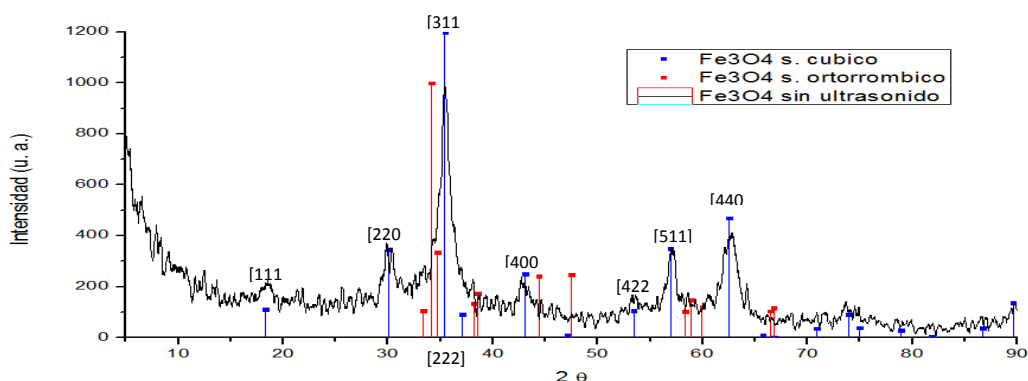


Figura 4.5. Patrón de difracción de rayos X de magnetita sin utilizar ultrasonido (a).

Cuando se sintetiza magnetita es normal que se obtengan otras fases y óxidos de hierro no deseadas. Una de las formas en las que podemos comprobar si se cuenta con magnetita es caracterizando la muestra por medio de difracción de rayos X. En la figura 4.6 no se puede apreciar de manera contundente la presencia de óxido férrico en fase α ni en estructura ortorrómbica.

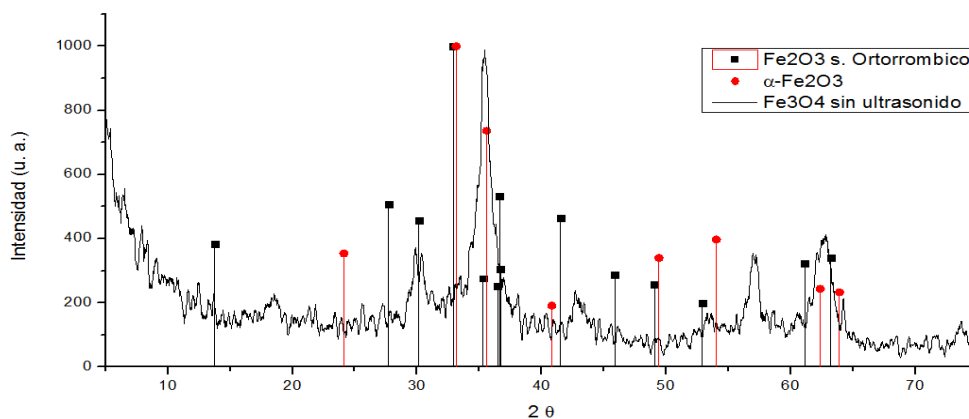


Figura 4.6 Patrón de difracción de rayos X de magnetita sin utilizar ultrasonido. De acuerdo con las fichas cristalográficas 89 – 7047 (Fe_2O_3 ortorrómbica) y 89-2810 (γ - Fe_2O_3 ortorrómbica) (b).

En la figura 4.7 se muestra el difractograma de la muestra de magnetita después del tratamiento ultrasónico. Además se compara con los datos de las fichas cristalográficas de magnetita con estructura cristalográfica cúbica y ortorrómbica.

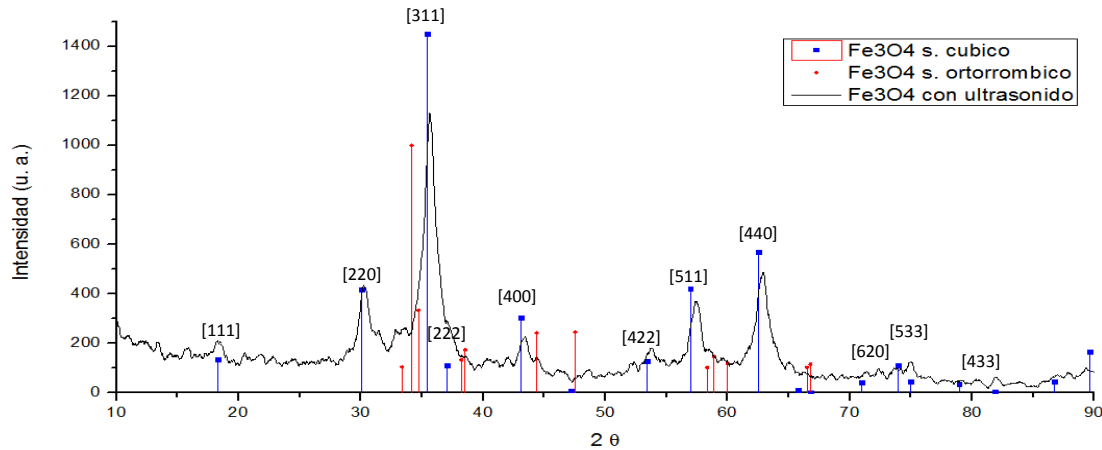


Figura 4.7. Patrón de difracción de rayos X de magnetita con ultrasonido y madurada. Mostró estructura cúbica al ser comparado con las fichas cristalográficas 89 – 4319 (Fe_3O_4 cubica) y 89-6466 (Fe_3O_4 ortorrómbica) (c).

4.1.4 Espectrometría de Fotoelectrones dispersados por rayos X: magnetita

Para saber la composición química de las muestras de magnetita la sometimos a la técnica de XPS. En la figura 4.9 se muestra el espectro perteneciente a la muestra de magnetita con maduración a 50 °C durante 30 minutos, donde no se aprecia contaminación inesperada. Se obtienen los picos representativos de Hierro 2p_{1/2} y 2p_{3/2}, además de los picos representativos de oxígeno 1,2s.

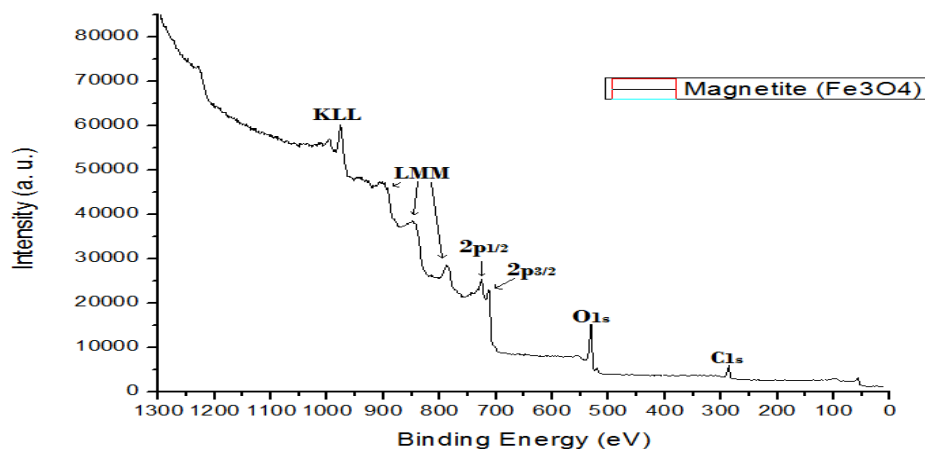


Figura 4.9. Espectro XPS de magnetita con ultrasonido y madurada.

Como pudimos apreciar, los resultados muestran que las partículas de magnetita tienen tamaño variable en el rango de los 8 a 20 nm y medias de 14.5 nm para las partículas sin maduración y 16 nm para las partículas con ultrasonido y maduras, con lo cual se logró obtener tamaño de partícula igual a algunos reportados utilizando el mismo método de síntesis [49]. Presentan propiedades magnéticas necesarias para la futura separación magnética de ADN [44]. El patrón de difracción de rayos X, describe cristalinidad en las partículas y estructura cúbica de magnetita. El espectro de XPS nos indica que las muestras de magnetita no presentan contaminación inesperada.

4.2 Partículas submicrométricas esféricas de sílice

Las imágenes de las partículas compuestas SiO_2 fueron obtenidas por el microscopio marca JEOL modelo JSM-5300.

4.2.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM): sílice

Como puede apreciarse en las figuras 4.10 (SEM) y 4.12 (TEM) se obtuvieron partículas submicrométricas de sílice con forma semiesférica definida. Como se muestra en la distribución de tamaño de partícula, en la figura 4.12, la media de tamaño de partícula fue de 226 nm y se tienen las siguientes características: Desviación estándar: 4; Media: 226; Máximo: 366; y Mínimo: 124, además se tiene una distribución de tamaño unimodal. Se tomaron como muestra para la estadística 240 partículas. El análisis de área superficial BET, para nuestras partículas de sílice, arrojó los resultados de $150.7693 \text{ m}^2/\text{g}$.

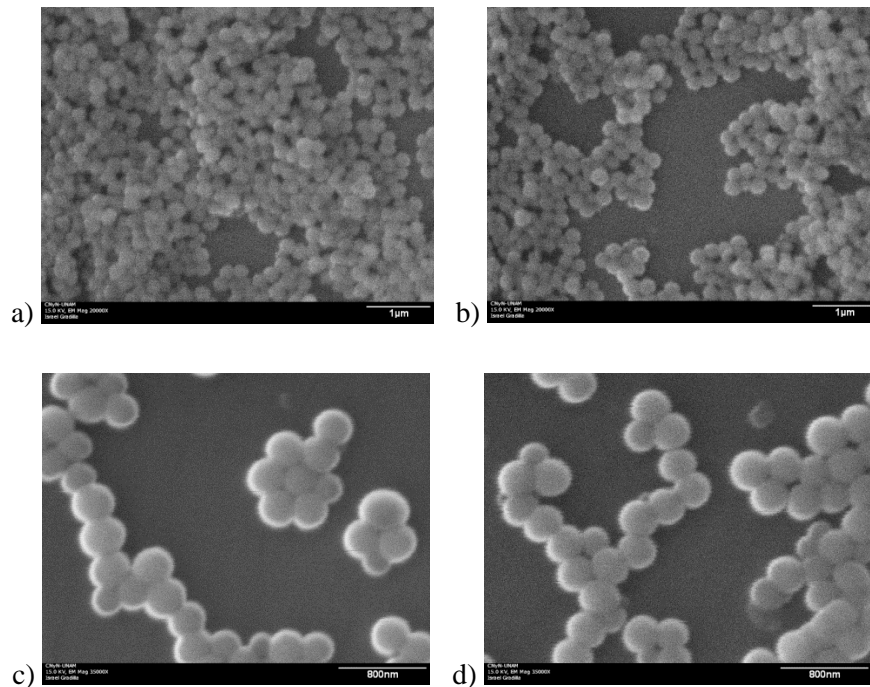


Figura 4.10. Imágenes SEM de partículas submicrométricas de sílice (SiO_2). Las imágenes a, b, c y d corresponden a la muestra de SiO_2 . Se puede apreciar su morfología esférica definida.

Las partículas de sílice reportadas, figura 4.11, muestran morfología muy similar con las nuestras; dispersión de tamaños grande y forma esférica bien definida. Teniendo una media de 224.2 nm de diámetro y una gran dispersión de tamaño. El método de síntesis es igual al nuestro: se utilizaron los siguientes reactivos en la siguiente relación; etanol (8 mol/L), TEOS (0.045 mol/L), [H₂O]/[TEOS] (66.7), NH₄OH (mol/L)[43].

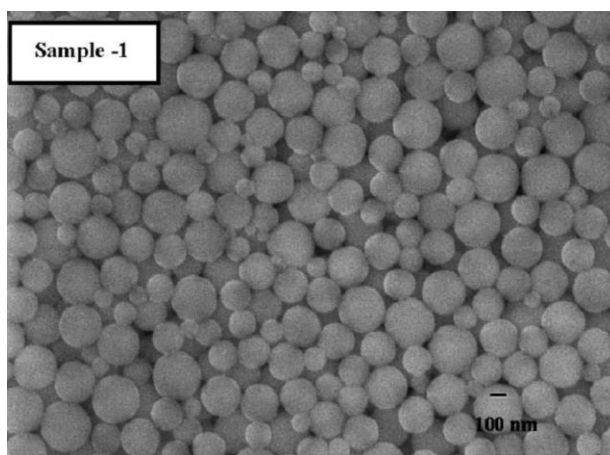


Figura 4.11. Imágen SEM de partículas esféricas de sílice. Mostrando forma definida y esférica. Con tamaños de partícula de 100 a 320 nm, aproximadamente [43].

4.2.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM): sílice

La figura 4.12 son las imágenes de TEM de nuestras partículas submicrométricas esféricas de sílice. Con la figura 4.13 nos muestra la distribución unimodal de tamaños de partícula y su media de 225 nm de diámetro.

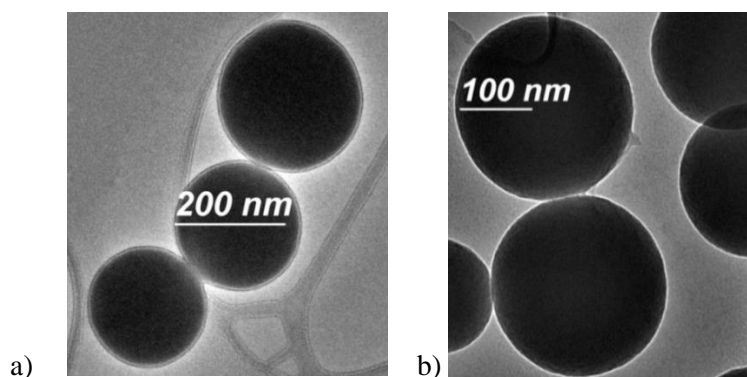


Figura 4.12. Imágenes TEM de nanopartículas de sílice. Las imágenes a y b corresponden a la muestra de SiO₂. Partículas de Sílice con morfología bien definida y esférica.

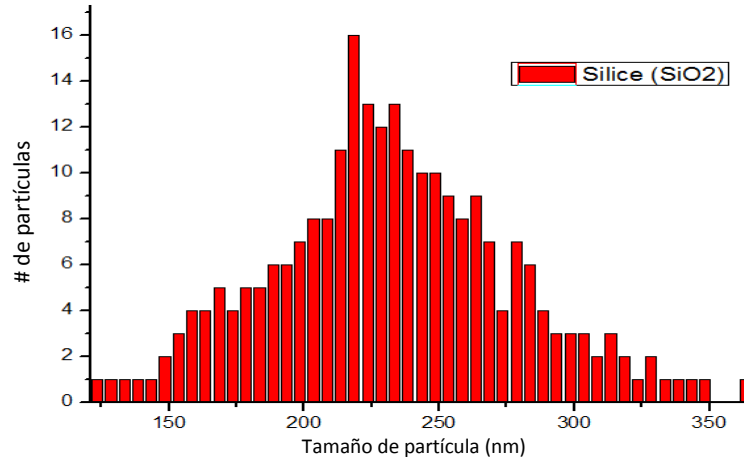


Figura 4.13. Distribución de tamaño de partículas (240 partículas) de sílice.

4.2.3 Difracción de rayos X (DRX): sílice

El difractograma de las partículas submicrométricas describe el lóbulo característico de todos los materiales amorfos, figura 4.14. La longitud de onda utilizada fue de 1.5405 Å (Cu). Como se puede apreciar, no hay picos representativos de cristalinidad para la muestra de partículas de sílice.

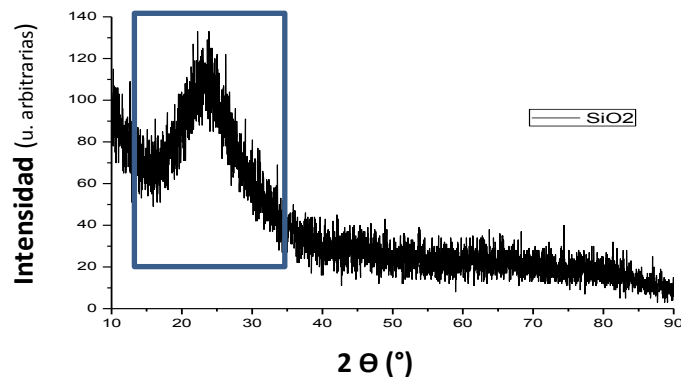


Figura 4.14. Patrón de difracción de partículas submicrométricas de sílice (SiO_2). No se muestran picos característicos de muestras cristalinas.

4.2.4 Espectrometría de Fotoelectrones dispersados por rayos X: sílice

Para saber la composición química de las muestras de sílice la sometimos a la técnica de XPS. En la figura 4.15 se muestra el espectro perteneciente a la muestra de sílice, donde no se aprecia contaminación severa. Se obtienen los picos representativos de silicio Si2s y Si2p.

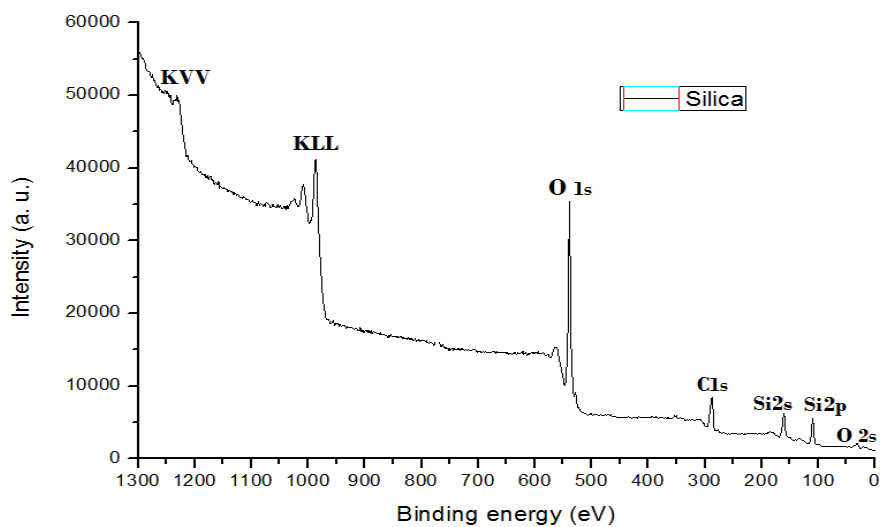


Figura 4.15. Espectro XPS de magnetita con ultrasonido y madurada.

4.3 Nanopartículas core-shell de magnetita-sílice

4.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM): magnetita-sílice

En la figura 4.16 podemos apreciar, de manera no muy clara, a las nanopartículas tipo core-shell de magnetita-sílice. Se alcanza a apreciar forma definida, semicircular y en forma de racimos debido a la preparación de la muestra: fue agregada una gota de etanol conteniendo a las nanopartículas en un portamuestras de vidrio.

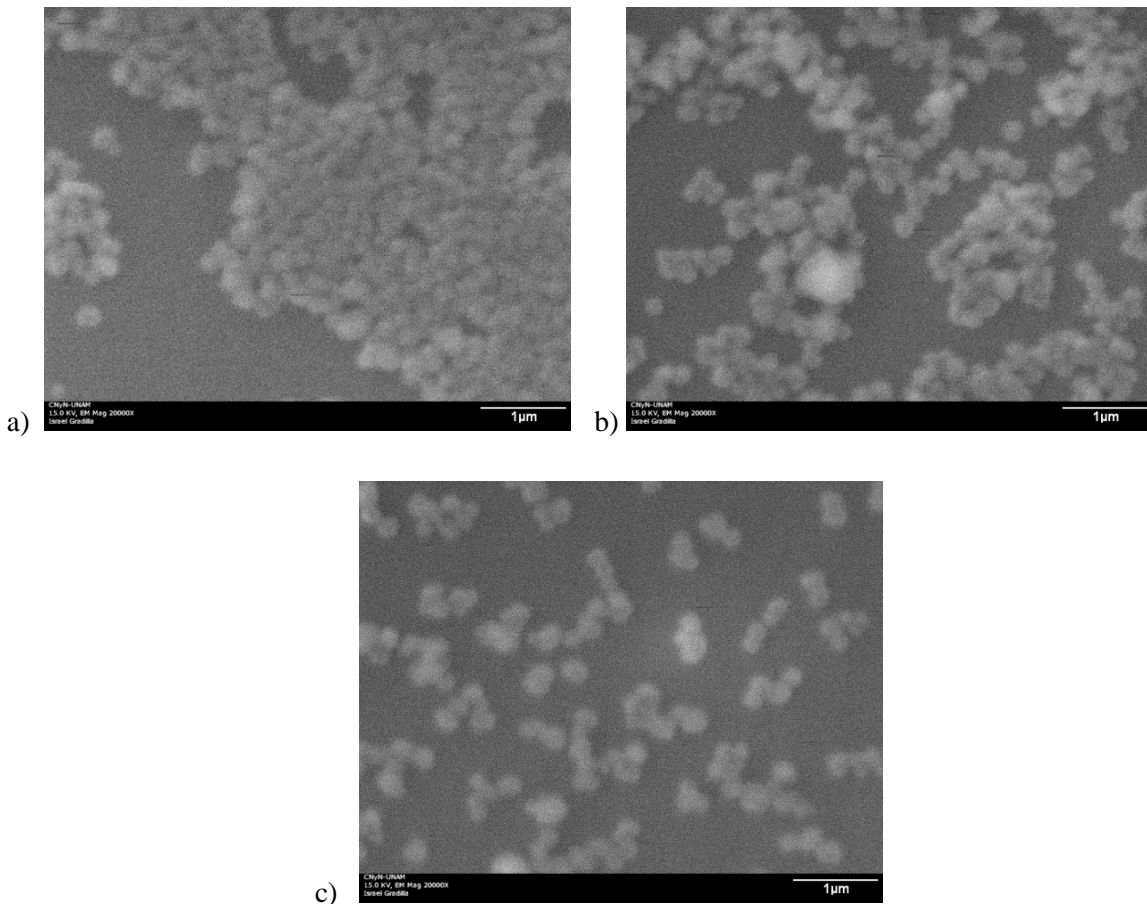


Figura 4.16. Imágenes SEM de nanopartículas de sílice (SiO_2) tipo core-shell. Las tres imágenes son misma muestra, siendo diluidas en cantidades diferentes de etanol: 1 mL,a); 1,5 mL,b); 2mL,c).

4.3.2 Microscopía electrónica de transmisión (TEM): magnetita-sílice

En las anteriores imágenes de SEM no se podía apreciar claramente la morfología de las partículas analizadas. Por lo tanto, se decidió hacer el análisis de TEM. Como se aprecia en la figura 4.17 la estructura core-shell puede ser apreciada, mostrando la magnetita en el núcleo y una capa externa de sílice. La figura 4.18 muestra el mismo experimento, pero reduciendo la cantidad de TEOS a 1/8 de la cantidad inicial. El tamaño promedio de partícula magnetita-sílice es mostrado en la figura 4.20. en la figura 4.19 se puede apreciar el resultado obtenido por Deng, Yong-Hui, et al. utilizando diferentes cantidades de TEOS como precursor para la capa externa de sílice. El tamaño de la capa de sílice es directamente proporcional a la cantidad de TEOS utilizada en la síntesis. El análisis de área superficial BET, para nuestras partículas de magnetita-sílice, arrojó los resultados de $217.418 \text{ m}^2/\text{g}$.

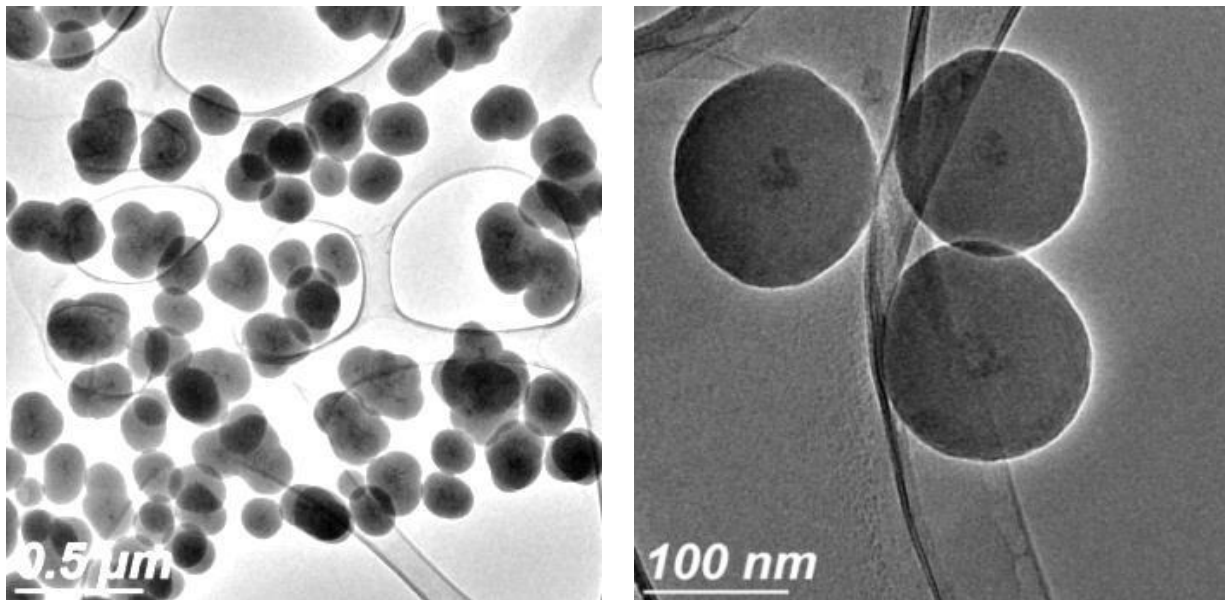


Figura 4.17. Imágenes TEM de nanopartículas de magnetita-sílice. Mostrando su tamaño de aproximadamente 100 nm y su composición core-shell de magnetita-sílice. Se aprecia que la cubierta de sílice de aproximadamente 50 nm de radio.

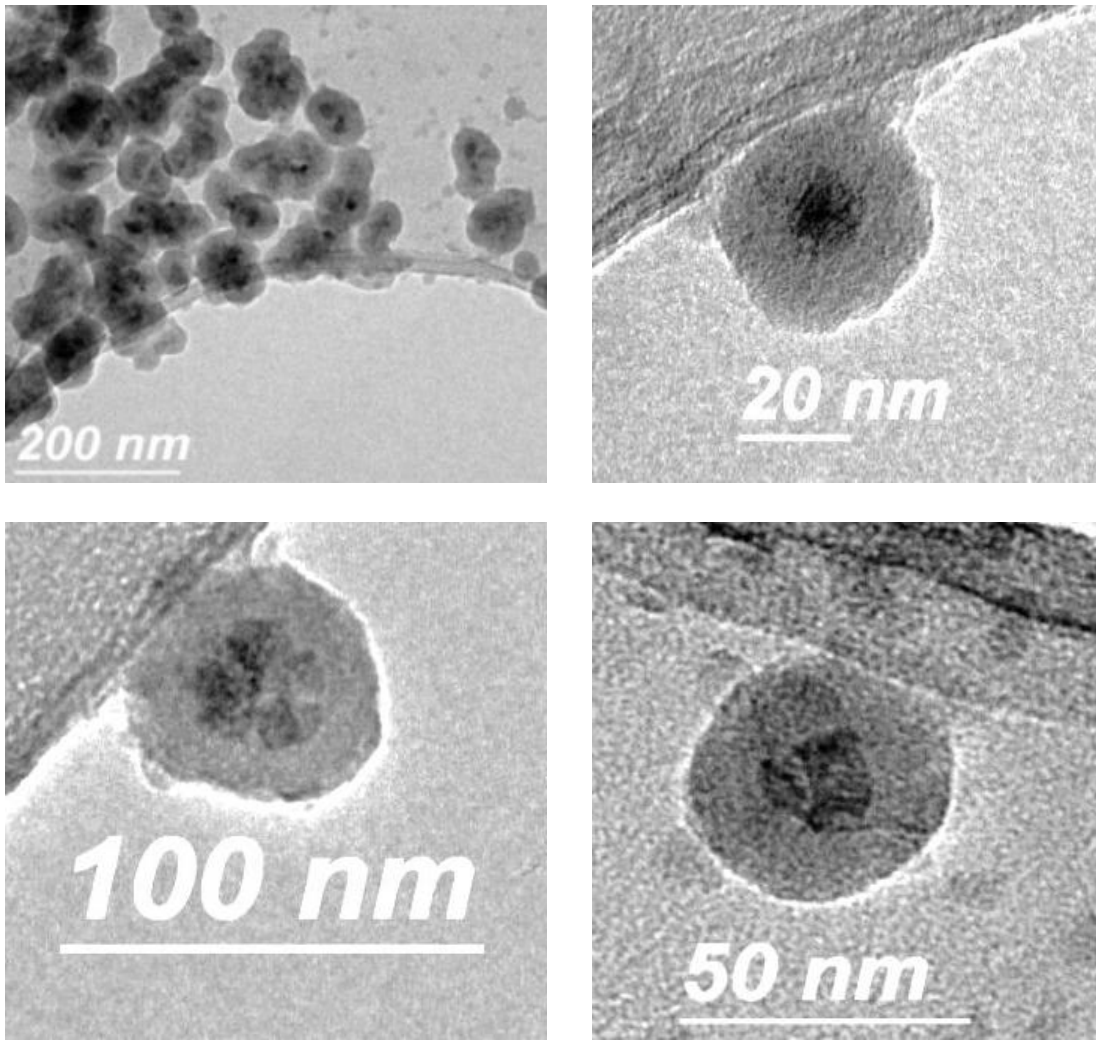


Figura 4.18. Imágenes TEM de nanopartículas de magnetita-sílice. Cantidad de TEOS reducida a 1/8 de la cantidad inicial.

La figura 4.19 son las imágenes TEM de nanopartículas con estructura core-shell de magnetita-sílice reportadas [48]. En ellas se puede observar el efecto de la cantidad de TEOS durante el recubrimiento de los núcleos de magnetita con sílice. Se puede observar que la cantidad de TEOS es directamente proporcional a la dimensión de la capa externa de sílice.

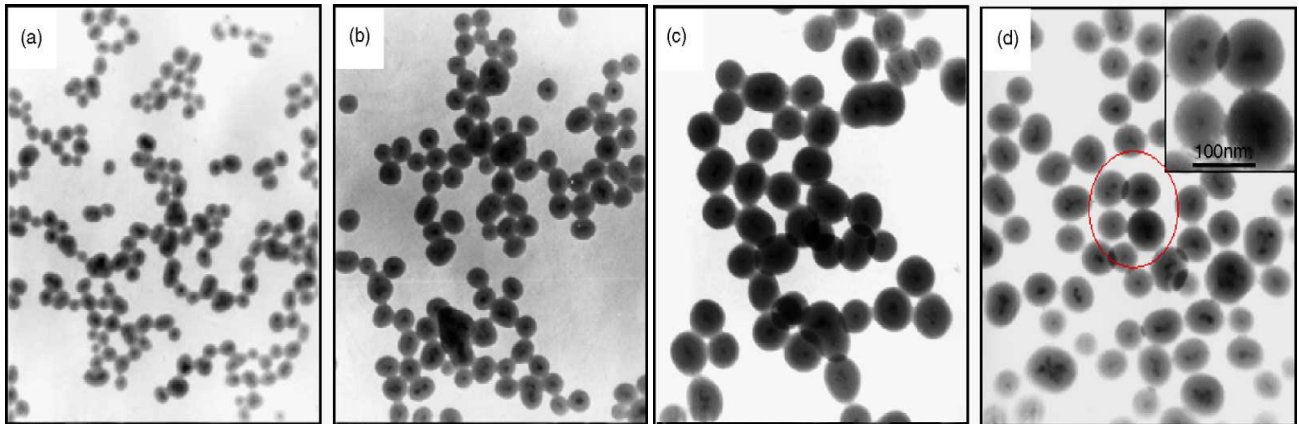


Figura 4.19. Imágenes TEM de nanopartículas de magnetita-sílice utilizando diferentes cantidades de TEOS: (a) 1 mL, (b) 3 mL, (c) 5mL and (d) 7mL como precursor [48].

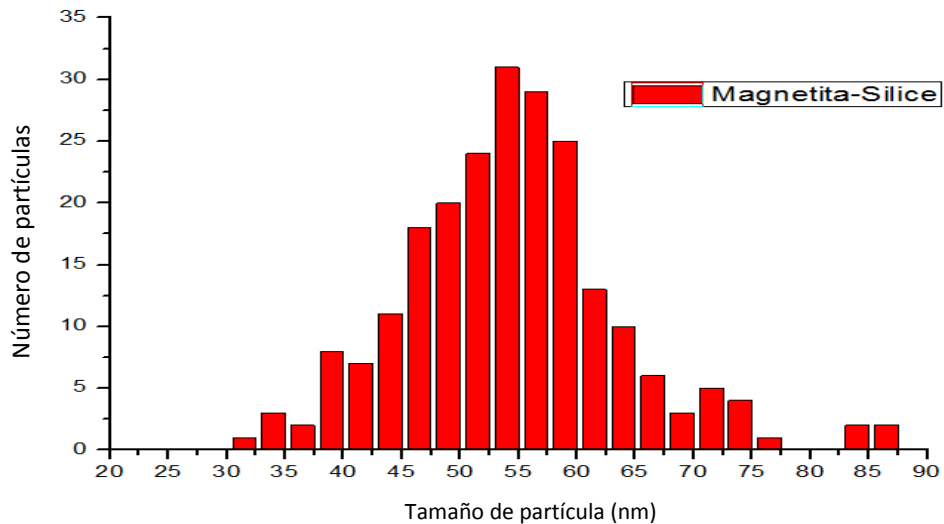


Figura 4.20. Gráfica de tamaño de nanopartícula de magnetita-sílice.

4.3.3 Difracción de rayos X (DRX): magnetita-sílice

La estructura cristalina de las muestras core-shell de magnetita-sílice fue sometida a difracción de rayos X. Mostrando un difractograma, en la figura 4.21 se observan los picos representativos de la estructura cúbica de magnetita confirmados con la ficha cristalográfica 89-4319 y también muestra el lóbulo representativo de la capa externa de sílice en los ángulos 2θ bajos (17° - 20°).

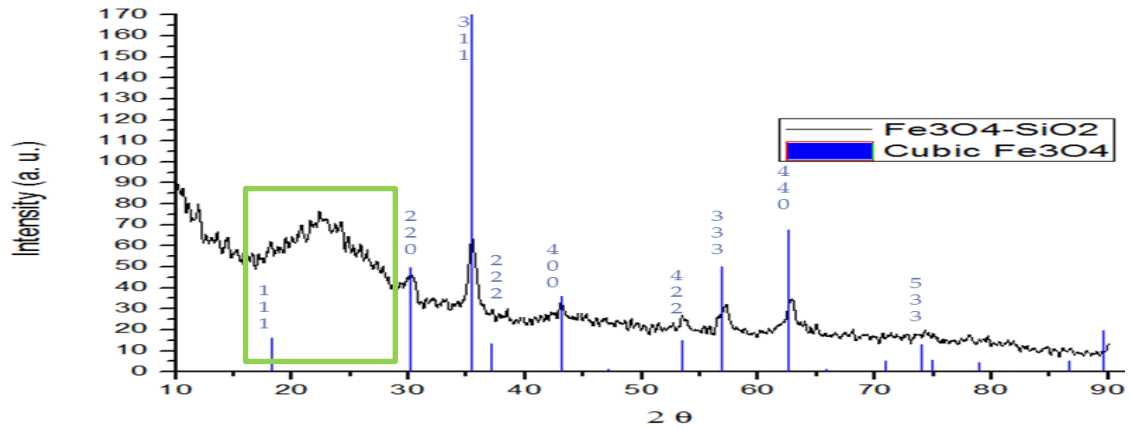


Figura 4.21. Patrón de difracción de magnetita-sílice ($Fe_3O_4-SiO_2$), mostrando las estructuras cristalinas combinadas de magnetita y sílice. Comparación con ficha cristalográfica de magnetita cúbica (89-4319)

4.3.4 Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS): magnetita-sílice.

Para saber la composición química de las muestras de magnetita- sílice la sometimos a la técnica de XPS. En la figura 4.22 se muestra el espectro perteneciente a la muestra de sílice, donde no se aprecia contaminación inesperada. Se observan los picos representativos de silicio Si2s y Si2p y hierro Fe2p1/2 y Fe2p3/2.

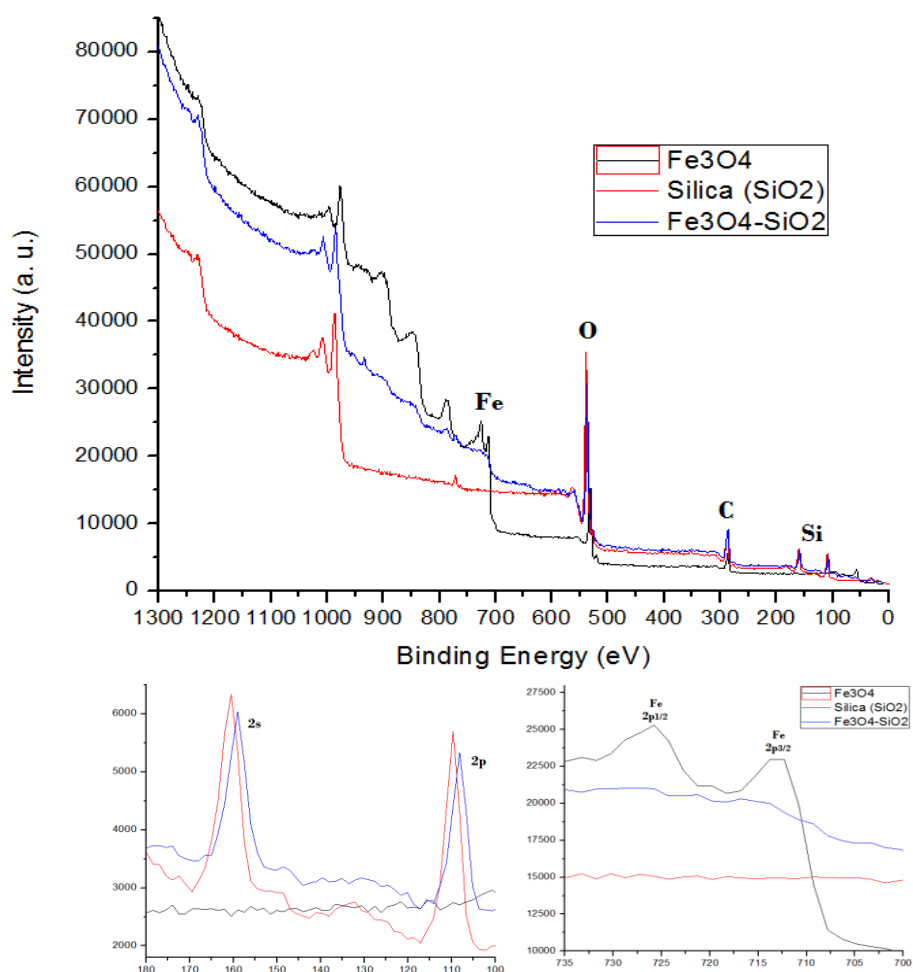


Figura 4.22. Espectro XPS de nanopartículas de magnetita, sílice y magnetita-sílice (a). Picos característicos para Hierro (b) y los picos característicos para Silicio (c).

4.4 Extracción de ADN

La absorbancia para el ADN extraído con el protocolo de extracción magnética fue la siguiente: con una cantidad de 5 μL de muestra. Una electroforesis en gel de agarosa al 1%, figura 4.23. Ésta es resultado de correr las muestras de ADN bacteriano extraídas con ayuda de nuestro protocolo de extracción magnética, corrida a 80 volts durante 35 min. Puede apreciarse ARN degradado en la parte inferior de la imagen, debido a que no se utilizó la enzima capaz de digerirlo: RNasa.

Una solución de dsDNA con una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ debe tener una A_{260} igual a 1.0. Esto nos lleva a la siguiente ecuación:

$$X_{\text{g(ADN)}} = (50 \mu\text{g}) * (A_{\lambda(260)})$$

Donde X_{g} son los gramos a ADN, $A_{\lambda(260)}$ es la absorbancia de la solución medida con una longitud de onda de 260 nm. Después se multiplica por el factor de dilución: 1000 $\mu\text{L}/5 \mu\text{L}$: 200

La tabla 4.1 nos muestra los resultados de las extracciones de ADN con las nanopartículas de magnetita-sílice.

Muestra	$A_{\lambda(260)}$	$A_{\lambda(280)}$	$A_{\lambda(260)}/A_{\lambda(280)}$	Rendimiento ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0.035	0.017	2.058	350
2	0.0341	0.016	2.131	341

Tabla 4.1. Resultados de las extracciones de ADN con las nanopartículas de magnetita-sílice.

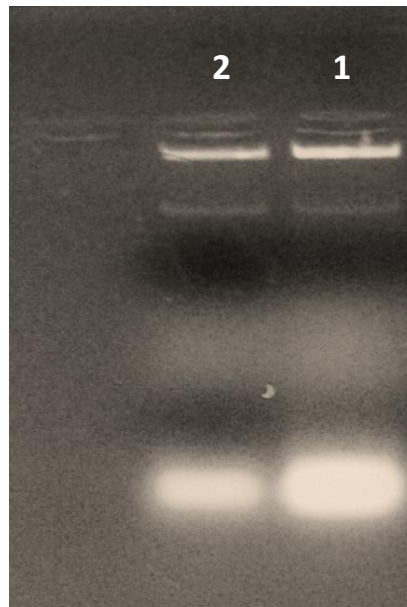


Figura 4.23 Imagen de electroforesis en gel de agarosa al 1% (0.35 g de agarosa). 5 micro litros de muestra de ADN extraído con protocolo de extracción magnética y visto con luz UV.

En la figura 4.24 se aprecia la electroforesis de ADN bacteriano en gel de agarosa al 1%. De las muestras obtenidas con ayuda del protocolo de extracción magnética. El gel fue corrido a 80 volts durante 35 min. Se observan en los carriles 1-3 las purificaciones de ADN bacteriano utilizando las partículas de magnetita-sílice, 1: nanopartículas, 2: micropartículas y 3: compuesto, y en los carriles 4-5 la purificación de ADN con la técnica tradicional de Fenol/Cloroformo, donde la contaminación de ARN es visible. Las puridades obtenidas por estos métodos

Muestra	$A_{\lambda(260)}$	$A_{\lambda(280)}$	$A_{\lambda(260)} / A_{\lambda(280)}$	Rendimiento ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.033	0.0226	1.46	330
2	0.021	0.0154	1.38	210
3	0.023	0.0175	1.31	230
4	0.007	0.0036	1.91	70
5	0.006	0.0031	1.92	60

Tabla 4.2. Resultados de las extracciones de ADN.

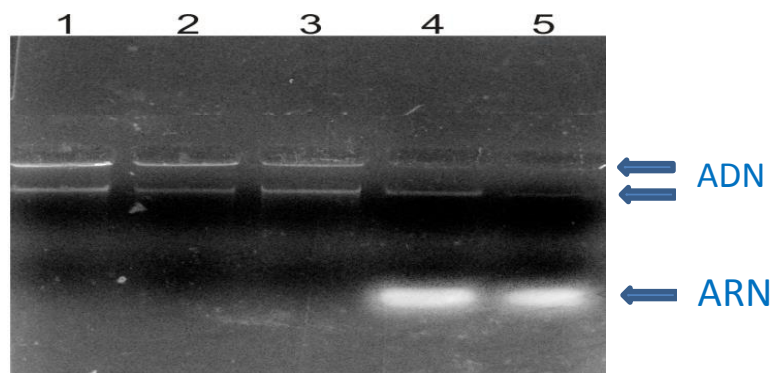


Figura 4.24 Imagen de electroforesis de ADN en gel de agarosa 1% teñido en Bromuro de Etidio y visto con luz UV.

La imagen de gel de electroforesis reportada caracterizando ADN, de bacteria *E. coli*, obtenido de las extracciones y compararlo con kits comerciales, figura 4.25 [50]. Para evitar que el ADN se degradara, se utilizó 1 μ L de buffer de restricción de digestión comercial incubando la solución por 1 h a 37 °C. Terminando la reacción al calentar a 65 °C durante 10 min. La solución fue analizada en un gel de agarosa al 1% la cual no mostró diferencias significantes en los patrones de digestión de ADN obtenidos utilizando separación magnética y método de kits comerciales [50]. La extracción de ADN obtenida de 1 mL de cultivo de bacteria fue realizada utilizando el método de separación magnética, kit comercial y el de fenol-cloroformo, se muestra en la figura 4.26.

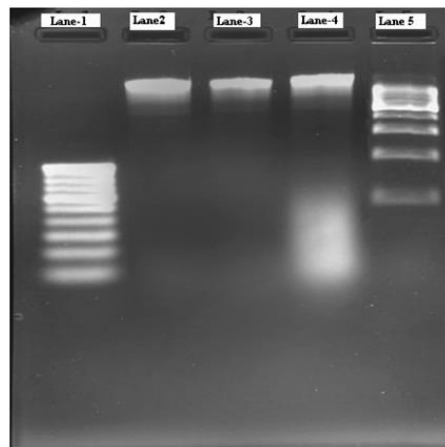


Figura 4.25 Imagen de electroforesis de ADN en gel de agarosa 1%. Línea 1 y 5; marcador de peso molecular: 100 y 500 bp respectivamente. La línea 2 ADN genómico digerido de *EcoRI* aislado utilizando nanopartículas magnéticas. Línea 3; Kit comercial. Línea 4; método de fenol-cloroformo. [50]

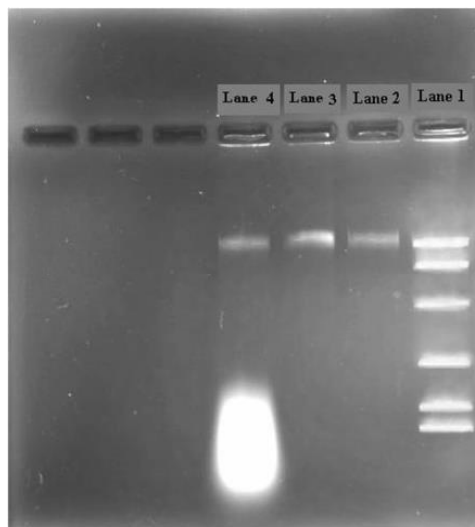


Figura 4.26 Imagen de electroforesis de ADN bacteriano en gel de agarosa 1%. Línea 2; utilizando nano partículas magnéticas. La línea 3 ADN obtenido utilizando el kit comercial de extracción. Línea 4; método de fenol-cloroformo. Línea 1; marcador de peso molecular. [50]

V. Discusión

El objetivo principal de esta tesis fue “*Crear un material magnético con afinidad al ADN para utilizarlo en la extracción del mismo*”. Una de las maneras de conseguirlo es sintetizar dicho material con estructura core-shell, situando en el núcleo un material magnético y en la coraza un material con afinidad al ADN. Para comprobar el rendimiento de las nanopartículas las utilizamos en la purificación de ADN bacteriano. En este capítulo se discutirán los resultados obtenidos en este trabajo.

Las partículas de magnetita fueron sintetizadas por medio del método de coprecipitación. Siendo sometidas a ultrasonido y dejadas madurar durante la síntesis. El ultrasonido afecta en la forma y dispersión del tamaño de grano en las partículas de magnetita tal y como se aprecia en la figura 4.2 (a-f). Después de ser sometidas al ultrasonido, se maduraron a una temperatura de 80 °C en baño maría durante 60 minutos con lo cual aumenta el tamaño de grano en la partícula de magnetita, como se muestra en la figura 4.2 (e, f). El resultado de ser sometidas a ultrasonido y maduración es un tamaño de grano promedio de 14.5 nm obteniendo una dispersión de tamaño unimodal, figura 4.3. Los resultados en la morfología de la magnetita sintetizada, figura 4.2 (g-l), son muy similares a los ya reportados [37] [47] [48]. La aglomeración de partículas de magnetita es visible en todas las imágenes de la figura 4.2. Las muestras de magnetita que contienen recubierta polimérica de PEG y con maduración a temperatura mayor de 80 °C tienen tamaño mayor y están mejor definidas que las que no las tienen, como es el caso de las imágenes de la figura 4.2 (e, f y h). Sin la capa de PEG recubriendo la nano partícula de magnetita, se obtiene un menor tamaño promedio de partícula, figura 4.2 (h).

Todas las muestras de magnetita tuvieron respuesta magnética comprobada con un imán de Neodimio de intensidad máxima de 15 mT. La estructura cristalina de la magnetita sintetizada es la correspondiente a la de su fase cúbica como puede apreciarse en el difractograma de rayos X de la figura 4.5. La presencia de Fe_2O_3 es apreciable en el difractograma en la figura 4.6 y en la figura 4.7, lo anterior es debido a la oxidación del Hierro durante la síntesis de magnetita. Los resultados de XPS para las muestras de magnetita no presentan contaminación inusual, figura 4.9, al igual que las reportadas por Fujii et al. [51].

Como segundo paso se procedió a sintetizar partículas de sílice con el principal objetivo de que poder controlar la forma esférica de las partículas. Obtuvimos partículas esféricas (figura 4.10 y 4.12) con tamaño de diámetro promedio de 228 nm, figura 4.13. Comparando los resultados con los reportados por Kota Sreenivasa Rao, et.al. (2005), figura 4.11, muestran morfología muy similar con las nuestras, figura 4.10; dispersión de tamaños grande y forma esférica bien definida. Teniendo una media de 224.2 nm de diámetro y una gran dispersión de tamaño. Lo anterior debido a las condiciones de síntesis, cantidad de TEOS, temperatura, pH de solución, tipo de alcohol como solvente y el precipitante utilizado. Cada uno de los parámetros anteriores es crucial para poder obtener partículas esféricas de los tamaños obtenidos. Las partículas de sílice por medio del método de síntesis de hidrólisis y condensación tienden a conformar partículas con forma esférica bien definida. En el patrón de difracción de rayos X, figura 4.14, está presente el lóbulo característico de las estructuras amorfas (*Wacker HDK*) [25]. Debido al análisis XPS de nuestra muestra de sílice y resultados reportados por Shchukarev et al., se puede concluir que no hay contaminación inusual en la muestra.

El último paso de síntesis, y poder obtener nuestra estructura core-shell de magnetita-sílice, fue necesario unir las propiedades de cada uno de los materiales sintetizados. Así que seguimos con el último paso de síntesis; la síntesis de partículas con estructura núcleo-coraza de magnetita-sílice. Para saber con certeza si la estructura de nuestras partículas era de forma núcleo-coraza, tuvimos que recurrir a la microscopia electrónica. Las figuras 4.17 y 4.18 nos muestran que la estructura núcleo-coraza fue conseguida para nuestras partículas. Aunque, como se puede apreciar en la figura 4.17, las partículas tienen una coraza de aproximadamente 50 nm de espesor lo cual causaba que la respuesta magnética se debilitara, comprobado por tiempo de decantación magnética con el imán. Con la finalidad de combatir este problema y esperando una mejor respuesta magnética, fueron realizados cambios al método de síntesis para poder disminuir el tiempo de decantación magnética. La cantidad de reactivo precursor de sílice, tetraetilortosilicato (TEOS), fue disminuida a la octava parte de la utilizada inicialmente en la síntesis. Lo anterior fue hecho, basándonos en los resultados obtenidos por Yong-Hui Deng, et. al. (2005) donde se logra aumentar o disminuir el grosor de la capa de sílice directamente con el aumento o disminución de la cantidad de precursor TEOS. La relación entre el grosor y la cantidad de TEOS es directamente proporcional (figura 4.19). Los resultados presentes en la figura 4.18 muestran que las partículas magnetita-sílice disminuyen su tamaño debido al poco contenido de TEOS en la síntesis. Estas partículas pasaron a ser de tamaño promedio de 55 nm de diámetro y tener una distribución unimodal. Con el método de síntesis utilizado se recubre con una capa delgada de sílice. Cuando se hace esto, la sílice recubre el núcleo tomándolo como semilla, en este caso los núcleos de magnetita. Si las partículas de

magnetita llegan a estar aglomeradas, la capa de sílice recubre a dicho aglomerado de partículas. Por lo tanto es necesario contar con núcleos bien dispersos y sin aglomeración alguna para lograr nanopartículas bien definidas. Ésto puede ser corroborado por los resultados que obtuvieron Yong-Hui Deng, et. al. (2005). Ellos obtuvieron nanopartículas bien dispersas de magnetita, las cuales utilizaron como núcleos magnéticos, y los recubrieron por el mismo método que nosotros, logrando partículas mejor definidas que las nuestras debido a la gran dispersión de los núcleos, figura 4.19.

Por medio de difracción de rayos X se comprobó que las nanopartículas de magnetita-sílice siguen teniendo la estructura cúbica de la magnetita y presenta el lóbulo amorfo de la sílice, figura 4.21, mostrando similitudes con lo reportado anteriormente por Qian-HongWan et al. (2009). Y por último, no se mostró contaminación presente por medio de XPS figura 4.22.

Para poder cumplir con el objetivo principal de esta tesis, se realizaron purificaciones de ADN utilizando las nanopartículas magnéticas tipo core-shell de magnetita-sílice. Las extracciones fueron exitosas en todos los casos, ya que en todos los geles de electroforesis había ADN presente, como se aprecia en la figura 4.23. Este ADN fue purificado con ayuda de nuestras nanopartículas y el protocolo de purificación magnética de ADN. Se alcanzan a apreciar dos líneas luminosas en las líneas del gel. Éstas representan bandas de ADN. La banda superior es ADN con mayor peso molecular que la banda de ADN inferior. Por lo tanto, se concluye que la banda superior es ADN genómico y la banda inferior ADN fragmentado. Estas bandas también pueden ser apreciadas en la figura 4.24. Las 5 líneas del gel contienen ADN purificado. Las líneas 1-3 fueron obtenidas por el método de extracción magnética. Estas tres líneas no presentan ARN ya que no se utilizó RNasa, la cual se encarga de digerirlo, en el método de purificación magnética. Por otro lado, es evidente que en las líneas 4 y 5 la bandas de ADN son más tenues que las primeras tres líneas. La relación de absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 ($\lambda_{260}/\lambda_{280}$) es mayor para las muestras de ADN purificado con el método tradicional. No obstante las mediciones de absorbancia favorecen las nanopartículas de magnetita-sílice, pudiendo observar un rendimiento de 330 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN purificado. Al comparar nuestros resultados, figuras 4.23 y 4.24, con los ya reportados por A. Bandyopadhyay, et. al. (2011), figuras 4.25 y 4.26, cuyas extracciones de ADN fueron con nanopartículas de magnetita sin ningún tipo de recubrimiento, podemos observar que nosotros tenemos dos bandas de ADN en nuestro gel de agarosa mientras ellos obtienen una banda simple. Lo anterior sugiere que nuestro protocolo de extracción no está siendo llevado a cabo de la manera más adecuada posible, ya que nuestro ADN está siendo fragmentado. Más pruebas de extracción de ADN deben realizarse para poder obtener bandas singulares de ADN extraído por medio de nuestro método.

VI. Conclusión

En la presente sección se describen las conclusiones que se obtuvieron al sintetizar las nanopartículas de magnetita y magnetita-sílice, así como las recomendaciones para trabajo a futuro.

- ✓ Se obtuvieron nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4), con respuesta magnética de estructura cristalina cúbica.
- ✓ Se obtuvieron partículas submicrométricas esféricas de sílice, definidas, con un promedio de 226 nm y con una distribución de tamaños grandes, logrando obtener control de la morfología semiesférica, lo cual fue de importancia para poder recubrir nuestras nanopartículas de magnetita.
- ✓ Las nanopartículas de magnetita están recubiertas con sílice amorfa, con estructura core-shell de forma semiesférica y con promedio de 55.67 nm. Asimismo se demostró que la cantidad de TEOS utilizada en el método de recubrimiento es proporcional al tamaño de la coraza de sílice en las nanopartículas de magnetita-sílice
- ✓ Las nanopartículas core-shell, micropartículas y los compositos de magnetita-sílice obtenidos mostraron ser capaces para de purificar ADN.
- ✓ El método de purificación magnética de ADN consume menos tiempo y cantidad de reactivos, entre ellos reactivos nocivos para el medio ambiente.
- ✓ Se corrieron electroforesis en gel de agarosa, de las muestras de ADN bacteriano purificado con ayuda de las nanopartículas core-shell de magnetita-sílice, mostrándose en todas la presencia de ADN.
- ✓ El costo total de los materiales para sintetizar 250 mg (comercialmente se venden 200 mg) de nanopartículas de magnetita-sílice (core-shell) fue de aproximadamente 5 dólares americanos.

6.1 RECOMENDACIONES

Cabe mencionar que a pesar de los resultados obtenidos aún quedan varios puntos por llevar a cabo, los cuales enuncio a continuación.

- Medición de lazo de histéresis magnética de nanopartículas.
- Recubrir magnetita con sílice y alúmina por medio de ALD (Atomic Layer Deposition).
- Funcionalizar las nanopartículas de magnetita-sílice con otros grupos funcionales.
- Comparar rendimiento de nanopartículas con rendimiento de partículas comerciales.
- Obtener imágenes de TEM y AFM de nanopartículas con ADN purificado.
- Estandarizar el método de purificación magnética para obtener mejores rendimientos.

VII. Bibliografía

- [1] M. N. Cardoza Contreras, “Síntesis solvotérmica y caracterización de nanoalambres de WO_x ,” CNyN-UNAM, 2010.
- [2] R. M. C., “Síntesis y caracterización de nanopartículas de oro para aplicaciones biomédicas,” UABC, 2010.
- [3] C. J. F. Shen S. Wu W., Guo K., Meng H., “A novel process to synthesize magnetic hollow silica microspheres,” *Colloids and Surfaces A: Physicochem*, vol. 311, pp. 99–105, 2007.
- [4] S. D. Kamaruddin S., “The preparation of silica–titania core–shell particles and their impact as an alternative material to pure nano-titania photocatalysts,” *Today*, vol. 161, no. 1, pp. 53–58, 2011.
- [5] F. J. R. Brenden J. Theaker, Katherine E. Hudson, “Doped hydrophobic silica nano- and micro-particles as novel agents for developing latent fingerprints,” *Forensic Science International*, vol. 174, no. 1, pp. 26–34, 2008.
- [6] A. C. Templeton, W. P. Wuelfing, and R. W. Murray, “Monolayer-Protected Cluster Molecules,” *Account. Chemical Research*, vol. 33, p. 27, 2000.
- [7] X. Xu, J. Wang, C. Yang, H. Wu, and F. Yang, “Sol-gel formation of $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ nanocomposites: Effects of different iron raw material,” *Journal of Alloys and Compounds*, vol. 468, no. 414, 2009.
- [8] B. S. E. Mihai, “Chunming,” *CS*, vol. 01, no. 22, p. 101, 2007.
- [9] H. Li, D. R. Daniel, M. M. Maye, and C. Zhong, “Core-Shell Nanostructured Nanoparticle Films as Chemically Sensitive Interfaces,” *Analytical Chemistry*, vol. 73, no. 4441, 2001.
- [10] Y. Song, Y. Cao, P. Chen, Q. Zhao, and G. Shen, “Fabrication of mesoporous $\text{CdTe}/\text{ZnO}/\text{SiO}_2$ core/shell nanostructures with tunable dual emission and ultrasensitive fluorescence response to metal ions,” *Chemistry Materials*, vol. 21, no. 68, 2009.
- [11] M. L. M., “Composites with Nanomaterials,” *American Scientific Publishers*.
- [12] Z. Y. Sounderya N., “Use of Core/Shell Structured Nanoparticles for Biomedical Applications.,” 2007.
- [13] K. Han, Z. Zhao, Z. Xiang, C. Wang, J. Zhang, and B. Yang, “The sol-gel preparation of ZnO/silica core-shell composites and hollow silica structure,” *Materials Letters*, vol. 61, no. 363, 2007.

- [14] J. Zhao, L. Wu, and J. Zhi, "Fabrication of micropatterned ZnO/SiO₂ core/shell nanorod arrays nanocrystalline diamond film and their application to DNA hybridization detection," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 18, no. 2459, 2008.
- [15] A. Figuerola and R. et al Di Corato, "From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications," *Pharmacological Research*, vol. 62, no. 2, pp. 126–143, 2010.
- [16] F. Yang and Y. et al Li, "Paramagnetism," *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA*, 2003.
- [17] A. Lu and E. L. et al Salabas, "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application.," *Angewandte Chemie International*, vol. 46, no. 8, pp. 1222–1244, 2007.
- [18] N. A. Sánchez, G. Pacheco, P. Perez, H. Armendariz, M. L. Guzman, J. Saniger, and J. Fripiat, "Mesoporous silica from rice hull ash," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 82, p. 614, 2007.
- [19] G. Pacheco-Malagaón, P. Perez, N. A. Sánchez, M. L. Guzman, C. López, J. Saniger, F. Hernandez, and J. Fripiat, "Local order in depolymerized silicate lattices," *Journal of Inorganic Chemistry*, vol. 44, no. 23, 2005.
- [20] S. D. Kamaruddin S., "The preparation of silica–titania core–shell particles and their impact as an alternative material to pure nano-titania photocatalysts," *Today*, vol. 161, no. 1, pp. 53–58, 2011.
- [21] W. L. Yuan J., Xing W., Gu G., "The properties of organic pigment encapsulated with nano-silica via layer-by-layer assembly technique," *Original Research Article Dyes and Pigments*, vol. 2, no. 76, pp. 463–469, 2008.
- [22] K. S. Zhu Y., Fang Y., Borchardt L., "PEGylated hollow mesoporous silica nanoparticles as potential drug delivery vehicles," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 141, pp. 199–206, 2011.
- [23] S. Y. Liu Y. D., Fang F. F., Choi H. J., "Fabrication of semiconducting polyaniline/nano-silica nanocomposite particles and their enhanced electrorheological and dielectric characteristics," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 381, pp. 17–22, 2011.
- [24] H. Y. H. Wang C. T., Wu C. L., Chen I. C., "Humidity sensors based on silica nanoparticle aerogel thin films," *Original Research Article Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 107, no. 1, pp. 402–410, 2005.
- [25] K.- Othmer, "Silica," *Encyclopedia of chemical technology*. Wiley, pp. 977–1029.
- [26] Warmick, "Determining the isoelectric point point," *Colloidal Dynamics*, 2011.

- [27] S. et al Douglas, *Principios de analisis instrumental*, 5th ed. España: , 2001.
- [28] B. D. Cullity, *Elements of X-ray Diffraction*. EUA: Adison Wesley, 1956.
- [29] P. Poole and C. and F. Owens, *Introduction to nanotechnology*. EUA: Wiley, 2003.
- [30] F. C. Jentoft, “Diffuse Reflectance IR and UV-vis Spectroscopy Fritz-Haber-,” - Gesellschaft, 2004.
- [31] P. de la C. C. Álamo J. P., López J., “Purificación de ácidos nucleicos,” Cordoba, 2005.
- [32] S. Neveu and et al Bee, A, “Size-Selective Chemical Synthesis of Tartrate Stabilized Cobalt Ferrite Ionic Magnetic Fluid,” *Journal of Colloid and Interface Science*2, vol. 255, no. 2, pp. 293–298, 2002.
- [33] J. Lee and T. et al Isobe, “Magnetic properties of ultrafine magnetite particles and their slurries prepared via in-situ precipitation,” *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 109, pp. 121–127, 1996.
- [34] K. Kandori and et al Kawashima, Y., “Effects of citrate ions on the formation od monodispersed cubic hematite particles,” *Journal os Colloid and Interface Sciense*, vol. 152, pp. 284–288, 1992.
- [35] A. L. Willis and N. J. et al Turro, “Spectroscopic characterization of the surface of Iron Oxide nanocrystals,” *Chemistry of materials*, vol. 17, no. 24, pp. 5970–5975, 2005.
- [36] Z. Liu and et al Yang, X. B., “Preparation and characterization of magnetic P (St-co-MAA-co-AM) microspheres,” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 302, no. 2, pp. 529–535, 2006.
- [37] D.-L. Zhao, P. Teng, Y. Xu, Q.-S. Xia, and J.-T. Tang, “Magnetic and inductive heating properties of Fe₃O₄/polyethylene glycol composite nanoparticles with core-shell structure,” *Journal of Alloys and Compounds*, p. 4, 2010.
- [38] Brinker C. J., *Sol-Gel Science*. ISBN, 1990, pp. 1–12.
- [39] J. O. Flores Flores, “Obtencion de sonogeles de SiO₂ en ausencia de Catalizadores,” UNAM-Ciencia e Ingenieria de Materiales, 2008.
- [40] L. C. Klein, *Sol-gel Technology for thin films, fibers, preforms, electronics, and specialty shapes*. Noyes Publications, 1988.
- [41] D. R. Vollet, D. A. Donatti, A. Ibañez Ruiz, and W. C. de Castro, “Phys. Rev.,” 2003.

- [42] L. L. Hench, *Sol-Gel Silica: Properties*. Noyes Data Corporation/ Noyes Publications, 1998.
- [43] K. S. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige, and K. Makino, "A novel method for synthesis of silica nanoparticles," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 289, pp. 125–131, 2005.
- [44] S. Ruobing, W. Yucong, Y. Hu, L. Chen, and Q.-H. Wan, "Preparation of magnetite-loaded silica microspheres for solid-phase extraction of genomic DNA from soy-based foodstuffs," *J. of Chromatography A*, vol. 1216, pp. 6389–6389, 2009.
- [45] S. A. Miller, D. D. Dykes, and H. F. Polesky, *A simple salting out procedure for extracting DNA from human cell*. 1988, p. 1215.
- [46] S. K. Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, "Short Protocols in Molecular Biology," in *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th ed., I. John Wiley & Sons, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2002, p. 1512.
- [47] Y. Weia, B. Hanb, X. Hua, Y. Linc, X. Wangd, and X. Denga, "Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties," *2011 Chinese Materials Conference*, vol. 27, pp. 632–637, 2011.
- [48] D. Yong-Hui, W. Chang-Chun, H. Jian-Hua, Y. Wu-Li, and F. Shou-Kuan, "Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach," *Colloids and Surfaces A: Physicochem*, vol. 262, pp. 87–93, 2005.
- [49] B. Jaramillo Tabares, A. A. Zuleta Gil, and F. Jaramillo Isaza, "Effects of the synthetic method on the particle size and purity of magnetite," *Grupo de corrosion y Proteccion (GCP)*, 2009.
- [50] S. C. and K. S. A. Bandyopadhyay, "Rapid isolation of genomic DNA from E. coli XL1 Blue strain approaching bare magnetic nanoparticles," *CURRENT SCIENCE*, vol. VOL. 101,, no. 2, 2011.
- [51] T. Fujii, F. M. F. de Groot, and G. A. Sawatzky, "In situ XPS analysis of various iron oxide films grown by NO₂-assisted molecular-beam epitaxy," *PHYSICAL REVIEW B*, vol. 59, no. 4, p. 8, 1999.