

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Nanociencias**

**Extracción de ácidos nucleicos usando nanopartículas
magnéticas núcleo-coraza**

Tesis para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Jorge Torres Rodríguez

Ensenada, Baja California, México
2017

Tesis defendida por
Jorge Torres Rodríguez

y aprobada por el siguiente Comité

Dr. Gerardo Soto Herrera
CoDirector de tesis

Dr. Franklin David Muñoz Muñoz.
CoDirector de tesis

Dr. Javier Alonso López Medina
Dra. Edna Lorena Hernández López.
Dr. Jesús Alberto Maytorena Córdoba.
Dr. Daniel Saucedo Carvajal.



Dr. Sergio Fuentes Moyado
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta Jorge Torres Rodríguez como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias

Extracción de ácidos nucleicos usando nanopartículas magnéticas núcleo-coraza

Resumen aprobado por:

Dr. Gerardo Soto Herrera
CoDirector de tesis

Dr. Franklin David Muñoz Muñoz
CoDirector de tesis

Se llevó a cabo la síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$) por el método de coprecipitación química. Luego, estas nanopartículas fueron recubiertas con una coraza de sílice (SiO_2), a través del método sol-gel. De esta forma se desarrollaron sistemas nanoestructurados núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ y $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ con tamaños menores a los 100 nm. Con estos materiales se realizó un procedimiento experimental para su aplicación en la extracción magnética de ácido desoxirribonucleico (ADN), evaluando los rendimientos de extracción mediante absorción de luz ultravioleta y electroforesis en gel. Las caracterizaciones de los materiales núcleo-coraza propuestos se realizaron mediante difracción de rayos X (XRD), microscopias electrónicas (SEM, TEM) y espectroscopias electrónicas (EDS, FTIR, XPS). Con este trabajo se demostró que los sistemas propuestos son potenciales candidatos para la fabricación industrial de sistemas para la extracción magnética de ácidos nucleicos.

Palabras clave: Nanopartículas núcleo-coraza; extracción magnética de ácidos nucleicos; magnetita; ferrita de cobalto zinc.

Abstract of the thesis presented by Jorge Torres Rodríguez as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience

Nucleic acid extraction using magnetic core-shell nanoparticles

Abstract approved by:

Dr. Gerardo Soto Herrera

Thesis CoDirector

Dr. Franklin David Muñoz Muñoz

Thesis CoDirector

It was carried out the synthesis of nanoparticles of magnetite (Fe_3O_4) and cobalt zinc ferrite ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$) by a chemical coprecipitation method. Later, these particles were covered with a shell of silica (SiO_2), via sol-gel method. With this process, nanostructure systems of core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ and cobalt zinc ferrite $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ with smaller sizes than 100 nm, were developed. An experimental process for a magnetic extraction of deoxyribonucleic acids application was carried out with these materials, evaluating the extraction yields by ultraviolet light absorption and gel electrophoresis. The characterization of these core-shell materials were performed under X-ray diffraction (XRD), electronic microscopies (SEM, TEM) and electronic spectroscopies (EDS, FTIR, XPS). With this work it was demonstrated that the proposed systems are potential candidates for industrial fabrication of nucleic acids magnetic extraction systems.

Keywords: Core-shell nanoparticles; magnetic nucleic acid extraction; magnetite; cobalt zinc ferrite.

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada al mejor de mis amigos, el que siempre me escucha aunque yo a veces olvide escuchar. Él es mi Papá.

Agradecimientos

Gracias a mi familia, y amigos en general por brindarme de todo el apoyo y de los cariños que un hijo, hermano y compañero necesita.

A mi Madre por ser el motor de la familia, que con su esfuerzo y trabajo ha logrado lo que se ha propuesto en la vida, es un gran ejemplo a seguir.

A mi hermana Yolanda que es parte de mí ser, con la que comparto muchos gustos y que sé que me entiende y yo la entiendo incondicionalmente, y que no cambiaría por nada el tiempo que he pasado a su lado.

A mi Padre por ser la figura paterna y a quien le debo la razón de seguir un estudio en el camino de las ciencias.

Al Dr. Franklin que me guio sin dudarle desde el día que lo conocí. De quien he aprendido muchas cosas que algún día me gustaría poner en práctica cuando viaje a otro país.

Al Dr. Gerardo Soto quien ha movido montañas para que yo esté aquí haciendo uso de instalaciones y equipos de laboratorio. Gracias por su amistad.

Al Dr. Javier que me compartió sus resultados, fruto de su tiempo y dedicación al magnetismo de la materia.

A la Dra. Lorena Hernández a quien admiro mucho porque en el laboratorio me enseñó a escuchar el entorno, para trabajar con un buen desempeño.

Al Dr. Jesús Maytorena que conoce muchas formas de resolver problemas y que ahora seguro yo le he ocasionado uno más.

Al Dr. Daniel Carvajal de quien su formalidad y dedicación al trabajo motiva mis pasos.

A la Dra. Amelia Portillo del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias UABC por su gran apoyo y paciencia.

Al Maestro David Domínguez por su asistencia en los análisis de XPS

Al Doctor Hugo Borbón por su amabilidad y buena voluntad para las tutorías del FTIR.

A la Maestra Eloísa Aparicio por sus consejos y tutorías sobre el XRD

Al Maestro Israel Gradilla gracias por los momentos agradables y chuscos en operación del SEM.

Al Microscopista Francisco Medina por tan arduo trabajo e intensa búsqueda de nanopartículas en el TEM.

Al CICESE por ser una gran institución que me abrió las puertas a una nueva oportunidad para continuar mis estudios con un posgrado en Nanociencias.

Al CNyN por ser un gran intermediario compuesto por grandes personas que impulsan el desarrollo de la ciencia y la tecnología en sus aulas e instalaciones.

A la UABC que es mi alma mater de estudios universitarios y que me permitió una vez más pasar un gran momento en sus laboratorios para la elaboración de mi trabajo de tesis.

Gracias al CONACyT y a la beca No. 689884 la cual me permitió emprender la tarea y concluirla con éxito.

A Dios por guiarme dentro del camino de la vida, con altas y bajas, pero con una actitud positiva siempre.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	x
Lista de tablas.....	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 – Antecedentes	1
1.2 – Justificación	5
1.3 – Hipótesis.....	6
1.4 – Objetivos	7
1.4.1 – Objetivo general	7
1.4.2 – Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2. Marco teórico.....	8
2.1 – Nanotecnología	8
2.2 – Nanomateriales	8
2.3 – Nanopartículas	10
2.3.1 – Nanopartículas metálicas	10
2.3.2 – Nanopartículas magnéticas (NPM).....	11
2.3.3 – Magnetismo de nanopartículas: Superparamagnetismo.....	14
2.4 – Óxido de hierro.....	16
2.5 – Ferrita	17
2.5.1 – Estructura cristalina tipo espinela	17
2.5.2 – Magnetita (Fe_3O_4)	18
2.5.3 – Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)	19
2.5.4 – Ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$).....	19
2.6 – Síntesis de nanopartículas magnéticas	20
2.7 – Estabilización de nanopartículas magnéticas.....	21
2.7.1 – Funcionalización por materiales orgánicos.....	22
2.7.1.1 – Estabilizantes monoméricos y surfactantes.....	23

2.7.2 – Funcionalización por materiales inorgánicos	24
2.7.2.1 – Sílice.....	24
2.8 – Síntesis sol-gel: método Stöber	25
2.9 – Ácidos nucleicos: ADN y ARN	27
2.10 – Extracción de ácidos nucleicos	27
2.10.1 – Línea celular para la extracción de ácidos nucleicos.....	28
2.10.2 – Extracción magnética de ácidos nucleicos	28
Capítulo 3. Metodología experimental.....	30
3.1 – Reactivos químicos y material de laboratorio	30
3.2 – Instrumentación para caracterización	31
3.2.1 – Difracción de rayos X (XRD).....	31
3.2.2 – Espectroscopia de luz infrarroja (FTIR).....	31
3.2.3 – Microscopia electrónica de barrido (SEM)	32
3.2.4 – Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDS).....	32
3.2.5 – Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)	32
3.2.6 – Microscopia electrónica de transmisión (TEM).....	32
3.2.7 – Espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta.....	33
3.3 – Preparación de nanopartículas magnéticas núcleo-coraza.....	33
3.3.1 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$)	33
3.3.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)	35
3.3.3 – Sinterización de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc	36
3.3.4 – Reactor para la síntesis continua de nanopartículas magnéticas	36
3.4 – Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos.....	37
3.4.1 – Preparación del cultivo de extracción	37
3.4.2 – Extracción magnética de ácidos nucleicos	38
3.4.3 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de solución cloroformo.....	38
3.4.4 – Medición de absorción de luz UV y electroforesis en gel	39
Capítulo 4. Resultados.....	40
4.1 – Síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4).....	40
4.1.1 – Estudio previo.....	41
4.1.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$).....	43
4.1.2.1 – Caracterización XRD de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	43

4.1.2.2 – Caracterización FTIR de Ácido Cítrico y CTAB.....	44
4.1.2.3 – Caracterización FTIR de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	44
4.1.2.4 – Caracterización SEM y EDS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	46
4.1.2.5 – Caracterización XPS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	46
4.1.2.6 – Caracterización TEM de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	47
4.1.2.7 – Distribución de tamaños de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	48
4.2 – Síntesis de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$).....	48
4.2.1 – Estudio previo.....	49
4.2.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$).....	51
4.2.2.1 – Caracterización XRD de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	51
4.2.2.2 – Caracterización FTIR de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	52
4.2.2.3 – Caracterización SEM y EDS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	54
4.2.2.4 – Caracterización XPS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	55
4.2.2.5 – Caracterización TEM de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	56
4.2.2.6 – Distribución de tamaños de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	57
4.3 – Dispersión de nanopartículas núcleo-coraza en medio acuoso	58
4.4 – Cuantificación de extracción de ácidos nucleicos por espectroscopia UV.....	59
4.5 – Electroforesis en gel agarosa para extracciones de ácidos nucleicos	60
Capítulo 5. Discusiones.....	61
5.1 – Sistemas de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)	61
5.1.1 – Estudio previo.....	62
5.1.2 – Análisis sobre el recubrimiento de sílice	62
5.1.3 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$).....	63
5.2 – Sistemas de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$).....	65
5.2.1 – Estudio previo.....	65
5.2.2 – Análisis sobre el control de la temperatura	66
5.2.3 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto-zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$).....	66
5.3 – Dispersión de nanopartículas núcleo-coraza en medio acuoso	69

5.4 – Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos por espectroscopia UV	70
5.4.1 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de extracción magnética.....	70
5.4.2 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de solución cloroformo.....	71
5.5 – Electroforesis en gel agarosa para las extracciones de ácidos nucleicos.....	72
Capítulo 6. Conclusiones	74
Perspectivas	76
Literatura citada	77
Anexos.....	84
<i>Anexo A – Síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)</i>	<i>84</i>
<i>Anexo B – Síntesis de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe_2O_4$)</i>	<i>86</i>
<i>Anexo C – Tabla de solubilidad.....</i>	<i>89</i>

Lista de figuras

Figura	Página
Figura 1 Estructura en doble hélice de la cadena de ADN.....	1
Figura 2 Microescala y la nanoescala.....	9
Figura 3 Ordenamiento de los dipolos magnéticos de un material paramagnético	12
Figura 4 Ordenamiento de los dipolos magnéticos de un material ferromagnético.....	13
Figura 5 Ordenamiento de los dipolos magnéticos de un material antiferromagnético y ferrimagnético.....	13
Figura 6 Modelo atómico clásico	14
Figura 7 Gráfica de coercitividad en función del tamaño del diámetro de partícula	15
Figura 8 Estructura cristalina espinela normal y estructura cristalina espinela inversa.....	18
Figura 9 Curva de histéresis	20
Figura 10 Molécula de ácido cítrico	23
Figura 11 Molécula de bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB.....	23
Figura 12 Red tridimensional de la sílice, SiO ₂	25
Figura 13 Monómero de tetraetil ortosilicato, TEOS.....	255
Figura 14 Composición y direccionalidad de la cadena polinucleótida de ADN	27
Figura 15 Extracción magnética de ácidos nucleicos.....	29
Figura 16 Diagrama del reactor implementado para la síntesis de NPMNC	37
Figura 17 XRD para las nanopartículas de maghemita, γ -Fe ₂ O ₃	41
Figura 18 SEM y EDS para las nanopartículas de maghemita, γ -Fe ₃ O ₄	41
Figura 19 XRD para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	42
Figura 20 SEM y EDS para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	42
Figura 21 XRD para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB	43
Figura 22 FTIR para las muestras de ácido cítrico y CTAB puros.....	44
Figura 23 FTIR para las nanopartículas magnéticas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB	45
Figura 24 SEM y EDS para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB.....	46
Figura 25 XPS para nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB	46
Figura 26 TEM para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB	47
Figura 27 Histograma de la distribución del tamaño del diámetro de nanopartículas núcleo coraza de magnetita, Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ +CTAB.....	48
Figura 28 XRD para las nanopartículas de ferrita de cobalto zinc, Co _{0.25} Zn _{0.75} Fe ₂ O ₄	49
Figura 29 FTIR para nanopartículas de ferrita de cobalto zinc, Co _{0.25} Zn _{0.75} Fe ₂ O ₄	50

Figura 30 XRD para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	51
Figura 31 Corrimiento del patrón de difracción de XRD para las NPMNC+CTAB	52
Figura 32 FTIR para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	53
Figura 33 SEM y EDS para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	54
Figura 34 XPS para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	55
Figura 35 TEM para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	56
Figura 36 TEM para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$	57
Figura 37 Histogramas de la distribución del tamaño del diámetro de nanopartículas núcleo coraza de ferrita de cobalto zinc, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$	58
Figura 38 Imágenes de dispersion y recuperación magnética para las nanopartículas núcleo-coraza	58
Figura 39 Electroforesis en gel agarosa	60
Figura 40 Interaccion entre moléculas de surfactantes solubles y un substrato hidrofílico	68
Figura 41 Grupos silanoles y siloxano sobre una partícula recubierta de sílice	70
Figura 42 Mecanismo de unión entre la sílice y el ADN	71

Lista de tablas

Tabla	Página
Tabla 1 Óxidos de hierro	16
Tabla 2 Lista de reactivos, soluciones y medios necesarios	30
Tabla 3 Lista de material y equipo utilizados	30
Tabla 4 Absorbancias, purezas y concentraciones de extracción de ácidos nucleicos.....	59
Tabla 5 Valores medios y desviaciones estándar para los valores de absorción, pureza y concentraciones de extracción de los ácidos nucleicos.....	60
Tabla 6 Reglas de solubilidad	89

Capítulo 1. Introducción

1.1 – Antecedentes

Desde el descubrimiento de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN) en el año de 1869, como parte de investigaciones llevadas a cabo por el científico Suizo Friedrich Miescher, se le ha atribuido una gran importancia al estudio del ADN (Dahm, 2010). Sin embargo, el descubrimiento de la estructura de los ácidos desoxirribonucleicos se le atribuye a James D. Watson y Francis Crick, quienes en el año de 1953 marcaron una pauta imprescindible en la ciencia, dando lugar a la formación de nuevas disciplinas e influyendo en el curso de muchas otras líneas de investigación ya establecidas (Watson & Crick, 1953). El arreglo atómico de las bases nitrogenadas que forman la cadena del ADN y la representación gráfica de la estructura en doble hélice de la molécula de ADN, se muestran en la figura 1. Se dice que el descubrimiento del ADN, al igual que el entendimiento de su estructura y funcionamiento, puede representar el descubrimiento más importante del último siglo.

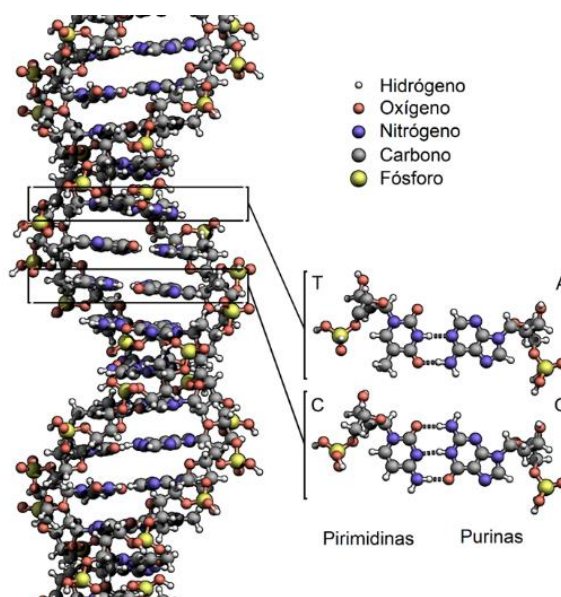


Figura 1 Estructura en doble hélice de la cadena de ADN. Las dos hélices se componen de grupos azúcar-fosfato, mientras que las barras horizontales están compuestas por un par de bases nitrogenadas que mantienen a la cadena unida mediante puentes de hidrógeno. Estas bases pueden ser: aminas (A), timinas (T), Guaninas (G) y Citosinas (C). *Imagen tomada de <http://www.richardwheeler.net/contentpages/index.php>.*

El impacto que representa el descubrimiento del ADN en el desarrollo de la ciencia y la medicina han sido de gran importancia, tanto para la identificación y el estudio de la secuencia de los nucleótidos de los ácidos nucleicos (los genes), los cuales contienen la información para la codificación y el desarrollo de la

mayoría de las enfermedades, al igual que en la síntesis y producción de medicinas para el tratamiento de dichas enfermedades. El ADN está presente en muchas de las muestras biológicas estudiadas en el laboratorio, el cual, antes de poder ser analizado, debe de ser aislado correctamente del resto del material en la muestra. Entonces, con el fin de llevar a cabo un estudio apropiado del ADN, y de ácidos nucleicos en general, el método para su extracción resulta ser de gran importancia, al tratarse de un procedimiento que consiste en una combinación de procesos físicos y químicos en un determinado orden o secuencia.

El método de extracción de biomoléculas en general, ya sea, ADN, ARN (Ácidos ribonucleicos) o proteínas, es la práctica más elemental dentro de los laboratorios de biología molecular. A partir de la primera extracción de ADN realizada, muchos otros investigadores han estudiado y mejorado el protocolo de extracción, lo que ha dado lugar a nuevos avances en el aislamiento y purificación de ADN. La pureza, ya sea del ADN o del ARN, hace referencia a la cantidad de ácidos nucleicos y proteínas, así como lípidos y otros componentes celulares, presentes en la muestra extraída. Dicha pureza puede calcularse por medio de espectrofotometría de luz UV (Cox & Nelson, 2008). Actualmente, existe una gran variedad de protocolos de extracción disponibles en internet, revistas científicas y manuales de laboratorio. Además, existe un gran número de kits comerciales de extracción, basados en un protocolo especializado para la extracción específica de ADN, ARN o de proteínas, a partir de un tipo de muestra o cultivo celular en particular. Convencionalmente, los pasos que se llevan a cabo para la purificación de ADN incluyen: el lisado de las células (proceso de ruptura de la membrana celular para la liberación del ADN), la inactivación de nucleasas (inhibición de enzimas para prevenir la degradación del ADN) y la purificación del ADN (para la separación de los ácidos nucleicos de los residuos celulares) (Bromham, 2015). Sin embargo, una vez que se genera el lisado y la inactivación de las nucleasas en las células, los métodos para la purificación y limpieza del ADN se pueden llevar a cabo generalmente por dos maneras distintas: mediante métodos basados en solución y mediante métodos basados en fase sólida (Tan & Yiap, 2009).

Dentro de los métodos basados en solución el método de extracción por solución fenol-cloroformo es el más común, el cual requiere de un proceso de centrifugación vigorosa del medio, para dar lugar a la formación de una emulsión bifásica, la cual se compone de una fase orgánica que contendrá los lípidos y proteínas, y de una fase acuosa que contendrá el ADN (Chomczynski & Sacchi, 1987). Por otra parte, algunos de los métodos de extracción en fase sólida tienen características en común con los métodos de extracción por solución, como por ejemplo, la técnica de separación por columna, donde una columna es normalmente operada bajo una fuerza centrífuga. Dichas columnas están compuestas por un soporte sólido (hecho de sílice o de diferentes tipos de resinas), el cual provee de una atracción específica entre los átomos de su superficie y la carga superficial de los ácidos nucleicos. Este método tiene el potencial de

purificar ácidos nucleicos de una manera más rápida en comparación a los métodos convencionales, debido a un procedimiento de extracción más sencillo, el cual se basa en los mismos principios químicos que los métodos convencionales, principalmente en cuatro pasos fundamentales: el lisado de células, la adsorción de ácidos nucleicos, el lavado del medio y la elución del ADN adsorbido (Kojim & Ozawa, 2002).

Las matrices de sílice hidroxilada (Woodard, Walters, & Down, 1997), las cuentas de vidrio (vidrio molido, partículas de sílice), tierras de diatomeas (Mishra, Arukha, Bashir, Yadav, & Prasad, 2017) y las resinas de intercambio iónico (Elders, 2012) son otros componentes que también forman parte de las extracciones de fase sólida. La extracción por fase sólida ha sustituido el uso del método de extracción por solución, debido a la sencillez, altas concentraciones y óptimas puridades de extracción obtenidas. Además de esto, cabe mencionar que en la extracción de fase sólida se evita el uso de reactivos como: fenol y cloroformo, lo cual es de gran ventaja debido a que la manipulación de estas sustancias químicas, así como su tratamiento y desecho, necesitan de protocolos de seguridad estrictos. Por lo tanto, las metodologías que no requieran de estos compuestos evita la acumulación de residuos tóxicos, al igual que la generación de algún tipo de daño o impacto ambiental.

Uno de los materiales que es utilizado con mayor frecuencia en la extracción de fase sólida de ADN es el dióxido de silicio (SiO_2), también llamado comúnmente sílice, el cual es un material inorgánico, fácil de encontrar en la naturaleza y tanto su uso como su descarte no representa algún tipo de repercusión ambiental. En ese sentido, existe una gran variedad de materiales de sílice, los cuales poseen formas y tamaños diferentes, sin embargo, todos poseen una química característica en común (Iler, 1979).

Cuando se combinan las propiedades superficiales de la sílice a escala nanotecnológica, con las propiedades de atracción magnética de nanopartículas magnéticas (partículas con tamaños de 1 a 100 nanómetros), se obtienen sistemas conjugados que poseen las ventajas de ambos materiales, superando así las limitaciones que cada componente puede llegar a presentar por separado. En consecuencia, este nuevo material poseerá comportamientos característicos del dióxido de silicio y de la partícula magnética en conjunto.

Para el caso de las nanopartículas magnéticas (NPM), estas presentan la ventaja de ser manipulables mediante la aplicación de un campo magnético externo. Además, poseen propiedades físicas y químicas que resultan ser atractivas para su aplicación en diferentes áreas, tales como: la catálisis, la biotecnología, la biomedicina, la electrónica, etc. (Lu, Salabas, & Schüth, 2007). Sin embargo, la desventaja principal que presentan las nanopartículas magnéticas es su inestabilidad química, por lo que estas suelen ser

recubiertas con materiales estables, manteniendo sus propiedades originales y estabilizándolas de manera apropiada. Dicha inestabilidad química se debe en gran parte a que las nanopartículas poseen una relación área superficial volumen muy elevada, en comparación con la relación entre el área superficial y el volumen de partículas de tamaños macrométricos. Por ejemplo, una nanopartícula de 10 nm de diámetro tendrá una relación superficie:volumen de 0.6 nm^{-1} , mientras que una pelota de béisbol tendrá una relación superficie:volumen de apenas $8 \times 10^{-8} \text{ nm}^{-1}$. Para el caso de la nanopartícula, entre mayor sea la relación superficie:volumen, esta tendrá un área superficial mayor y el volumen total de átomos será muy pequeño, por lo tanto el comportamiento de la nanopartícula será inestable, debido a que la fuerza con la que los átomos de la superficie serán atraídos por los átomos situados en el interior de la nanopartícula, será muy débil. Esto les otorga a los átomos de la superficie de las nanopartículas un nivel energético mayor, así como un potencial de reacción mayor, facilitándoles la capacidad de unirse a los átomos superficiales de otras nanopartículas en su entorno, con velocidades de reacción y formación de enlaces químicos superiores a partículas de mayor tamaño a escalas mayores (Hernando, Crespo, & García, 2005). Es por esto que las nanopartículas magnéticas son recubiertas con materiales inorgánicos como la sílice, lo cual les otorga una mayor estabilidad, dando lugar a la formación de nanopartículas magnéticas núcleo-coraza con una gama amplia de aplicaciones (Mélinon et al., 2014). Entre ellas, este tipo de materiales tienen incidencia en áreas como la biología, mecánica, óptica, magnetismo, química, catálisis (fotocatálisis), celdas solares y microelectrónica (Gawande et al., 2015).

El uso y aplicación de nanopartículas magnéticas tipo núcleo-coraza en un contexto biotecnológico se originó a partir de un método utilizado para la inmovilización y manipulación magnética de enzimas ligadas a soportes insolubles dentro de biorreactores (Magnani, Galluzzi, & Bruce, 2006). Para lograr la inmovilización enzimática, Robinson y colegas utilizaron partículas magnéticas de óxido de hierro silanizado y un compuesto de óxido de hierro-celulosa (con diámetros de 53 a 63 μm) para la inmovilización respectiva de α -quimiotripsina y β -galactosidasa (Robinson, Dunnill, & Lilly, 1973). Una década después, se descubrió que la interacción entre el ADN y la superficie de microesferas de sílice creaba enlaces iónicos que mantenían unidas ambas estructuras, lo que causó que los métodos de purificación fueran adaptados para el aprovechamiento de este comportamiento (Vogelstein & Gillespie, 1979). A partir de entonces, en conjunto con el desarrollo de la nanotecnología, así como de otras disciplinas del campo de las ciencias y la ingeniería, se han investigado y mejorado las técnicas de síntesis de nanopartículas magnéticas con propiedades óptimas, para su aplicación en la extracción magnética de ADN (F. Chen, Shi, Xue, Chen, & Wan, 2010). Tales técnicas se basan en una variedad de métodos de síntesis los cuales van desde métodos tradicionales basados en soluciones de química húmeda, hasta técnicas más exóticas como pirolisis laser o la deposición de vapores químicos, dentro de las cuales, el proceso de coprecipitación acuosa es el más

utilizado debido al fácil control del pH de solución, así como la cantidad de reactivos presentes en el medio (Sun, Lee, & Zhang, 2008). Existen muchos tipos de partículas magnéticas, tales como: la magnetita, la ferrita de cobalto, la ferrita de zinc, o la ferrita de cobalto-zinc, entre otras, las cuales tienden a exhibir un comportamiento superparamagnético cuando los tamaños de nanopartícula son menores a los 10 nm. Tal comportamiento hace referencia a coercitividads pequeñas en la nanopartícula (López et al., 2012). Otras de las aplicaciones que existen para los sistemas nanoestructurados tipo núcleo-coraza con propiedades magnéticas, dentro del área de la biomedicina, son en el transporte y liberación dirigida de fármacos (X. Chen, 2013), así como en la imagenología por resonancia magnética nuclear (Campbell et al., 2011).

1.2 – Justificación

La inestabilidad química de las nanopartícula magnéticas, las aglomeraciones debido a fuerzas de atracción intrínsecas entre nanopartículas magnéticas, así como el control limitado tanto sobre el tamaño de la partícula como su interacción fisicoquímica con otras moléculas de interés biológico, son factores que impiden la dispersión y estabilización óptima de las nanopartículas magnéticas en medios acuosos. Esto representa una limitación para el uso de nanopartículas magnéticas en procesos de extracción o aislamiento de ácidos nucleicos. Por ello, la ruta más viable para solucionar dicho problema es la síntesis de un recubrimiento sobre el componente magnético, usando para ello un material químicamente estable, cuya síntesis pueda realizarse siguiendo metodologías sencillas y con la posibilidad de escalamiento a producción industrial, siendo esta una de las principales limitaciones que surge con la fabricación de sistemas a nanoescala. Así, se destaca que uno de los métodos adaptables a dichos requerimientos es el de “sol-gel”. Sin embargo, al recurrir a las metodologías reportadas en la literatura para la síntesis de sistemas de nanopartículas magnéticas tipo núcleo-coraza, se encuentran algunas limitaciones, especialmente en la omisión de los rendimientos de producción de los sistemas nanoestructurados, y del rendimiento o efectividad para lograr un encapsulado sobre la totalidad de los núcleos magnéticos presentes en el medio de reacción. En contraste, existen muchos reportes en donde se recurre a procedimientos que suman una alta inversión de energía y tiempo para la síntesis de este tipo de sistemas. Esto significa que la mayoría de reportes relacionados con la síntesis de nanopartículas magnéticas tipo núcleo-coraza no contienen información con relevancia significativa para el sector empresarial o industrial interesado en la producción y comercialización de este tipo de materiales. Por lo tanto, esto abre un área de oportunidad para la aplicación de Ingeniería en Nanotecnología que permita obtener materiales nanoestructurados eficientes siguiendo metodologías simples, acortando tiempos de reacción, y reduciendo los costos de producción.

En consecuencia, para este trabajo se tomó como base los avances reportados de forma general sobre la síntesis de los sistemas de nanopartículas magnéticas tipo núcleo-coraza, pero enfocándose en los sistemas más estudiados hasta la actualidad: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Sobre estos sistemas basados en núcleos de nanopartículas de magnetita, se encontró experimentalmente que el uso de agentes surfactantes durante la síntesis contribuye a estabilizar dichos núcleos antes del recubrimiento con SiO_2 , impactando así en el rendimiento de producción del sistema. Además, que el uso de estos compuestos confiere a la superficie del sistema núcleo-coraza la inclusión de ciertos grupos funcionales, los cuales actúan incrementando su interacción con moléculas de ADN. Por otro lado, los métodos de síntesis reportados para estos materiales se componen de varias etapas y carecen de la posibilidad de adaptarse a un proceso continuo para su fabricación. En consecuencia, este trabajo se enfoca en ofrecer alternativas para superar estos limitantes.

Adicionalmente, con todo lo anterior, este trabajo se complementa mediante la síntesis de nanopartículas magnéticas de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ por medio de coprecipitación química, y su recubrimiento con SiO_2 por medio del método sol-gel, para formar así los sistemas núcleo-coraza: $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Sobre las nanopartículas de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ se encuentran reportados estudios sobre su uso como ferrofluidos, en los que se aprovechan las propiedades magnéticas sobresalientes del material. En estos estudios se destaca la necesidad de utilizar medios dispersantes como ácido oleico, queroseno, tolueno, entre otros, para prevenir la aglomeración de las nanopartículas. Sin embargo, estas condiciones se destacan como no favorables para su interacción con sistemas biológicos, debido a la alta toxicidad de cada una de estas sustancias químicas. Por ello, en este trabajo se destaca el interés por aprovechar las propiedades inherentes de los sistemas $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ para su aplicación en la extracción magnética de ADN, por medio de su recubrimiento con SiO_2 . De esta forma se crea un material compuesto de una superficie con la capacidad de interaccionar físicamente con moléculas de ADN, y simultáneamente, aprovechando las ventajas que ofrece tener un núcleo con la capacidad de responder a campos magnéticos externos, mediante el uso de imanes de neodimio comunes de alrededor de 1.3 Teslas de intensidad (Lucas, Lucas, Mercier, Rollat, & Davenport, 2015)

1.3 – Hipótesis

El recubrimiento con óxido de silicio (SiO_2) de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y ferrita de cobalto-zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$), por medio de metodologías sencillas que requieran de un bajo consumo energético y de tiempos cortos de producción, permitirán obtener sistemas nanoestructurados tipo

núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ con cualidades atractivas para la industria biomédica y biotecnológica. Esta modificación superficial de estas nanopartículas mejorará las propiedades de superficie para potenciar su aplicación en la separación o extracción magnética de ADN.

1.4 – Objetivos

1.4.1 – Objetivo general

Sintetizar y estudiar nuevos sistemas de nanopartículas tipo núcleo-coraza con propiedades superparamagnéticas y superficie modificada, por medio de metodologías sencillas, reduciendo requerimientos energéticos e inversión de tiempo, a través de un proceso de fabricación continuo. Se propone aprovechar las propiedades magnéticas de las nanopartículas y las propiedades de la superficie modificada para su potencial aplicación en la extracción y purificación de ADN para subsecuentes investigaciones.

1.4.2 – Objetivos específicos

- Optimizar la síntesis de nanopartículas tipo núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ partiendo de métodos ya reportados de coprecipitación química (síntesis de Fe_3O_4) y sol-gel (síntesis de SiO_2), para su adaptación a procesos de fabricación continuos que conlleven a obtener altos rendimientos de reacción, con bajo consumo de reactivos y energía.
- Determinar la influencia de la adición de agentes surfactantes al proceso de síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, sobre los rendimientos de recubrimiento y su aplicación en la extracción de ADN.
- Sintetizar nanopartículas de ferrita de cobalto-zinc, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ siguiendo metodologías preestablecidas de coprecipitación química.
- Recubrir nanopartículas de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ con SiO_2 por medio del método sol-gel, optimizando la metodología para lograr reproducibilidad de resultados, minimizar tiempos de preparación y consumo energético.
- Generar un estudio de caracterización morfológica y estructural mediante microscopias electrónicas (SEM, TEM) y difracción de rayos X (XRD).
- Generar estudios de composición química por medio de espectroscopias de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopias de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS).
- Realizar una extracción y cuantificación del material biológico (ADN).

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 – Nanotecnología

Como resultado de la aplicación de conceptos y técnicas experimentales, originalmente diseñadas para el estudio macroscópico de los sólidos, científicos e ingenieros han encontrado un área de investigación en común. Tal área es el campo de la nanociencia, donde, ciencias como la física, la química, la biología, y las ciencias computacionales tienen intereses en común asociados con la nanoescala. De igual manera ocurre con la ingeniería en computación, ingeniería eléctrica e ingeniería mecánica (Sattler, 2011b). Así como la ciencia genera el conocimiento científico y la ingeniería genera la tecnología, ambos campos trabajan en conjunto, haciendo uso de sus herramientas de trabajo, para elaborar las bases teóricas de la nanociencia y su aplicación en la nanotecnología. La nanotecnología es la manipulación de la materia a escala nanométrica. De este modo, la nanotecnología busca contribuir a la investigación y desarrollo de dispositivos con base nanoestructurada, aplicando los principios fundamentales de la ciencia para explicar las propiedades físicas, químicas y bioquímicas de la materia a nivel nanométrico, para el bienestar de la sociedad. Mientras que los micro dispositivos están compuestos por partes que miden micrómetros (la millonésima parte de un metro), la nanotecnología se encarga de manipular átomos y moléculas con un control y precisión de nanómetros (mil veces menor a un micrómetro). Por lo tanto, la “Nanotecnología” también puede ser descrita como la “Tecnología molecular” (Drexler, 1986).

2.2 – Nanomateriales

Los nanomateriales son materiales que poseen componentes estructurales con tamaños entre 1 y 100 nm, sin embargo, la elección del límite superior de la escala se justifica por el tipo de propiedades físicas que los nanomateriales puedan llegar a presentar. Los materiales en la escala nanométrica tienden a modificar su comportamiento cuando su tamaño se aproxima al valor límite de dicha escala, por lo que a esta escala las propiedades de la materia, como el área superficial de partícula, cambian, dando lugar a la presencia de efectos cuánticos debido al tamaño de partícula (Buzea, Blandino, & Robbie, 2007). La figura 2 muestra los tamaños de algunos de los objetos más comunes dentro de la nanoescala y la microescala. Mientras que el grosor aproximado de un cabello humano es de aproximadamente 80,000 nm (80 μm), las células tienen un tamaño promedio de 10 μm (el rango puede oscilar desde los 0.3 hasta los 120 μm), y el diámetro de la estructura de la cadena en doble hebra del ADN mide apenas 2nm.

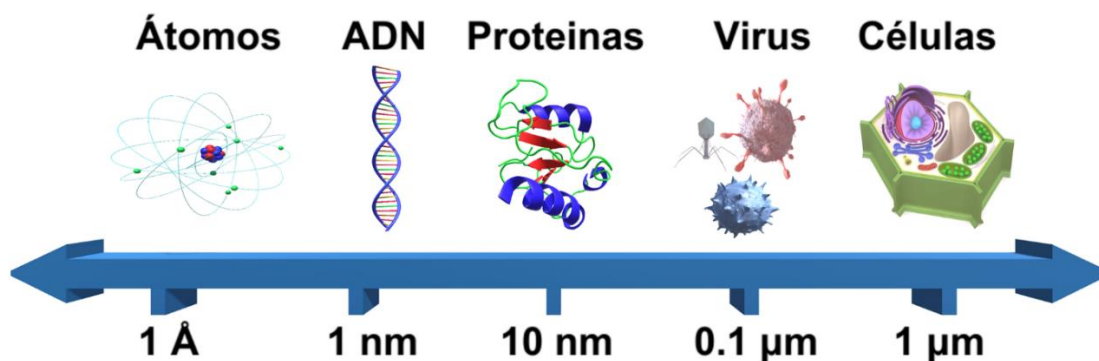


Figura 2 Dimensiones promedio de diferentes objetos en la microescala y la nanoescala. *Imagen de autoría propia.*

Para el estudio del comportamiento de la materia a escalas nanométricas, es necesario un trasfondo teórico basado en los conceptos básicos de los estados de la materia, las clases y estructuras de los sólidos cristalinos, teoría de bandas, defectos, electrónica, así como las bases de la teoría del transporte iónico. Estos conocimientos en general permitirán evaluar por qué diferentes clases de materiales exhiben diferentes propiedades, tales como el ferromagnetismo, la piezoelectricidad, la superconductividad, la termoelectricidad, entre otras propiedades, las cuales tienen una implicación en la nano escala (Ozin, Arsenault, & Cademartiri, 2009). Dos de los factores principales que causan que los nanomateriales se comporten de distinta manera, en comparación a los materiales en bulto, son: los efectos de superficie, donde, a menor tamaño de partícula, mayor será la fracción de átomos expuesta sobre la superficie y mayor será la energía promedio de enlace por átomo; y por otra parte, los efectos cuánticos del material, en donde los fenómenos de absorción y fluorescencia de luz, así como, los potenciales de ionización y afinidades electrónicas del material, dependen en gran parte del tamaño de partícula (Roduner, 2006). Estos factores afectan la reactividad química de los materiales y, por lo tanto, también afectan sus propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y magnéticas (Buzea et al., 2007).

En general, existe una gran variedad de métodos para la síntesis de materiales en bulto, los cuales pueden ser modificados y adaptados para la síntesis de diversas clases de nanomateriales. El control de los tamaños, las formas y superficies de las nanopartículas, les confiere propiedades y funciones específicas que les permiten ser adaptadas para una aplicación en particular. Sin embargo, al modificar alguno de los procedimientos de la síntesis de estado sólido en bulto, en lugar de obtener un material con formas de esferas, barras o laminas, existe la posibilidad de obtener diferentes estructuras o morfologías en la síntesis de nanomateriales, como por ejemplo: nanoclusters, nanocables o nanolaminas (Ozin et al., 2009).

2.3 – Nanopartículas

Una de las áreas de mayor investigación en nanotecnología es el desarrollo de nanopartículas para su aplicación en campos de investigación que van desde la biomedicina (Salata, 2004), óptica (Anderson, Hartschuh, & Novotny, 2005), electrónica (Ma et al., 2015), nanoquímica (Ozin et al., 2009), energía solar (Taylor et al., 2013), hasta la agricultura (Parisi, Vigani, & Rodríguez-Cerezo, 2015). En nanotecnología, una nanopartícula se define como un objeto pequeño de forma aproximadamente esférica, que se comporta como una sola entidad en base a sus propiedades físicas y de transporte. Tienen grandes aplicaciones biomédicas debido a su capacidad para cruzar membranas biológicas y acceder a células, tejidos y órganos, a los que normalmente partículas de mayor tamaño no podrían acceder (Caruso, Merlo, & Caffo, 2014).

En la naturaleza también se pueden encontrar nanopartículas, tanto orgánicas, como inorgánicas (de la Fuente & Grazu, 2012). Algunos microorganismos tienen la capacidad de producir nanopartículas magnéticas en forma de magnetosomas (Faivre & Godec, 2015), así como, el desgaste natural de óxidos de hierro y de minerales silicatos, forman de igual manera nanopartículas (Hill, 2006).

2.3.1 – Nanopartículas metálicas

Actualmente, partículas de oro, plata y otros metales nobles, son utilizadas comúnmente en ciencias e ingeniería biomédicas (Mody, Siwale, Singh, & Mody, 2010). Este gran interés se debe en particular al tipo de propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas y magnéticas de las partículas metálicas. Sin embargo, al hablar de las propiedades magnéticas en particular, existen nanopartículas metálicas, como las nanopartículas de oro, que poseen un comportamiento diamagnético (repelen el campo magnético) (Nealon et al., 2012), a diferencia de otro tipo de nanopartículas metálicas que sí son atraídas por los campos magnéticos, al poseer un comportamiento ferromagnético. Muchas de estas propiedades y sus aplicaciones están fuertemente influenciadas por el tamaño y la forma de las partículas, con geometrías que van desde esferas, barras, tubos, hasta prismas. (Sattler, 2011a).

2.3.2 – Nanopartículas magnéticas (NPM)

Actualmente se han desarrollado muchos tipos de NPM con diferentes formas, tamaños y composiciones, mediante diferentes técnicas de síntesis. Con el desarrollo de la nanociencia y la nanotecnología, las NPM han adquirido gran importancia y han encontrado numerosas aplicaciones en campos como la biomedicina, diagnóstico y tratamiento de cáncer, biología molecular, bioquímica, en tecnología de ferrofluidos, etc. (Lopez, Espinoza-beltran, Zambrano, Gomez, & Prieto, 2012). En general, las NPM tienen un gran potencial de aplicación en ciencias e ingeniería biomédicas debido a su biocompatibilidad, baja toxicidad, fácil modificación de superficie y propiedades magnéticas intrínsecas (Mou, Ali, Li, & He, 2015).

La magnetita (Fe_3O_4) y la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) son dos de las formas más comunes de óxido de hierro, que pueden ser sintetizadas en forma de NPM, las cuales son utilizadas dentro de una gran variedad de aplicaciones debido a sus propiedades superparamagnéticas. Normalmente, el principal comportamiento magnético que presentan las NPM es el ferromagnetismo. Sin embargo, dependiendo de las condiciones experimentales durante el proceso de fabricación de las NPM de óxido de hierro, se podrán formar una o más fases del óxido de hierro, resultando en la combinación de varios comportamientos magnéticos.

Los comportamientos magnéticos de la materia son básicamente tres: el diamagnetismo, el paramagnetismo y el ferromagnetismo (Bauer & Westfall, 2011). Debido a que la síntesis de NPM resulta en muchos casos en una compleja distribución de fases de óxidos de hierro, es indispensable sintetizar estructuras monofásicas de óxido de hierro para dar lugar un comportamiento magnético definido.

Se puede decir que el fenómeno del **diamagnetismo** está presente en toda la materia, sin embargo, sus efectos son menores en comparación a los otros comportamientos magnéticos. En otras palabras, el diamagnetismo solo se puede observar en un tipo de material, si este no presenta otro tipo de magnetismo. Cuando un campo magnético externo es aplicado a un material diamagnético, un momento dipolar magnético débil es inducido en dirección contraria al campo aplicado, causando que el material diamagnético sea ligeramente repelido por el campo externo. Una vez se retira el campo magnético externo, el material deja de ser repelido (Blundell, 2001).

A diferencia de los materiales diamagnéticos, el fenómeno del **paramagnetismo** ocurre en materiales que tienen átomos con un momento magnético neto. Estos materiales están compuestos principalmente de elementos de transición (incluyendo actínidos y tierras raras) (Bauer & Westfall, 2011). Cada átomo en el material tiene un dipolo magnético permanente, el cual, se encuentra “unido” débilmente al dipolo

magnético del átomo vecino. La energía térmica del entorno causa una alineación aleatoria de dichos momentos, dando lugar a un campo magnético nulo, como se muestra en la figura 3a. Cuando un campo magnético externo es aplicado, una pequeña fracción de los momentos magnéticos comienza a alinearse, logrando dirigirse en dirección del campo magnético externo, mientras compite contra la energía térmica del entorno, como se ilustra en la figura 3b. Una vez el campo magnético es retirado, la energía térmica del entorno vuelve a causar una alineación aleatoria de los momentos magnéticos (Blundell, 2001).

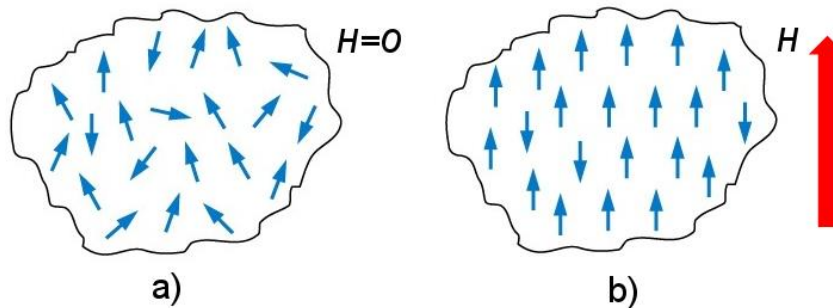


Figura 3 a) En un material paramagnético los momentos magnéticos están unidos débilmente entre sí y tienen una alineación aleatoria dentro del material. **b)** Cuando un campo magnético externo es aplicado, una pequeña fracción de los momentos magnéticos logra dirigirse en dirección del campo magnético, logrando una magnetización neta.

Imagen obtenida de (Serway & Jewett, 2004).

Solo una pequeña cantidad de materiales cristalinos exhiben un tipo de comportamiento magnético fuerte llamado **ferromagnetismo**. Los materiales ferromagnéticos están constituidos principalmente por los elementos hierro, cobalto, níquel, gadolinio y disprosio, así como por aleaciones que contengan estos elementos (Bauer & Westfall, 2011). El comportamiento magnético de estos materiales está regido por momentos magnéticos atómicos permanentes, los cuales tienden a alinearse de manera paralela entre sí, incluso en la presencia de un campo magnético externo débil. Una vez los momentos son alineados, el material ferromagnético permanece magnetizado, aun cuando el campo externo es removido. Esta alineación permanente se debe a un fuerte acoplamiento entre los momentos vecinos del material, un acoplamiento que solo puede entenderse en términos de la mecánica cuántica (Blundell, 2001). La figura 4 muestra el comportamiento de los dipolos magnéticos en un material ferromagnético.

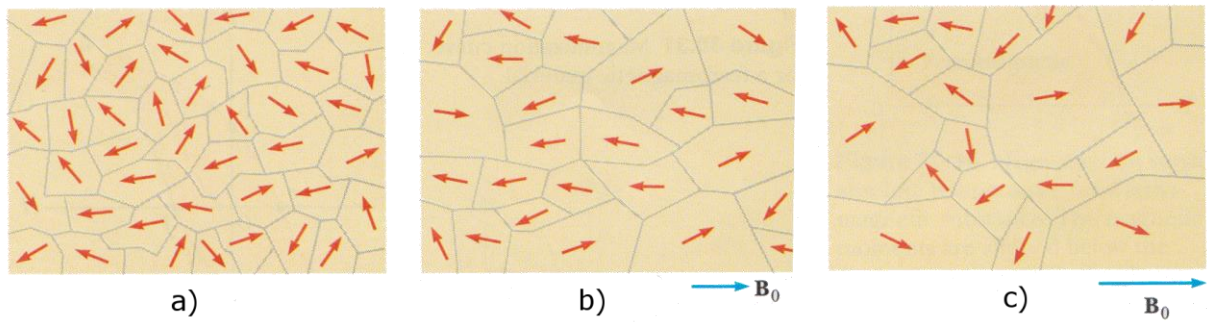


Figura 4 a) Comportamiento ferromagnético de una muestra sin magnetizar, con dominios dispuestos de manera aleatoria. **b)** Los dominios magnéticos se alinean paralelos a un campo magnético externo B_0 y aumentan de tamaño. **c)** Al aumentar el campo externo, los dominios desalineados se vuelven más pequeños, hasta el punto en el que el material adquiere una magnetización remanente. *Imagen tomada de (Serway & Jewett, 2004).*

El **antiferromagnetismo** es un caso particular del magnetismo en donde la interacción entre los momentos magnéticos tiende a alinear los momentos de manera adyacente, formando dos subredes anti paralelas entre sí. Debido a que todos los momentos magnéticos tienen la misma magnitud, esto resulta en un momento magnético nulo. Por lo tanto, los materiales antiferromagnéticos no presentan una magnetización espontanea (Spaldin & Mansbridge, 2011). La figura 5a muestra el arreglo de los dipolos en un material antiferromagnético. El **ferrimagnetismo**, al igual que el antiferromagnetismo, se encuentra presente en materiales que tienen poblaciones de átomos con momentos magnéticos opuestos entre sí. Sin embargo, en los materiales ferrimagnéticos los momentos magnéticos opuestos son desiguales, resultando en una magnetización neta (Spaldin & Mansbridge, 2011). Esto ocurre cuando las poblaciones consisten de diferentes materiales o iones (por ejemplo, el Fe^{2+} y Fe^{3+}). La figura 5b muestra el arreglo de los dipolos en los materiales ferrimagnéticos, los cuales son generalmente ferritas y granates magnéticos.

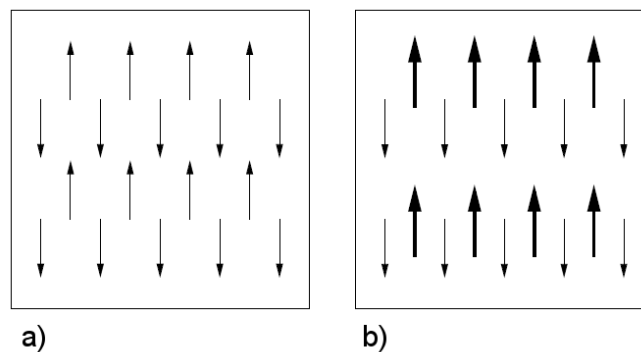


Figura 5 Ordenamiento de los dipolos magnéticos de un material **a)** antiferromagnético y **b)** ferrimagnético. *Imagen tomada de (Spaldin & Mansbridge, 2011).*

2.3.3 – Magnetismo de nanopartículas: Superparamagnetismo

En principio, toda la materia al estar compuesta por electrones, debería de ser magnética. La razón por la cual existen sustancias sin magnetismo, es porque el momento magnético de los electrones que orbitan alrededor del núcleo atómico es cancelado por el momento magnético de otros electrones orbitando en dirección opuesta. El momento magnético de un electrón μ es proporcional a su momento angular L , pero debido a la carga negativa del electrón, los vectores μ y L apuntan en direcciones opuestas, como se observa en la figura 6. Como resultado, el efecto magnético producido por el movimiento orbital de los electrones alrededor del núcleo es muy pequeño o prácticamente nulo para la mayoría de los materiales.

En añadidura a su momento magnético orbital, un electrón (al igual que los protones, neutrones y otras partículas) tiene una propiedad intrínseca llamada “espín” que también contribuye al momento magnético del átomo. De esta manera, el momento magnético total de un átomo es la suma vectorial de los momentos magnéticos orbitales y de espín (Blundell, 2001).

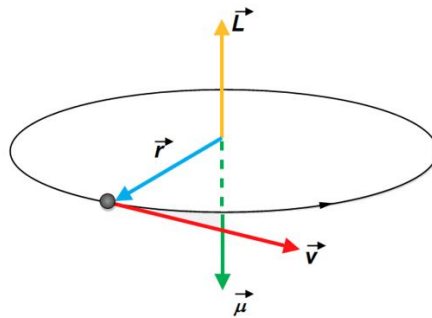


Figura 6 Modelo atómico clásico. Un electrón se mueve con velocidad v alrededor del núcleo de un átomo en una órbita circular de radio r , con un momento angular L asociado en una dirección (perpendicular a su movimiento) y un momento magnético μ en dirección opuesta. A pesar de que este modelo presenta muchas deficiencias, sus predicciones están de acuerdo con la teoría correcta, expresada en términos de la física cuántica. *Imagen obtenida de (Serway & Jewett, 2004).*

Por debajo de un tamaño crítico de diámetro de partícula, las propiedades magnéticas de partículas pequeñas están dominadas por la presencia de monodominios magnéticos. Todos los materiales ferromagnéticos se componen de regiones microscópicas llamadas “dominios magnéticos”, regiones dentro de las cuales los momentos magnéticos se encuentran alineados en una sola dirección. Los dominios pueden tener volúmenes de 10^{-12} a 10^{-8} m³ y contener de 10^{17} a 10^{21} átomos. Las fronteras entre cada dominio con diferente orientación entre si se llaman “paredes de dominio” (Blundell, 2001). Debido a que la formación de las paredes de los dominios magnéticos depende del balance entre energías de

intercambio (las cuales promueven paredes anchas) y energías de anisotropía magnetocrystalina (las cuales promueven paredes delgadas), típicamente se generan paredes de dominio de 100 nm de grosor. Por lo tanto, al sintetizar partículas de tamaños menores a 100 nm, no se podrán establecer paredes de dominio magnético dentro de la partícula, lo cual dará como resultado la formación de una partícula con monodominio magnético. (Spaldin & Mansbridge, 2011).

A medida que el tamaño de partícula se reduce, la coercitividad del material incrementa y las partículas monodominio son formadas. Sin embargo, por debajo de un cierto diámetro crítico (D_c) la coercitividad decrece y eventualmente tiende a cero. La coercitividad H_c hace referencia al campo magnético H requerido para reducir el valor de la magnetización remanente de un material a cero. La figura 7 muestra una gráfica de la coercitividad de partículas pequeñas en función del diámetro de partícula. La disminución de la coercitividad en partículas pequeñas es el resultado de la disminución de la de energía de anisotropía magnética de la nanopartícula, debido a la disminución de su tamaño. A medida que el volumen es reducido, la energía térmica del medio puede superar las fuerzas de anisotropía magnética de la nanopartícula e invertir espontáneamente su magnetización, incluso en ausencia de un campo magnético externo. Este fenómeno es conocido como superparamagnetismo, debido a que la resistencia entre la energía térmica y la anisotropía magnética del material, da lugar a la formación de partículas con un comportamiento de magnetización cualitativamente similar al de los materiales con momentos paramagnéticos, pero con un momento magnético mucho mayor (Spaldin & Mansbridge, 2011).

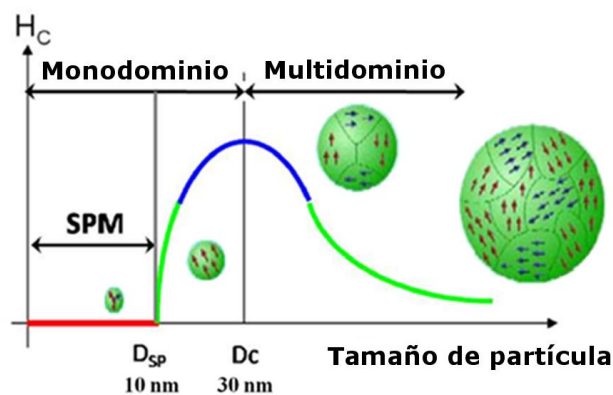


Figura 7 Gráfica de coercitividad magnética en función del tamaño del diámetro de partícula y la formación de partículas monodominio a partir de un diámetro crítico (D_c). Imagen tomada de (Fojtik, Horák, Trung, & Škere, 2009).

2.4 – Óxido de hierro

Los óxidos de hierro son compuestos generados a partir de hierro y oxígeno. Este término es utilizado de igual manera tanto para óxidos, como para hidróxidos y oxihidróxidos que contienen cationes de hierro divalentes Fe^{2+} y/o trivalentes Fe^{3+} , y aniones hidroxilo OH^- y/o de oxígeno O^{2-} . Actualmente se conocen en total dieciséis fases puras del óxido de hierro, las cuales se listan en la tabla 1 (Cornell & Schwertmann, 2003). Dentro de las fases de óxido de hierro que comúnmente se obtienen a partir de la síntesis de NPM, la magnetita (Fe_3O_4) resulta ser la más viable para su aplicación en áreas como la medicina y biotecnología, como agente de contraste, en bioseparación, como agente de liberación de fármacos, o en tratamientos de hipertermia, debido a sus propiedades superparamagnéticas superiores en relación a las otras fases (Laurent et al., 2008).

Tabla 1 Óxidos de hierro. Las 16 diferentes fases que componen los compuestos de óxido de hierro.

Oxihidróxidos	
Goethita	$\alpha\text{-FeO(OH)}$
Lepidocrocita	$\gamma\text{-FeO(OH)}$
Akaganeíta	$\beta\text{-FeO(OH)}$
Schwertmannita	$\text{Fe}_{16}\text{O}_{16}(\text{OH})_y(\text{SO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Feroxihita	$\delta\text{-FeOOH}$ y $\delta'\text{-FeOOH}$
Oxihidróxido de hierro (III) (alta presión)	FeO(OH)
Ferrihidrita	$\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Hidróxidos	
Hidróxido férrico (Bernalita)	$\text{Fe(OH)}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$
Hidróxido ferroso	Fe(OH)_2
Corrosiones verdes	$\text{Fe}_x^{3+}\text{Fe}_y^{2+}(\text{OH})_{3x+2y-z}(\text{A}^-)_z$; donde $\text{A}^- = \text{Cl}^-$ o 0.5SO_4^{2-}
Óxidos	
Hematita	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Fase beta	$\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Maghemita	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Fase épsilon	$\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Magnetita	Fe_3O_4
Wustita	Fe_{1-x}O

2.5 – Ferrita

Las ferritas son óxidos de metales de transición con un comportamiento ferrimagnético y además dieléctrico. Estos materiales encuentran su aplicación en situaciones en donde la conductividad eléctrica que algunos materiales ferromagnéticos pueden llegar a presentar, resulta un factor inconveniente. Una ferrita es un tipo de compuesto cerámico, constituido de óxido de hierro (III), Fe_2O_3 , combinado químicamente con uno o más elementos metálicos adicionales, $\text{MO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$, donde O es un átomo de oxígeno y M es un ion metálico divalente, ya sea $M = \text{Mn, Co, Ni, Zn, Mg, Fe, Cu, Cd}$, o la mezcla de ellos (Carter & Norton, 2007).

Existen principalmente dos tipos de ferritas, las cuales se diferencian en su estructura cristalina en forma de: ferritas cúbicas y ferritas hexagonales. La mayoría de las ferritas poseen una estructura cristalina tipo espinela cúbica de grupo espacial $Fd3m$. A pesar de ser una estructura simple, la espinela cúbica ha sido objeto de una amplia investigación debido a su amplio potencial de aplicación en dispositivos electrónicos y como parte de un estudio sistemático de la física fundamental (Carta et al., 2009). En una celda cristalina cúbica centrada en las caras (FCC, por sus siglas en inglés), también conocida como celda cúbica de empaquetamiento compacto, hay dos clases de espacios entre los sitios que ocupan los átomos: los sitios tetraédricos, rodeados por 4 átomos y los sitios octaédricos, rodeados por 6 átomos (átomos de oxígeno para el caso de la espinela cúbica) (Kittel, 2005).

2.5.1 – Estructura cristalina tipo espinela

Las ferritas cúbicas cristalizan en una estructura tipo espinela (nombrada así por el mineral espinela, $\text{MgO}\cdot\text{Al}_2\text{O}_3$). Las espinelas tienen una fórmula química general $\text{MO}\cdot\text{E}_2\text{O}_3$ donde M es el ion divalente $M = \text{Mn, Co, Ni, Zn, Mg, Fe, Cu, Cd}$, y E es algún elemento del grupo de las espinelas, por ejemplo $E = \text{Al, Fe, Cr, V, Si, Sb}$. La ocupación atómica de una estructura cristalina tipo espinela puede escribirse como:



donde las cantidades dentro de los corchetes representan la ocupación promedio de los sitios tetraédricos (sitios A) y los sitios octaédricos (sitios B) y la variable i representa el parámetro de inversión (Carta et al., 2009). Para el caso particular de las espinelas de hierro, $E = \text{Fe}$.

Dependiendo de la distribución catiónica, una espinela puede ser *normal*, *inversa* o *parcialmente inversa*. Para una espinela normal, $i = 0$, y para una espinela inversa, $i = 1$. Cuando se encuentran presentes los cationes divalentes en ambos sitios tetraédricos y octaédricos, la espinela es parcialmente inversa, y el factor de inversión se encontrará entre $0 < i < 1$ (Carta et al., 2009). La figura 8 muestra un diagrama de los arreglos cristalinos tipo espinela normal y espinela inversa.

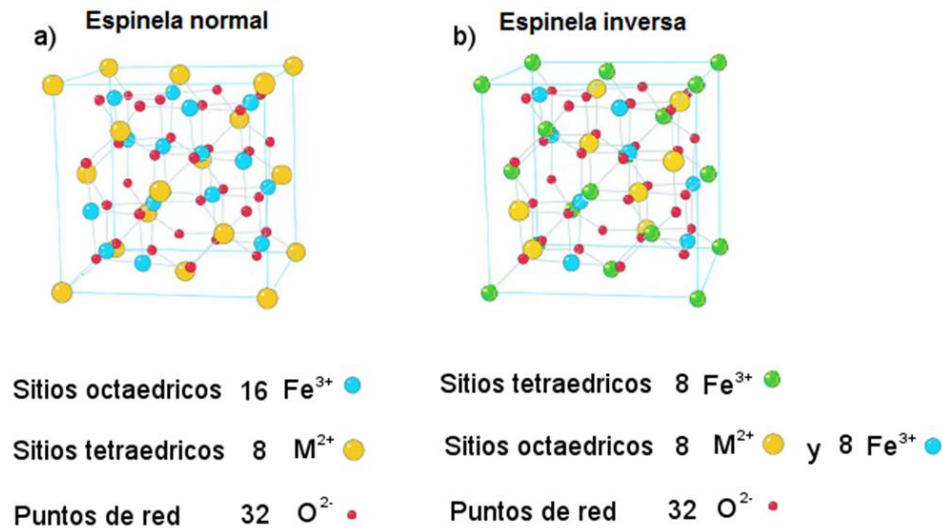


Figura 8 a) Estructura cristalina espinela normal y **b)** estructura cristalina espinela inversa. . *Imagen tomada y modificada de (Seko, 2006).*

2.5.2 – Magnetita (Fe₃O₄)

El material magnético con aplicación tecnológica más común es la ferrita cubica de formula general Fe²⁺Fe₂³⁺O₄, conocida como magnetita. La magnetita es un óxido de hierro con estructura tipo espinela inversa, en donde las posiciones tetraédricas de su estructura cristalina están ocupadas por el ion Fe³⁺, mientras que los sitios octaédricos están ocupados por cantidades iguales de iones de Fe³⁺ y Fe²⁺. Debido a esto, la magnetita es termodinámicamente inestable a presiones atmosféricas de oxígeno. Los cristales de magnetita sintética son por lo regular pequeños (<100 nm) y si no se protegen adecuadamente contra el oxígeno atmosférico, pueden oxidarse durante o después del proceso de síntesis (Schwertmann & Cornell, 1992). Existen dos formas básicas para la síntesis de magnetita, las cuales son:

- a) La oxidación parcial de una solución salina de Fe²⁺ con KNO₃ bajo condiciones alcalinas a 90°C
- b) La precipitación de una solución de Fe²⁺/Fe³⁺ con una proporción de Fe²⁺: Fe³⁺ igual a 1:2.

2.5.3 – Maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)

La maghemita es un óxido de hierro que puede ser considerado como el producto de la oxidación total de la magnetita. A partir de la oxidación, existe una serie completa de transiciones entre la magnetita y la maghemita, así como un cambio de coloración característico del material, de negro a café-rojizo. Tanto para la estructura cúbica de la magnetita, como de la maghemita, 1/3 de los sitios intersticiales son sitios tetraédricos en coordinación con el oxígeno y 2/3 son sitios octaédricos. Sin embargo, en la maghemita solo 5/6 del total de las posiciones disponibles se encuentra ocupada únicamente por el ion Fe^{3+} . Esto se logra creando vacancias (\square), de la forma: $\text{Fe}_3\text{O}_4 \rightarrow \text{Fe}_{2.67}\square_{0.33}\text{O}_4$, mediante la expulsión del 11% del hierro de la estructura. La maghemita con un orden de vacancias completo puede indexarse como un sistema cristalino cúbico primitivo o una red tetragonal, cualquier otro orden de vacancias para la maghemita resulta en una estructura cúbica tipo FCC (centrada en las caras) (Schwertmann & Cornell, 1992).

2.5.4 – Ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$)

Para describir el comportamiento de un material ferromagnético o ferrimagnético, es necesario hacerlo a través de una gráfica de histéresis, tal como se observa en la figura 9a, donde el campo \mathbf{H} es el campo magnético externo que incide sobre el material y la inducción magnética \mathbf{B} es la respuesta causada por el material debido al campo magnético externo. Las nanopartículas de ferrita de cobalto zinc $\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$, son materiales que poseen una curva de histéresis pequeña, es decir, un campo coercitivo pequeño y por lo tanto se consideran como un material blando. La figura 9d muestra la gráfica de histéresis característica para un material blando. El campo coercitivo en este tipo de materiales es pequeño, lo que hace que se requiera de un campo magnético externo pequeño (en dirección opuesta al campo previamente expuesto) para eliminar la remanencia magnética del material, por lo tanto son fáciles de desmagnetizar. El campo coercitivo de las nanopartículas de $\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$, el tamaño de cristal, así como el tamaño de nanopartícula, disminuyen respectivamente mediante el incremento de la cantidad de zinc en el compuesto. En función del aumento de átomos de zinc, las NPM de $\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ presentan una tendencia al comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente (López et al., 2012).

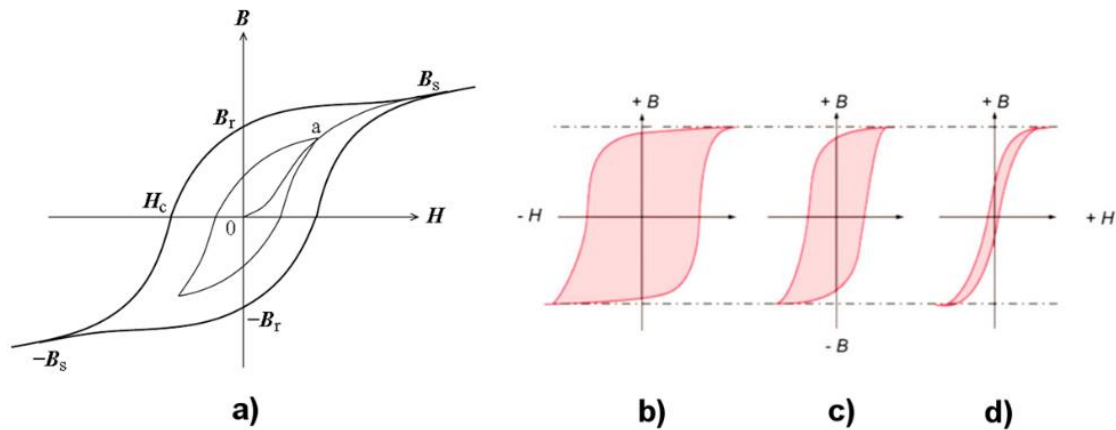


Figura 9 a) Curva de histéresis para materiales ferromagnéticos y ferrimagnéticos, y curvas características de histéresis para materiales b) duros, c) intermedios y d) blandos. Imágenes tomadas de (Spaldin & Mansbridge, 2011) y (Serway & Jewett, 2004).

Estas propiedades hacen de las NPM de $\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ una herramienta ideal para su aplicación tecnológica en varios campos, incluyendo dispositivos electrónicos y ferrofluidos, así como en aplicaciones biomédicas para terapia y diagnóstico de cáncer, liberación magnética de fármacos, cristales fotónicos, y sistemas de almacenamiento de información de alta densidad. Al igual que la magnetita, el método de síntesis de las nanopartículas $\text{Co}_{(1-x)}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ se basa en la coprecipitación de soluciones salinas en un medio alcalino (López et al., 2012).

2.6 – Síntesis de nanopartículas magnéticas

La síntesis de nanomateriales es un proceso complejo. Por ello existe una gran variedad de técnicas disponibles para producir diferentes tipos de nanopartículas. Como resultado, es imposible generalizar todas las técnicas de síntesis actualmente disponibles. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas se pueden englobar en tres categorías, las cuales son: (i) síntesis por condensación de vapor, (ii) síntesis por reacción química y (iii) síntesis por rutas de reacción de estado sólido (Chaudhuri & Paria, 2011).

Para la producción de nanomateriales se puede hablar de dos estrategias de síntesis en general: la síntesis “top down” y la síntesis “bottom up”. La síntesis “top down” trabaja principalmente con las síntesis por rutas de reacción de estado sólido, las cuales producen dispositivos en la nanoescala partiendo de objetos

en la macro escala, como por ejemplo, las técnicas de litografía (fotolitografía ultravioleta, haz de electrones, haz de iones, sondas de barrido) y las técnicas mecánicas (maquinado, molido, pulido). Por otra parte, la síntesis “bottom up” trabaja con la síntesis por reacciones químicas, así como con la síntesis por deposición de vapores químicos, explotando las propiedades químicas de moléculas para el auto ensamblado de los átomos y las moléculas con precisión atómica entre ellas, por medio de la agregación coloidal y el depósito y crecimiento de películas delgadas (Hill, 2006; Chaudhuri & Paria, 2012).

Las técnicas de síntesis definen en gran parte las propiedades de las NPM. Las nanopartículas de magnetita sintetizadas mediante diferentes técnicas muestran variaciones en sus propiedades estructurales, magnéticas, dieléctricas, entre otras (Sharma et al., 2016). Las NPM pueden ser sintetizadas por diferentes métodos, entre ellos: la microemulsión, la síntesis sol-gel, las reacciones sonoquímicas, las reacciones hidrotermales, la hidrólisis y termólisis de precursores químicos, la síntesis por inyección de flujo, así como la síntesis química por electrospray (Laurent et al., 2008). No obstante, el método más común para la síntesis de nanopartículas magnéticas, de magnetita, hematita o maghemita, es la coprecipitación química de sales de hierro, la cual forma parte de una técnica de síntesis “bottom up” por reacción química que no requiere de grandes tiempos de operación y costos energéticos, y que por el contrario ofrece un alto rendimiento para el crecimiento de NPM, en comparación a otras técnicas de síntesis (Rafiq et al., 2015).

2.7 – Estabilización de nanopartículas magnéticas

Teóricamente, son cuatro tipos de fuerzas las que contribuyen a la inestabilidad de un sistema coloidal magnético, lo cual ocasiona que las NPM tiendan a aglomerarse y pierdan algunas de sus propiedades específicas (Brinker & Scherer, 1990). Estas cuatro fuerzas son: las fuerzas de atracción de van der Waals, las cuales inducen una fuerte atracción de corto alcance; las fuerzas electrostáticas de repulsión, las cuales ocurren en particular para sólidos sumergidos en solventes polares o soluciones electrolíticas; las fuerzas magnéticas dipolares entre dos partículas, las cuales inducen interacciones que resultan ser generalmente atractivas; y finalmente las fuerzas de repulsión estérica, las cuales actúan principalmente sobre partículas recubiertas (Magnani et al., 2006). Para obtener coloides de nanopartículas magnéticas que sean estables ante este tipo de interacciones es crucial lograr la estabilización de las NPM en el medio de síntesis y consecuentemente en el medio en donde serán utilizadas. En general, la manera de estabilizar las partículas magnéticas se logra modificando una, o ambas de las interacciones de repulsión, en específico: la repulsión electrostática y la repulsión estérica (Schwertmann & Cornell, 1992).

La estabilización de nanopartículas por repulsión electrostática se logra al modificar el valor del punto isoeléctrico de su superficie (IEP, por sus siglas en inglés). El punto isoeléctrico de la magnetita se encuentra a un pH_{IEP} de 6.8 (Laurent et al., 2008). Este punto está definido como las condiciones a las que el potencial electrocinético (potencial zeta, ζ) es igual a cero. La magnitud del potencial zeta provee información sobre la estabilidad de la nanopartícula, las cuales exhiben una repulsión electrostática a mayores magnitudes de potencial y por lo tanto un incremento en su estabilidad. Esto impide que la magnetita sea estable dentro del agua a un rango de pH de 6 a 10, provocando que la partícula no se disperse y precipite (Laurent et al., 2008). Sin embargo, se sabe que materiales como la sílice tienen un punto isoeléctrico IEP dentro de un rango de pH de 1 a 3 (Brinker & Scherer, 1990). Por lo tanto, el recubrimiento de la magnetita con un material de sílice estabilizará las nanopartículas por repulsión electrostática al modificar su punto isoeléctrico, y dependiendo del pH de la fase dispersante, la superficie de la magnetita recubierta tendrá una carga negativa que le permitirá estabilizarse en un medio acuoso.

La otra forma de lograr la dispersión de las NPM, se logra mediante la repulsión estérica haciendo uso de estabilizantes de capa orgánica, especialmente cuando las partículas se encuentran inmersas en solventes no acuosos. Dentro de la variedad de agentes estabilizantes de capa orgánica se encuentran: el ácido láurico, el ácido oleico, el ácido cítrico, así como los surfactantes de doble capa (Philipse, Bruggen, & Pathmamanoharan, 1994). Cabe mencionar que además de brindar estabilidad, el uso de agentes orgánicos monoméricos (como el ácido cítrico y el ácido oleico), así como el uso de agentes orgánicos poliméricos, en el proceso de síntesis, influyen en el control del tamaño de la NPM (Laurent et al., 2008). Los principales tipos de agentes estabilizantes para el recubrimiento de nanopartículas, se pueden clasificar en dos grupos principales según el tipo de funcionalización que presentan.

2.7.1 – Funcionalización por materiales orgánicos

Los compuestos orgánicos son comúnmente utilizados para recubrir superficies de nanopartículas de óxido de hierro durante o después del procedimiento de síntesis, para evitar su aglomeración. Al funcionalizar la magnetita con compuestos orgánicos, además de proveer de las características magnéticas básicas, estas presentan buena dispersión y biocompatibilidad. Generalmente, los compuestos orgánicos se pueden clasificar en tres tipos de estabilizantes, como: estabilizantes monoméricos y surfactantes, estabilizantes poliméricos y los estabilizantes biológicos (Wu, He, & Jiang, 2008). A continuación, se describen los estabilizantes monoméricos y surfactantes, como base para lograr la dispersión de las NPM.

2.7.1.1 – Estabilizantes monoméricos y surfactantes

Los grupos funcionales de los estabilizantes orgánicos monoméricos y surfactantes, se componen de grupos carboxilatos, fosfatos y sulfatos, los cuales tienen la tendencia de unirse con la superficie de la magnetita (Cornell & Schwertmann, 2003). El ácido cítrico es un estabilizante orgánico monomérico soluble en agua, el cual, debido a la funcionalidad de sus tres grupos carboxilos, es adsorbido a la superficie de la magnetita vía uno o dos de estos grupos, dependiendo de la necesidad estérica y de la curvatura de la superficie de la nanopartícula. De esta manera, al menos un grupo carboxilo del ácido cítrico quedará libre, lo que provee de un comportamiento hidrófilo a la nanopartícula (Laurent et al., 2008). La figura 10 muestra un diagrama de la molécula del ácido cítrico y la interacción entre los grupos carboxilo y la nanopartícula de magnetita.



Figura 10 Molécula de ácido cítrico y su interacción con las nanopartículas magnéticas. *Imagen tomada de (Cheraghipour, Javadpour, & Mehdizadeh, 2012)*

Por su parte, los surfactantes, propiamente llamados tensoactivos, tienen la capacidad de disminuir la tensión superficial entre la interface de dos fases condensadas, para este caso el agua y la NPM hidrofóbica (Kim et al., 2008). Los surfactantes tienen una estructura molecular que se compone de dos partes, una parte polar (hidrofílica) y una parte apolar (hidrofóbica) (Salaguer, 2002). El surfactante catiónico de Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, por sus siglas en inglés), el cual se observa en la figura 11, resulta ser un buen medio para la construcción de micelas que ayudan en la formación de nanopartículas, debido a su buena capacidad de disociación en agua.

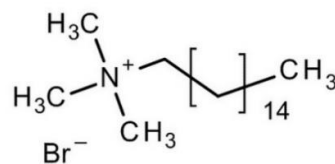


Figura 11 El bromuro de cetiltrimetilamonio, CTAB, tiene un grupo funcional cargado positivamente, el cual mantiene la neutralidad eléctrica asociado a un anión (Bromo). La parte no polar del CTAB está constituida por una cadena de grupos alquilo, mientras que la parte polar es un grupo amonio cuaternario. *Imagen tomada de (LOBA, 2012).*

2.7.2 – Funcionalización por materiales inorgánicos

Las nanopartículas de óxido de hierro pueden ser recubiertas con estabilizantes inorgánicos, como: la sílice (Andrade, Souza, Pereira, Fabris, & Domingues, 2009), el oro (Moraes Silva, Tavalhaie, Sandiford, Tilley, & Gooding, 2016), el gadolinio (III) (Zhao et al., 2014), entre otros. Estos recubrimientos no solo proveen de estabilidad a las nanopartículas en solución, sino que también promueven su funcionalización con varios ligandos biológicos compatibles con la superficie de la nanopartícula (Laurent et al., 2008). En términos generales, el recubrimiento y la funcionalización de nanopartículas por materiales inorgánicos comprende el uso de materiales como: sílice, metales, no metales, óxidos de metal y sulfuros. A continuación, se describen las características y la síntesis de un material de sílice.

2.7.2.1 – Sílice

El término “sílice” es una designación corta y conveniente para describir al “dióxido de silicio” (SiO_2), tanto en su forma cristalina, como amorfa, hidratada o hidroxilada (Iler, 1979). La sílice es el único óxido estable del silicio. Su estructura es una red sólida covalente, tal como se observa en la figura 12a. El bloque principal de la sílice y las estructuras de silicatos, es el tetraedro de SiO_4^{4-} , que se observa en la figura 12b. Todas las formas de sílice contienen el enlace Si–O, el cual es el enlace más estable de todos los enlaces Si–X, para cualquier elemento enlazante X. A partir de estudios por espectroscopia infrarroja tres grandes bandas de absorción a 800, 1100 y 1250cm^{-1} , se le atribuyen a vibraciones fundamentales del enlace Si–O, variando poco para cada forma estructural de la sílice (H. E. Bergna & Roberts, 2006).

La sílice ofrece una óptima estabilización, que la hace el compuesto más utilizado para la funcionalización de las nanopartículas de óxido de hierro, previniendo su agregación en líquidos, mejorando su estabilidad química, sin alterar las características magnéticas. Además, provee de una biocompatibilidad con sistemas biológicos al no representar ser una amenaza tóxica frente a ellos (H. E. Bergna & Roberts, 2006). Este recubrimiento estabiliza las NPM de dos maneras. Una manera se basa en el blindado de la interacción dipolar magnética de los núcleos. La otra hace referencia a la carga negativa de las nanopartículas de sílice. Esta carga se debe principalmente a adsorciones o adiciones de iones a las superficies del recubrimiento. Para el caso del SiO_2 , los iones de adsorción preferentes son los iones OH^- . Como resultado, las partículas adquieren una carga neta negativa (Petrucci, 2011). Esto permite promover la repulsión coulombica entre las NPM, superando las fuerzas gravitacionales, manteniéndose suspendidas indefinidamente en el medio.

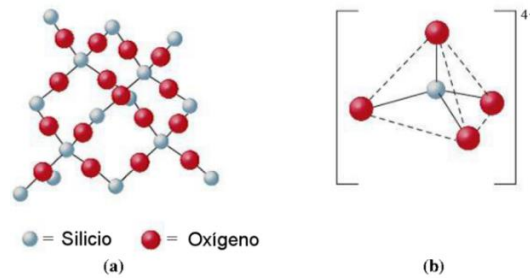


Figura 12 a) Red tridimensional de enlaces covalentes de la sílice SiO_2 , y **b)** la coordinación tetraédrica del anión silicato SiO_4^{4-} , con un átomo de silicio rodeado por cuatro átomos de oxígeno. *Imagen tomada de (Petrucci, 2011).*

2.8 – Síntesis sol-gel: método Stöber

El crecimiento y las necesidades cada vez más sofisticadas de la tecnología moderna han atraído la atención de científicos de varias disciplinas hacia el estudio de las propiedades de la sílice coloidal. Un ejemplo de esto es el desarrollo de la ciencia y tecnología basada en el método de síntesis sol-gel. Este método se basa en la síntesis de materiales mediante la preparación de un sol, la solidificación del sol (gelificación) y la remoción del solvente de dispersión (Horacio E. Bergna, 1994). Un sol es una suspensión coloidal de partículas sólidas dispersas en un medio líquido. La clase de precursores más utilizados para las reacciones sol-gel son los alcóxidos de metal. El ejemplo de alcóxido de metal más estudiado es el tetraetóxido de silicio (tetraetil ortosilicato, TEOS), $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, el cual se muestra en la figura 13 (Brinker & Scherer, 1990). La síntesis sol-gel a partir del TEOS también se conoce como el método Stöber, en el cual la sílice es formada *in situ* a través de la hidrólisis y condensación del TEOS (Stöber, Fink, & Bohn, 1968)

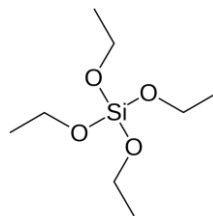
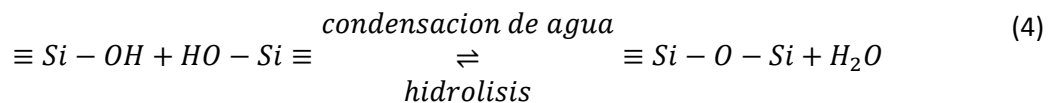
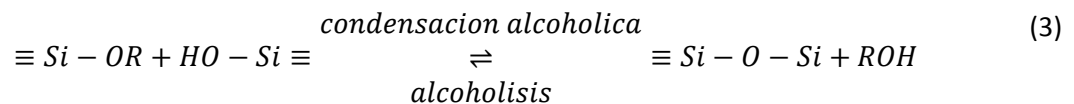
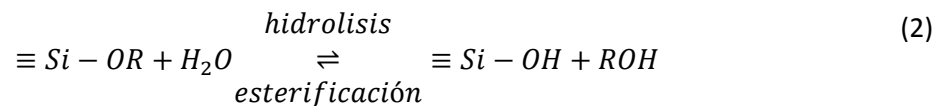


Figura 13 Monómero de tetraetil ortosilicato, TEOS. *Imagen de dominio público*

Debido a que los metales de alcóxido reaccionan fácilmente con el agua, en el proceso de hidrólisis, un ion hidroxilo se adhiere al átomo metálico de silicio. Dependiendo de la cantidad de agua y de la presencia de catalizadores, la hidrólisis puede llegar a completarse o detenerse, resultando en una hidrólisis parcial del

metal. Dos moléculas parcialmente hidrolizadas pueden unirse entre sí en una reacción que se conoce como reacción de condensación. Por definición, una reacción de condensación libera una molécula pequeña, ya sea de agua o de alcohol. Este tipo de reacción puede continuar hasta alcanzar tamaños de molécula grandes mediante un proceso de polimerización (Brinker & Scherer, 1990). La síntesis de suspensiones de partículas monodispersas de sílice, se puede dividir generalmente en tres reacciones, que describen el proceso sol-gel a un nivel de grupos funcionales, como se observa en las siguientes 3 ecuaciones:



Las nanopartículas núcleo-coraza, han atraído gradualmente cada vez más la atención, debido a que este tipo de nanopartículas han emergido entre la frontera de la química de materiales y otros campos, tales como: la electrónica, la biomedicina, la farmacéutica, la óptica y la catálisis. (Chaudhuri & Paria, 2011). Las propiedades de las nanopartículas núcleo-coraza pueden ser modificadas dependiendo del material que constituye el núcleo o del material que constituye la coraza. Las principales ventajas que se obtienen a partir del recubrimiento núcleo-coraza van desde: la modificación de superficie, la habilidad de incrementar su funcionalidad, una mejor estabilidad y dispersabilidad, el control de la liberación del núcleo, así como la reducción del consumo de materiales costosos, entre otros (Chaudhuri & Paria, 2011).

El recubrimiento de las NPM con sílice les confiere de varias ventajas, tales como, propiedades de adsorción, adhesión, y propiedades catalíticas, las cuales dependen principalmente de la química y de la geometría de las superficies de la sílice (Horacio E. Bergna, 1994). Una aplicación común de las nanopartículas magnéticas núcleo-coraza, es la extracción magnética de ácidos nucleicos. Esto se debe a que la sílice le confiere a las nanopartículas magnéticas una mayor dispersión y una mejor biocompatibilidad, cuando esta es utilizada en sistemas biológicos (Chaudhuri & Paria, 2011)

2.9 – Ácidos nucleicos: ADN y ARN

Los ácidos nucleicos están presentes en la mayoría de las muestras biológicas frescas de los laboratorios. Estos largos biopolímeros, o biomoléculas, son esenciales para todas las formas de vida. Están compuestos de monómeros, los cuales están constituidos a su vez de nucleótidos que se pueden dividir en tres componentes: una pentosa (azúcar de 5 carbonos), un grupo fosfato y una base nitrogenada. En el caso de encontrar al azúcar como una ribosa simple, el polímero se llamará ácido ribonucleico (ARN), mientras que, si el azúcar es un derivado de la ribosa en forma de desoxirribosa, la molécula se llamará ácido desoxirribonucleico (ADN). En la figura 14 se puede observar un diagrama que describe la composición y direccionalidad de la molécula de ADN.

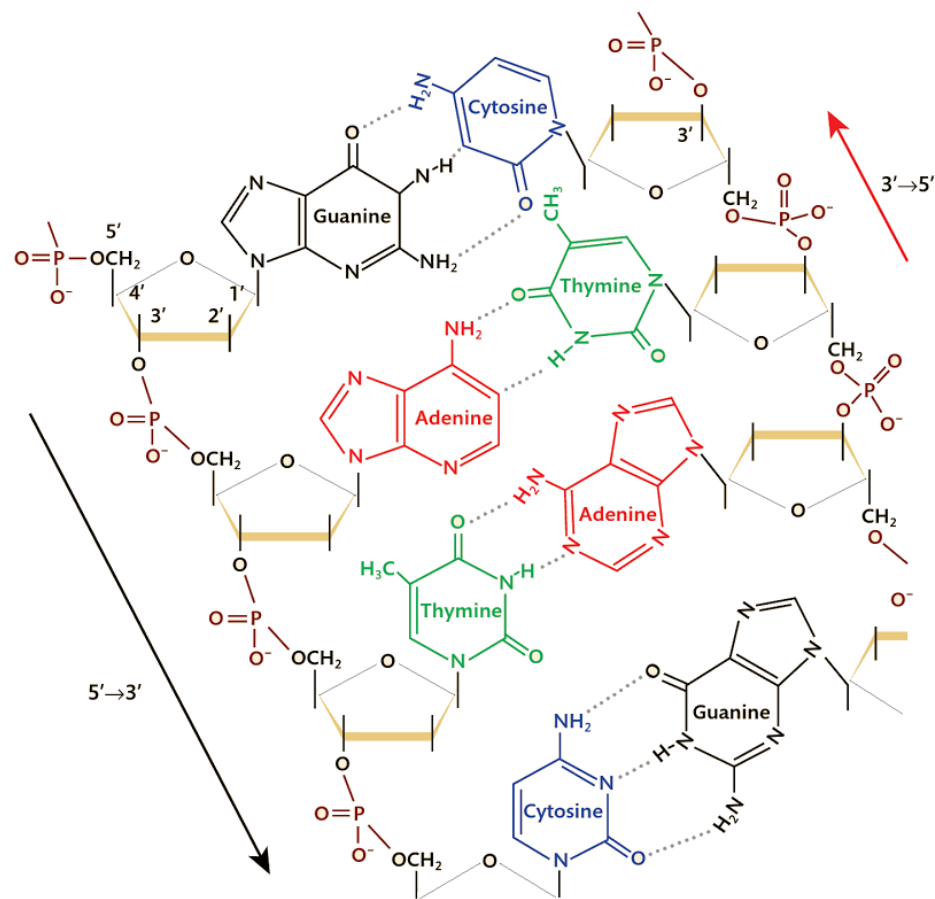


Figura 14 Una cadena polinucleótida de ADN se construye creando un enlace fosfodiéster que une el carbono 3' del azúcar de la cadena en crecimiento, con un fosfato adherido al carbono 5' de un nucleótido nuevo. Cada azúcar de la columna de enlaces azúcar-fosfato está unido a una base nitrogenada. La unión de dos columnas de polinucleótidos mediante puentes de hidrógeno entre pares de bases complementarias, forman la famosa doble hélice de ADN, donde la citosina (C) y la guanina (G) forman 3 enlaces de hidrogeno y la adenina (A) y la timina forman 2 enlaces de hidrogeno. Cada par consiste de una purina de doble anillo y una pirimidina de anillo sencillo. *Imagen tomada de (Bromham, 2015).*

2.10 – Extracción de ácidos nucleicos

2.10.1 – Línea celular para la extracción de ácidos nucleicos

Para la extracción de ácidos nucleicos se necesita primeramente elegir y preparar adecuadamente la muestra a analizar, así como preparar las soluciones y los reactivos a utilizar durante la extracción. Para fines académicos, el microorganismo utilizado con mayor frecuencia en prácticas dentro de los laboratorios de biología molecular es la enterobacteria *Escherichia coli*, debido a que es un organismo bacteriano que ha sido estudiado por mucho tiempo y además su genoma ya ha sido secuenciado completamente, el cual tiene una longitud de 4,639,221 pb (Blattner, 1997). Para su preparación, se suele inocular una muestra pura de la bacteria dentro de un medio Luria Bertani (LB) a 37°C, para hacer un cultivo overnight (16 horas), el cual produce aproximadamente de 10^7 hasta 10^8 células por mililitro. (Bandyopadhyay, Chatterjee, & Sarkar, 2011). Para la extracción de ácidos nucleicos de este trabajo se preparó mediante un crecimiento overnight en un medio de cultivo LB, una cepa de *E. coli* DH5 α , la cual es una cepa “virgen” que no presenta plásmidos en su interior, por lo que es utilizada comúnmente para rutinas de clonación de ADN recombinante (Invitrogen, 2006).

2.10.2 – Extracción magnética de ácidos nucleicos

La técnica de extracción magnética de ácidos nucleicos, es un método que ha sido modificado a partir de métodos de extracción relativamente modernos, al grado de incluir el uso de NPM en el proceso de la extracción de los ácidos nucleicos. Básicamente, el método de extracción magnética de ácidos nucleicos en se puede dividir en 4 pasos. Estos pasos son: el lisado de las células, la unión del ADN a las NPM, el lavado del medio y la elución final. A continuación se describen a grandes rasgos las características principales de cada uno de estos pasos.

Lisado

El procedimiento de lisado, es donde se rompen las células, mediante la adición de detergentes o surfactantes, como el SDS (dodecilsulfato sódico), que ayudan a destruir y remover las membranas lipídicas de las células para así poder exponer el ADN fuera del núcleo celular.

Unión

Como segundo paso, se agrega una cierta cantidad de NPM, previamente lavadas con una solución de ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA), el cual es una sustancia quelante que inhibe la actividad de las desoxirribonucleasas (enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace fosfodiéster y degradan el ADN) (Guérout, Picot, Abi-Ghanem, Hartmann, & Baaden, 2010). De esta manera se protegerá el ADN expuesto a las NPM y no será degradado. A continuación, se utiliza un buffer de unión, generalmente compuesto por una solución salina y una concentración de polietilenglicol (PEG), que ayuda en la correcta adhesión de las NPM a la columna de enlaces fosfato de la cadena de ADN.

Lavado

El lavado posterior es realizado por lo general con 2 tipos de soluciones, entre ellas el cloruro de sodio NaCl de alta concentración salina y el buffer de lavado de acetatos. Este último, aporta iones de magnesio y potasio los cuales, al igual que el cloruro de sodio promueven la precipitación de compuestos orgánicos que intervienen en el proceso de extracción y que deben de ser purificados fuera de la extracción de ADN.

Elución

La elución final se lleva a cabo mediante la redispersión en agua libre de nucleasas, debido a que los ácidos nucleicos tienen un comportamiento hidrofílico (solubles en agua), permanecerán dispersos en una fase acuosa (Zumbo, 2013). La figura 15 muestra un diagrama del procedimiento a seguir para realizar la extracción magnética de ácidos nucleicos.

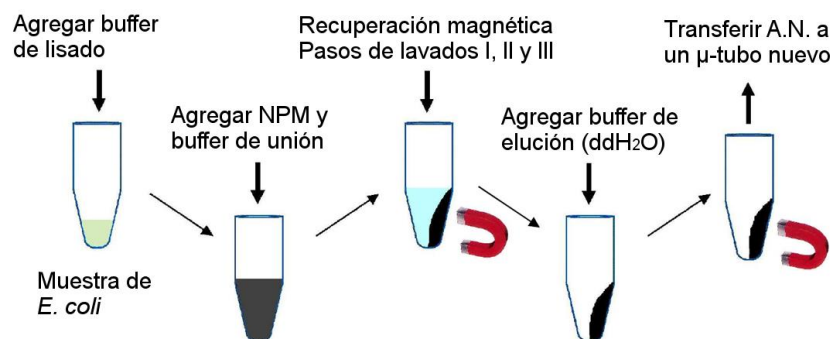


Figura 15 Extracción magnética de ácidos nucleicos (A. N.). Los pasos básicos para la extracción son ilustrados mediante cinco imágenes que describen el orden de la adición y remoción de reactivos y sobrenadantes. . *Imagen tomada y modificada de <http://www.chemicell.com/products/purification/docs/geneMAG-DNABlood.pdf>.*

Capítulo 3. Metodología experimental

En este capítulo se describen los métodos a utilizar para la síntesis de NPM por coprecipitación química y el recubrimiento de las NPMNC por síntesis sol-gel, así como la extracción de ácidos nucleicos.

3.1 – Reactivos químicos y material de laboratorio

A continuación, se presentan las tablas 2 y 3 con el listado de los reactivos, material y equipo utilizado para llevar a cabo el trabajo de síntesis de NPM y la extracción de ácidos nucleicos dentro del laboratorio.

Tabla 2. Lista de reactivos, soluciones y medios necesarios para la síntesis de NPM y extracción de ácidos nucleicos.

Reactivos para síntesis de NPM		Reactivos y medios para extracción de ácidos nucleicos	
FeCl ₃ ·6H ₂ O	HCl	Cepa <i>E. coli</i> DH5α	CTAB/NaCl
FeCl ₂ ·4H ₂ O	TEOS	ADN liofilizado (Fago λ)	Cloroformo
CoCl ₂ ·6H ₂ O	CTAB	Medio Luria Bertani	Isopropanol
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	Etanol	EDTA 0.5 M pH 7.2	Agarosa
NH ₄ OH	H ₂ O desionizada	Buffer de unión (20% PEG 8000, 2.5 M NaCl)	Buffer de lavado (25 mM TrisHCl pH 7.8, 100mM KOAc, 10 mM Mg ₂ OAc)
NaOH	Argón	SDS 10%	TBE 1X (Tris-Borato-EDTA)
Ac Cítrico		NaCl 5M	Bromuro de etidio
		H ₂ O libre de nucleasas	Buffer de carga
		Buffer TE	

Tabla 3 Lista de material y equipo utilizado para la síntesis de NPM y la extracción de ácidos nucleicos.

Material y equipo para síntesis de NPM		Material y equipo para extracción de ácidos nucleicos	
Reactor de vidrio	Vasos de precipitado	Incubadora de micro tubos	Espectrómetro UV
Espátula	Agitador mecánico	Incubadora con agitación	Esterilizadora
Micropipetas	Sonicadora	Centrifuga de 2,000 G	Cámara para electroforesis
Pipeta de vidrio	Baño maría	Centrifuga de 20,000 G	Transluminador
Pipeteadores	Bomba de jeringa		
Matraz de bola 250 ml	Puntas para micropipetas		
Agitador de vidrio	Papeles tornasol		
Jeringa de plástico	Imán de neodimio		
Microtubos	Horno de secado		
Balanza			

3.2 – Instrumentación para caracterización

A continuación, se describe el equipo utilizado para la caracterización del material sintetizado, así como los detalles técnicos de las condiciones de operación para cada equipo de trabajo.

3.2.1 – Difracción de rayos X (XRD)

Las fases de estructura cristalina para los sistemas sintetizados se midieron en dos equipos de difracción de rayos X diferentes (XRD, por sus siglas en inglés). La lectura se realizó desde la posición 2θ de 10 a 80° utilizando la radiación Cu K α de 8.04 KeV emitida por un ánodo de cobre, con un tamaño de apertura de 0.02° y un tiempo de captura de 0.5 segundos, para ambos equipos, los cuales fueron:

- Phillips™ X'pert MPD
- Bruker™ D2 Phaser

El tamaño de cristal (D_{DRX}) se calculó mediante la anchura a media altura (FWHM) del pico de reflexión del plano cristalino (311) y la ecuación de Scherrer para partículas de tamaños pequeños (Cullity, 1956) la cual viene dada por:

$$D_{DRX} = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (5)$$

Donde K es una función de la forma de partículas, en este caso toma un valor de 0.9, λ es la longitud de onda de la radiación, β es el ancho del pico a la altura media (FWHM) en radianes y θ el ángulo de Bragg.

3.2.2 – Espectroscopia de luz infrarroja (FTIR)

La espectroscopia de transformada de Fourier de luz infrarroja (FTIR, por sus siglas en inglés) se llevó a cabo dentro del rango del infrarrojo fundamental, entre una frecuencia de 4000 y 360 cm^{-1} , en un espectroscopio Bruker™ Tensor 27. Las muestras fueron preparadas mezclando los polvos de las

nanopartículas en bromuro de potasio KBr, a una concentración aproximada del 2% para después ser comprimida y convertirla en pastilla.

3.2.3 – Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) se realizaron a 15 KeV mediante un microscopio electrónico de barrido JEOL™ JSM 5300. Las muestras se presentaron en polvo y se depositaron sobre una cinta de carbón para su análisis respectivo.

3.2.4 – Fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDS)

La espectroscopia de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía (EDS, por sus siglas en inglés) fue detectada para energías de rayos X entre 0 y 10 KeV, mediante un detector Kevex SuperDry II montado en el microscopio SEM.

3.2.5 – Espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS)

La espectroscopia por fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS, por sus siglas en inglés) se midió dentro de un rango de energías de 0 a 1300 eV, utilizando la radiación Al K α de 1.48 KeV, emitida por un ánodo de aluminio, con ayuda de un equipo XPS de alta resolución marca SPECS™.

3.2.6 – Microscopia electrónica de transmisión (TEM)

El tamaño de partícula fue estudiado mediante microscopia de transmisión de electrones (TEM, por sus siglas en inglés) utilizando un microscopio JEOL™ JEM 2010, a 200 KeV. Las muestras fueron preparadas sonicando una solución de NPM diluida en alcohol isopropílico, de donde se extrajo una gota y se depositó sobre una rejilla de cobre.

3.2.7 – Espectrofotometría de absorción de luz ultravioleta

Las mediciones de absorción de luz UV se llevaron a cabo con el equipo de absorción UV NanoDrop™ Lite, el cual emplea tensión superficial para estabilizar una muestra biológica líquida en un pedestal de metal que detecta el valor de absorción de luz UV. Las longitudes de onda utilizadas fueron a 260 nm y a 280 nm. Típicamente este equipo presenta una precisión del 2% (Thermo Scientific, 2010).

3.3 – Preparación de nanopartículas magnéticas núcleo-coraza

Para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) y ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$) se eligió un método de coprecipitación química, para después ser recubiertas con una coraza de sílice (SiO_2), a través del método sol-gel. Con este procedimiento, se desarrollaron sistemas nanoestructurados núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ y $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2$. En particular se eligió la síntesis de magnetita debido a que es un material que ya ha sido estudiado y del cual se puede encontrar la suficiente información en los acervos científicos como para poder utilizarlo de referencia y compararlo con los resultados de la síntesis del segundo sistema de nanopartículas magnéticas, la ferrita de cobalto zinc, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$, el cual es un sistema que presenta propiedades superparamagnéticas y que no se encuentra reportado en la literatura para su uso como agente de extracción magnética de ácidos nucleicos. Todos los sistemas sintetizados se llevaron a cabo en un reactor de vidrio cerrado, adaptado para llevar a cabo la síntesis bajo una atmósfera inerte. La figura 16 muestra un diagrama del reactor y su descripción.

3.3.1 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$)

Para la síntesis de NPM núcleo coraza (NPMNC) de magnetita se adaptó un método de coprecipitación reportado en la literatura (Bayat, Shakourian-Fard, & Hashemi, 2014). Para la síntesis de las NPMNC de magnetita se prosiguió con la segunda parte del protocolo (Bayat et al., 2014). Sin embargo este método no permitió obtener los resultados esperados por lo que se adoptó otra ruta que resultó con mejores rendimientos de síntesis y finalmente una extracción de ácidos nucleicos aceptable. A continuación se describe la ruta de síntesis que permitió la síntesis de NPM estabilizadas en un medio acuoso.

Para la síntesis de NPM de magnetita se adaptó el método de coprecipitación reportado en la literatura (Bayat et al., 2014), mientras que para las NPMNC de magnetita se utilizó el método (X. Chen, 2013), mediante los cuales, se disuelven concentraciones respectivas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0.123M y de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0.059M en 30 ml de H_2O desionizada en dos vasos de precipitado por separado. Luego, las soluciones se mezclan bajo agitación continua a 130 rpm en un reactor cerrado, bajo atmosfera de argón durante 90 minutos en baño maría a 90°C. La temperatura del medio se aumenta mediante una rampa de temperatura hasta alcanzar primeramente la temperatura de 80°C, donde se comienza a adicionar una solución de 5 ml de NH_4OH 28.6% mediante goteo a una razón de 0.5 ml/min. La solución cambia de color a un color negro característico de la síntesis de magnetita. Después se agrega una solución acuosa de 2.5 ml de ácido cítrico al 40% a una razón de 0.5 ml/min. Una vez transcurridos los primeros 30 minutos, la mezcla se coloca en agitación continua a 130 rpm, sin flujo de argón y a temperatura ambiente durante los 60 minutos restantes. Después de transcurrido el tiempo, el precipitado se decanta magnéticamente y se agregan al reactor 100 ml de H_2O desionizada mediante pipeteo para no redispersar el precipitado. Con ayuda de una varilla de vidrio se agita suavemente la mezcla, hasta la homogenización de la fase acuosa y el medio básico. Luego de esto, se extrae con cuidado la mayor cantidad posible de sobrenadante líquido, hasta obtener sólo el precipitado solido en el reactor. A continuación, para la peptización correcta de las NPM de magnetita, estas son tratadas con 5 ml de HCl 0.1M mediante inmersión durante 5 minutos. Después, las NPM se separan magnéticamente y el sobrenadante es extraído.

Prosiguiendo con el proceso de síntesis sol-gel, primero las NPM son redispersadas dentro de una mezcla de 80 ml de alcohol etílico (agregados al reactor mediante pipeteo), al igual que 20 ml de H_2O desionizada y 1 ml de NH_4OH 28.6%. Se sonica por un minuto para alcanzar la dispersión total del medio y seguido de esto se agregan 0.144mmol de TEOS. Después se agita vigorosamente a 130 rpm durante un tiempo de 12 horas a temperatura ambiente. Después de las 12 horas, las NPMNC sintetizadas se decantan magnéticamente y el sobrenadante es extraído. Las NPMNC son redispersadas nuevamente en una mezcla de 60 ml de alcohol etílico, 0.3 g de CTAB, 80 ml de H_2O desionizada y 1 ml de NH_4OH 28.6% (agregados en dicho orden). La mezcla se sonica por 30 minutos para después, cambiar de lugar la dispersión a un matraz de bola de 250 ml. Se agregan 1.9mmol de TEOS y se agita durante 12 horas a 130 rpm a temperatura ambiente. Después de 12 horas las NPMNC+CTAB se decantan magnéticamente y se extrae el sobrenadante líquido. En la última etapa, el exceso de CTAB es removido, a partir de una redispersión de las NPMNC+CTAB en 100 ml de etanol dentro de un matraz de 500 ml, mediante reflujo químico durante 48 horas a una temperatura de 90°C. Para obtener una mayor limpieza, el etanol se cambia cada 12 horas. Finalmente, las NPMNC+CTAB, se secan en horno a vacío (0.1 Bar) a una temperatura de 45°C durante 24 horas, para después hacer las caracterizaciones correspondientes.

3.3.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$)

De manera simultánea a los pasos realizados para la ruta de la síntesis de magnetita, la síntesis de NPM de ferrita de cobalto zinc siguió un método de coprecipitación modificado a partir de (Lopez et al., 2012). Después, las NPM sintetizadas fueron recubiertas adaptando el método de síntesis (Bayat et al., 2014). Al igual que para la magnetita, los resultados no fueron los más viables para la síntesis óptima de NPM, debido a oxidaciones de superficie, y se optó por diseñar una nueva ruta de síntesis para la correcta dispersión y estabilización de las NPM tipo núcleo-coraza, conforme al siguiente método descrito.

Primeramente se lleva a cabo la síntesis de NPM de ferrita de cobalto-zinc en base al método de coprecipitación descrito por (Lopez et al., 2012), con las modificaciones respectivas para obtener los rendimientos del método (Bayat et al., 2014) y los recubrimientos de sílice a partir de una síntesis sol-gel (X. Chen, 2013). A partir de estos cambios, se disuelven concentraciones respectivas de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\frac{2}{15}$ M, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $\frac{0.25}{15}$ M y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a $\frac{0.75}{15}$ M en 27.27 ml de H_2O desionizada, en tres vasos de precipitado por separado. Las soluciones se mezclan y se agitan vigorosamente a 130 rpm en un reactor cerrado durante 60 minutos en baño maría a 90°C . La temperatura del medio se aumenta mediante una rampa de temperatura hasta alcanzar primeramente la temperatura de 80°C donde se comienza a precipitar con una solución de 18.2 ml de NaOH 3M a una razón de 7.5 ml/min. La solución cambia de color a un color café oscuro característico del material durante el proceso de precipitación. Después de esto se agregan 2.5 ml de Ac. Cítrico 40% a una razón de 0.5 ml/min. Después de la precipitación, la solución se deja enfriar en un baño frío y se decanta magnéticamente. Una vez la temperatura se regula a 25°C se agregan 100 ml de agua desionizada, mediante pipeteo para no redispersar el precipitado. Se agita suavemente hasta la homogeneización de las fases acuosa y la solución básica y se extrae el sobrenadante líquido hasta obtener solo el precipitado sólido. A continuación, las NPM son tratadas mediante inmersión en 5 ml de HCl 0.1M durante 5 minutos para su peptización correcta. Después, las NPM se separan magnéticamente y el sobrenadante es extraído.

Para comenzar el proceso de síntesis sol-gel, las NPM son redispersadas en una mezcla de 80 ml de alcohol etílico (agregados al reactor mediante pipeteo), 20 ml de H_2O desionizada y 1 ml de NH_4OH 28.6%. La mezcla se sónica por un minuto para alcanzar la dispersión total y seguido de esto se agregan 0.144mmol de TEOS. Después se agita vigorosamente a 130 rpm durante un tiempo de 12 horas a temperatura ambiente. Después de 12 horas, las NPMNC sintetizadas se decantan magnéticamente y el sobrenadante es extraído. Las NPMNC son redispersadas nuevamente en una mezcla de 60 ml de alcohol etílico, 0.3 g de

CTAB, 80 ml de H₂O desionizada y 1 ml de NH₄OH 28.6%, los cuales se agregan en dicho orden. La mezcla se sónica por un tiempo de 30 minutos y después, la solución en dispersión se cambia de lugar a un matraz de bola de 250 ml. Se agregan 1.9mmol de TEOS y se agita durante 12 horas a 130 rpm a temperatura ambiente. Después de 12 horas las NPMNC+CTAB se decantan magnéticamente y se extrae el sobrenadante líquido. En la última etapa el CTAB en exceso es removido, a partir de una redispersión de las NPMNC+CTAB en 100 ml de etanol en un matraz de 500 ml, en reflujo químico durante 48 horas a una temperatura de 90°C. Para obtener una mayor limpieza, el etanol se cambia cada 12 horas. Finalmente, después de separar el último sobrenadante de etanol de las NPMNC+CTAB, estas se secan en horno a vacío (0.1 Bar) a una temperatura de 45°C durante un tiempo de 24 horas.

3.3.3 – Sinterización de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc

Con el objetivo de obtener un material con una fase de alto grado de cristalinidad a partir de las nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$), una fracción de las nanopartículas de ferrita de cobalto zinc de cada sistema sintetizado (NPM, NPMNC y NPMNC+CTAB) es llevado a un tratamiento de sinterización en horno a una temperatura de 600°C, por un tiempo de 10 horas mediante una rampa de calentamiento de 8°C por minuto (Teixeira, Ogasawara, & Nóbrega, 2006).

3.3.4 – Reactor para la síntesis continua de nanopartículas magnéticas

El arreglo del reactor implementado reúne las características necesarias para sintetizar los productos y manejar los reactivos para obtener los nanomateriales de una forma continua, debido a que en todo momento las nanopartículas sintetizadas están inmersas en un medio acuoso con burbujeo de gas inerte. De esta manera, las NPM no son expuestas al oxígeno atmosférico evitando la oxidación y el cambio de fase cristalina de la superficie de las NPM. A continuación la figura 16 muestra un diagrama del reactor y las partes que lo componen.

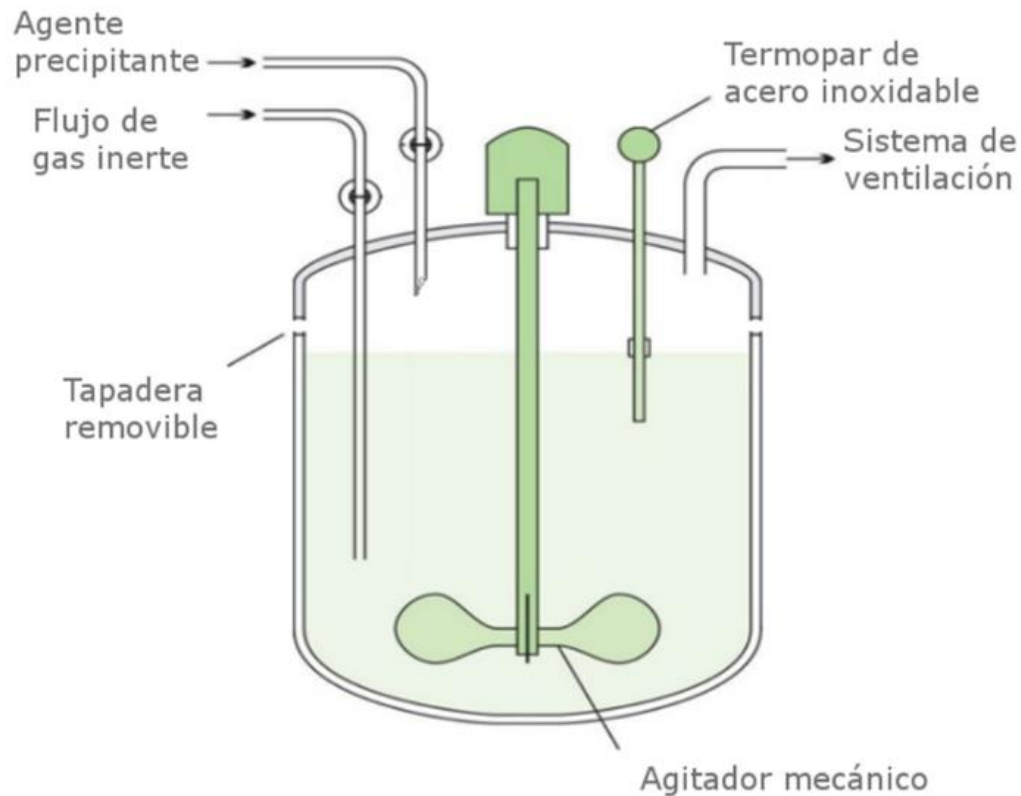


Figura 16 Diagrama del reactor implementado para la síntesis de NPMNC de manera continua, con una capacidad volumétrica de hasta 250 ml para reactivos en solución acuosa. *Imagen tomada y modificada de (Clements, 2010).*

3.4 – Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos

3.4.1 – Preparación del cultivo de extracción

Primero, se prepara un medio de cultivo LB (Luria-Bertani), base para el mantenimiento y la propagación de *Escherichia coli*, al disolver 2.5g del polvo LB en 100 ml de agua purificada. Después de mezclar bien, se lleva a autoclave a 121°C durante 15 minutos para su esterilización. Una vez esterilizado se agrega con un asa una pequeña cantidad de células de una cepa de *E. coli* DH5 α almacenadas a -80°C. El medio se deja en reposo a temperatura ambiente para generar un crecimiento overnight (por 16 horas). Después de este tiempo, se colocan 3 ml del medio celular en un microtubo y se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos, para después retirar el sobrenadante líquido del material biológico. Este procedimiento se lleva a cabo con los 100 ml de cultivo celular overnight de *E. coli* DH5 α total. El total de microtubos con un pellet celular (aproximadamente 33) se almacenan a -20°C para su posterior uso en la extracción de ADN.

3.4.2 – Extracción magnética de ácidos nucleicos

Para la extracción del material genético se siguió una metodología modificada a partir del protocolo (Hawkins, Connor-morin, Roy, & Santillan, 1994). Previamente se deben de descongelar a temperatura ambiente las células de *E. coli* a utilizar. Una vez descongeladas se centrifugan y se retira el sobrenadante. A continuación, se pesan 20 mg del sistema de NPM a utilizar (NPM, NPMNC o NPMNC+CTAB) y se lavan en 1 ml de EDTA 0.5 M pH 7.2 (agitando por inversión) un total de 3 veces. Finalmente, las NPM son resuspendidas en 1 ml de EDTA. Posteriormente a las células de *E. coli* se le agregan 30 µl de SDS 10% y se incuba por 2 minutos a temperatura ambiente para que sean lisadas. Después, se agregan 40 µl de la dispersión de NPM en EDTA al lisado celular. Se añaden 100 µl del buffer de unión (20% PEG 8000, 2.5M NaCl), se mezcla por inversión y se incuba por 5 minutos a temperatura ambiente. Para el caso particular de las NPMNC+CTAB, la extracción se realiza dos veces, una utilizando el buffer y otra sin el buffer de unión. Se prosigue a lavar las partículas colocando el microtubo sobre un imán con suficiente fuerza de atracción magnética y se espera un tiempo de 2 minutos. Después de capturadas las NPM se retira el sobrenadante y se agrega una cantidad de 0.5 ml de NaCl 5M para realizar el primer lavado, se descarta el sobrenadante y se agregan de nuevo 0.5 ml de NaCl 5M realizando el lavado por segunda ocasión. Después, se agregan 0.5 ml del buffer de lavado (TrisHCl 25 mM pH 7.8, KOAc 100mM, Mg₂OAc 10 mM). Para el lavado no hay necesidad de resuspender las nanopartículas en cada paso. Finalmente, después de eliminar el último sobrenadante de los lavados, las NPM se resuspenden en 50 µl de H₂O libre de nucleasas, se agita suavemente y las NPM son capturadas magnéticamente, se separa la fase líquida y se almacena en un tubo por separado para su posterior análisis.

3.4.3 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de solución cloroformo

Para la extracción de ácidos nucleicos mediante el método de solución cloroformo se siguió un protocolo modificado (Ausubel et al., 2003). Primero se descongelan a temperatura ambiente las células de *E. coli* a utilizar y una vez descongeladas se centrifugan y se retira el sobrenadante. Después se les añade 30 µl de SDS al 10%, se mezcla y se incuban 5 minutos a una temperatura entre 50 y 65°C. En esta etapa la solución se torna viscosa. Después se añaden 567 µl de TE buffer y se mezcla bien con ayuda de la pipeta para disolver la solución. Luego se añaden 100 µl de NaCl 5M y se mezcla mediante inversión. Posteriormente, se agregan 80 µl de solución de CTAB/NaCl, se agita nuevamente (sin vortex) y se deja incubar 10 minutos a 65°C. A continuación se añade 500 µl de cloroformo, se mezcla vigorosamente y se centrifuga por 10

minutos a 14,000 rpm. Después de la centrifugación, se generan dos fases dentro del microtubo, una fase orgánica (en la parte de abajo) y una fase acuosa (en la parte de arriba). La fase acuosa es removida, evitando absorber la interface orgánica, y se almacena en un microtubo limpio. Se añade el 60% del volumen retirado en isopropanol y se mezcla suavemente por inversión hasta observar un precipitado blanco. Se centrifuga por 5 minutos a 14,000 rpm y después se decanta el sobrenadante. Se deja escurrir la muestra en papel secante por 5 minutos y finalmente se resuspende el material orgánico en 50 μ l de H₂O libre de nucleasas.

3.4.4 – Medición de absorción de luz UV y electroforesis en gel

Para el análisis mediante absorción de luz ultravioleta se utilizan 2 μ l del líquido sobrenadante obtenido directamente de la extracción de ácidos nucleicos, los cuales se depositan sobre el pedestal del espectrómetro de absorbancia de luz UV (Nanodrop™ Lite) y se mide su absorción a 260 nm y a 280 nm respectivamente. Las mediciones se llevan a cabo metódicamente realizando un proceso de limpieza entre cada muestra para evitar la contaminación del lector y la alteración de la lectura.

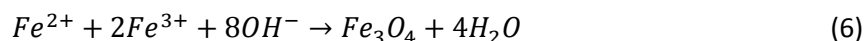
Para la electroforesis en gel, se prepara un gel de agarosa al 0.8%. Para la preparación del gel se miden 35 ml de TBE 1X y con ayuda de un matraz Erlenmeyer, se mezclan con 0.28 g de agarosa, agitándolos para ayudar en la disolución. Se calienta en el horno microondas por un minuto para lograr la disolución total. Se agita con cuidado, evitando la formación de burbujas y se agregan 2 μ l de Bromuro de etidio, evitando la inhalación de vapores. Se llena la cámara de electroforesis con TBE y se pone el gel previamente preparado. Se prepara la muestra mezclando 7 μ l de los ácidos nucleicos extraídos con 2 μ l de buffer de carga, y posteriormente se llena el pozo del gel con esta mezcla. Una vez cargado el gel con todas las muestras, se corre la electroforesis a 80 V por 40 minutos. Una vez que ha corrido el gel, se retira y es observado en un transluminador de luz UV para poder ver la fluorescencia de las bandas correspondientes al ADN extraído.

Capítulo 4. Resultados

En este capítulo se reportan los resultados de la síntesis de nanopartículas de magnetita y ferrita de cobalto-zinc mediante métodos de coprecipitación química, así como el recubrimiento de dichas nanopartículas con un precursor de sílice mediante la síntesis tipo sol-gel. El objetivo fue generar sistemas de nanopartículas magnéticas núcleo-coraza (NPMNC) mediante un proceso continuo, con las características apropiadas y en el menor tiempo posible. Para estimar los rendimientos de la síntesis se realizaron cálculos basados en el peso de las NPM correspondientes, sin la contribución del recubrimiento. Para el estudio de la fase cristalina de las nanopartículas de ferrita de cobalto-zinc en particular, se llevó a cabo un proceso de sinterización antes y después del proceso de recubrimiento. Los sistemas fueron analizados mediante diferentes técnicas de caracterización, entre ellas XRD, FTIR, SEM, EDS, XPS y TEM, para comparar sus características estructurales y composición química. De igual manera, se evaluaron los rendimientos de extracción magnética de ácidos nucleicos para los sistemas sintetizados. Las extracciones magnéticas se compararon con el método de extracción de ácidos nucleicos por un protocolo de solución cloroformo, así como con una muestra de ADN liofilizado del bacteriófago λ . Todas las extracciones de ADN (a excepción del bacteriófago λ) se hicieron por duplicado, a partir de un cultivo overnight (24 horas) de una cepa de *Escherichia coli DH5 α* . Posteriormente se midió la absorbancia mediante espectrometría de luz UV (en un equipo NanoDrop™ Lite) para conocer la concentración y pureza de los ácidos nucleicos extraídos. Finalmente, se realizó un análisis de fluorescencia mediante electroforesis en gel.

4.1 – Síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

A continuación, se describe la *ecuación iónica neta* para la reacción de coprecipitación de las nanopartículas de magnetita, Fe_3O_4 :



Para el desarrollo de la ecuación iónica neta de la reacción de coprecipitación de las nanopartículas de magnetita Fe_3O_4 vea el anexo A.

4.1.1 – Estudio previo

El material esperado para la síntesis realizada por el protocolo de coprecipitación reportado en la literatura (Bayat et al., 2014) era la magnetita Fe_3O_4 , sin embargo el material final presentó el conjunto de planos característicos de la fase maghemita $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, con estructura cristalina tetragonal y grupo espacial P4_32_12 (No. 96) (Ficha: 01-089-5894). La caracterización por difracción de rayos X se observa en la figura 17.

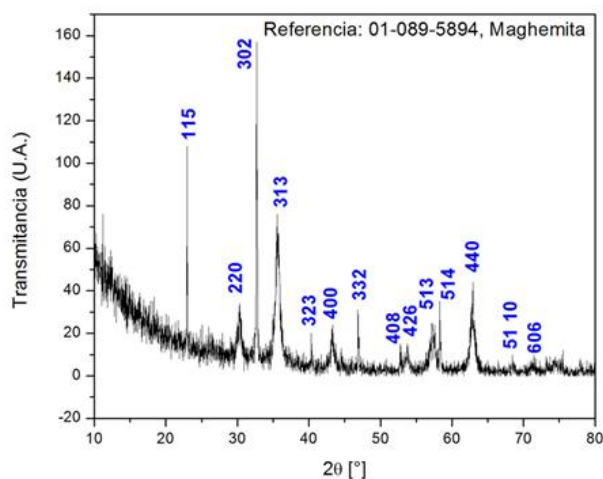


Figura 17 Difractograma de rayos X para las nanopartículas de maghemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

La figura 18a muestra la imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido SEM para las NPM de maghemita. La espectroscopia de fluorescencia de rayos X, EDS se observa en la figura 18b.

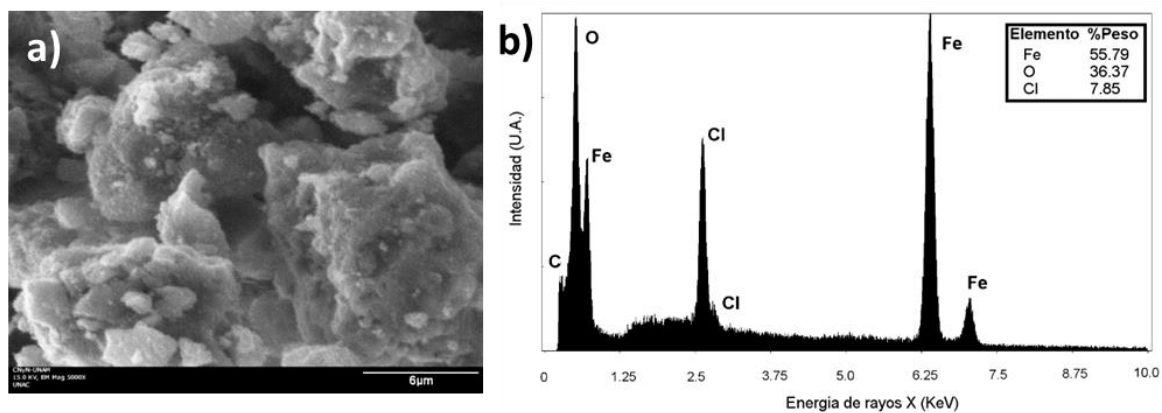


Figura 18 a) Microscopía electrónica de barrido a una magnificación de 5000X y **b)** espectroscopia de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva para las nanopartículas de maghemita, $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$.

Debido a la distribución no uniforme de tamaños y morfologías de las NPM, así como la oxidación de su superficie, se continuó con la segunda parte del protocolo (Bayat et al., 2014), para la síntesis de NPMNC de magnetita recubiertas de sílice. El difractograma de la caracterización por difracción de rayos X para las NPMNC se observa en la figura 19, en donde se observó un patrón para una estructura cristalina cubica, con grupo espacial Fd-3m (No. 227) (Ficha: 00-019-0629), característico del óxido de hierro de fase magnetita (Fe_3O_4). Para el análisis del tamaño de cristalito se utilizó la ecuación de Scherrer, *Ec. (5)*, y se obtuvo un tamaño de cristal de 15.83 nm. Cabe mencionar que este valor, al depender de factores como la constante K , pueden presentar hasta un 20% de incertidumbre en la precisión del cálculo (Alexander & Klug, 1950). Por último, la microscopia SEM de la figura 20a muestra aglomeraciones y la espectroscopia EDS de las NPMNC de la figura 20b, muestra un producto final con contaminaciones de cloro.

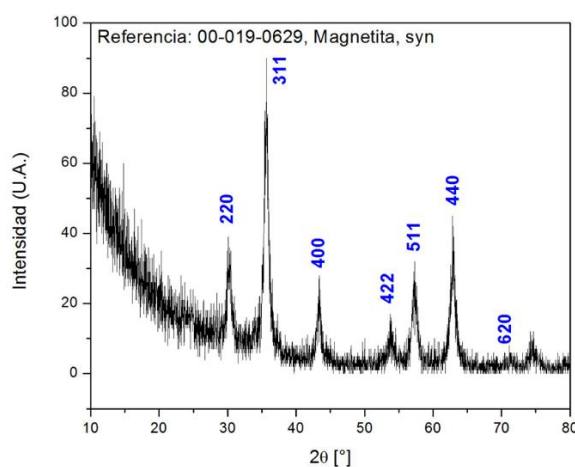


Figura 19 Difractograma de rayos X para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$.

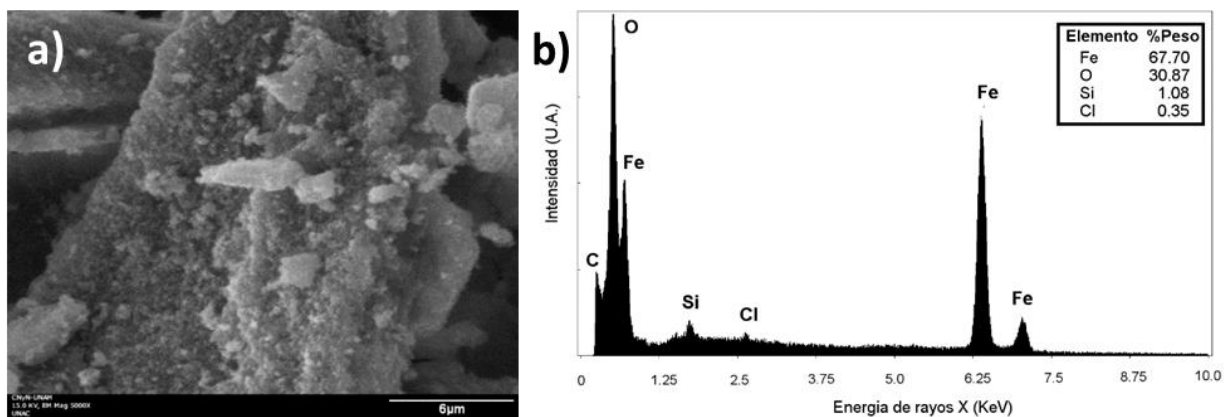


Figura 20 a) Microscopia electrónica de barrido a una magnificación de 5000X y **b)** espectroscopia de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$.

4.1.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$)

Para lograr la síntesis correcta de las NPMNC de magnetita con recubrimiento de sílice, se sintetizaron primeramente NPM a partir de Bayat et al., 2014, método que consta en la precipitación química de la solución de sales de hierro en un medio alcalino, para después hacer uso de estabilizantes químicos como el boruro de cetiltrimetilamonio (CTAB), para el recubrimiento mediante el protocolo de síntesis sol-gel establecido por Chen, 2013. Una vez recubiertas las NPMN+CTAB, se secaron al vacío a una temperatura de 45°C por un tiempo 24 horas y después se realizaron los respectivos análisis de caracterización morfológica y estructural. Para los rendimientos de síntesis, el cálculo teórico mediante la definición del reactivo limitante fue de 0.44 g (para la magnetita sin recubrimiento), mientras que el rendimiento en la práctica fue de 0.469 g (para la magnetita recubierta).

4.1.2.1 – Caracterización XRD de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$

La caracterización por difracción de rayos X para las NPMNC de magnetita utilizando CTAB como surfactante, se puede observar en la figura 21. De la misma manera que para las NPMNC de magnetita, las NPMNC de magnetita + CTAB arrojaron un difractograma donde se observa un patrón de difracción característico para un compuesto de óxido de hierro con una estructura cristalina cubica y un grupo espacial Fd-3m (No. 227) (Ficha: 00-019-0629). Esto confirma la formación de magnetita mediante coprecipitación química. El ruido en la señal a ángulos bajos se debe a la fluorescencia del hierro. Después de un análisis de tamaño de cristalito utilizando la ecuación de Scherrer se obtuvo un tamaño de cristal de 13.85 nm. Cabe recordar que este valor puede tener hasta un 20% de incertidumbre en la precisión.

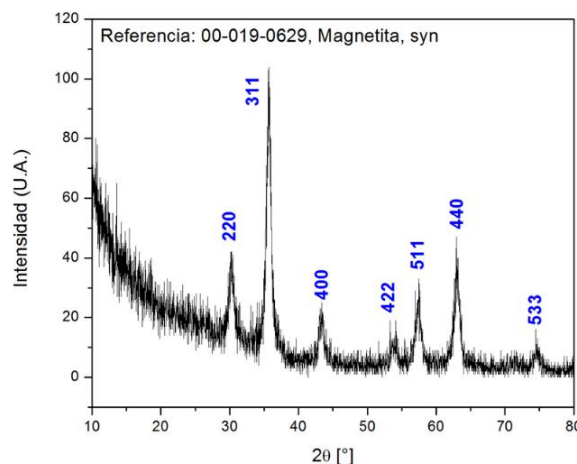


Figura 21 Difractograma de rayos X para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$.

4.1.2.2 – Caracterización FTIR de Ácido Cítrico y CTAB

Para continuar con el análisis de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de las NPMNC de magnetita + CTAB, se hizo primeramente el análisis de espectroscopia infrarroja para el estabilizante monomérico puro y para el surfactante utilizado (el ácido cítrico y el CTAB). De esta manera se pudieron describir las características de los enlaces de los componentes presentes en cada etapa de la reacción de síntesis de las NPMNC de magnetita + CTAB. La figura 22 muestra los espectros FTIR de estos dos compuestos en su estado puro.

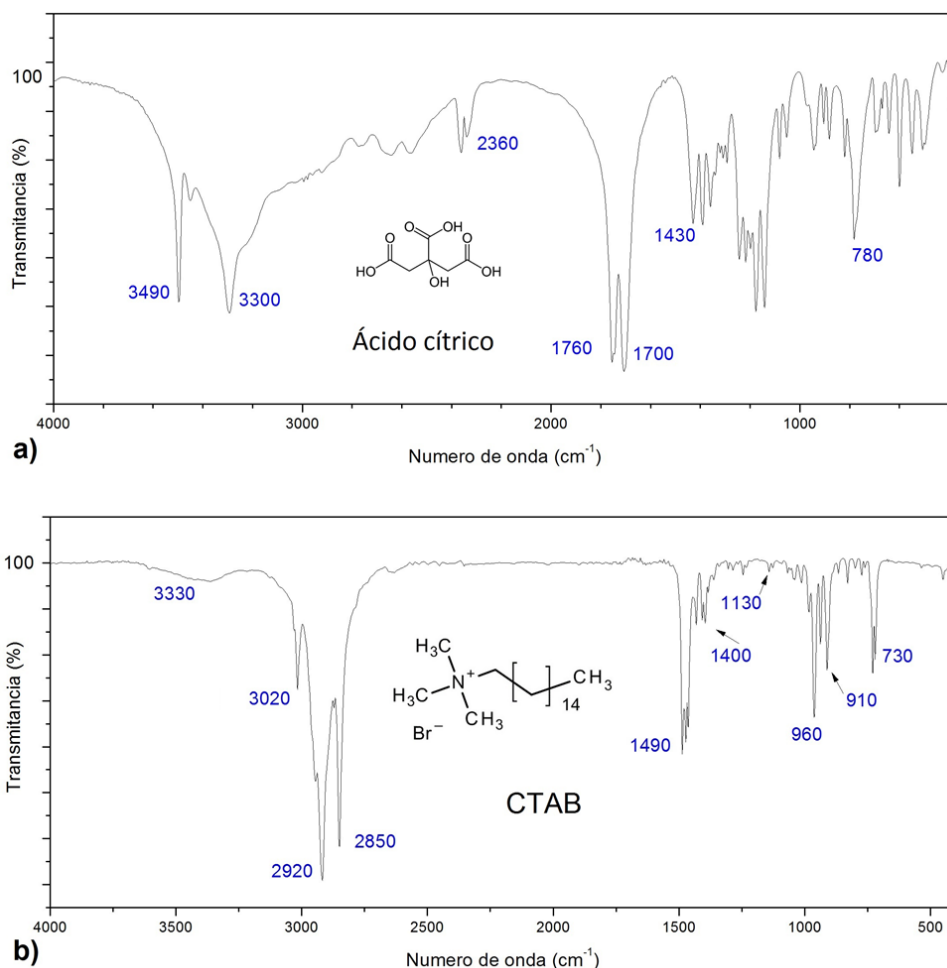


Figura 22 Espectro FTIR para **a)** una muestra del ácido cítrico y **b)** una muestra de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB).

4.1.2.3 – Caracterización FTIR de nanopartículas núcleo-coraza de Fe₃O₄@SiO₂+CTAB

El análisis de espectroscopia infrarroja de las NPMNC de magnetita + CTAB se observa en la figura 23. Este análisis se realizó para cada etapa del proceso de estabilización y recubrimiento de la NPM, desde el

proceso de síntesis de la NPM, hasta la etapa final del proceso de reflujo químico, en donde el exceso de surfactante CTAB es removido. Como resultado se pretende obtener información relevante para cada etapa del proceso, que permita diferenciar el tipo de material sintetizado mediante el método de dispersión y estabilización, a diferencia de otros métodos, lo cual se planteará en las discusiones.

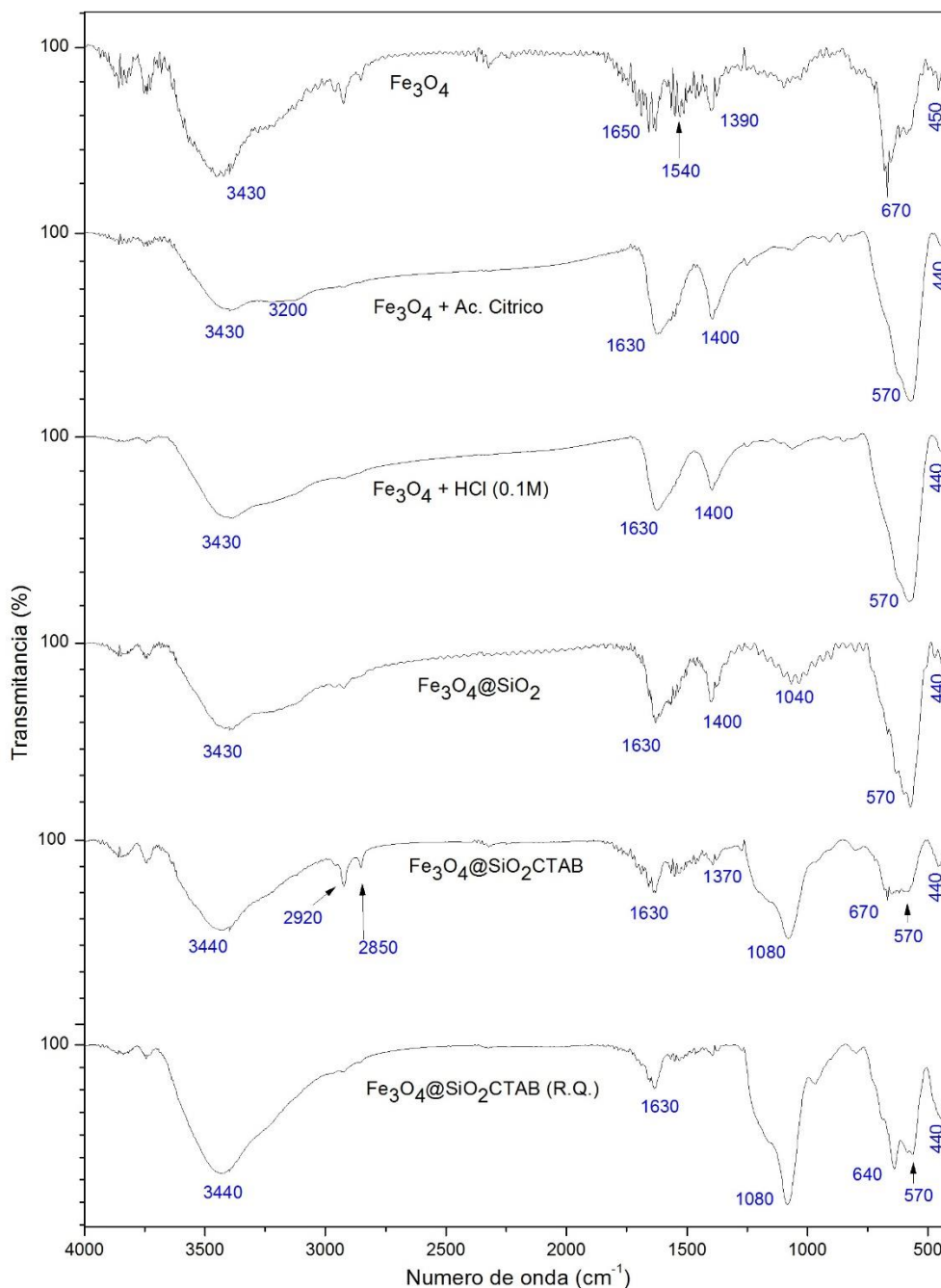


Figura 23 Espectros de absorción de luz infrarroja para las etapas del proceso de síntesis de las nanopartículas magnéticas núcleo-coraza de magnetita + CTAB, Fe₃O₄@SiO₂+CTAB. Cada etapa del proceso de estabilización y recubrimiento arrojó una absorción característica para el comportamiento de los diferentes tipos de enlaces presentes en los grupos funcionales unidos a los compuestos químicos.

4.1.2.4 – Caracterización SEM y EDS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$

La microscopía electrónica de barrido se observa en la figura 24a. De igual manera la espectroscopia de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía que se observa en la figura 24b.

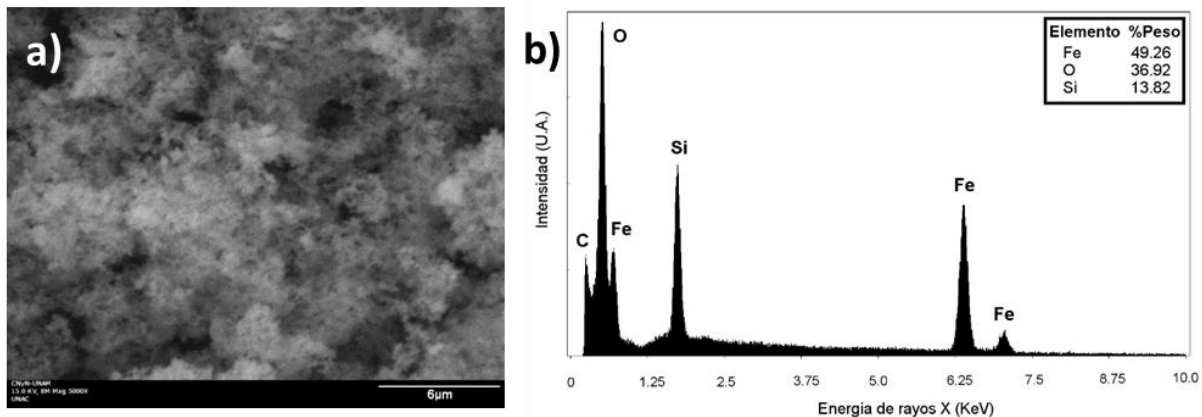


Figura 24 a) Microscopía electrónica de barrido a una magnificación de 5000X y **b)** espectroscopia de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita, $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$.

4.1.2.5 – Caracterización XPS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$

La espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X muestra un espectro XPS para los elementos presentes en las NPMNC, con energías de enlace correspondientes a los estados químicos y a la estructura electrónica de cada elemento. La figura 25a muestra el espectro XPS con energías de enlace de 0 a 13000 eV, así como en la figura 25b se muestra la ventana de energía emitida para el elemento de hierro.

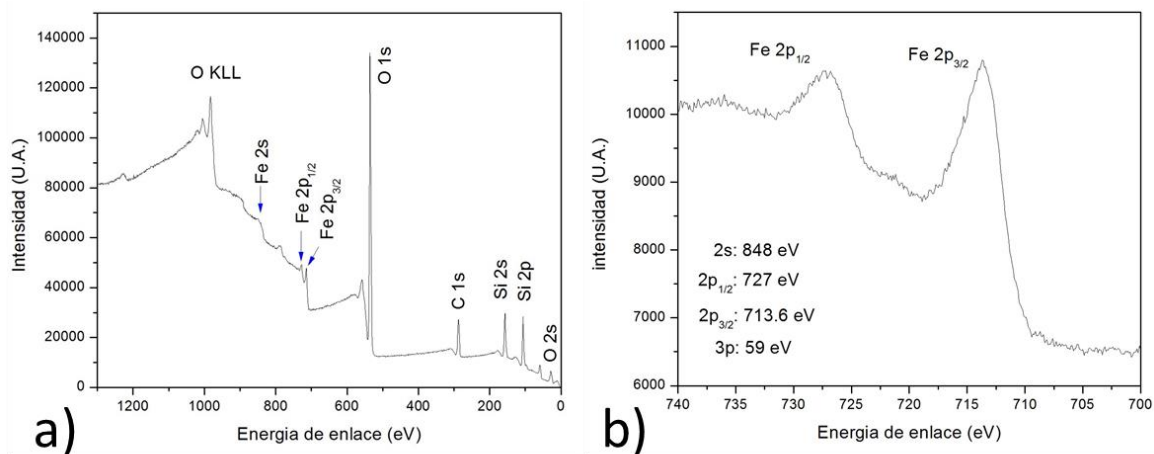


Figura 25 XPS generado a partir de emisión de rayos X de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$. En **a)** se muestra el espectro general y en **b)** se muestra la ventana de energías de enlace para la fotoemisión del hierro.

4.1.2.6 – Caracterización TEM de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$

La microscopía electrónica de transmisión para las NPMNC de magnetita + CTAB muestra imágenes de alta resolución para nanopartículas con tamaños que oscilan entre los 10 y los 15 nm de diámetro, las cuales se pueden observar en las micrografías a diferentes ampliaciones de la figura 26.

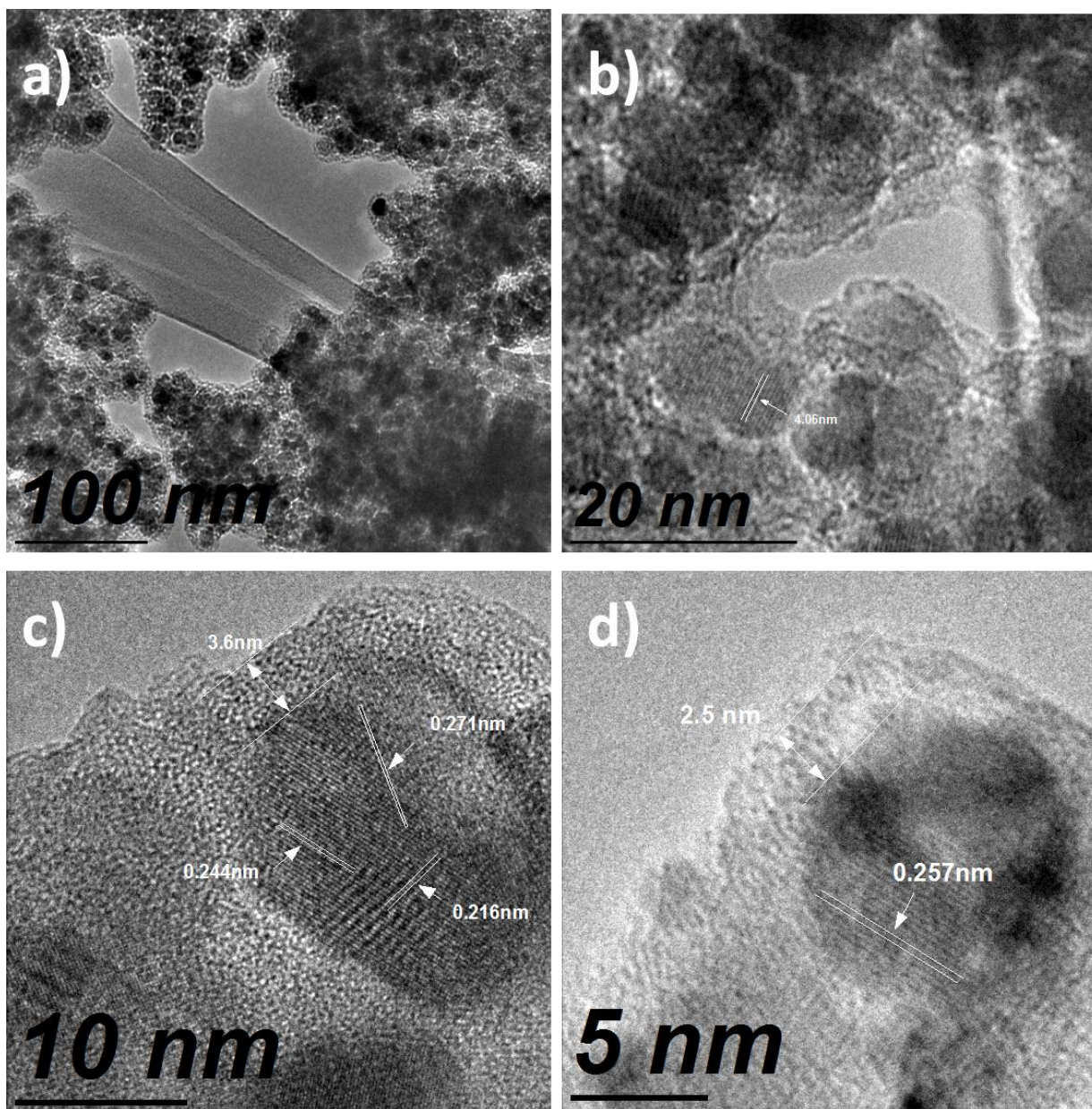


Figura 26 Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión para las nanopartículas núcleo-coraza de magnetita + CTAB, $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2+CTAB$, presentan tamaños de partícula de 10 a 15 nm. En la imagen **b)**, **c)** y **d)** se pueden observar las diferentes distancias interplanares para el núcleo de una partícula, los cuales coinciden con los espaciamentos interplanares reportados para la magnetita y para la sílice cristalina. De igual manera se observan recubrimientos de sílice de 2.5 a 3.6 nm de espesor.

4.1.2.7 – Distribución de tamaños de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$

Los histogramas de los tamaños de nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$ se observan en la figura 27, tanto como para las partículas sin sinterizar como para las partículas sinterizadas, las cuales muestran en conjunto un rango de tamaños que oscilan entre 10 y 20 nm.

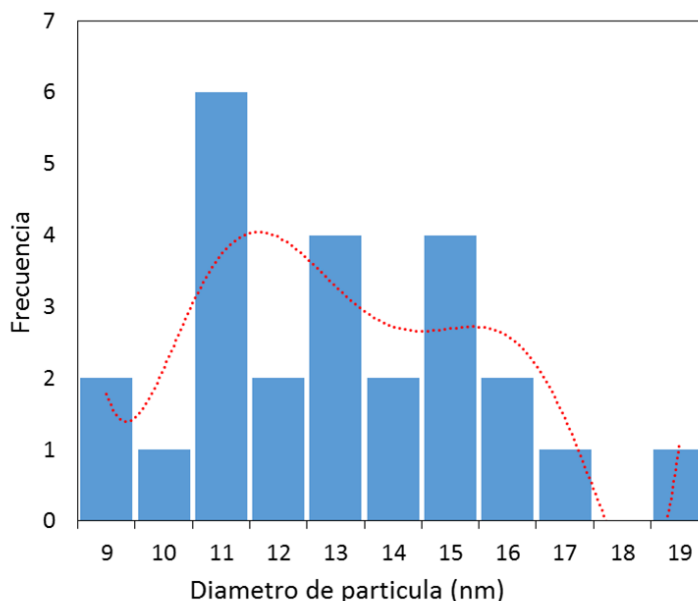
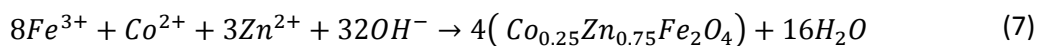


Figura 27 Histograma de la distribución de tamaños para los diámetros de partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$.

4.2 – Síntesis de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$)

A continuación, se describe la ecuación química de la reacción de coprecipitación para la ferrita de cobalto zinc, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$:



Para el desarrollo de la *ecuación iónica neta* y un análisis de las etapas de la reacción de coprecipitación química de las nanopartículas de ferrita de cobalto zinc, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$, vea el anexo B.

4.2.1 – Estudio previo

Para la síntesis de las NPM de ferrita de cobalto zinc se siguió un protocolo de coprecipitación reportado por López et al., 2012, con las modificaciones necesarias para obtener como resultado nanopartículas con características superparamagnéticas. La caracterización por difracción de rayos X para la síntesis de NPM de ferrita de cobalto zinc se observa en la figura 28. Tras hacer un análisis del tamaño de cristal con la ecuación de Scherrer, se obtuvieron los tamaños de 31.73 y 49.35 nm, para las NPM de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ sin sinterizar y sinterizadas a 600°C respectivamente. Como ya se mencionó, este cálculo representa un 20% de incertidumbre en su precisión, al depender de factores como la constante K de forma de partícula, por lo que se suele utilizar un valor de $K = 1$ como convención para la reducción del valor de incertidumbre (Alexander & Klug, 1950). Otro factor que influye en la precisión del cálculo del tamaño de cristal es debido al ensanchamiento β de los picos de difracción, el cual es inversamente proporcional al diámetro como se observa en la ecuación (5). Los picos de difracción derivan de la contribución en grupo sobre todos los átomos del cristal. En cristales ideales la suma es sobre un número “infinito” de átomos, lo que genera una señal de longitud de onda espectral estrecha. A diferencia de los materiales en la macroescala, las nanopartículas tienen menos átomos, por lo tanto la suma de red no es capaz de converger en una línea de difracción estrecha, tendiendo mostrar un ensanchamiento (Cullity, 1956). De esta manera el ancho del pico de difracción es un indicador del tamaño de cristal de la nanopartícula. La caracterización por espectroscopia infrarroja de las NPM de ferrita de cobalto zinc se observa en la figura 29.

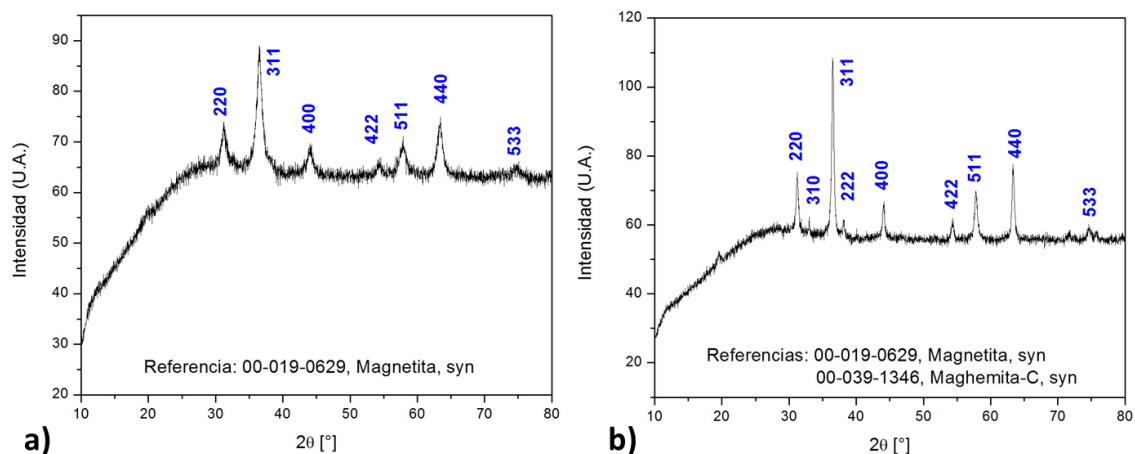


Figura 28 Difractograma de rayos X para las nanopartículas de ferrita de cobalto zinc $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$, **a)** sin sinterizar y **b)** sinterizadas a una temperatura de 600°C por un tiempo de 10 horas.

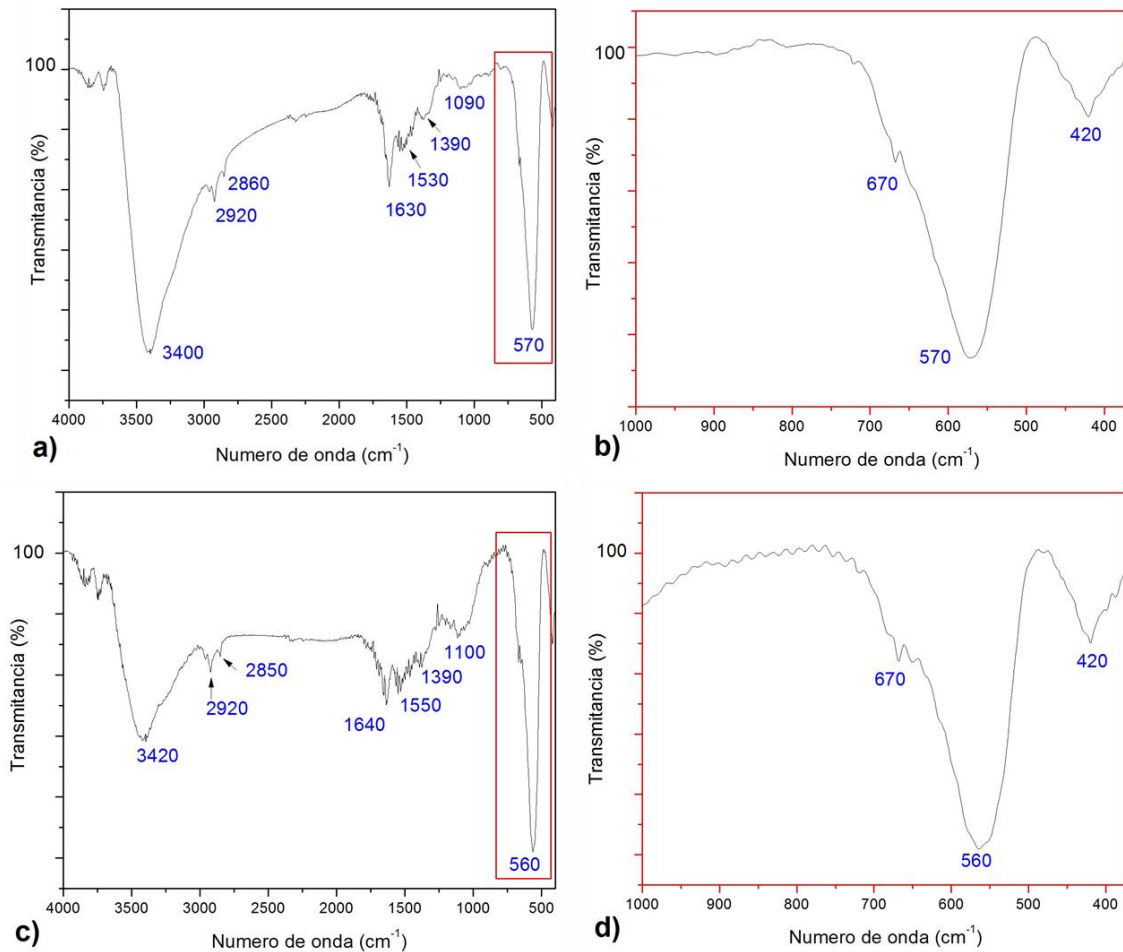


Figura 29 Espectro de absorción de luz infrarroja de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc **a)** y **b)** sin sinterización, y **c)** y **d)** sinterizadas a una temperatura de 600°C por un tiempo de 10 horas. Las imágenes **b)** y **d)** son ampliaciones respectivas del espectro de absorción dentro del rango de 1000 a 370 cm⁻¹.

Mediante microscopía SEM de las NPM de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ con y sin sinterización, se observó una variedad de tamaños y morfologías no uniformes, mientras que para la espectroscopia de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva, se observaron valores de energías de enlace característicos de los elementos de la muestra (6.396 keV para el Fe, 6.924 KeV para el Co y 8.630 KeV) (Bruker, 2015), con valores para los porcentajes en peso proporcionales a las cantidades utilizadas en la síntesis de NPMNC. Se prosiguió con la síntesis de las NPMNC de ferrita de cobalto zinc recubiertas con sílice, para lo cual se siguió el mismo protocolo para el recubrimiento de nanopartículas reportado por Bayat et al., 2014. La microscopía SEM de las NPMNC de ferrita de cobalto-zinc mostró morfología no uniforme para las NPMNC, inclusive en la espectroscopia EDS para este sistema sintetizado se encontró una contaminación de cloro. Por lo tanto se continuó a generar el recubrimiento apropiado mediante surfactantes y estabilizantes.

4.2.2 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$)

Para la síntesis de las NPMNC de ferrita de cobalto-zinc con recubrimiento de sílice, estabilizadas por un surfactante catiónico (CTAB), se adaptaron los protocolos establecido por Chen, 2013 y por López et al., 2012. Las nanopartículas recubiertas se llevaron a secado al vacío a una temperatura de 45°C por un tiempo de 24 horas. Posterior a esto se hizo una calcinación de una fracción del rendimiento total de las nanopartículas recubiertas a una temperatura de 600°C, para de igual manera, realizar los respectivos análisis de caracterización morfológica y estructural, tanto de la fracción sin sinterizar como de la fracción sinterizada. Para los rendimientos de síntesis, el cálculo teórico mediante la determinación del reactivo limitante resulto en un peso de 0.44 g para el núcleo sin recubrimiento, mientras que el rendimiento en la práctica fue de 0.544 g para la partícula núcleo coraza sintetizada.

4.2.2.1 – Caracterización XRD de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$

La caracterización por difracción de rayos X para las NPMNC de ferrita de cobalto-zinc utilizando CTAB como surfactante se puede observar en la figura 30. El patrón describe un compuesto de óxido de hierro con estructura cristalina cubica y grupo espacial Fd-3m (No. 227) (Ficha: 00-019-0629), el mismo que aparece después de sinterizar la muestra. El cálculo de tamaño de cristal con la ecuación de Scherrer arrojó tamaños de 18.44 y 12.3 nm de manera respectiva para las NPMNC+CTAB sintetizadas.

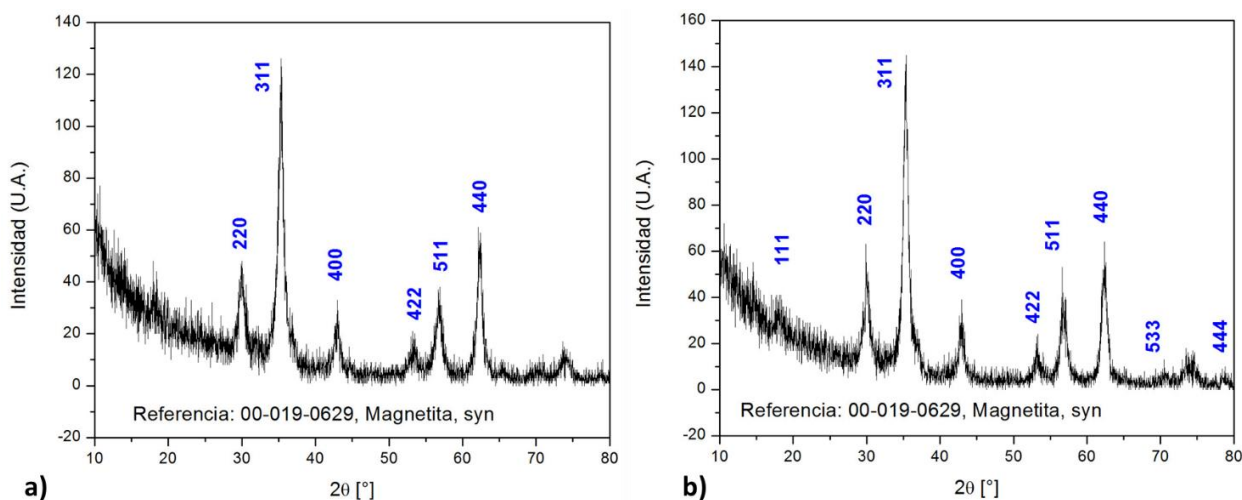


Figura 30 Difractograma de rayos X para las nanopartículas núcleo-coraza $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$ con un proceso de síntesis **a)** sin sinterización y **b)** con sinterización a una temperatura de 600°C por un tiempo de 10 horas.

En forma de comparar los patrones de difracción obtenidos para la magnetita y la ferrita de cobalto zinc, la figura 31 muestra una comparación de los difractogramas obtenidos para ambos sistemas, en donde se observa un corrimiento del patrón de difracción para las NPMNC de ferrita de cobalto zinc, debido al reacomodo de átomos de zinc en su red atómica. Esto se puede observar al comparar con una línea recta vertical el pico de intensidad máxima [311], el cual se encuentra a una posición 2θ de 35.68 para las NPMNC de magnetita, mientras que para la ferrita de cobalto zinc sin sinterizar se encuentra a 35.32° y para la ferrita de cobalto zinc sinterizada se encuentra a 35.31°. Por lo tanto, mientras que para los dos diferentes sistemas de NPMNC (magnetita y ferrita de cobalto zinc) hay un corrimiento de 0.36°, se observa que para la ferrita de cobalto zinc sin sinterizar y sinterizada no hay un corrimiento notorio.

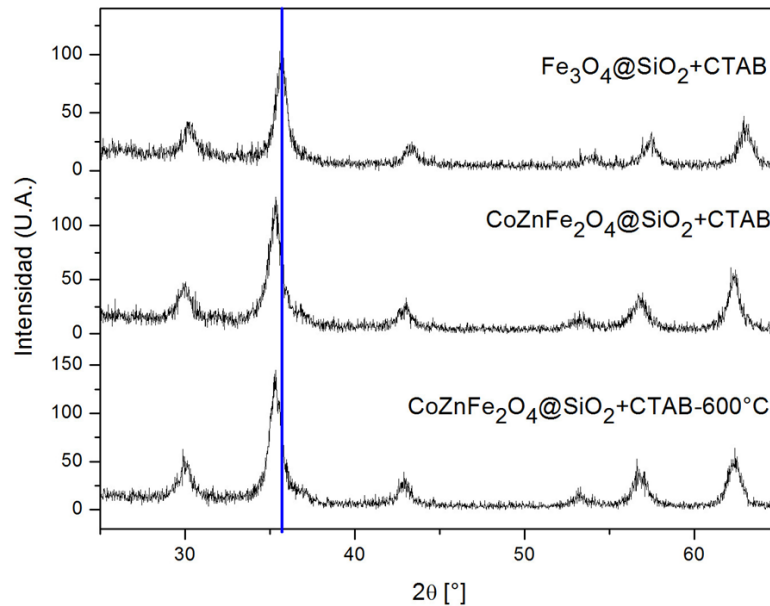


Figura 31 Corrimiento del patrón de difracción de XRD para las NPMNC+CTAB sintetizadas.

4.2.2.2 – Caracterización FTIR de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@SiO_2+CTAB$

El análisis para la espectroscopia infrarroja para las nanopartículas $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@SiO_2+CTAB$ se muestra en la figura 32. Los resultados de este análisis son similares a los presentados para el sistema $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$, en donde se demuestra que la adición de CTAB al proceso de síntesis de la coraza de SiO_2 , incrementa la señal Si-O a 1070 cm^{-1} . Además de estas señales también se pueden describir las otras componentes del espectro las cuales son la presencia de vibraciones de tensión de enlaces O–H a frecuencias entre los 3600 y 3200 cm^{-1} , así como las vibraciones de deformación de O–H a frecuencias de 1630 cm^{-1} , atribuidas a la presencia de grupos hidroxilo (-OH), o a moléculas de agua, en coordinación con la superficie insaturada de átomos de hierro. También se pueden observar las vibraciones de tensión del enlace C–O (para el anión $\text{CO}_3=$) a la frecuencia de 1400 cm^{-1} a causa de la presencia de CO_2 atmosférico en la muestra (Iyengar et al., 2014).

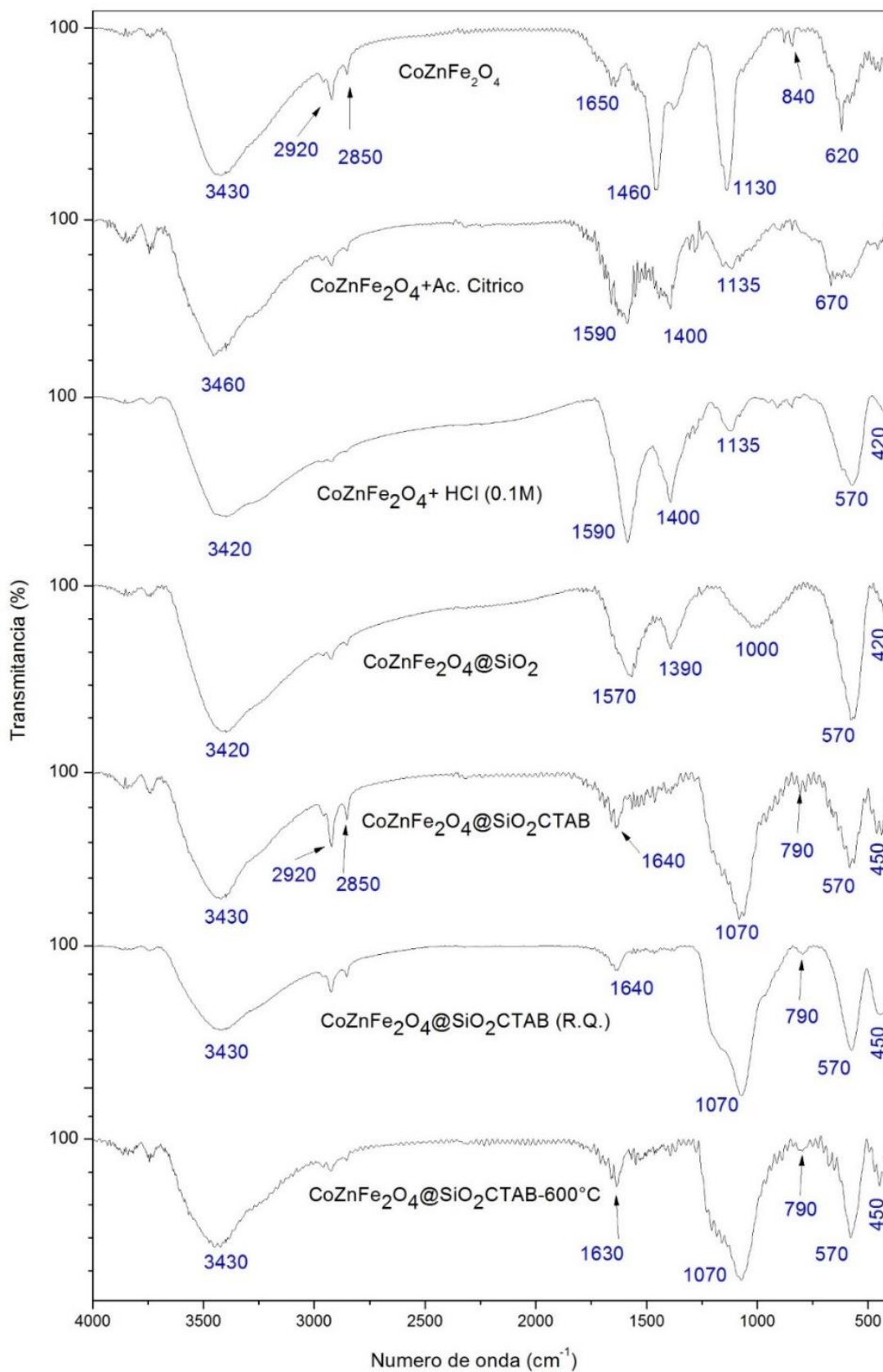


Figura 32 Espectro de absorción de luz infrarroja para las distintas etapas del proceso de estabilización y recubrimiento de las nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto zinc + CTAB, Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄@SiO₂+CTAB.

4.2.2.3 – Caracterización SEM y EDS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$

La microscopía electrónica de barrido de las NPMNC se observa en la figura 33a. La espectroscopia de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva mostró el espectro de dispersión que se observa en la figura 33b, con los respectivos valores de porcentaje de peso de los elementos presentes. De igual manera en las figuras 33c y 33d se observan las caracterizaciones de las muestras sinterizadas. Cabe mencionar que después del proceso de sinterización los valores de energías de enlace para la muestra se mantuvieron iguales, sin embargo los porcentajes de peso presente cambiaron al grado de perder la estequiometría del sistema, lo cual pudo deberse a un error de medición en el equipo.

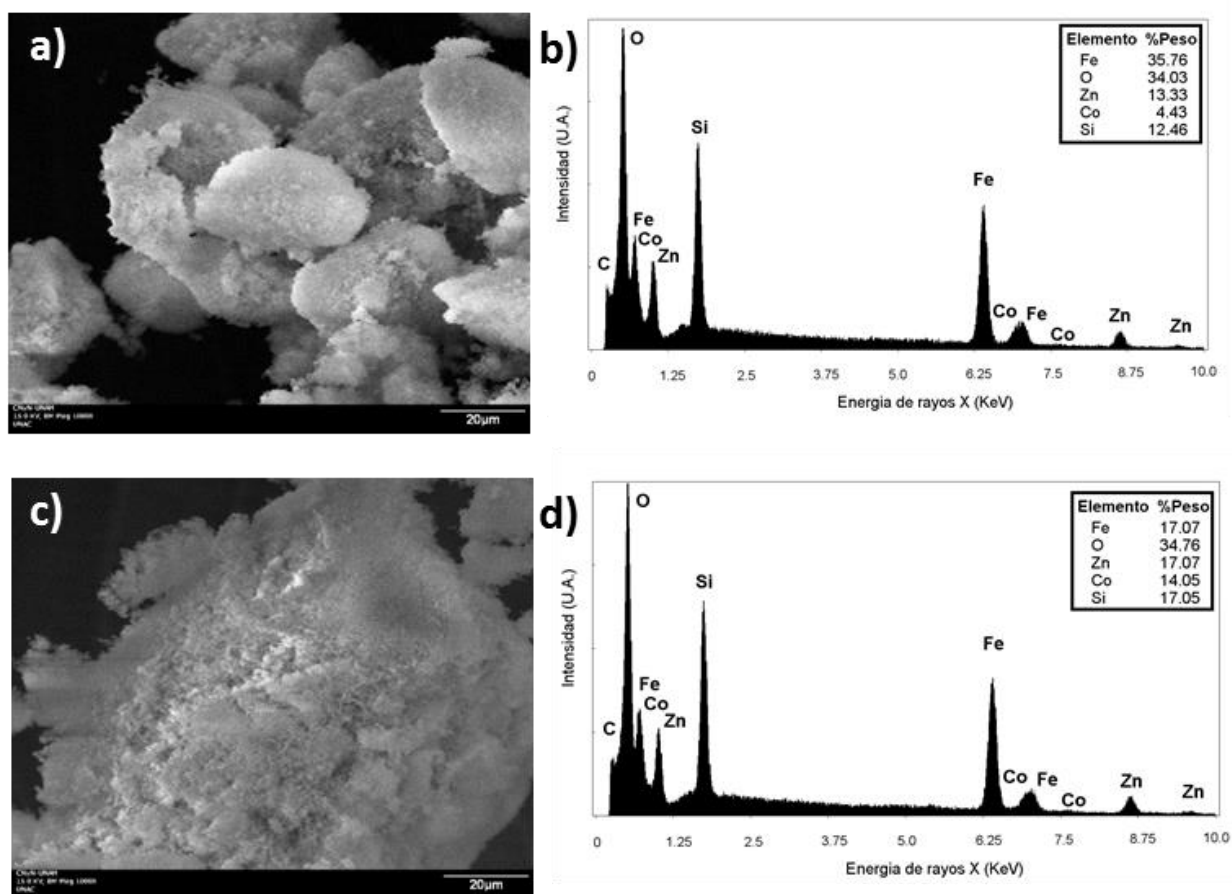


Figura 33 Imágenes SEM y espectro EDS para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$ antes del proceso de sinterización a) y b), y después del proceso de sinterización c) y d).

4.2.2.4 – Caracterización XPS de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$

La espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X muestra un espectro XPS para los elementos presentes en las NPMNC, con energías de enlace correspondientes a estados químicos y a la estructura química de cada elemento. La figura 34a muestra el espectro XPS resultante, así como las ventanas de energía emitidas por los elementos que componen la ferrita de cobalto zinc, se muestran en las figuras 34b, 34b y 34c.

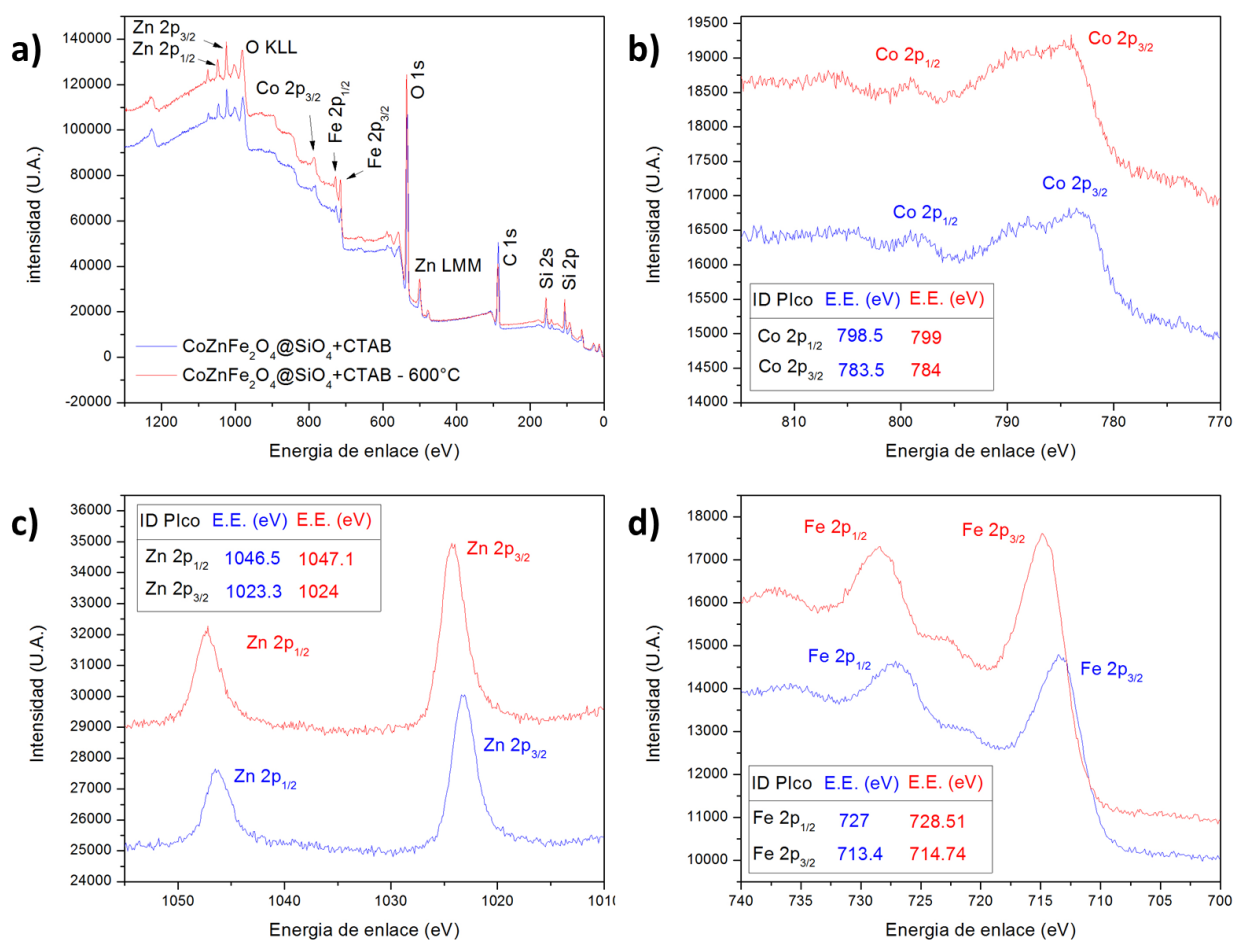


Figura 34 XPS generado a partir de emisión de rayos X de nanopartículas núcleo-coraza de fórmula química $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$. En **a)** se muestra el espectro general mientras que en **b)**, **c)**, y **d)** se muestran solo las ventanas de energías para el cobalto, zinc y hierro, respectivamente. En color azul se muestran los valores para la muestra no sinterizada y en color rojo los valores para las muestras con sinterización.

4.2.2.5 – Caracterización TEM de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$

La microscopía electrónica de transmisión para las NPMNC de ferrita de cobalto zinc mas CTAB, sin sinterizar y sinterizadas a 600°C, se muestran en la figura 35 y 36 respectivamente, las cuales muestran imágenes de NPMNC de ferrita de cobalto zinc con tamaños aproximados de 10 a 20 nm de diámetro con recubrimientos de aproximadamente 1.2 nm de grosor.

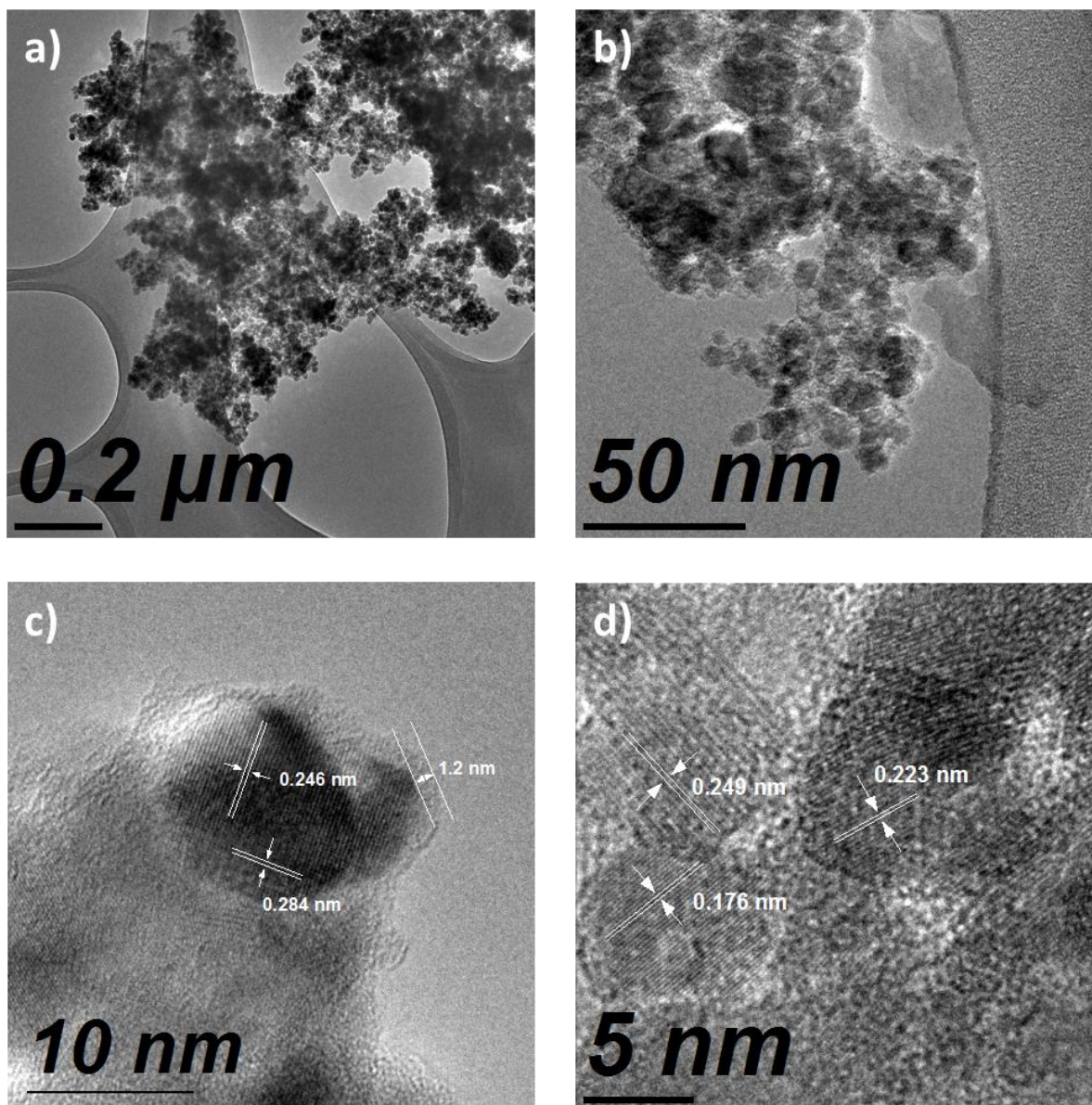


Figura 35 Imágenes de microscopías electrónicas por transmisión para las nanopartículas núcleo-coraza $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$, sin sinterizar. En ellas se observan partículas con tamaños de 10 a 20 nm de diámetro. Las imágenes **c)** y **d)** muestran diferentes distancias interplanares de la NPMNC.

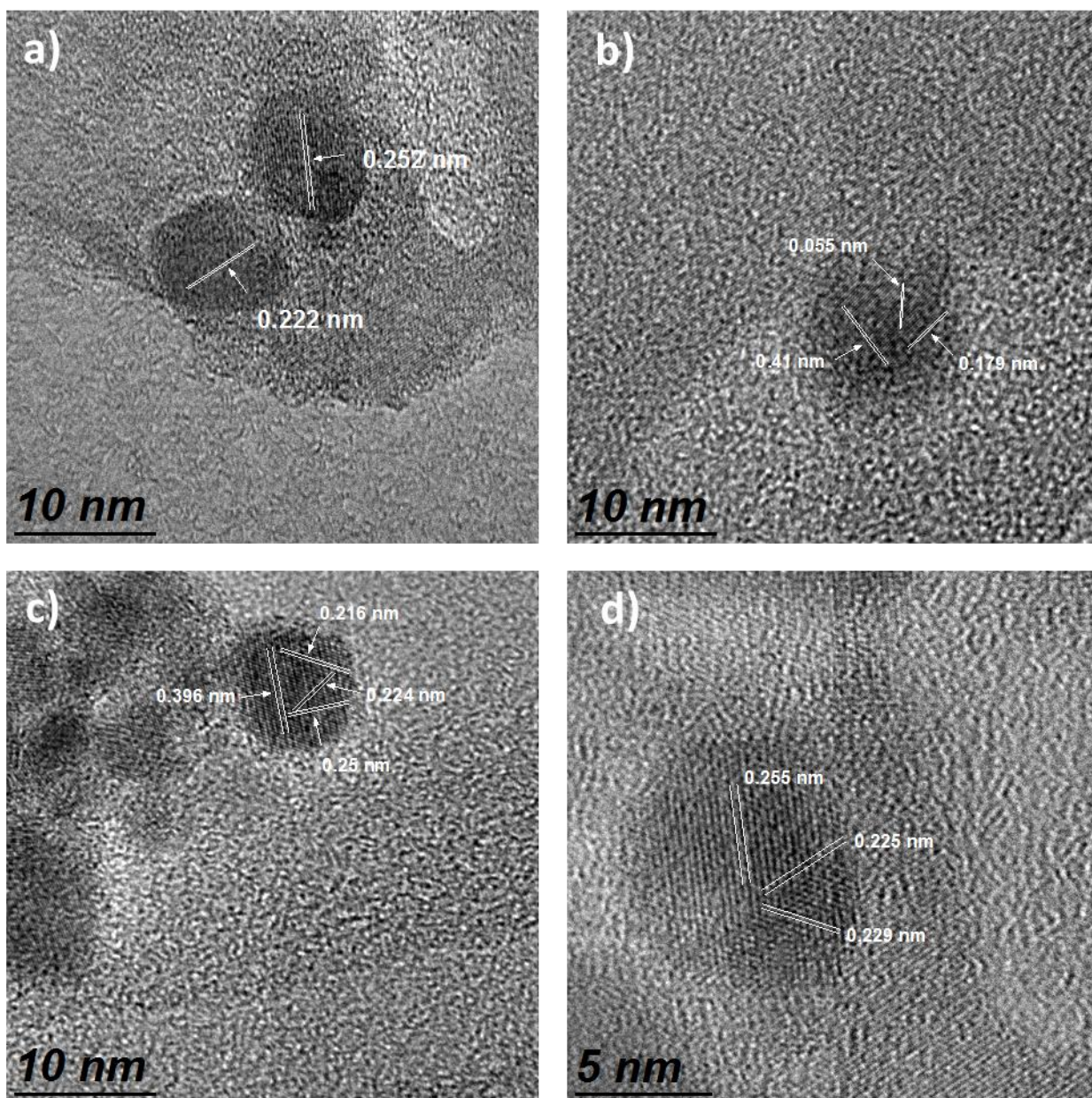


Figura 36 Imágenes de microscopía electrónica de transmisión para las nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$, sinterizadas a una temperatura de 600°C . En ellas se observan partículas con tamaños de 10 nm de diámetro y distancias interplanares de 0.25 nm de longitud en promedio.

4.2.2.6 – Distribución de tamaños de nanopartículas núcleo-coraza de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$

Los histogramas de los tamaños de nanopartículas de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@ \text{SiO}_2 + \text{CTAB}$ se observan en la figura 37, tanto como para las partículas sin sinterizar como para las partículas sinterizadas, las cuales muestran en conjunto un rango de tamaños que oscilan entre 5 y 20 nm.

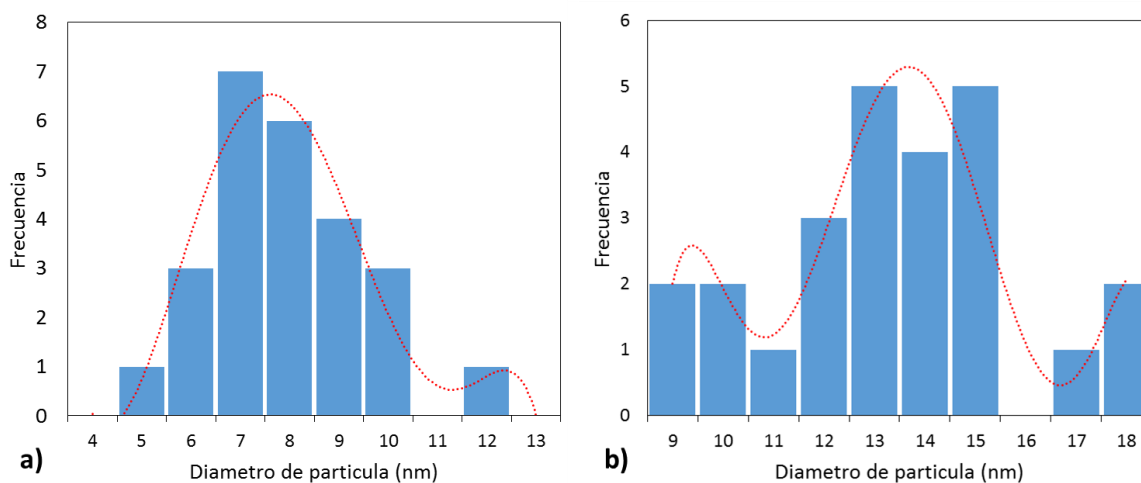


Figura 37 Histogramas de la distribución del tamaño del diámetro de nanopartícula de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$ **a)** sin sintetizar y **b)** sintetizadas.

4.3 – Dispersión de nanopartículas núcleo-coraza en medio acuoso

Para el análisis de la dispersión de los sistemas sintetizados en un medio acuoso, se tomó una cantidad aproximada de 20 mg de cada uno de los tres sistemas de NPMNC+CTAB sintetizados, estos son: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$, $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$ y $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ los cuales se suspendieron en 15 ml de H_2O desionizada respectivamente. Cabe mencionar que los sistemas que se sintetizaron sin surfactantes no presentaron buena dispersión en medio acuoso, por lo tanto no se reportaron sus resultados de dispersión. Las muestras fueron dispersadas y recapturadas mediante la exposición a un campo magnético externo durante un tiempo de 1 minuto. La figura 38 muestra la dispersión y recuperación magnética de las NPMNC+CTAB en un medio de agua destilada.

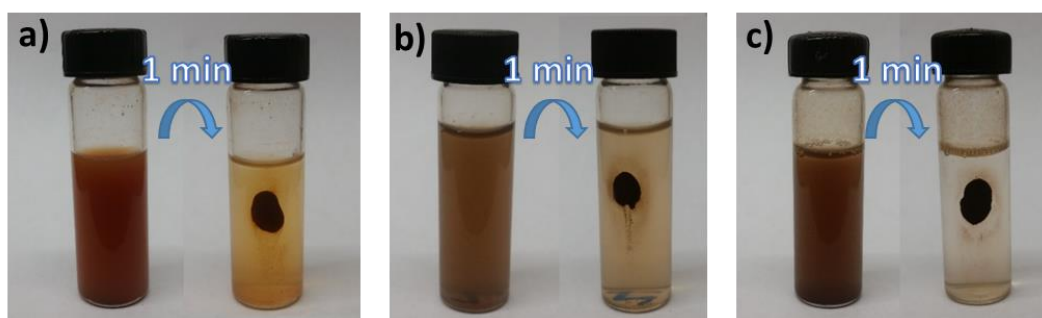


Figura 38 Imágenes de dispersiones y recuperación magnética en un tiempo de 1 minuto para las nanopartículas de **a)** $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$, **b)** $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$, y **c)** $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$ sintetizadas a 600°C .

4.4 – Cuantificación de extracción de ácidos nucleicos por espectroscopia UV

Los análisis por espectrofotometría de luz ultravioleta de las muestras de las extracciones de ácidos nucleicos mostraron diferentes valores de absorción de luz ultravioleta, los cuales se pueden representar como una concentración y/o una pureza, para las extracciones de ácidos nucleicos analizadas. Cabe mencionar que el proceso de extracción se elaboró por duplicado para cada tipo de NPM sintetizada. En la tabla 4 se observan los promedios de los valores de absorción de las 14 muestras de ácidos nucleicos extraídos.

Tabla 4 Absorbancias, purezas y concentraciones de extracción mediante absorción ultravioleta para las 14 muestras de ácidos nucleicos extraídos por los distintos métodos. Cada método de extracción se realizó por duplicado. Para las extracciones de ácidos nucleicos realizadas por sistemas sintetizados con surfactantes, se realizó una segunda lectura, para cada muestra y su respectivo duplicado, para corroborar la fiabilidad de la lectura.

		Lecturas de absorción ultravioleta					
		Promedio 1era Lectura			Promedio 2da Lectura		
Muestra	Nombre del metodo de extracción	Abs 260 nm	Pureza	[ng/μl]	Abs 260 nm	Pureza	[ng/μl]
1	Fago λ (ADN comercial)	0.564	1.740	28.200			
2	Extrac. Cloroformo	7.045	2.125	351.950			
3	Fe ₃ O ₄	2.308	1.505	115.400			
4	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	1.662	1.785	83.150			
5	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ + CTAB (c/B.U.)	1.585	1.640	79.250	1.837	1.645	91.850
6	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ + CTAB (s/B.U.)	2.144	1.550	107.200	1.858	1.645	92.900
7	CoZnFe ₂ O ₄	1.185	1.770	59.200			
8	CoZnFe ₂ O ₄ /600°C	0.429	2.340	21.450			
9	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂	1.260	1.730	63.150			
10	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ /600°C	0.806	1.890	40.250			
11	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ + CTAB (c/B.U.)	0.884	1.930	44.150	1.054	1.830	52.700
12	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ + CTAB (s/B.U.)	0.885	2.095	44.250	1.243	1.955	62.150
13	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ + CTAB/600°C (c/B.U.)	0.912	1.920	45.600	0.934	1.880	46.700
14	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ + CTAB/600°C (s/B.U.)	1.110	1.915	55.450	1.410	1.835	70.500

A continuación, en la tabla 5 se muestran los valores de la media y desviaciones estándar calculados únicamente para las lecturas de extracción de ácidos nucleicos realizadas a partir de los sistemas de NPMNC+CTAB, debido a su buena dispersión en medios acuosos y altos rendimientos de extracción.

Tabla 5 Valores medios y desviaciones estándar para los valores de absorción, pureza y concentraciones de extracción de los ácidos nucleicos extraídos a partir de los sistemas de NPMNC+CTAB. Cada cálculo está basado en el promedio de los 4 distintos valores recolectados de la cuantificación de extracción de la tabla 4.

		Promedios de aborciones					
		Abs 260 nm		Pureza		[ng/ μ l]	
Muestra	Muestras con CTAB	Media	D. E.	Media	D.E.	Media	D.E.
5	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ - CTAB (c/B.U.)	1.711	0.341	1.643	0.026	85.550	17.078
6	Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ - CTAB (s/B.U.)	2.001	0.796	1.598	0.062	100.050	39.851
11	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ - CTAB (c/B.U.)	0.969	0.159	1.880	0.107	48.425	7.952
12	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ - CTAB (s/B.U.)	1.064	0.291	2.025	0.160	53.200	14.546
13	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ - CTAB/600°C (c/B.U.)	0.923	0.221	1.900	0.094	46.150	11.025
14	CoZnFe ₂ O ₄ @SiO ₂ - CTAB/600°C (s/B.U.)	1.260	0.156	1.875	0.193	62.975	7.814

4.5 – Electroforesis en gel agarosa para extracciones de ácidos nucleicos

En la figura 39 se observan las bandas correspondientes al material genético extraído mediante la metodología tradicional con cloroformo y con las diferentes nanopartículas magnéticas sintetizadas en este trabajo de tesis. Los números corresponden al orden mostrado en la tabla 4. Las muestras que mostraron bandas de mayor intensidad de fluorescencia corresponden a los pozos 6 (Fe₃O₄@SiO₂+CTAB) y 14 (Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe₂O₄@SiO₂+CTAB).

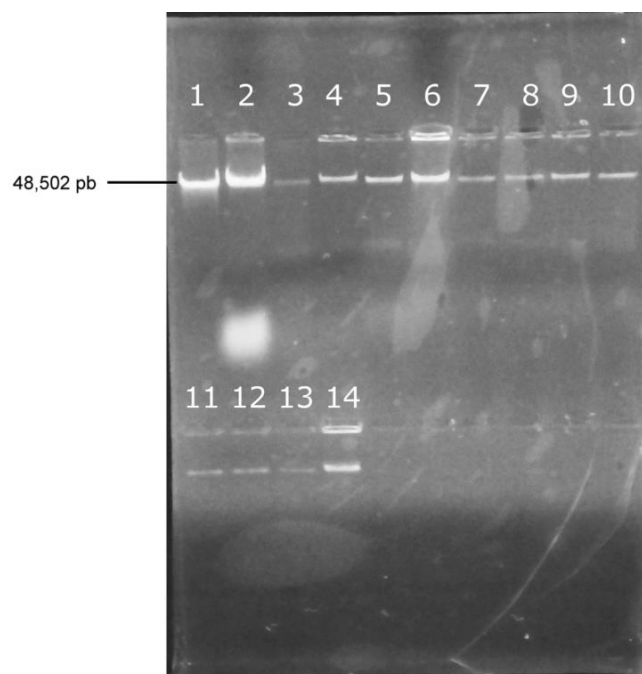


Figura 39 Electroforesis en gel agarosa para las 14 extracciones de ácidos nucleicos. La numeración de cada pozo corresponde al número del método de extracción que se observa en la tabla 4. Las muestras 6 y 14 son las muestras que muestran mayor fluorescencia de ácidos nucleicos en los pozos, las cuales fueron extraídas mediante el método de extracción magnética de NPMNC+CTAB.

Capítulo 5. Discusiones

En esta tesis se han reportado los resultados de la síntesis de nanopartículas de magnetita y ferrita de cobalto zinc, su estabilización y recubrimiento, así como su aplicación en la extracción de ácidos nucleicos. Basándose en protocolos previamente establecidos para la síntesis de nanopartículas magnéticas, realizando algunas modificaciones respectivas, se propuso encontrar la mejor ruta para la síntesis de un material que pudiera brindar las mejores características y rendimientos para la extracción de ácidos nucleicos, en comparación con otro tipo de nanopartículas magnéticas reportadas en la literatura. Como resultado de la elección del medio de síntesis, se optó por la elaboración de un reactor de vidrio en donde llevar a cabo la reacción, de manera que los reactivos pudieran ser suministrados fácilmente y que, a través del suministro de un flujo de un gas inerte, se pudiera generar una atmosfera libre de oxígeno para evitar la oxidación de las nanopartículas. La figura 16 muestra el diagrama del reactor construido. Después de esto, se experimentó con los diferentes métodos elegidos para la correcta estabilización y recubrimiento, optando por las vías más accesibles y efectivas, las cuales resultaron ser aquellas en las que el proceso se hizo de manera continua, calculando los rendimientos de reacción y recubriendo el material sintetizado con una cantidad determinada de precursor para su mayor aprovechamiento. Finalmente se comparó cada uno de los sistemas generados y se obtuvo información, tanto morfológica como estructural, así como de rendimiento para la extracción de ácidos nucleicos a partir de ellos.

5.1 – Sistemas de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

Al hablar de aplicaciones biomédicas, el uso de la fase magnetita tiene una mayor preferencia sobre la fase de maghemita, debido a saturaciones de magnetización mayores y altas susceptibilidades magnéticas (Roca, Marco, Del Puerto Morales, & Serna, 2007). Por esto es de gran importancia evitar la oxidación de la magnetita. Una opción para lograr este objetivo es recubrir las NPM con un material estable como lo es la sílice (SiO_2). Para el caso de la síntesis de magnetita, la formación de una fase de maghemita (óxido de hierro III), puede deberse a la oxidación topotáctica de la magnetita, es decir, una reacción de oxidación tal que la orientación cristalina del producto final está determinada por la orientación cristalina inicial (Müller, 2013). La superficie de la nanopartícula de magnetita tiende a oxidarse y formar un recubrimiento de maghemita al estar en contacto directo con el oxígeno del medio ambiente (Iyengar et al., 2014).

5.1.1 – Estudio previo

El difractograma de rayos X para NPM de magnetita de la figura 17 resultó en una evidente oxidación, debido a que el patrón de picos de difracción obtenido difirió del patrón característico para la magnetita, llevándose a cabo la síntesis de una fase de maghemita. Las imágenes de SEM para la NPM de maghemita de la figura 18a muestran un material amorfo en bulto, lo cual no permitió la formación de nanopartículas. Al ser recubierta, se observa en el difractograma de la figura 19, que se logró estabilizar y se obtuvo la fase deseada, sin embargo dicha partícula no mostró una dispersión uniforme en el medio acuoso, lo cual se puede observar en la imagen SEM de la figura 20a. Cabe mencionar que el difractograma de rayos X se ve afectado por la fluorescencia del hierro a ángulos menores de 25° (2θ), lo cual se debe a que la energía de ionización del hierro por parte de la magnetita es menor (7 KeV) que la energía del haz de rayos X de la fuente de cobre $K\alpha$ (8.04 KeV), por lo tanto, los rayos X tendrán la suficiente energía como para expulsar un electrón de la capa K del hierro resultando en la emisión de una radiación de fluorescencia (Suryanarayana, C., Grant Norton, 1998).

5.1.2 – Análisis sobre el recubrimiento de sílice

Para poder sintetizar un material con un recubrimiento uniforme de sílice se puede utilizar la aproximación descrita por Bergna, 1994, mediante la cual se calcula que se necesita un mínimo de 5.5% de SiO_2 en peso para generar un recubrimiento de sílice de monocapa atómica sobre nanopartículas de 40 nm de diámetro. Por lo tanto, para recubrir nanopartículas de 10 nm de diámetro, surge una relación área-volumen que requiere de agregar una cantidad mayor a 5.5% en peso de SiO_2 para el recubrimiento de una capa monoatómica de sílice. Para asegurar la correcta protección de nanopartículas, y evitar al máximo la reducción de la magnetización de los nanocompuestos magnéticos a recubrir, Liu et al. (Liu, Xu, Finch, & Egerton, 1998) utilizaron un porcentaje en peso de 11% de SiO_2 para recubrir nanopartículas de aproximadamente 20 nm de diámetro. A partir de este resultado, surge la idea de utilizar un mínimo de 22% de SiO_2 en peso para el recubrimiento eficiente de NPM de 10 nm de diámetro.

Como parte de la síntesis del recubrimiento de sílice, es necesario generar un medio de reacción homogéneo para que las partículas puedan recubrirse uniformemente en todo el volumen del reactor. Una parte fundamental del método de síntesis, es la adición de un componente y la correspondiente agitación del medio de reacción para asegurar la dispersión correcta. Para el caso de la adición del

precursor de sílice (TEOS), previamente se debe de generar un medio de solución alcalino uniforme, para alcanzar un pH de 10 en el medio y permitir la formación de sílice sobre la superficie de las nanopartículas. Las proporciones entre el solvente orgánico presente, el agua y el catalizador del medio de dilución, permiten llevar a cabo el proceso sol-gel para el recubrimiento de las NPM, el cual se basa en la hidrólisis del precursor de TEOS y la subsecuente condensación del TEOS hidrolizado sobre los grupos hidroxilo de la superficie de la nanopartícula metálica. Mediante el control de la hidrólisis del TEOS, el enlace M–O–Si es establecido entre la superficie de los átomos metálicos (M) y el silicio del TEOS, dando lugar a la formación de una red tridimensional de sílice mediante la formación y polimerización de enlaces siloxanos (Si–O–Si), en función del incremento de la concentración de TEOS y un grado de hidrólisis (Liu et al., 1998).

5.1.3 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de magnetita ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$)

La falta de dispersión de nanopartículas en un medio acuoso y su consecuente precipitación, son dos de los factores más comunes que influyen en el rendimiento del recubrimiento de sílice, lo cual da como resultado la aglomeración de las nanopartículas. Por esta razón se decidió trabajar con métodos que mejoraran las dispersiones de las NPM en el medio acuoso. Los núcleos magnéticos fueron sintetizados con ayuda de estabilizantes monoméricos y surfactantes, lo que les confiere mejor dispersión y estabilidad para poder ser recubiertos por una capa de sílice satisfactoriamente.

Como resultado del recubrimiento de magnetita con sílice mediante el uso de surfactantes y estabilizantes monoméricos (CTAB y ácido cítrico), el difractograma de rayos X de la figura 21 muestra la formación de una nanopartícula de magnetita con estructura cristalina cubica y grupo espacial Fd-3m (No. 227) (Ficha: 00-019-0629), mientras que para el análisis de Scherrer se encontró un tamaño de cristalito de 13.85 nm de longitud. Para los rendimientos de síntesis, el cálculo teórico del peso de las NPM fue de 0.44 g, mientras que el rendimiento practico fue de 0.469 g. Considerando que el espectro EDS de la figura 24b, no es un valor absoluto empero una técnica puntual que permite comparar los análisis de rendimientos, este muestra un valor del 13.82% en peso para el silicio presente, se puede calcular que un aproximado de 29.52% le corresponde a un compuesto de sílice (SiO_2). Por lo tanto, si el peso teórico total de la síntesis de Fe_3O_4 es 0.44 g y representa el 70.48% de las NPMNC de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$, esto hace referencia a la síntesis de 0.184g de SiO_2 total. Por lo tanto, el rendimiento teórico total, en base a los resultados recolectados por EDS, debe de ser 0.624 g, y por lo tanto 0.155 g se perdieron en la recolección final. Al comparar la cantidad total de 29.52% de SiO_2 presente, y la cantidad de 22% de SiO_2 mínima necesaria para el

recubrimiento eficiente de NPM de 10 nm de diámetro, suponemos que al menos una capa monomérica recubrirá a las NPMNC (Liu et al., 1998). Cabe mencionar que también en base al espectro EDS, se observa un material libre de impurezas. La microscopia SEM de la figura 24a muestra una morfología uniforme, a diferencia de los rendimientos de uniformidad alcanzados con otros métodos de síntesis de NPM de Fe_3O_4 .

Como resultado del análisis por absorción de luz infrarroja de la figura 23 se puede observar que a lo largo del proceso de síntesis y recubrimiento, la banda de vibración $\nu_1=570\text{ cm}^{-1}$ permanece sin modificación, hasta el momento que se agrega el CTAB al medio de síntesis, generando un pico a 640 cm^{-1} . Esto puede deberse al pico de absorbancia de 730 cm^{-1} correspondiente al CTAB puro, el cual, al ser adsorbido por la superficie de la nanopartícula es recorrido hacia una frecuencia de 640 cm^{-1} , indicando la formación de un complejo (Nithiyantham et al., 2015). De igual manera, cuando el exceso de CTAB es removido mediante reflujo químico, la banda de absorción característica de la magnetita a 570 cm^{-1} es nuevamente visible y las vibraciones a 2920 y 2850 cm^{-1} , correspondientes a tensiones de grupos C–H antisimétricos y simétricos del CTAB, disminuyen de intensidad, lo que indica una limpieza del exceso de CTAB. Finalmente, se obtiene una señal intensa para la absorción de una banda a la frecuencia de 1080 cm^{-1} correspondiente al enlace siloxano Si–O–Si del recubrimiento de sílice (Andrade et al., 2009), la cual tiene como origen una señal a una frecuencia de 900 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones del enlace Si–O–Fe, entre la NPM y el recubrimiento de sílice (Xu, Wang, Yang, Wu, & Yang, 2009). Previo al recubrimiento de sílice, el tratamiento con ácido cítrico y la peptización con ácido clorhídrico ayudaron en la definición de los picos de absorción. Por parte del grupo carboxilo COOH del ácido cítrico puro, el pico atribuido a la vibración de enlace C=O del grupo carbonilo ubicado a 1760 cm^{-1} , se recorre de lugar después de ser absorbido por la superficie de la NPM a una frecuencia de 1630 cm^{-1} . Esta absorción se le atribuye a grupos carboxilatos del ácido cítrico formando complejos con los átomos de hierro en la superficie de la nanopartícula de Fe_3O_4 , así como a vibraciones de deformación del enlace O–H atribuidos a grupos hidroxilo (-OH), o a moléculas de agua, en coordinación con la superficie insaturada de átomos de hierro (Iyengar et al., 2014). La banda a 1400 cm^{-1} puede ser asignada a la vibración de tensión asimétrica por parte del CO proveniente del grupo carboxilo COOH expuesto (Cheraghpour et al., 2012). A medida que el recubrimiento de sílice aumenta de grosor, las señales provenientes por parte de los enlaces carboxilo del ácido cítrico disminuyen de intensidad, hasta la desaparición total de la banda a 1400 cm^{-1} después del proceso de reflujo químico. El material sintetizado resulta ser un material cristalino tipo espinela inversa debido a que las absorciones características para la espinela inversa están descritas por las bandas ν_1 a 570 cm^{-1} , correspondiente a los enlaces $M_T\text{--O--}M_O$ (donde M_T y M_O corresponden al metal que ocupa la posición tetraédrica y la posición octaédrica respectivamente), la banda ν_2 a 440 cm^{-1} , la cual indica la presencia de enlaces $M_O\text{--O}$, y por la banda ν_3 entre $400\text{--}350\text{ cm}^{-1}$, donde se encuentran presentes los enlaces $M_T\text{--}M_O$ (Andrade et al., 2009).

La espectroscopia por fotoelectrones emitidos por rayos X, de la figura 25a muestra la firma espectral de los electrones removidos por excitación de rayos X para los respectivos elementos que componen la muestra (Moulder, Stickle, Sobol, & Bomben, 1992). La ventana espectral de la figura 25b, muestra las energías de enlace para los electrones de las orbitas $2p_{1/2}$ y $2p_{3/2}$ del hierro, con energías de enlace de 727 y 713.6 eV respectivamente. Estos valores coinciden con los reportados en la literatura para la magnetita (Yamashita & Hayes, 2008). La figura 26 muestra las imágenes de microscopia TEM con diferentes tamaños de NPMNC los cuales se calculan entre 10 y 15nm de diámetro mediante el histograma de la figura 27, valor que coincide con el tamaño de cristalito calculado por el método de Scherrer (13.85 nm). Mediante los cálculos por el método de difracción de Laue para las distancias interplanares a partir de las imágenes TEM, se pudieron relacionar los planos (222) y (311) correspondientes a la estructura cristalina de la magnetita (Ficha: 00-019-0629). De igual manera, se pueden observar en las figuras 26c y 26d que los espesores del recubrimiento de SiO_2 fueron de aproximadamente 2.5 a 3.6 nm de grosor.

5.2 – Sistemas de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$)

Simultáneamente al desarrollo del método experimental adaptado para la síntesis de NPM de magnetita, se implementó un protocolo para la síntesis de NPM de ferrita de cobalto zinc con estequiometría $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$. Se espera que la incorporación de Co y Zn en la red incremente el comportamiento superparamagnético de las NP. Se consideraron factores a los cuales la síntesis de magnetita fue sometida, partiendo de resultados reportados en la literatura. Debido a que las NPM de ferrita de cobalto-zinc tienen muy buena estabilidad química (López et al., 2012), la síntesis no fue realizada bajo atmosfera inerte, sin embargo, por conveniencia se utilizó el mismo reactor de vidrio.

5.2.1 – Estudio previo

La difracción de rayos X para las NPM de ferrita de cobalto zinc que se muestra en la figura 28a, forma una estructura cristalina cubica con grupo espacial Fd-3m. Al realizar la sinterización del material se obtuvo una fase de maghemita debido a la presencia del plano cristalino (310) (Ficha: 00-039-1346). Lo mismo ocurre cuando la NPM es recubierta con sílice y sinterizada a 600°C. La espectroscopia IR de las figuras 29b y 29d correspondientes a las NPM de ferrita de cobalto-zinc, muestra la presencia de absorciones

características para un material cristalino tipo espinela inversa con bandas ν_1 a 570 cm^{-1} y ν_2 en 420 cm^{-1} y absorciones a frecuencias de baja intensidad a 670 y 420 cm^{-1} . Sin embargo la muestra sinterizada a 600°C presenta una mayor intensidad del pico a 670 cm^{-1} en comparación con la muestra sin sinterización. Esto es característico de la maghemita originada por la oxidación de magnetita, indicando un mayor arreglo de vacancias catiónicas generadas por la oxidación de la superficie (Roca et al., 2007).

5.2.2 – Análisis sobre el control de la temperatura

Un factor muy importante en la síntesis de NPM de ferrita de cobalto zinc es el control adecuado de la temperatura del medio. Como se observó para las NPM de magnetita, las temperaturas de crecimiento pueden oscilar entre una temperatura ambiente ($\sim 27^\circ\text{C}$) y los 90°C (esta última debido al uso de estabilizantes), lo cual da lugar a la formación de una fase de magnetita o de maghemita, dependiendo de las condiciones del entorno de síntesis. Para la síntesis de NPM de ferrita de cobalto zinc en particular, las temperaturas son relativamente elevadas, oscilando entre los 80 y 90°C . Un factor que probablemente determina la elección de las temperaturas de reacción es la solubilidad de los agentes precipitantes y estabilizantes en el medio. Para la síntesis de hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), Ishikawa et al., encontraron que al incrementar la temperatura y concentración del hidróxido alcalino del medio de reacción (NaOH, KOH, LiOH) la solubilidad del medio también aumentaba (Ishikawa, Yoshioka, Sato, & Okuwaki, 1997). Para el caso del ácido cítrico, Oliveira et al., encontraron que al aumentar la temperatura del medio, la solubilidad del ácido cítrico y del solvente del medio también tendía a aumentar (Oliveira, Malagoni, & Franco, 2013).

5.2.3 – Síntesis de nanopartículas núcleo-coraza de ferrita de cobalto-zinc ($\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@SiO_2+\text{CTAB}$)

Como parte de la estabilización general de las NPMNC de ferrita de cobalto-zinc $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@SiO_2$, mediante un recubrimiento usando sílice, se optó por el uso de estabilizantes orgánicos y surfactantes catiónicos (ácido cítrico y CTAB), dado el buen rendimiento que presentaron estos compuestos en la síntesis de NPMNC de magnetita: $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$. El recubrimiento llevado a cabo para las NPMNC de ferrita de cobalto-zinc, mostró de igual manera buenos resultados, al grado de proteger a las NPM de ferrita de cobalto-zinc aun después de ser sometidas al proceso de sinterización, evitando la oxidación y por lo tanto la conservación de su fase cristalina cubica. La figura 30 muestra el patrón de difracción de rayos X de una

ferrita de cobalto zinc con estructura cristalina cubica característica de un óxido de hierro de fase magnetita (Ficha: 00-019-0629). Después de la sinterización a 600°C los picos de difracción aparecen más estrechos, lo que indica un mayor índice de cristalinidad del material (Lopez et al., 2012). Cabe mencionar que al comparar las posiciones de los picos de difracción para la NPMNC de magnetita y las NPMNC de ferrita de cobalto zinc, lo cual se puede observar en la figura 31, se encuentra un corrimiento del patrón de difracción, lo que confirma la tendencia a la formación de una estructura cristalina tipo espinela normal (López et al., 2012).

A partir del análisis de espectroscopia infrarroja del crecimiento de las NPMNC de la figura 32, las vibraciones de tensión del enlace metal-oxígeno fueron localizadas a frecuencias de 570 y 450 cm^{-1} para los sitios tetraédricos ($\text{Fe}^{3+}-\text{O}^{2-}$) y octaédricos ($\text{Fe}^{2+}-\text{O}^{2-}$), respectivamente, lo cual corrobora la formación de un material cristalino tipo espinela (Srivastava et al., 2011). El recubrimiento de sílice es formado por un proceso sol-gel, lo cual se puede comprobar mediante la presencia de la vibración característica de los enlaces siloxanos ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) a 1000 cm^{-1} (Kulkarni, Sawadh, & Prakash, 2014). Una vez que el CTAB interviene en la formación de las NPMNC la señal del enlace siloxano se intensifica y se desplaza hacia una frecuencia de 1070 cm^{-1} (H. E. Bergna & Roberts, 2006). Otro indicador de la presencia del CTAB son los picos a 2920 y 2850 cm^{-1} correspondientes a las tensiones antisimétricas y simétricas de grupos C-H.

El consenso general del recubrimiento se le atribuye a la atracción electrostática entre el surfactante catiónico (CTAB) y los grupos SiO^- de la superficie, al modificar las condiciones del punto isoeléctrico de la interface. Las moléculas adsorbidas formaran una monocapa sobre la superficie y posteriormente, a medida que el área hidrofóbica expuesta aumenta, las interacciones hidrofóbicas darán lugar a la adsorción de moléculas adicionales de surfactantes. El surfactante adsorbido formará bicapas uniformes, comúnmente en forma de admicelas, similares a micelas esféricas planas (Tyrode, Rutland, & Bain, 2008). La figura 40 muestra un diagrama de las diferentes morfologías que se pueden formar durante la adsorción de las moléculas de surfactante soluble sobre una superficie hidrofílica limpia.

La estabilización de las NPMNC les permitió generar un recubrimiento uniforme sobre su superficie, como lo muestran las microscopias SEM de la figura 33a, para morfologías uniformes constituidas por NPMNC de ferrita de cobalto zinc. En el espectro EDS de la figura 33b obtenido para las energías de enlace se pueden observar los porcentajes de los elementos presentes, los cuales concuerdan con la razón 1:2 característica para las ferritas, donde la relación Co:Zn:Fe se puede observar en los respectivos porcentajes en peso de 4.43:13.33:35.76 lo que correspondería a un 0.247:0.743:2.0, valor aproximado al valor estequiométrico teórico de 0.25:0.75:2.

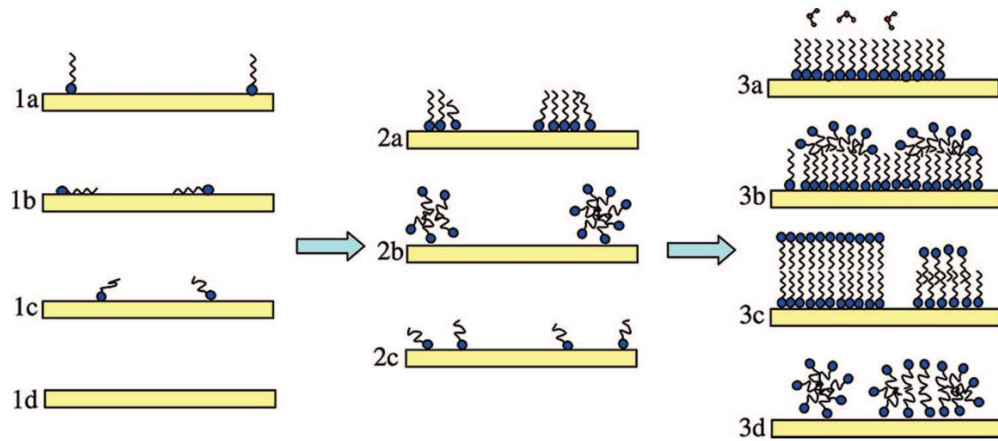


Figura 40 Diagrama de las diferentes morfologías formadas durante el proceso de adsorción entre moléculas de surfactantes solubles y un sustrato hidrofílico limpio (1d). Las cadenas de hidrocarburos del surfactante adsorbido pueden yacer sobre la superficie de forma perpendicular a esta (1a), paralela (1b) o aleatoriamente orientada (1c). A medida que aumenta el recubrimiento, las moléculas pueden distribuirse aleatoriamente de manera individual (2c) o la interacción puede dar lugar a la formación de hemimicelas (2a) o admicelas (2b). A índices altos de recubrimientos, una serie de estructuras pueden formarse, tales como: monocapas (3a), hemimicelas sobre una monocapa (3b), bicapas (3c) o admicelas (3d). *Imagen tomada de (Tyrode et al., 2008).*

Si comparamos el rendimiento teórico calculado de 0.44g para las NPM de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$, con el peso recuperado de 0.544 g para las NPMNC de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$, podemos calcular si en realidad, el exceso de 0.104 g corresponde al SiO_2 . Debido a que la señal de silicio obtenido en el EDS de la figura 33b, tiene una intensidad de 12.46%, esto hace referencia a un 26.65% aproximado en peso para el SiO_2 sintetizado. Si la suma de porcentajes de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4 + \text{SiO}_2$ es igual al 100%, entonces el $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4$ corresponde a 73.34%, porcentaje que tiene asociado una masa de 0.44 g por lo tanto el 100% corresponde a 0.599 g. Entonces $0.599\text{g} - 0.544\text{g} = 0.055\text{g}$, es la cantidad perdida después de la recuperación y $0.599\text{g} - 0.44\text{g} = 0.159\text{g}$ es la cantidad total de SiO_2 sintetizada sobre la NPMNC.

En la espectroscopia de fotoelectrones emitidos por rayos X (XPS) de la figura 34, se le pueden atribuir las señales de las energías de enlace, a los orbitales de los electrones excitados de los elementos que componen la ferrita de cobalto-zinc recubierta por sílice. En particular, dentro de las ventanas energéticas de los elementos principales (Co, Zn y Fe) en las figuras 34b, 34c y 34d, se observa un ligero corrimiento hacia energías mayores cuando la muestra es sinterizada a una temperatura de 600°C , en relación con las energías de enlace a temperatura ambiente (Moulder et al., 1992). Para el caso de las energías de enlace de la ventana del hierro, estas indican la formación de una fase de magnetita, tanto para la muestra sinterizada como para la muestra sin sinterización, lo cual coincide con los resultados obtenidos por difracción de rayos X para las NPMNC de ferrita de cobalto zinc (Yamashita & Hayes, 2008).

En el análisis mediante microscopia TEM de las figura 35 y 36, se observan tamaños de nanopartículas con diámetros entre los 20 y 10 nm, tanto para partículas sin sinterizar, como sinterizadas. Dichos valores se representan en los histogramas de la figura 37a y 37b, los cuales coinciden con el tamaño de cristalito obtenido mediante la ecuación de Scherrer (18.44 y 12.3 nm respectivamente). Las distancias interplanares observadas oscilan entre 0.22 y 0.25 Å de distancia, las cuales corresponden a la presencia del plano cristalino (311) característico de un material tipo magnetita (Ficha: 00-019-0629). Para poder obtener una buena dispersión de las NPM para la preparación de las rejillas TEM, se consideraron factores como la polaridad de los disolventes utilizados, así como cargas superficiales y tamaños de partículas. Debido a la presencia de restos de detergentes o estabilizadores, se realizó una centrifugación para la separación de partículas de diferentes tamaños. La separación por centrifugación de partículas grandes ($>0.8\mu\text{m}$) es más fácil que para partículas pequeñas ($<50\text{nm}$), debido a que las nanopartículas requieren de centrifugaciones mayores a 300,000 G para su sedimentación completa (Bang Laboratories Inc., 2008).

5.3 – Dispersión de nanopartículas núcleo-coraza en medio acuoso

Como se observa en la figura 38, las tres muestras elegidas presentan una dispersión total en el medio de dilución. En particular la muestra de ferrita de cobalto zinc sinterizada a 600°C , presentó una mejor respuesta de recuperación magnética mediante la exposición a un campo magnético externo, durante un tiempo de recuperación de 1 minuto. Esto se debe a la buena combinación de los comportamientos magnéticos de la NPM sintetizada y de las fuerzas de atracción superficial del recubrimiento de sílice de las NPMNC, proveyendo de un comportamiento hidrófilo a la nanopartícula, debido a la electronegatividad del oxígeno de grupos hidroxilo de la superficie y a la interacción polar con el medio acuoso que rodea a las nanopartículas (Laurent et al., 2008).

Los grupos hidroxilo superficiales son sitios donde la adsorción física del agua (y otras moléculas polares) ocurren. En una superficie ideal, completamente hidroxilada ($4.9\text{ OH}/\text{nm}^2$), las moléculas de H_2O cubrirán primeramente todos los sitios OH disponibles formando una capa de enlaces múltiples de hidrogeno (Brinker & Scherer, 1990). En general, los grupos silanoles superficiales disociados, así como grupos enlazados a hidrogeno, contribuirán con los sitios de adsorción de moléculas de agua sobre una superficie de sílice completamente hidroxilada (Christy, 2013). La figura 41 muestra un diagrama de los diferentes tipos de grupos silanoles, como siloxanos, que pueden estar presentes sobre la superficie de una partícula de sílice completamente hidroxilada.

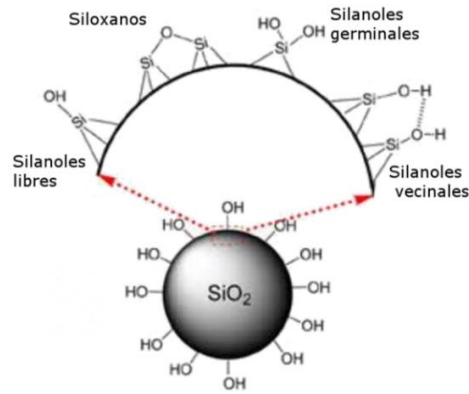


Figura 41 Grupos silanoles y siloxano sobre una partícula recubierta de sílice completamente hidroxilada. *Imagen tomada de (Cervený, 2012)*

5.4 – Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos por espectroscopia UV

Las lecturas de absorción se realizaron en un espectrofotómetro de luz ultravioleta. Debido a que los nucleótidos que conforman las cadenas de ADN y ARN absorben luz a una frecuencia del espectro electromagnético de 260nm y las proteínas absorben a 280nm, la proporción $A_{260/280}$ es utilizada frecuentemente para medir la pureza de las extracciones de ADN y ARN. Una lectura de absorción $A_{260/280}$ de ~1.8 es generalmente aceptada para la extracción de ADN “puro”, mientras que una lectura de absorción $A_{260/280}$ de ~2.0 se debe generalmente a extracciones de ARN “puro” (Wilfinger, 1997).

5.4.1 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de extracción magnética

En la tabla 4 se muestran las absorciones obtenidas en base a los distintos sistemas de NPM sintetizados, así como las absorciones de las extracciones por solución cloroformo y la lectura del ADN liofilizado del fago λ . Al analizar muestras extraídas con las NPM y NPMNC, se puede notar que aquellas obtenidas con los sistemas de NPMNC+CTAB, presentaron absorbancias mayores al ser analizadas por el NanoDrop™, lo que podría sugerir un buen rendimiento de extracción. Las muestras fueron analizadas por duplicado y el detector del espectrómetro se limpió con un paño desechable después de cada medición.

Los valores de la extracción por medio de NPMNC+CTAB, oscilaron cerca de un valor de 1.8. Por lo tanto representan valores de pureza y concentración para una extracción conformada en su mayoría por ADN. Estos valores representan una extracción para ADN con concentraciones y purezas aceptables. Chan et al.,

encontraron que para extracciones con partículas magnéticas los valores de absorción $A_{260/280}$ oscilan entre 1.6 y 1.7 (F. Chen et al., 2010). Sin embargo, particularmente para el sistema de NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ se obtuvo un valor de $A_{260/280}=1.875$ el cual resulta ser un valor insuperable para la extracción de ADN.

Las fuerzas de atracción superparamagnética de las NPMNC de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}$, se pueden deducir del estudio de tamaño de partícula, y la gráfica de la figura 7, donde a tamaños menores de 10 nm la nanopartícula se comporta de manera superparamagnética, por lo que en ausencia de un campo externo la nanopartícula no mantendrá un campo magnético remanente. Además de esta fuerza, la fuerza de atracción principal en la extracción de ácidos nucleicos se genera entre la carga negativa de la superficie de sílice y los enlaces azúcar-fosfato de carga negativa de las columnas de los ácidos nucleicos. El ADN se une a los grupos silanoles y siloxano en presencia de sales caotrópicas, tales como el cloruro de sodio NaCl, entre otras (Shi, Shin, Hassanali, & Singer, 2015). El CTAB al ser un surfactante catiónico potente, ayuda a eliminar la posible presencia de polisacáridos de membranas celulares (biomoléculas con función estructural, constituidas por monosacáridos) y adicionalmente minimiza el efecto de metabolitos secundarios, como polifenoles, los cuales interfieren y coprecipitan junto con el ADN (Clarke, 2009). Por lo tanto, la presencia de restos de moléculas de CTAB sobre el recubrimiento de sílice de las NPMNC les otorga un mejor rendimiento debido al potente comportamiento de actividad de superficie. Cabe mencionar que al utilizar los sistemas de NPMNC+CTAB en conjunto con el buffer de unión (20%PEG 8000), el rendimiento de extracción se ve reducido. La figura 42 muestra un diagrama del posible mecanismo para la unión entre la sílice y el ADN dentro de soluciones con altas concentraciones de sales caotrópicas.

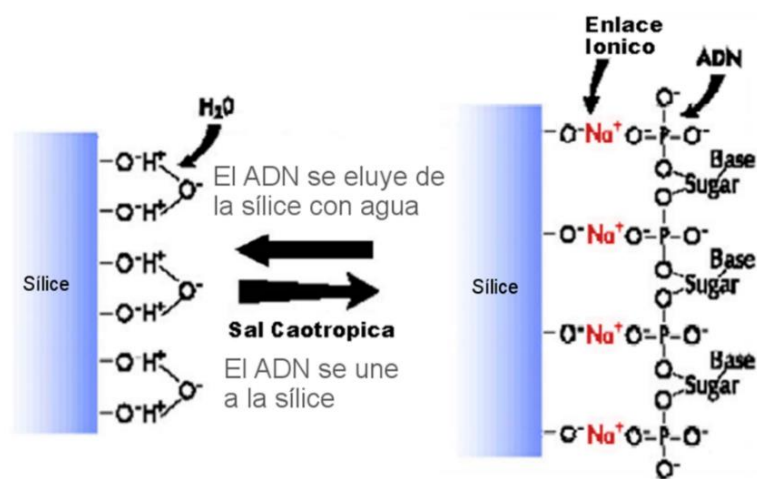


Figura 42 Mecanismo de unión entre la sílice y el ADN en soluciones con altas concentraciones de sales caotrópicas. Imagen tomada de <http://docplayer.cz/33411193-lzolace-nukleovych-kyseliny.html>

5.4.2 – Extracción de ácidos nucleicos mediante el método de solución cloroformo

Para la extracción de ácidos nucleicos por medio del método de solución cloroformo, se obtuvo una concentración de ácidos nucleicos alta (351.95 ng/ μ l), con un valor de pureza de extracción (2.125) que indica la extracción de un material genético con un alto contenido de ARN. En general el método resultó ser un buen método de extracción tanto para ADN como de ARN. Sin embargo, en la figura 39 se observa que el ARN extraído se encuentra degradado, lo cual se explicará en la siguiente sección.

Cabe mencionar que el uso de cloroformo en la extracción de ácidos nucleicos deriva del método de extracción por solución de fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987), donde la cualidad de la solución de fenol es la capacidad de desnaturalizar proteínas rápidamente. Sin embargo, a pesar de ser un ácido carbónico inflamable, corrosivo y tóxico, no es capaz por sí solo de inhibir completamente la actividad de las enzimas que degradan al ARN. Para esto, el papel principal del cloroformo en este tipo de extracción es la remoción de proteínas, lípidos, carbohidratos y debris celular. Debido a que el cloroformo es usualmente miscible con la mayoría de los compuestos orgánicos, y a causa de la inmiscibilidad de la mezcla de cloroformo en agua, dos fases distintas son formadas en el medio de solución. Las proteínas y los lípidos, al ser hidrofóbicos se hallarán en la fase orgánica de la mezcla, mientras que los ácidos nucleicos permanecerán dispersos en la fase acuosa, de donde pueden ser removidos fácilmente (Zumbo, 2013). A pesar de esto, el cloroformo, al igual que el fenol, es un agente tóxico que su desecho representa un impacto ambiental, por lo que su desuso en los laboratorios de microbiología ha venido en aumento, siendo sustituido por los métodos de extracción basados en la atracción de la sílice y los ácidos nucleicos.

5.5 – Electroforesis en gel agarosa para las extracciones de ácidos nucleicos

La electroforesis en gel agarosa de la figura 39 muestra las respectivas fluorescencias para los ácidos nucleicos extraídos mediante los 14 métodos de extracción distintos. El pozo No. 1 corresponde a una muestra control la cual es un ADN puro reconstituido a partir de ADN liofilizado de fago λ ; este tiene una estructura lineal de doble hebra de 48,502 pb de longitud. A partir del pozo No. 2 hasta el pozo No. 14, el material genético extraído proviene de la cepa de *E. coli* DH5 α , la cual está constituida por una cadena circular de doble hebra que tiene una longitud de 4,686,137 pb (Invitrogen, 2006), lo cual restringe evidentemente su movilidad dentro del gel de electroforesis. Por tal razón, los ácidos nucleicos extraídos para las muestras de la cepa de *E. coli* permanecieron estáticos dentro del pozo, independientemente del método de extracción utilizado. Es importante mencionar que para las extracciones magnéticas no se

observan rastros de ARN, debido a que el ARN es fácilmente degradable y es separado de la precipitación final al momento de hacer la extracción. Por su parte, en la extracción por solución cloroformo del carril 2 se observa una muestra de ARN degradado (smear). Para realizar una extracción eficiente de ARN funcional se deben de utilizar protocolos especializados que operan principalmente a condiciones de temperatura bajas (Ausubel et al., 2003).

Cada método extrajo una cantidad diferente de ácidos nucleicos, siendo los pozos 6 y 14 los que muestran evidentemente una mayor extracción de ácidos nucleicos. De igual manera, cada sistema de NPM sintetizado, con o sin recubrimiento, con o sin sinterización, tiene la capacidad de extraer ácidos nucleicos, debido a los grupos funcionales que conforman su superficie. En particular, el método que arrojó el mejor rendimiento de extracción (el método No. 14) no necesitó de la adición del buffer de unión (20%PEG 8000). Dicho método, compuesto por NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$, logró cumplir con los estándares especificados para ser utilizado como un agente de extracción eficiente de ácidos nucleicos, el cual posee un comportamiento superparamagnético y su recubrimiento le permite lograr una dispersión uniforme a través del medio de solución.

Capítulo 6. Conclusiones

A continuación, se presentan las conclusiones obtenidas en este trabajo:

- Como conclusión general, se resalta la síntesis y estudio de las nanopartículas magnéticas que cumplen con los requisitos fundamentales para la separación magnética de ácidos nucleicos (ADN). El sistema óptimo de nanopartículas magnéticas está compuesto por NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$. Los rendimientos de pureza cumplen con los estándares especificados (1.875), al comportarse como un agente para la extracción de ADN comparable a los kits comerciales. Esto, debido al comportamiento superparamagnético de las nanopartículas y una dispersión uniforme en solución a partir de la correcta funcionalización de superficie de sílice.
- A partir de un método de síntesis por coprecipitación, seguido del método sol-gel, se logró la síntesis de núcleos magnéticos y su recubrimiento, respectivamente, para formar diferentes sistemas $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ y $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$. Con la adición del ácido 3-hidroxicarboxi pentanodiólico (ácido cítrico) se pudo conseguir la dispersión adecuada de las NPM, y posteriormente, con la adición del compuesto surfactante Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) se obtuvo un mejor recubrimiento de sílice para lograr la estabilización de la nanopartícula.
- Como parte de la unión de varios protocolos para la síntesis de NPMNC+CTAB, se logró generar un método de síntesis que permitiera desarrollar todos los pasos de la síntesis de NPMNC+CTAB en un proceso continuo, minimizando el tiempo de operación y los requisitos energéticos.
- Las caracterizaciones por espectroscopia infrarroja permitieron determinar la efectividad del recubrimiento con la adición de agente surfactante, además de evidenciar la formación de la estructura tipo espinela para el compuesto de NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$.
- Las caracterizaciones por difracción de rayos X permitieron determinar una fase cristalina tipo magnetita para las NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$, con estructura cristalina tipo espinela cubica y grupo espacial Fd-3m (No. 227) (Ficha: 00-019-0629).
- La comparación de los difractogramas de rayos X para la magnetita y la ferrita de cobalto zinc muestra un corrimiento de 0.36° , lo cual indica la formación de una estructura espinela normal.
- El análisis por espectroscopia XPS demostró la presencia de hierro con fase magnetita aun después de la sinterización a 600°C , lo cual coincide con el análisis XRD y TEM.
- Las NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ poseen tamaños de cristalito con valores de 12.3 nm de longitud, lo cual concuerda con los tamaños de 15 nm para las

nanopartículas observadas en el histograma obtenido mediante la medición de la microscopia TEM, en donde además se observó el plano cristalino (311) característico de una estructura cristalina cubica (Ficha: 00-019-0629).

- Los sistemas sintetizados de NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ resultaron ser los sistemas más eficientes para la extracción de ADN puro, en comparación con los otros sistemas de nanopartículas núcleo-coraza sintetizados y también con el método de solución cloroformo. Incluso, al comparar rendimientos de extracción con otros métodos de extracción magnética reportados en la literatura, con las NPMNC+CTAB de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ se alcanza a cubrir un estándar de pureza y concentración mayor.

Perspectivas

- Realizar una extracción con las NPMNC de $\text{Co}_{0.25}\text{Zn}_{0.75}\text{Fe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2+\text{CTAB}/600^\circ\text{C}$ después de un largo tiempo de almacenamiento en la solución de EDTA, para comprobar su capacidad de estabilización química y almacenamiento en medio acuoso.
- Continuar con los análisis de caracterización DLS para calcular los tamaños de diámetro de partícula y los valores del potencial Z alrededor de la partícula, para así conocer la respuesta óptima para la dispersión uniforme de las nanopartículas en el medio acuoso.
- Llevar a cabo caracterizaciones de los comportamientos magnéticos en un equipo especializado como el magnetómetro de interferencia cuántica (SQUID, por sus siglas en inglés) o en un magnetómetro de muestra vibrante (VSM, por sus siglas en inglés).

Literatura citada

- Alexander, L., & Klug, H. P. (1950). Determination of crystallite size with the x-ray spectrometer. *Journal of Applied Physics*, 21(2), 137–142. <https://doi.org/10.1063/1.1699612>
- Anderson, N., Hartschuh, A., & Novotny, L. (2005). Near-field Raman microscopy. *Materials Today*, 8(5), 50–54. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)00846-1](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)00846-1)
- Andrade, A. L., Souza, D. M., Pereira, M. C., Fabris, J. D., & Domingues, R. Z. (2009). Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles coated with silica through a sol-gel approach, 55, 420–424.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. . G., Smith, J. A., & Struhl, K. (2003). *Current Protocols in Molecular Biology*. Boston, Massachusetts: Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>
- Bandyopadhyay, A., Chatterjee, S., & Sarkar, K. (2011). Rapid isolation of genomic DNA from E. coli XL1 Blue strain approaching bare magnetic nanoparticles. *Current Science*, 101(2), 210–214.
- Bang Laboratories Inc. (2008). *Working with Microspheres* (No. 201). Indiana.
- Bauer, W., & Westfall, G. D. (2011). *Física para ingeniería y ciencias con física moderna*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Bayat, A., Shakourian-Fard, M., & Hashemi, M. M. (2014). Selective oxidation of sulfides to sulfoxides by a molybdate-based catalyst using 30% hydrogen peroxide. *Catalysis Communications*, 52, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2014.03.026>
- Bergna, H. E. (1994). The Colloid Chemistry of Silica. *Advances in Chemistry: American Chemical Society*, 234(2), 47. <https://doi.org/10.1021/ba-1994-0234>
- Bergna, H. E., & Roberts, W. O. (2006). *Colloidal Silica: Fundamentals and Applications*. Florida: Taylor and Francis group. <https://doi.org/10.1002/fld.463>
- Blattner, F. R. (1997). The Complete Genome Sequence of Escherichia coli K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462. <https://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Blundell, S. (2001). *Magnetism in Condensed Matter*. New York: Oxford University. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Brinker, J. C., & Scherer, G. W. (1990). *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. London: Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-444>
- Bromham, L. (2015). *An Introduction to Molecular Evolution and Phylogenetics* (2nd ed.). London: Oxford University.
- Bruker. (2015). Periodic Table of Elements and X-ray Energies. *Bruker*, 2. Retrieved from © Bruker GJS 11-2015 P/N: 040.0043.02.2
- Buzea, C., Blandino, I. I. P., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), 1–103.

- Campbell, J. L., Arora, J., Cowell, S. F., Garg, A., Eu, P., Bhargava, S. K., & Bansal, V. (2011). Quasi-cubic magnetite/silica core-shell nanoparticles as enhanced MRI contrast agents for cancer imaging. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021857>
- Carta, D., Casula, M. F., Falqui, A., Loche, D., Mountjoy, G., Sangregorio, C., & Corrias, A. (2009). A Structural and Magnetic Investigation of the Inversion Degree in Ferrite Nanocrystals MFe_2O_4 (M = Mn, Co, Ni). *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(20), 8606–8615. <https://doi.org/10.1021/jp901077c>
- Carter, C. B., & Norton, M. G. (2007). *Ceramic Materials: Science and Engineering*. Berlin: Springer. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Caruso, G., Merlo, L., & Caffo, M. (2014). *Innovative Brain Tumor Therapy: Nanoparticle-Based Therapeutic Strategies*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Cervený, S., Schwartz, G., Ortegú, J., Colmenero, J., Loichen, J., & Westermann, S. (2012). Dielectric study of hydration water in silica nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(45): 24340–24349.
- Chaudhuri, R. G., & Paria, S. (2011). Core/Shell Nanoparticles: Classes, Properties, Synthesis Mechanisms, Characterization, and Applications. *American Chemical Society*, 112, 2373–2433.
- Chen, F., Shi, R., Xue, Y., Chen, L., & Wan, Q. H. (2010). Templated synthesis of monodisperse mesoporous maghemite/silica microspheres for magnetic separation of genomic DNA. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322(16), 2439–2445. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2010.02.053>
- Chen, X. (2013). Core/shell structured silica spheres with controllable thickness of mesoporous shell and its adsorption, drug storage and release properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 428, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.03.038>
- Cheraghipour, E., Javadpour, S., & Mehdizadeh, A. R. (2012). Citrate capped superparamagnetic iron oxide nanoparticles used for hyperthermia therapy. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5(12), 715–719. <https://doi.org/10.4236/jbise.2012.512089>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156–159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Christy, A. A. (2013). The Nature of Rest Silanol Groups on the Surfaces of Silica Based Solid Phase Extraction Materials. *Advanced Materials Research*, 650, 66–71. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.650.66>
- Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 5177–5179. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5177>
- Clements, A. (2010). *The essential chemical industry*. York: University of York, Chemical industry education centre.
- Cornell, R. M., & Schwertmann, U. (2003). *The Iron Oxides Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses* (2nd ed.). Weinheim: WILEY-VCH.
- Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2008). *Lehninger: Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and company.

- Cullity, B. D. (1956). *Elements of X-Ray Diffraction*. Reading, Massachusetts: Addison-Wesley. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Dahm, R. (2010). From discovering to understanding. Friedrich Miescher's attempts to uncover the function of DNA. *EMBO Reports*, *11*(3), 153–160. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.14>
- de la Fuente, J. M., & Grazu, V. (2012). *Nanobiotechnology: Inorganic nanoparticles vs Organic nanoparticles*. Amsterdam: Oxford.
- Drexler, E. (1986). *Engines of Creation*. Massachusetts: Anchor Press/Doubleday.
- Elvers, B. (2012). *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley VCH. <https://doi.org/10.1002/14356007.a14>
- Faivre, D., & Godec, T. U. (2015). From bacteria to mollusks: The principles underlying the biomineralization of iron oxide materials. *Angewandte Chemie - International Edition*, *54*(16), 4728–4747. <https://doi.org/10.1002/anie.201408900>
- Fojtik, A., Horák, D., Trung, T. Q., & Škere, T. (2009). Magnetic and Metallic Nanoparticles for Biomedical Application. *Nanocon*, 1–8.
- Gawande, M. B., Goswami, A., Asefa, T., Guo, H., Biradar, A. V., Peng, D.-L., ... Varma, R. S. (2015). Core-shell nanoparticles: synthesis and applications in catalysis and electrocatalysis. *Chem. Soc. Rev.*, *44*(21), 7540–7590. <https://doi.org/10.1039/C5CS00343A>
- Guérout, M., Picot, D., Abi-Ghanem, J., Hartmann, B., & Baaden, M. (2010). How Cations can Assist Dnase I in DNA Binding and Hydrolysis. *PLoS Computational Biology*, *6*(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001000>
- Hawkins, T. L., Connor-morin, T. O., Roy, A., & Santillan, C. (1994). DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Research*, *22*(21), 4543–4544.
- Hernando, A., Crespo, P., & García, M. A. (2005). Metallic Magnetic Nanoparticles. *The Scientific World*, *5*, 972–1001. <https://doi.org/10.1100/tsw.2005.121>
- Hill, A. J. (2006). *Nanostructure control of materials*. Cambridge: Woodhead Publishing.
- Iida, H., Takayanagi, K., Nakanishi, T., & Osaka, T. (2007). Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, *314*(1), 274–280. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.047>
- Iler, R. K. (1979). *The chemistry of silica. Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry*. Chichester N.Y.: John Wiley and Sons. <https://doi.org/10.1002/ange.19800920433>
- Invitrogen. (2006). *MAX Efficiency DH5α Competent Cells. Transformation* (Vol. 19).
- Ishikawa, K., Yoshioka, T., Sato, T., & Okuwaki, A. (1997). Solubility of hematite in LiOH, NaOH and KOH solutions. *Hydrometallurgy*, *45*, 129–135. [https://doi.org/10.1016/S0304-386X\(96\)00068-0](https://doi.org/10.1016/S0304-386X(96)00068-0)
- Iyengar, S. J., Joy, M., Ghosh, C. K., Dey, S., Kotnala, R. K., & Ghosh, S. (2014). Magnetic, X-ray and Mössbauer studies on Magnetite/Maghemite Core-Shell Nanostructures Fabricated through Aqueous Route. *Royal Society of Chemistry*, *4*, 64919–64929. <https://doi.org/10.1039/b000000x>

- Kim, J., Kim, H. S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., ... Hyeon, T. (2008). Multifunctional uniform nanoparticles composed of a magnetite nanocrystal core and a mesoporous silica shell for magnetic resonance and fluorescence imaging and for drug delivery. *Angewandte Chemie - International Edition*, 47(44), 8438–8441. <https://doi.org/10.1002/anie.200802469>
- Kittel, C. (2005). *Introduction To Solid State Physics* (8th ed.).
- Kojim, K., & Ozawa, S. (2002). Method for isolating and purifying nucleic acids, US 20020192667 A1.
- Kulkarni, S. A., Sawadh, P. S., & Prakash, K. P. (2014). Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Fe₃O₄@SiO₂ Nanoparticles. *Journal of the Korean Chemical Society*, 58(1), 100–104. <https://doi.org/10.4236/wjcmp.2011.12008>
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., & Muller, R. N. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. *Chemical Reviews*, 108(6), 2064–2110. <https://doi.org/10.1021/cr068445e>
- Liu, Q., Xu, Z., Finch, J. A., & Egerton, R. (1998). A novel two-step silica-coating process for engineering magnetic nanocomposites. *Chemistry of Materials*, 10(12), 3936–3940. <https://doi.org/10.1021/cm980370a>
- LOBA. (2012). CTAB. *LOBA Chemie, Laboratory Reagents & Fine Chemicals*, 2681, 10. Retrieved from <https://www.lobachemie.com/Quaternary-Ammonium-Compounds-02681/NCETYLNNN-TRIMETHYL-AMMONIUM-BROMIDE-CASNO-57-09-0.aspx>
- Lopez, J., Espinoza-beltran, F. J., Zambrano, G., Gomez, M. E., & Prieto, P. (2012). Caracterización de nanopartículas magnéticas de CoFe₂O₄ y CoZnFe₂O₄ preparadas por el método de coprecipitación química. *Revista Mexicana de Física*, 58, 293–300.
- López, J., González-Bahamón, L. F., Prado, J., Caicedo, J. C., Zambrano, G., Gómez, M. E., ... Prieto, P. (2012). Study of magnetic and structural properties of ferrofluids based on cobalt-zinc ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(4), 394–402. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2011.07.040>
- Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, 46(8), 1222–1244. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>
- Lucas, J., Lucas, P., Mercier, T. Le, Rollat, A., & Davenport, W. G. I. (2015). *Rare Earths: Science, Technology, Production, and Use*. Oxford: Elsevier.
- Ma, F. X., Hu, H., Wu, H. Bin, Xu, C. Y., Xu, Z., Zhen, L., & Lou, X. W. (2015). Formation of Uniform Fe₃O₄ Hollow Spheres Organized by Ultrathin Nanosheets and Their Excellent Lithium Storage Properties. *Advanced Materials*, 27(27), 4097–4101. <https://doi.org/10.1002/adma.201501130>
- Magnani, M., Galluzzi, L., & Bruce, I. J. (2006). The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2302–2311. <https://doi.org/10.1166/jnn.2006.505>
- Mélinon, P., Begin-Colin, S., Duvail, J. L., Gauffre, F., Boime, N. H., Ledoux, G., ... Warot-Fonrose, B. (2014). Engineered inorganic core/shell nanoparticles. *Physics Reports*, 543(3), 163–197.

- Mishra, M., Arukha, A. P., Bashir, T., Yadav, D., & Prasad, G. B. K. S. (2017). All new faces of diatoms: Potential source of nanomaterials and beyond. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01239>
- Mody, V. V., Siwale, R., Singh, A., & Mody, H. R. (2010). Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, *2*(4), 282–289. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.72127>
- Moraes Silva, S., Tavallaie, R., Sandiford, L., Tilley, R., & Gooding, J. J. (2016). Gold Coated Magnetic Nanoparticles: Preparation, Surface Modification for Analytical and Biomedical Applications. *Chem. Commun.*, *52*(48), 7528–7540. <https://doi.org/10.1039/C6CC03225G>
- Mou, X., Ali, Z., Li, S., & He, N. (2015). Applications of magnetic Nanoparticles in Targeted Drug Delivery System. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *15*(1), 54–62. <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.9585>
- Moulder, J. F., Stickle, W. F., Sobol, P. E., & Bomben, K. D. (1992). *Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy*. Perkin-Elmer Corporation Physical Electronics Division. <https://doi.org/10.1002/sia.740030412>
- Müller, U. (2013). *Symmetry Relationships between Crystal Structures*. Marburg: Oxford Science. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199669950.001.0001>
- Nealon, G. L., Donnio, B., Greget, R., Kappler, J.-P., Terazzi, E., & Gallani, J.-L. (2012). Magnetism in gold nanoparticles. *Nanoscale*, *4*(17), 5244–5258. <https://doi.org/10.1039/c2nr30640a>
- Nithiyantham, U., Ede, S. R., Ozaydin, M. F., Liang, H., Rathishkumar, A., & Kundu, S. (2015). Low temperature, shape-selective formation of Sb₂Te₃ nanomaterials and their thermoelectric applications. *RSC Advances*, *5*(5), 89621–89634. <https://doi.org/10.1039/C5RA17284E>
- Oliveira, M. L. N., Malagoni, R. A., & Franco, M. R. (2013). Solubility of citric acid in water, ethanol, n-propanol and in mixtures of ethanol+water. *Fluid Phase Equilibria*, *352*, 110–113. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2013.05.014>
- Ozin, G. A., Arsenault, A. C., & Cademartiri, L. (2009). *Nanochemistry: a chemical approach to nanomaterials*. *Materials Today*. Royal Society of Chemistry. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(09\)70138-5](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(09)70138-5)
- Parisi, C., Vigani, M., & Rodríguez-Cerezo, E. (2015). Agricultural nanotechnologies: What are the current possibilities? *Nano Today*, *10*(2), 124–127. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.09.009>
- Petrucci, R. H. (2011). *General Chemistry*. Canada: Pearson.
- Philipse, A. P., Bruggen, M. P. B. Van, & Pathmamanoharan, C. (1994). Magnetic Silica Dispersions: Preparation and Stability of Surface-Modified Silica Particles with a Magnetic Core. *Langmuir*, *10*, 92–99.
- Rafiq, M. A., Khan, M. A., Asghar, M., Ilyas, S. Z., Shakir, I., Shahid, M., & Warsi, M. F. (2015). Influence of Co²⁺ on structural and electromagnetic properties of Mg-Zn nanocrystals synthesized via co-precipitation route. *Ceramics International*. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.04.141>
- Robinson, P. J., Dunnill, P., & Lilly, M. D. (1973). The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, *XV*, 603–606.

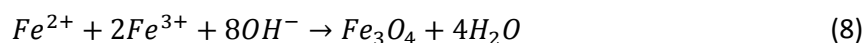
- Roca, A. G., Marco, J. F., Del Puerto Morales, M., & Serna, C. J. (2007). Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, 111(50), 18577–18584. <https://doi.org/10.1021/jp075133m>
- Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical Society Reviews*, 35(7), 583–592. <https://doi.org/10.1039/b502142c>
- Salaguer, J.-L. (2002). *SURFACTANTS Types and Uses. Laboratory of Formulation, Interfaces, Rheology and Processes* (Vol. 2). Merida: FiRP. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.019>
- Salata, O. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(1), 6. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-2-3>
- Sattler, K. D. (2011a). *Nanoparticles and Quantum Dots* (Vol. 3). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sattler, K. D. (2011b). *Principles and Methods Handbook of Nanophysics*. Boca Raton: CRC Press.
- Schwertmann, U., & Cornell, R. M. (1992). *Iron Oxides in the Laboratory. Mineralogical Magazine* (Vol. 56). Weinheim, Germany: WILEY-VCH. <https://doi.org/10.1180/minmag.1992.056.383.20>
- Seko, A., Yuge, K., Kuwabara, A., Oba, F., & Tanaka, I. (2006) *Prediction of ground-state structures and order-disorder phase transitions in II-III spinel oxides: A combined cluster-expansion method and first-principles study*. *Physical review B. Condensed matter*, 73(18): 184117.
- Serway, R. A., & Jewett, J. W. (2004). *Physics for scientists and engineers with modern physics*.
- Sharma, R., Thakur, P., Kumar, M., Thakur, N., Negi, N. S., Sharma, P., & Sharma, V. (2016). Improvement in magnetic behaviour of cobalt doped magnesium zinc nano-ferrites via co-precipitation route. *Journal of Alloys and Compounds*, 684, 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.05.200>
- Shi, B., Shin, Y. K., Hassanali, A. A., & Singer, S. J. (2015). DNA Binding to the Silica Surface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 119(34), 11030–40. <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b01983>
- Spaldin, N. A., & Mansbridge, J. (2011). *Magnetic materials: fundamentals and applications* (2nd ed.). Cambridge: Cambridge. <https://doi.org/10.1517/13543784.7.5.803>
- Srivastava, S., Awasthi, R., Gajbhiye, N. S., Agarwal, V., Singh, A., Yadav, A., & Gupta, R. K. (2011). Innovative synthesis of citrate-coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and its preliminary applications. *Journal of Colloid and Interface Science*, 359(1), 104–111. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.03.059>
- Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science*, 26(1), 62–69. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(68\)90272-5](https://doi.org/10.1016/0021-9797(68)90272-5)
- Sun, C., Lee, J. S. H., & Zhang, M. (2008). Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(11), 1252–1265. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2008.03.018>
- Suryanarayana, C., Grant Norton, M. (1998). *X-Ray Diffraction A practical Approach*. New York: Springer. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA , RNA , and Protein Extraction : The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Taylor, R., Coulombe, S., Otanicar, T., Phelan, P., Gunawan, A., Lv, W., ... Tyagi, H. (2013). Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids. *Journal of Applied Physics*, 113(1), 37. <https://doi.org/10.1063/1.4754271>
- Teixeira, A. M. R. D. F., Ogasawara, T., & Nóbrega, M. C. D. S. (2006). Investigation of sintered cobalt-zinc ferrite synthesized by coprecipitation at different temperatures: a relation between microstructure and hysteresis curves. *Materials Research*, 9(3), 257–262. <https://doi.org/10.1590/S1516-14392006000300003>
- Thermo Scientific. (2010). NanoDrop Spectrophotometers A280. *Thermo Scientific*, 32. <https://doi.org/10.1038/160852a0>
- Tyrode, E., Rutland, M. W., & Bain, C. D. (2008). Adsorption of CTAB on Hydrophilic Silica Studied by Linear and Nonlinear Optical Spectroscopy. *Journal of American Chemiistry Society*, 130, 17434–17445.
- Vallet-Regi, M., & Arcos Navarrete, D. (2015). *Nanoceramics in Clinical Use*. <https://doi.org/10.1039/9781782622550>
- Vogelstein, B., & Gillespie, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(2), 615–619. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.615>
- Watson, J. D., & Crick, F. H. C. (1953). Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature*, 171(4356), 737–738. Retrieved from <http://www.sns.ias.edu/~tlusty/courses/landmark/WatsonCrick1953.pdf>
- Wilfinger, W. W. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectro- photometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *BioTechniques*, 22(3), 474–481. <https://doi.org/10.2144/000113277>
- Woodard, D. L., Walters, H. A., & Down, A. J. (1997). Purification of dna on hydroxylated silicas. United States.
- Wu, W., He, Q., & Jiang, C. (2008). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397–415. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9174-9>
- Xu, X., Wang, J., Yang, C., Wu, H., & Yang, F. (2009). Sol-gel formation of gamma-Fe₂O₃/SiO₂ nanocomposites: Effects of different iron raw material. *Journal of Alloys and Compounds*, 468(1–2), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2008.01.013>
- Yamashita, T., & Hayes, P. (2008). Analysis of XPS spectra of Fe²⁺ and Fe³⁺ ions in oxide materials. *Applied Surface Science*, 254(8), 2441–2449. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2007.09.063>
- Zhao, X., Wang, W., Zhang, Y., Wu, S., Li, F., & Liu, J. P. (2014). Synthesis and characterization of gadolinium doped cobalt ferrite nanoparticles with enhanced adsorption capability for Congo Red. *Chemical Engineering Journal*, 250, 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.113>
- Zumbo, P. (2013). Phenol - chloroform Extraction. *Weill Cornell Medical College*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>

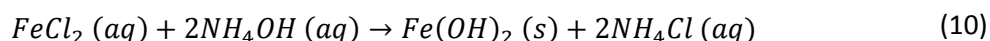
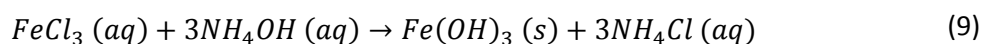
Anexos

Anexo A – Síntesis de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

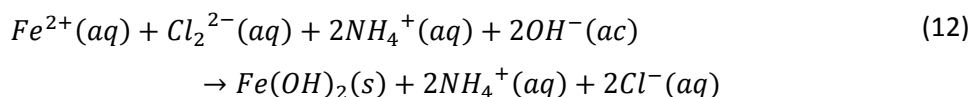
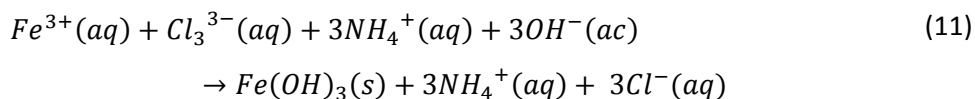
A continuación se describe la ecuación química de la reacción de precipitación de la magnetita Fe_3O_4



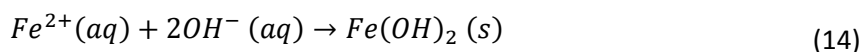
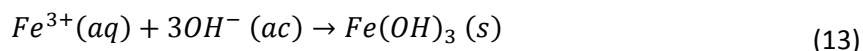
La ecuación anterior es nombrada propiamente la *ecuación iónica neta* de la reacción, la cual, se obtiene a partir de la ecuación de la reacción de precipitación de los reactivos en estado acuoso, en presencia de la base con la cual reaccionarán, que en este caso es el hidróxido de amonio. Por lo tanto, al tener dos reactivos en estado acuoso, podemos utilizar las reglas de solubilidad de la tabla 6 del anexo C y determinar la reacción de precipitación para ambos reactivos. Tanto el $FeCl_3$ como el $FeCl_2$ se encuentran en estado acuoso estos precipitan para dar lugar a los hidróxidos correspondientes, tal como s continuación:



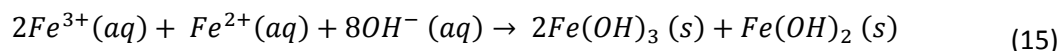
Las ecuaciones anteriores se suelen denominar *ecuaciones completas*, donde se encuentran presentes las fases acuosas y solidas de la reacción. Cada una por separado es una reacción de precipitación, y en conjunto las dos forman una coprecipitación. Expandiendo cada componente en sus respectivos iones, podemos expresar las ecuaciones en su *forma iónica*, tal como se muestra a continuación:



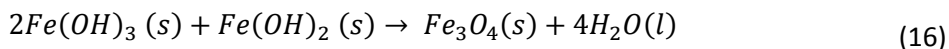
En ambas de las ecuaciones anteriores podemos observar que aparecen varios elementos que se repiten en ambos lados de la ecuación. Tales elementos, como los iones de cloro y los iones amonio, son los elementos espectadores. Debido a que en esta reacción estequiométrica los iones espectadores no afectan el equilibrio de la reacción, son removidos para así formar las siguientes ecuaciones iónicas netas:



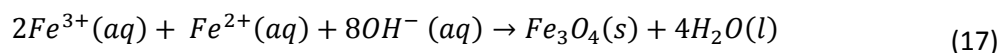
Dichas ecuaciones, son propiamente ecuaciones netas de dos procesos separados, las cuales deben de ser combinadas para describir la formación del compuesto final de magnetita. Debido a que el ion Fe^{3+} se encuentra en una proporción de 2:1 con respecto al ion Fe^{2+} , para que la ecuación final se encuentre balanceada multiplicamos por 2 la ecuación (13) y sumamos ambas expresiones, obteniendo así:



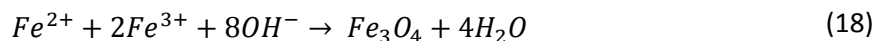
Esta proporción de los iones de hierro, además de ser la proporción estequiométrica correcta, resulta ser la óptima para sintetizar nanopartículas de tamaño reducido, debido a que, en la medida que se incrementa la proporción Fe^{3+}/Fe^{2+} , la deshidratación de los hidróxidos férricos y ferrosos es inducida por la formación preferencial del hidróxido férrico (Iida, Takayanagi, Nakanishi, & Osaka, 2007). Lo que sucede consecuentemente a la formación de los hidróxidos no solubles (y subsecuentemente de su deshidratación a magnetita) es una consecuencia de la reacción del cloruro de hierro soluble con los iones amoniacos presentes (Vallet-Regi & Arcos Navarrete, 2015).



De tal forma que de las ecuaciones (15) y (16) tenemos que la ecuación iónica neta para el proceso en general es:

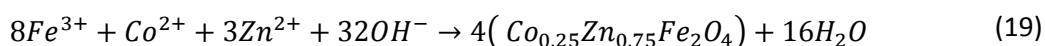


O de manera breve:

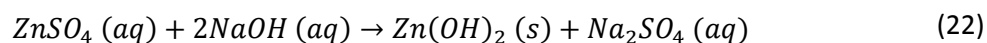
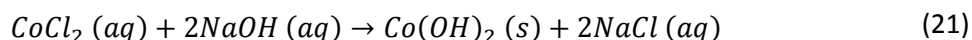
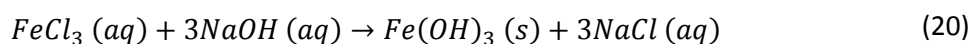


Anexo B – Síntesis de nanopartículas de ferrita de cobalto zinc ($Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe_2O_4$)

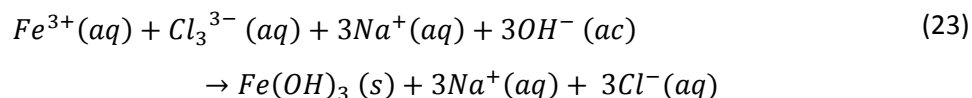
Para la síntesis de las nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto zinc, se siguió el protocolo de coprecipitación (Lopez et al., 2012) con las modificaciones necesarias para sintetizar las nanopartículas de fórmula no estequiométrica $Co_{0.25}Zn_{0.75}Fe_2O_4$ debido al comportamiento superparamagnético que tales nanopartículas presentan. La ecuación química para la síntesis de las nanopartículas se muestra a continuación:

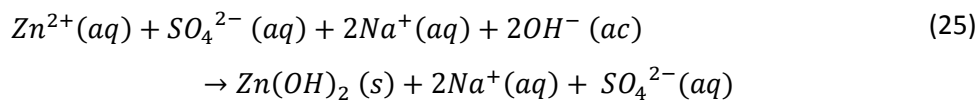
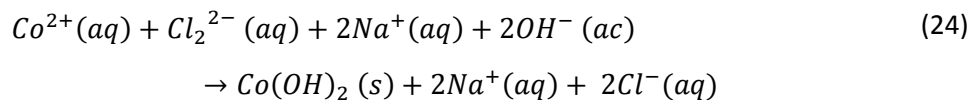


Utilizando las reglas de solubilidad de la tabla 6 del anexo C determinamos las reacciones de precipitación que componen dicha ecuación iónica neta, en donde encontramos varios compuestos disueltos en estado acuoso para precipitar con una base de hidróxido de sodio, y dar lugar a la formación de los elementos hidróxidos correspondientes, tal como se ve en las siguientes ecuaciones completas:

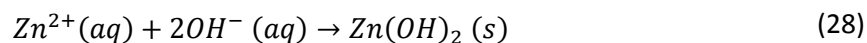
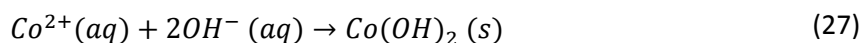
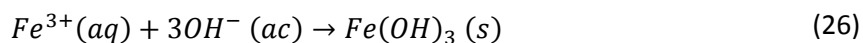


Expandiendo dichas ecuaciones podemos expresarlas en su forma iónica, tal como se muestra a continuación:

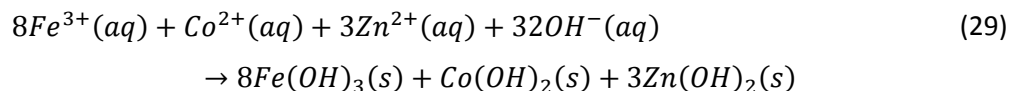




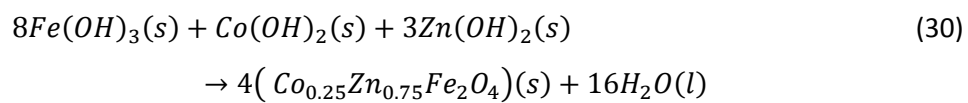
Donde observamos que en las tres ecuaciones aparecen varios elementos espectadores, tales como los iones de cloro, los iones sodio y los iones sulfato. Por lo tanto, al eliminar los iones espectadores no se afecta el equilibrio de la reacción y obtenemos las siguientes ecuaciones:



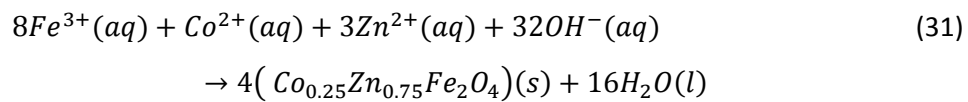
Debido a que el ion Fe^{3+} se encuentra en una proporción de 2:1 con respecto a la suma de las proporciones respectivas de iones Co^{2+} y Zn^{2+} es decir, una relación de 2:0.25:0.75 para el hierro, el cobalto y el zinc respectivamente, podemos arreglar dicha proporción para manejar números enteros con mayor facilidad. De tal manera que, al multiplicar la relación estequiométrica por 4, la proporción de iones es de 8:1:3 para los iones de hierro, cobalto y zinc respectivamente. Por lo tanto, la suma de las tres ecuaciones anteriores queda así:



Si consideramos entonces que la formación de los hidróxidos no solubles también conlleva a una deshidratación de ellos mismos como etapa intermedia de la coprecipitación de la ferrita de cobalto zinc, entonces se lleva a cabo la siguiente reacción para los hidróxidos parcialmente formados:



De tal forma que a partir de las ecuaciones (46) y (47) tenemos que la ecuación iónica neta para el proceso en general es:



O de manera breve:



Anexo C – Tabla de solubilidad

Para poder predecir si la reacción entre dos soluciones generará un precipitado, se necesita tener la información adecuada para saber cuáles compuestos iónicos de dichas soluciones son solubles en agua y cuáles no lo son. Por desgracia, actualmente no se cuenta con todas las reglas que abarcan las predicciones de solubilidad. En cambio, en base a estudios y observaciones experimentales se ha podido recopilar la suficiente información como para formar una pequeña guía de seis pasos que funcionan para la mayoría de los compuestos iónicos solubles. La tabla 6 a continuación muestra una guía de las reglas de solubilidad.

Tabla 6 Reglas de solubilidad. Pasos a seguir para determinar la solubilidad de compuestos iónicos.

Siga estas reglas en orden ascendente, dando preferencia a la enumeración antecedente cuando dos reglas se encuentren en conflicto. Esto entregará la predicción correcta en la mayoría de los casos.
Tabla obtenida a partir del libro (Petrucci, 2011)

1. Sales de cationes del grupo 1 (con algunas excepciones para Li^+) y de cationes NH_4^+ , son solubles.
2. Nitratos, acetatos y percloratos son solubles.
3. Sales de plata, plomo y mercurio (I) son insolubles.
4. Cloruros, bromuros y yoduros son solubles.
5. Carbonatos, fosfatos, sulfuros, óxidos e hidróxidos son insolubles (sulfuros de cationes del grupo 2 e hidróxidos de Ca^{2+} , Sr^{2+} y Ba^{2+} son ligeramente solubles).
6. Sulfatos son solubles con excepción de aquellos de calcio, estroncio y bario.