



APLICACIÓN DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR PARA LA CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE NANOPARTÍCULAS DE AU.

María Esther Bautista Ramírez^a, Yolanda Gomez y Gómez^a, Alejandro Cruz^b, José Abraham Balderas López^b

^aDepartamento de Bioprocesos, ^bDepartamento de Ciencias Básicas, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional, México D.F. maestherbr@gmail.com, mbautistar@ipn.mx

RESUMEN

Introducción: Las nanopartículas se definen como partículas cuyo tamaño es menor a 100nm, las nanopartículas metálicas se identifican por exhibir excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas que les confieren diversas aplicaciones que son totalmente dependientes a su tamaño nanométrico por lo que es importante realizar la caracterización de tamaño de las mismas. Actualmente existe una gran variedad de técnicas microscópicas para caracterizar físicamente nanopartículas que se identifican por ser técnicas costosas y muy complejas, por ello se propuso utilizar otra técnica alternativa para caracterizar nanopartículas, como es la electroforesis capilar, que en comparación a las técnicas microscópicas, se identifica por ser una técnica sencilla, de bajo costo y más accesible.

Metodología: se utilizaron estándares de nanopartículas metálicas de oro de 5, 50, 100, 200, y 300 nm obtenidas de Sigma®. Para la preparación de los buffers se utilizó ácido 3- ciclohexamino-1-1-propanosulfónico (CAPS) proveniente de Sigma®, dodecilsulfato sódico (SDS) procedente de Promega Corporation. Las separaciones se realizaron usando el sistema de Electroforesis Capilar Beckman Coulter Modelo: P/AC MDQ, se utilizó un capilar de sílice fundida (diámetro interno: 75µm y longitud total 33.4 cm).

Resultados y discusión: Se variaron condiciones como tipo y concentración de buffer, concentración de surfactante y voltaje, obteniendo mejores resultados utilizando buffer CAPS 10mM, SDS 70mM con un Voltaje de 30 Kv y un tiempo de inyección de 60 s a una longitud de onda de 532 nm donde se obtuvieron los tiempos de migración para las diferentes nanopartículas de Au 5nm(0.36 min), 50nm (0.44 min), 100nm(0.51min), 200nm(0.61min) y 300 nm (0.74 min) fig1.

Conclusiones: Se logró implementar un métodos para la caracterización de nanopartículas de oro mediante la técnica de electroforesis capilar, obteniendo una curva de calibración con una $R^2=0.99$ con la cual pueden caracterizarse nanopartículas en un intervalo de 5-300nm, utilizando buffer CAPS 10 mM, SDS 70 mM.

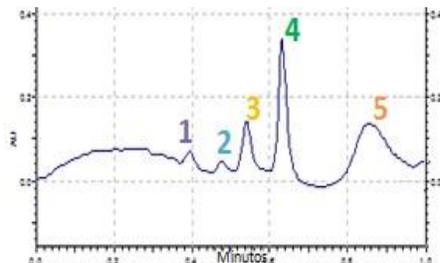


Figura 1. Electroferograma mezcla de nanopartículas de AU (1) 5nm, (2) 50nm, (3) 100nm, (4) 200nm y (5)



1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años los términos nanociencia y nanotecnología han originado gran relevancia en el ámbito científico, esto se debe a que la nanotecnología junto con otras ciencias se ha convertido en áreas prioritarias en el desarrollo científico y tecnológico actual. La nanociencia estudia todos aquellos fenómenos físicos o químicos que ocurren a una escala nanométrica en la que las propiedades de los materiales difieren significativamente de las que se pueden observar a gran escala, por su parte la nanotecnología se encarga de diseñar, conformar, sintetizar dispositivos o materiales a un nivel nano para usarse de forma práctica.

Nanociencia y nanotecnología, ciencia básica y ciencia aplicada respectivamente, tienen su fundamento en el estudio de los fenómenos ocurridos a escala nanométrica y en los llamados nanomaterial y constituyen un nuevo dominio científico que ha surgido para el diseño, manipulación, fabricación y aplicación de nuevas estructuras y materiales. A través de ellas se puede comprender la relación que se tienen entre las propiedades físicas y/o químicas de los materiales y las dimensiones de los mismos (Dominguez S.2011). Para comprender y tener una visión del mundo a escala nanométrica podemos visualizar la Figura 1.

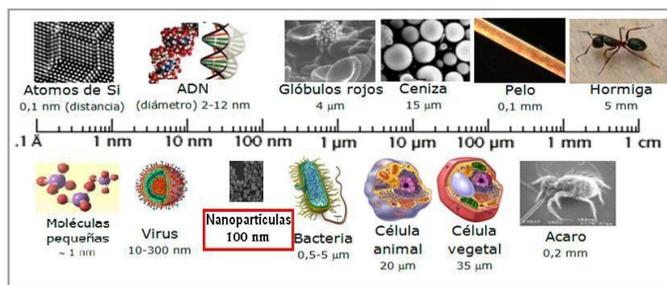


Fig.1. Escala nanométrica (www.quimicaviva.qb)

Hablar de nanómetros, es hablar de tamaños de moléculas muy pequeñas, a escala del tamaño de virus o del tamaño del ADN, donde también encontramos las llamadas nanopartículas.

Las nanopartículas metálicas han fascinado al mundo científico durante más de un siglo, en nuestros días son muy utilizadas en las ciencias biomédicas y la ingeniería. Son de gran interés debido a su enorme potencial en la nanotecnología. Actualmente las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas y modificadas con diversos grupos funcionales químicos que les permiten ser conjugados con anticuerpos, ligandos y fármacos de interés, abriendo así una amplia gama de potenciales aplicaciones en la biotecnología y medicina, sobre todo en el diagnóstico de enfermedades. Las nanopartículas metálicas se caracterizan por exhibir excelentes propiedades físicas, químicas y biológicas, que son totalmente dependientes a su tamaño nanométrico. Metales como oro, plata, paladio, hierro, titanio, bismuto, cobre entre otros, han sido empleados para fabricar nanopartículas de diversas formas y tamaños (Garduño M. 2011).

Las nanopartículas metálicas de oro presentan un extraordinario potencial como agente fototerapéutico en el tratamiento del cáncer, la elaboración de nanoestructuras, componentes electrónicos, vectorización de fármacos y moléculas terapéuticas, así como también se emplean en terapia génica como vehículos de plásmidos, DNA, RNA etc. El uso de oro con fines terapéuticos se remota a la antigüedad desde el manejo de oro coloidal en China en 2500 A.C., en el siglo XVI fue utilizado para tratar epilepsia y en el siglo XIX se utilizó para tratar la sífilis. Robert Koch descubrió su efecto como bacteriostático (Alqadi S., Remuñan C. 2009)

Las nanopartículas de oro pueden ser fácilmente funcionalizadas con amplios ligandos



anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc. (Figura 2), y producidas con distintos tamaños y formas, una de las ventajas que tiene sobre las demás partículas, es que pueden ser fácilmente preparadas y se pueden obtener diferentes tamaños entre 1 nm y 150 nm.

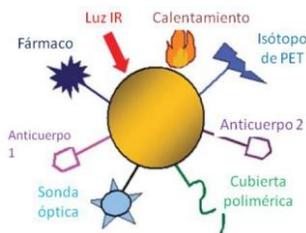


Fig. 2. Nanopartícula de oro funcionalizada

Caracterización de nanopartículas

Se pueden caracterizar diversas propiedades de las nanopartículas: Propiedades químicas, propiedades superficiales y tamaño y morfología.

Caracterización microscópica de nanopartículas

Como se ha mencionado, una de las características principales de las nanopartículas es su tamaño ya que muchas otras propiedades físico-químicas son dependientes del mismo, dichas propiedades pueden conferir a las nanopartículas diversas aplicaciones, como las que se han mencionado anteriormente, por ello es de suma importancia realizar una caracterización física de tamaño puesto que con base a su tamaño se definen sus aplicaciones, actualmente existe una gran variedad de técnicas microscópicas para la caracterización de nanopartículas, entre las cuales se encuentran la microscopia electrónica de transmisión (TEM), la microscopia de barrido túnel (SEM), microscopia de fuerza atómica (AFM), cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas respectivamente, pero tienen en común ser técnicas altamente costosas y muy complejas.

Electroforesis Capilar

La electroforesis capilar EC es una técnica utilizada para separar moléculas, permitiendo identificarlas y cuantificarlas. El principio de esta técnica, está basado en el desplazamiento de sustancias cargadas bajo un campo eléctrico por lo que la EC se puede definir como un método de separación de especies eléctricamente cargadas en solución, bajo la influencia de un campo eléctrico. En EC es importante el flujo electroosmótico que se origina por la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto un electrolito con una superficie sólida y cargada como son los capilares de sílice. El equipo de electroforesis capilar es relativamente sencillo y versátil (Fig. 3).

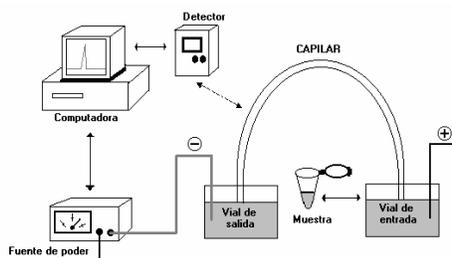


Fig. 3 Sistema general de electroforesis capilar

En EC la computadora controla la fuente de poder y la señal del detector. La muestra se introduce al capilar, generalmente por presión. La entrada y salida del capilar deben estar inmersas en el buffer que realiza la separación. Los electrodos, que están conectados a la fuente de poder, se encuentran en cada extremo del capilar. La corriente se establece de cátodo a ánodo. Cuando los analitos migran, pasan a través de una ventana dentro del mismo capilar y la señal se transforma para poder ser interpretada. En años recientes la electroforesis capilar EC ha tenido gran auge debido a las ventajas que presenta como método de separación de mezclas complejas, rapidez de análisis, mínimo uso de muestra y solventes orgánicos. (Castagnino J. 2000 y Ramírez A. 2012)

3. PARTE EXPERIMENTAL

Se utilizaron estándares de nanopartículas metálicas de oro de 5, 50, 100, 200, y 300 nm obtenidas de Sigma®. Para la preparación de los buffers se utilizó ácido 3- ciclohexamino-1-1- propanosulfónico (CAPS) proveniente de Sigma®, dodecilsulfato sódico (SDS) de Promega Corporation, buffers de boratos y fosfatos así como las ciclodextrina α y γ . Para preparar los buffers se utilizó agua desionizada. Todos los buffers que se utilizaron fueron preparados y filtrados con una membrana de 0.2 μm el día que se utilizaron. Todas las separaciones se realizaron usando el sistema de Electroforesis Capilar Beckman Coulter Modelo: P/AC MDQ, un capilar de sílice fundida recubierto de polimida (diámetro interno: 75 μm , longitud: 33.4 cm). Antes de ser utilizado, el capilar se trató con un lavado secuencial de 3 min por cada una de las soluciones siguientes, Agua desionizada, NaOH 1M, NaOH 0.1M y buffer de corrida, el capilar también se enjuaga con agua durante 3 min entre cada solución. Los experimentos de electroforesis capilar se realizaron a una temperatura de 25°C en un modo directo, utilizando diferentes métodos, (Tabla 1) en los cuales se variaron las condiciones de separación como buffer, voltaje, tiempo de inyección y longitud de onda. Antes de realizar la separación, las nanopartículas de oro fueron sonicadas durante 10 min utilizando el equipo ultrasónico Auto sciencie® modelo AS3120B.



De acuerdo a los diferentes tiempos de migración para las diferentes nanopartículas de Au 5nm(0.36 min), 50nm (0.44 min), 100nm(0.51min), 200nm(0.61min) y 300 nm (0.74 min) se realizó una regresión lineal donde se tiene una la siguiente ecuación $y=800.41x- 294.82$, donde se pueden caracterizar diferentes nanopartículas que tengan un tamaño entre 5 y 300 nm (fig. 5).

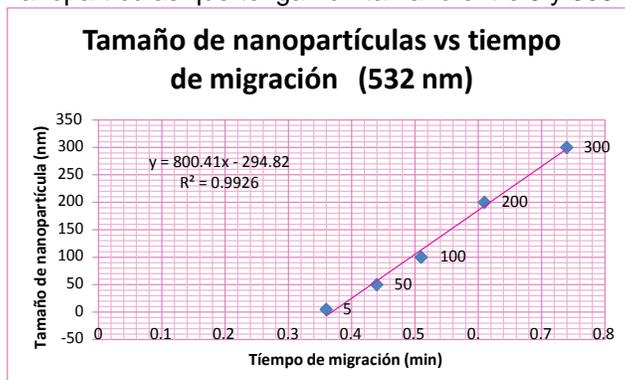


Fig.5. Gráfico del tamaño de nanopartícula vs tiempo de migración

4. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo se tienen las siguientes conclusiones: Se logró implementar un método para la caracterización de nanopartículas metálicas de oro mediante la técnica de electroforesis capilar. Utilizando la técnica de EC, se consiguió obtener una curva de calibración de tamaño de nanopartículas metálicas de oro con una $R=0.99$ con la cual pueden caracterizarse tamaños de nanopartículas en un intervalo de 5-300nm. Se logró observar los efectos que tienen diversas condiciones en los experimentos de EC, obteniendo mejores resultados utilizando buffer CAPS 10 mM, SDS 70 mM, un voltaje de 30 Kv. Se consiguió utilizar la electroforesis capilar como una técnica alternativa para la caracterización de nanopartículas metálicas de oro.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar M. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *Colletotrichum gloesporioides*. Tesis de doctorado, Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada, IPN, México.
2. Alqadi S., Remuñan C. (2009). *Nanopartículas metálicas: oro. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela.
3. Castagnino J. (2000). Bioquímica y fisicoquímica. *Electroforesis Capilar Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C. México*. 25, 13-32.
4. Domínguez S. (2011). *Síntesis de nanopartículas metálicas y de zeolitas para catálisis y separación de gases*. Tesis de doctorado. Universidad de Alicante.
5. Garduño Z. (2011). Fabricación de nanopartículas metálicas para aplicaciones fotovoltaicas. Tesis de Maestría, Escuela Superior de Ingeniería Mecánica y Eléctrica, IPN, México.
6. Ramírez A. G. (2012). *Desarrollo de un Método para la Determinación de Antibióticos en leche de Vaca por Electroforesis Capilar*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM, México.