



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias línea terminal Nanotecnología

Tesis

Desarrollo de una matriz de Sílice mesoporosa de
SBA-15 funcionalizada y su aplicación en la
purificación del ácido ribonucleico

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta
César Alejandro Díaz Cano

Dirigido por:
Dr. Rufino Nava Mendoza

Centro Universitario, Querétaro, Qro, Septiembre 2021. México



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

Maestría en Ciencias línea terminal Nanotecnología

Tesis

Desarrollo de una matriz de Sílice mesoporosa de SBA-15 funcionalizada y su aplicación en la purificación del ácido ribonucleico

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestría en Ciencias (Nanotecnología)

Presenta

César Alejandro Díaz Cano

Dirigido por:

Dr. Rufino Nava Mendoza

Dr. Rufino Nava Mendoza

Presidente

Dr. Juan Carlos Guillen

Secretario

Dra. María de los Ángeles Cuán

Hernández Vocal

Dra. Arely Irais Cárdenas Robles

Suplente

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro, Septiembre 2021. México

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Contenido

Índice de tablas.....	10
Índice de figuras.....	11
Resumen.....	8
Abstract.....	9
I. Introducción.....	13
II. Antecedentes	17
III. Justificación.....	19
IV. Descripción del Problema	20
V. Hipótesis y Objetivos.....	21
5.1. Hipótesis	21
5.2. Objetivo General	21
5.3. Objetivos Específicos.....	21
VI. Revisión Literaria	23
6.1. Fundamentación Teórica	23
6.1.1. Nanotecnología	23
6.1.2. RNA (Ácido Ribonucleico).....	23
6.1.3. Aplicación de la nanotecnología en la purificación del RNA	25
6.1.4. Métodos en la extracción y aislamiento del RNA.....	25
6.1.4.1. Métodos Convencionales	26
6.1.4.2. Extracción en Fase Sólida.....	26
6.1.5. Materiales Mesoporosos	27
6.1.6. Síntesis de materiales mesoporosos por el método de sol-gel.....	28
6.1.7. Funcionalización por grupos orgánicos.....	29
6.1.8. Nanopartículas de Sílice Mesoporosos en la transportación ácidos nucleicos	30
6.1.9. Electroforesis en gel.....	32
VII. Metodología	34
7.1. Materiales.....	34
7.2. Métodos	34
7.2.1. Procedimientos de preparación de la sílice mesoporosa SBA-15	34
7.2.1.1. Procedimientos funcionalización de la SBA-15 con grupos amino (NH ₂)	36
7.2.1.2. Procedimientos funcionalización de la SBA-15 con grupos mercapto (SH).....	37
7.2.2. Síntesis de la esponja mesoporosa de sílice (EMS-15).....	38
7.2.2.1. Funcionalización de la EMS-15 con grupos amino	39
7.2.3. Procedimiento de extracción del RNA.....	39
VIII. Resultados y Discusión.....	41

8.1. Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ a 77K.....	41
8.1.1. SBA-15 nativa y funcionalizada.....	42
8.1.2. EMS-15 nativa y funcionalizada.....	45
8.2. Difracción de Rayos X a bajos ángulos.....	48
8.2.1. SBA-15 nativa y funcionalizada.....	48
8.2.2. EMS-15 nativa y funcionalizada.....	52
8.3. Microscopias Electrónicas de Transmisión y Barrido de Alta Resolución.....	53
8.3.1. Microscopia Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM).....	54
8.3.2. Microscopia Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HRSEM): SBA-15 nativa.....	54
8.3.3. Microscopia Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HRSEM): EMS-15 nativa.....	54
8.4. Análisis termogravimétrico (TGA).....	55
8.4.1. SBA-15 nativa y funcionalizada.....	55
8.4.2. EMS-15 nativa y funcionalizada.....	58
8.5. Micro-espectroscopia Raman de la SBA-15 nativa y funcionalizada.....	61
8.6. Espectroscopia de Infrarrojo (FT-IR) de la EMS-15 nativa y funcionalizada.....	63
8.7. Purificación del RNA.....	64
IX. Conclusión.....	70
X. Referencia.....	72

Índice de Figuras

Dogma Central	24
Mecanismo de síntesis del material mesoporoso SBA-15	29
Post-síntesis de los grupos funcionales	30
Sistema de electroforesis en gel	33
Esquema del procedimiento de preparación de la SBA-15.....	35
Esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 con grupos amino.....	37
Esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 con grupos mercapto	38
Isoterma de adsorción-desorción de N ₂ del material de sílice mesoporoso SBA-15	42
Isoterma de adsorción-desorción de N ₂ del material de sílice mesoporoso SBA-15 funcionalizado con grupos amino	42
Distribución del diámetro de poro del material de sílice mesoporoso SBA-15.....	43
Distribución del diámetro de poro de la sílice mesoporoso SBA-15-NH ₂	44
Isotermas de adsorción-desorción de N ₂ de la EMS-15 y de la EMS-15-NH ₂	46
Distribución del tamaño de poro de la EMS-15 y EMS-15-NH ₂	47
Patrones de Difracción de Rayos-X a bajos ángulos de las sílices mesoporosas	50
Patrones de Difracción de Rayos-X a bajos ángulos de las sílices mesoporosa pura y funcionalizada con grupos -NH ₂ y -SH.....	51
Difractogramas de los materiales: a) EMS-15 nativa y b) EMS-15 funcionalizada (EMS-15-NH ₂).....	52
Imagen de HRTEM del material de sílice mesoporoso SBA-15.....	53
Imagen de SEM del material de sílice mesoporoso SBA-15.....	54
Imagen de SEM de la esponja de sílice mesoporosa ESM-15	55
Termograma de la pérdida de peso para las sílices mesoporosas nativa y funcionalizadas....	57
Primera derivada de la pérdida de peso (DTG) para las sílices mesoporosas pura y funcionalizadas.....	58
Termograma de la EMS-15	59
Termograma de la muestra NH ₂ /EMS-15.....	60
Espectro Raman de la SBA-15 nativa	61
Espectro Raman de la SBA-15 funcionalizada con grupos amino	62
Espectro Raman de la SBA-15 funcionalizada con grupos mercapto.....	63
Espectro FT-IR de la EMS-15 y de la EMS-15-NH ₂	64
Electroforesis en gel de la SBA-15 nativa y con grupos funcionalizados usando un Mini-Protean II y expuesta a través de la luz UV	65
Electroforesis en gel donde la cantidad de SBA-15 y EMS-15 varía de acuerdo con la concentración que se llegó a utilizar	66
Electroforesis en gel de la SBA-15 y EMS-15 expuestas a través de la luz UV	67
Electroforesis en gel utilizando 3NH ₂ -EMS-15 en diferentes bacterias.....	68
Electroforesis en gel de la 3NH ₂ -SBA-15 y 3NH ₂ -EMS-15 con diferentes variaciones en la concentración expuestas a través de la luz UV	69

Resumen

La expresión genética es fundamental en el funcionamiento en una célula, por lo tanto, el ácido ribonucleico (RNA) es esencial en ese proceso. Su detección ha permitido generar, por ejemplo; diagnósticos de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, trastornos hereditarios y tumores, e incluso investigación básica. Para proporcionar resultados más confiables se recurre a técnicas de biología molecular con fin de extraer células procariotas o eucariotas, pero se necesita obtener biomoléculas de RNA puras e intactas. Por lo tanto, purificar el RNA es un paso crítico, para la obtención de moléculas de RNA de buena calidad (puras e intactas). Los métodos de purificación se pueden dividir en tres grupos. El primero se basa en la extracción orgánica utilizando fenol: cloroformo. El segundo grupo abarca métodos de purificación del RNA por medio de la capacidad de absorción superficies específicas en presencia de sales caotrópicas y el tercer grupo incluye métodos que explotan el aislamiento del RNA en gradientes isopícnicos. Precisamente, los métodos de adsorción, son los más eficientes y rápidos en obtener un RNA de alta calidad. Por estas razones en este proyecto de tesis se desarrollaron sílices mesoporosas del tipo SBA-15 (Santa Bárbara Amorfo Número 15) y EMS-15 (Esponja Mesoporosa de Sílice Número 15) nativas y funcionalizadas con grupos amino y mercapto, como materiales adsorbentes para la purificación del RNA. Estas sílices mesoporosas funcionalizadas poseen adecuadas propiedades texturales (diámetro de poro en el rango de mesoporoso de 7 y 30 nm y alta área superficial de hasta $950 \text{ m}^2/\text{g}$) y permitieron realizar la adsorción de biomoléculas de RNA sobre su superficie, a través de los grupos funcionales. Además, se puede considerar que estos materiales adsorbentes realizaron la purificación de las moléculas de RNA con tamaño uniforme. Con el propósito de encontrar una explicación al comportamiento de los materiales adsorbentes en la purificación de RNA, estos fueron caracterizados mediante Difracción de Rayos X a bajo ángulo (SAXRD, Small-Angle X-Ray Diffraction) y espectroscopía de Raman.

Abstract

Genetic expression is essential in the functioning in a cell; therefore, ribonucleic acid (RNA) is essential in this process. Its detection has allowed to generate for example; diagnoses of viral, bacterial and parasitic diseases, inherited disorders and tumors, and even basic research. To provide more reliable results, molecular biology techniques are used to extract prokaryotic or eukaryotic cells, but it is necessary to obtain pure and intact RNA biomolecules. Therefore, purifying the RNA is a critical step to obtain good quality RNA molecules (pure and intact). The purification methods can be divided into three groups. The first is based on organic extraction using phenol: chloroform. The second group encompasses methods of RNA purification by means of specific surface absorption capacity in the presence of chaotropic salts and the third group includes methods that exploit the isolation of RNA in isopycnic gradients. Precisely, adsorption methods are the most efficient and fastest in obtaining high-quality RNA. For these reasons, in this thesis project, mesoporous silicas of the type SBA-15 (Santa Bárbara Amorphous Number 15) and MMS-15 (Mesoporous Silica Sponge Number 15) were developed native and functionalized with amino and mercaptan groups, as adsorbent materials for the RNA purification. These functionalized mesoporous silicas possess adequate textural properties (pore diameter in the mesoporous range of 7 and 30 nm and high surface area of up to 950 m² / g) and allowed the adsorption of RNA biomolecules on their surface, through the functional groups. Furthermore, it can be considered that these adsorbent materials performed the purification of the RNA molecules with uniform size. In order to find an explanation for the behavior of the adsorbent materials in RNA purification, they were characterized by low angle X-ray Diffraction (SAXRD, Small-Angle X-Ray Diffraction) and Raman spectroscopy.

I. Introducción

Las reglas de la transmisión de la información genética fueron acuñadas a finales de los 50s del siglo pasado por el Dogma Central de la Biología Molecular por el Dr. Francis Harry Compton Crick un físico, biólogo molecular y neurocientífico británico, que establece que la transferencia de la información sigue el camino desde el ácido desoxirribonucleico (DNA) a proteína a través del ácido ribonucleico (RNA) mientras que el camino inverso es imposible (Crick, 1970). Aunque este concepto fue parcialmente revisado, este sentó las bases para la división de moléculas activas biológicamente en informacional (DNA) y funcional (proteínas). En esta perspectiva, el papel del RNA resulta ser más completo, pues este cumple con funciones estructurales, informáticas, así como regulatorias.

Los ácidos nucleicos fueron descubiertos en 1869 por J.F. Miescher como sustancia química rica en fósforo, azufre y nitrógeno y denominada "nucleico" de acuerdo a su localización en el núcleo de las células. Los primeros y novedosos experimentos que se enfocaron a la pureza datan desde 1960, cuando Kurland y colaboradores desarrollaron el primer aislamiento utilizando centrifugación con cloruro de cesio (CsCl). En 1968, Kirby, introdujo el método de aislamiento de RNA con fenol:cloroformo. Más tarde, Chirgwin presentó la purificación utilizando tiocianato de guanidinio (plasma de membrana de proteína desnaturalizada) y β -mercaptoetanol (agente reductor) seguida por extracción con etanol o ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Chirgwin et al., 1979). Debido a que estos protocolos resultaron ser muy laboriosos y prolongados y además que presentaron muchas desventajas y problemas de reproducibilidad, se tuvieron que realizar muchas mejoras a estos métodos.

Chomczynski y Sacchi (1987) hicieron el método más directo mediante el acoplamiento de todas las etapas de extracción en una sola, mediante el uso de un reactivo compuesto de tiocianato de guanidinio, fenol y cloroformo. Esto disminuyó tanto los requerimientos de tiempo y el tamaño de muestra necesaria, incrementando así la eficiencia del método y minimizando la pérdida de RNA.

Recientemente, la importancia de los análisis por RNA se ha incrementado debido a las demandas crecientes tanto en la ciencia básica como aplicada, así como en las áreas clínicas.

Entonces, la purificación del RNA es una primera etapa crítica de una multitud de técnicas analíticas que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (PCR), reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), microarreglos, análisis de Northern Blot, análisis de protección de nucleasa, mapeo de RNA, traslación *in vitro* y construcción de biblioteca de cADN. Consecuentemente, hay una demanda creciente por kits disponibles comercialmente, las cuales están diseñadas para RNA puro y de alta calidad, íntegro y puro, para aplicaciones analíticas o necesidades científicas.

Independiente del principio de aislamiento de RNA utilizado, los protocolos de purificación individual tienen un número de requerimientos comunes. Primeramente, como una regla general, el material biológico debe ser manipulado de manera segura. Apropiado almacenamiento de muestras como por ejemplo en nitrógeno líquido o a -70°C o en el agente de conservación apropiado (por ejemplo, "RNA Later" desde Qiagen, Valencia, CA) es crítico. Cuando las muestras son colectadas desde animales sacrificados o de cadáveres, es importante limitar el período entre la muerte y la colección de la muestra para el mejor rendimiento de RNA de alta calidad. Antes de la separación, las muestras deben ser mecánicamente homogeneizadas o tratadas enzimáticamente. Debido a la alta tasa de degradación del RNA durante el procesamiento, todas las precauciones típicas en contra de la contaminación por la RNasa deben ser rigurosamente observados, es decir, se deben usar guantes en todo momento y cambiados frecuentemente para evitar introducción de las "RNasas". Bolsas que contienen tubos y botes de solución deben ser cerradas cuando ellas no están en uso para evitar contaminación por polvo. En paralelo, RNasas endógenas que naturalmente están presentes en los tejidos deben ser inactivados mediante inhibidores o por tratamiento químico tan rápido como sea posible después de haber colectado la muestra. El reactivo más comúnmente utilizado para tal propósito es el tiocianato de guanidinio, un fuerte desnaturante caotrópico. La degradación de RNA también puede ir disminuyendo el tamaño de la muestra (tejidos o células).

Las etapas posteriores en el aislamiento del RNA se basan en la diferente solubilidad de los constituyentes del material homogenizado. En ese punto, los tipos particulares de

las estrategias de purificación del RNA se pueden dividir en tres grupos. El RNA es recuperado ya sea desde la solución usando separación específica como se describirá más adelante, o por precipitación alcohólica. Para solucionar problemas de degradación del RNA, se puede utilizar un "sistema de reportero" de transcripción de RNA sintético radiomarcado. Si el RNA etiquetado intacto ^{32}P se recupera en el paso final, entonces el protocolo trabaja óptimamente. Los rendimientos esperados del RNA varían ampliamente entre los tejidos. Los tejidos como el hígado o el riñón suelen tener un mayor contenido de RNA y rendimientos en comparación con tejidos como el músculo, los pulmones o el cerebro. Como se mencionó anteriormente, hay tres enfoques básicos utilizados para aislar el RNA celular: (i) procedimientos basados en la diferente solubilidad de los componentes celulares en disolventes orgánicos, como fenol, etanol o isopropanol; (ii) métodos basados en la adsorción de RNA a superficies específicas en presencia de sales caotrópicas; (iii) protocolos que explotan la separación de RNA en centrifugación de gradiente isopícnico.

En la actualidad, la nanotecnología se ha abordado en la creación y aplicación de materiales a escala nanométrica aprovechando de todos modos dos técnicas basadas en enfoques top-down o ensamblaje bottom-up (Guo. P, 2011). En particular, se utilizan en el área de la nanomedicina donde prometen un gran uso en su beneficio y poder cambiar paradigmas en terapia e ingeniería de tejidos, ya que son excelentes como nanoportadores como una alta relación superficie a volumen, fácil modificación de superficie e ingeniería para obtener partículas de diversos tamaños, formas y diferentes características químicas. Además, deben ser biocompatibles, biodegradables y de baja toxicidad (Narayam, 2018).

Las estrategias actuales para la liberación de ácidos nucleicos se basan principalmente en la asociación de diferentes portadores, tales como vectores de virus, nanopartículas lipídicas y péptidos, para ello deben superar sus limitaciones inherentes. Los portadores ideales para la liberación de ácidos nucleicos deben poseer características tales como una síntesis y sencilla modificación en la agregación de grupos orgánicos, capaz de cargar de ácidos nucleicos, excelente biocompatibilidad y una alta movilidad. Pero existen problemas que surgen durante la administración de los

ácidos nucleicos con el uso de portadores como vectores de virus, la citotoxicidad inducida por las nanopartículas de lípidos, la pobre eficiencia de manejo de péptidos, lo que ha llevado a una necesidad urgente de desarrollar vehículos alternativos. Lo que lleva el uso de nanopartículas, que poseen formas y tamaños definidos, y estos portadores son bastante prometedores en la entrega de moléculas. Gracias a sus estructuras únicas y de grandes áreas de superficie, permiten la carga eficiente de diferentes moléculas, y además de la presencia de grupos químicos en la superficie de las nanopartículas, lo que permite la introducción de otras funcionalidades, tales como ligandos para la búsqueda de objetivos selectos y fluoróforos para el seguimiento del proceso de entrega. La biocompatibilidad y la eficiencia de entrega de estos nanoportadores son parte crucial en el éxito de la liberación de los ácidos nucleicos (Wenzhang Chan, 2017).

A diferencia de las nanopartículas en base de metales pesados, las nanopartículas de sílice mesoporosas (MSN o MSNP) son materiales nanoestructurados a base de sílice que presentan una excelente biocompatibilidad y estabilidad química. En comparación con otros nanomateriales, las MSN poseen características únicas, como grandes superficies, estructuras porosas únicas, grandes volúmenes de poros y tamaño de poro uniforme y ajustable, que han recibido gran atención en los últimos años por su uso como biomateriales para diversas aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, los MSN se han utilizado ampliamente en la inmovilización de enzimas, ingeniería de tejidos, diagnóstico y liberación de diversos fármacos, como fármacos de moléculas pequeñas y ácidos nucleicos (Wenzhang Chan, 2017; Narayam, 2018).

II. Antecedentes

En las últimas décadas, han existido diferentes métodos en la extracción y aislamiento de biomoléculas como DNA, RNA y proteínas, aunque depende del tipo de estudio o investigación que se quiere realizar. Sin embargo, todos comparten el hecho de que estas moléculas se encuentran en el interior de estructuras membranosas y están asociadas con las proteínas, se requiere el uso adecuado de ciertas sustancias para obtener una muestra pura libre de contaminantes como carbohidratos, lípidos, proteínas u otro ácido nucleico.

Generalmente, los procedimientos para purificar un ácido nucleico se basan en cuatro importantes pasos:

- Interrupción efectiva de células o tejidos.
- Desnaturalización de proteínas complejas.
- Inactivación de nucleasas
- Separación de contaminantes

El RNA es una molécula inestable y tiene una vida media muy corta una vez que se extrae de la célula o los tejidos. Existen varios tipos de RNA de origen natural, que incluyen RNA ribosómico (rRNA) (80% - 90%), RNA mensajero (mRNA) (2,5% - 5%) y RNA de transferencia (tRNA) (2,5% - 5%). Se requieren cuidados y precauciones especiales para el aislamiento del RNA tal como está susceptible a la degradación. El RNA es especialmente inestable debido a la presencia ubicua de RNasas que son enzimas presentes en la sangre, todos los tejidos, así como la mayoría de las bacterias y hongos en el medio ambiente. Siempre se han usado desnaturizantes fuertes en el aislamiento de RNA intacto para inhibir las RNasas endógenas. La extracción de RNA se basa en una buena técnica de laboratorio y una técnica libre de RNasa (Siun, 2009).

Actualmente, se ha tomado ventaja de la sílice mesoporosa como uno de los materiales inorgánicos con el propósito de ser portadores en la adsorción de biomoléculas, la sílice mesoporosa es un material reactivo significativamente útil. Posee varias características

que son aprovechados como tener una alta superficie específica y un gran volumen de poro; además, de poder modificar sus propiedades físico-químicas con la incorporación de componentes orgánicos en su superficie, en su estructura, o atrapados en sus canales; y de esta manera poder controlar su tamaño de poro, y las propiedades de la superficie.

Uno de estos ejemplos es la investigación de Ryouchi y colaboradores donde utilizan un material mesoporoso de forma esférica funcionalizada con grupos amino en la adsorción del RNA de manera selectiva y su capacidad de adsorción. Ellos indican que las partículas de 50 nm de poro poseen la capacidad de adsorber el RNA de manera selectiva y la mantiene intacta. Así también, la cantidad de amino que utilizan es con base en la proporción de 12/1 tetraetoxisilano/aminopropilsilano donde obtienen 272.6 µg/mg y es capaz de adsorber el RNA selectivamente cuatro veces más que los métodos tradicionales (Ryouchi, 2017).

Por otro lado, también lo han utilizado para purificar RNA de bacterias como por ejemplo *Escherichia coli* basado en nanopartículas recubiertas de silicio magnéticas, las ventajas que presenta es capaz de aislar el DNA a la vez que el RNA, el ácido nucleico de manera pura y con una alta calidad (Jiuhai, 2015).

III. Justificación

El RNA es de gran importancia en una amplia gama de análisis de laboratorio, especialmente, en el diagnóstico de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias, el diagnóstico de trastornos hereditarios y tumores, así como en investigación básica. Para proporcionar resultados relevantes y fiables, las técnicas de biología molecular utilizadas para tales fines requieren moléculas puras e intactas de RNA purificado. El RNA se puede extraer de organismos procariontes o eucariotes, a partir de diversos materiales heterogéneos, como tejidos frescos o congelados, líneas celulares, productos de PCR o muestras químicamente conservadas por largo tiempo. Por lo tanto, la purificación del RNA se convierte en un paso crítico, para la obtención de moléculas de RNA de buena calidad (puras e intactas).

Precisamente, los métodos de adsorción, que se basan en la habilidad del RNA para enlazarse a una superficie específica en la presencia de sales caotrópicas, son de los kits más disponibles en el mercado, debido a que son métodos rápidos y fáciles de aplicar, además de proporcionar RNA con alta calidad y pureza.

En este proyecto de tesis se aplicarán sílices mesoporosas del tipo SBA-15 y EMS-15 funcionalizadas con grupos amino y mercapto, como materiales adsorbentes para la purificación de RNA. Como algo novedoso en este proyecto, se espera que estos materiales adsorbentes realicen la purificación de moléculas de RNA con tamaño uniforme.

IV. Descripción del Problema

Si bien, los métodos actuales de adsorción, que se basan en la habilidad del RNA para enlazarse a una superficie específica en la presencia de sales caotrópicas, son de los kits más disponibles en el mercado ya que son métodos rápidos y fáciles de aplicar, y que proporcionan RNA con alta calidad y pureza, presentan ciertas desventajas, una de las cuáles es la aglomeración de los materiales adsorbentes, dificultando la recuperación del RNA. Otra desventaja importante, es que el RNA purificado presenta diversos tamaños, es decir, una distribución no uniforme en tamaño.

Por estas razones en este proyecto de tesis se efectuará el desarrollo de sílices mesoporosas del tipo SBA-15 y EMS-15 funcionalizadas con grupos amino y mercapto, como materiales adsorbentes para la purificación de RNA. Estas sílices mesoporosas funcionalizadas que poseen adecuadas propiedades texturales (diámetro de poro en el rango de mesoporoso de 7 a 20 nm y alta área superficial de hasta $950 \text{ m}^2/\text{g}$) permitirán realizar la adsorción de moléculas de RNA sobre su superficie a través de los grupos funcionales. Además, se espera que estos materiales adsorbentes realicen la purificación de moléculas de RNA con tamaño uniforme.

V. Hipótesis y Objetivos

5.1 Hipótesis

La presencia de los grupos funcionales amino y mercapto junto con las apropiadas características texturales (alta área superficial, diámetro del poro en el rango mesoporoso y alto volumen de poro) de la sílice mesoporosa permitirá formular un material absorbente con habilidad para enlazar moléculas de ácidos ribonucleicos para una purificación eficiente.

5.2 Objetivo General

Desarrollar un método eficiente para purificar ácidos ribonucleicos de tamaño uniforme y con alta pureza, mediante el uso de partículas de sílice mesoporosa del tipo SBA-15 EMS-15 funcionalizada con grupos amino y mercapto.

5.3 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos de este proyecto son los siguientes:

1. Aplicar las metodologías experimentales para la preparación de los materiales mesoporosos de sílice SBA-15 y EMS-15, y su funcionalización con grupos amino y mercapto.
2. Determinar las propiedades estructurales, morfológicas y tamaño de partícula de la sílice mesoporosa SBA-15 y EMS-15, y la presencia de los grupos amino y mercapto en los materiales.
3. Desarrollar la metodología experimental para determinar la capacidad de adsorción de RNA a partir de una cepa bacteriana del género *Bacillus subtilis* en la superficie de la sílice mesoporosa SBA-15 y de la EMS-15 nativas y funcionalizadas.

Estructura de la tesis

La tesis es organizada de la siguiente manera:

- **Capítulo 2:** es el análisis de la Revisión Bibliográfica, de los trabajos previos y de los que existen actualmente, sobre el tema.
- **Capítulo 3:** trata de las Metodologías Utilizadas para la realización de las actividades experimentales y de las diferentes técnicas de caracterización.
- **Capítulo 4:** se presentan y analizan los Resultados obtenidos en esta tesis.
- **Capítulo 5:** se establecen las Conclusiones del trabajo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

VI. Revisión Literaria

6.1 Fundamentación teórica

6.1.1 Nanotecnología

Desde hace varias décadas la nanotecnología ha ganado notoriedad en el campo de la biomedicina, por sus capacidades de obtener moléculas biocompatibles con el cuerpo humano, sin causar daños en las células por citotoxicidad, además de reducir los efectos secundarios de los medicamentos. Todo esto es posible con el manejo de las nanopartículas al ser sistemas de baja dimensión y poseer propiedades particulares como de ser catalizadores, su alta capacidad de adsorción y el poder que tienen de actuar como sensores. Actualmente existen investigaciones de su uso como nanoportadores basados en lípidos, nanopartículas poliméricas, dendrímeros (Peña & Vallet, 2010; Percin, İdil & Denizli, 2018; Smuszkiewicz, 2017).

Uno de los progresos más destacables con la nanotecnología, es el uso de materiales nanoporosos, en específico materiales mesoporosos de sílice, por sus adecuadas propiedades texturales (alta área superficial, diámetro de poro en el rango mesoporos y alto volumen de poro). Además, de poseer tamaños de poros uniformes y ajustables, y una apropiada y sencilla funcionalización de la superficie interna y externa de los poros. Las características anteriores, hacen de estas sílices mesoporosas, por ejemplo, interesantes materiales portadores de medicamentos.

6.1.2 RNA (ácido ribonucleico)

Toda la información necesaria para la supervivencia, mantenimiento y crecimiento de las células se encuentra en los genes, principalmente se componen de biomoléculas como

DNA (ácido desoxirribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) y proteínas, las cuales son construidas por unidades monoméricas como nucleótidos y aminoácidos. Físicamente, los genes se localizan en los cromosomas o en otras moléculas conocidas colectivamente como elementos genéticos. El DNA es el material genético de los organismos vivos, desde las bacterias unicelulares hasta los mamíferos multicelulares, y con el RNA convierte el patrón del DNA en una secuencia de aminoácidos conocidas como proteínas (Cramer, 2006; Galván, 2011; Brock & Madigan, 2015; Ríos, 2006).

Por lo general, los genes que llegan a contener las instrucciones para generar proteínas se expresan en un proceso de dos pasos:

Transcripción: La secuencia de DNA de un gen se copia para obtener una molécula de RNA. Este proceso es llamado transcripción porque implica reescribir, o transcribir, la secuencia de DNA en un "alfabeto" de RNA similar. En eucariontes, la molécula de RNA debe someterse a un procesamiento para convertirse en un **RNA mensajero (mRNA)** maduro.

Traducción: la secuencia de mRNA se decodifica para especificar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido (cadena proteica). El nombre traducción refleja que la secuencia de nucleótidos del mRNA se debe traducir al "idioma", completamente diferente, de los aminoácidos.

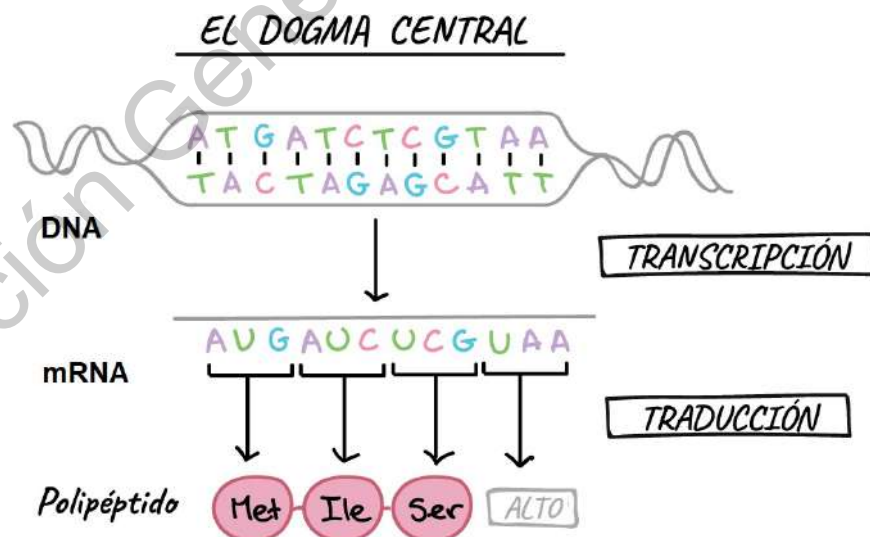


Figura 1. Dogma Central

Por lo tanto, durante la expresión de un gen codificante de proteína, la información fluye de manera DNA→RNA→Proteína. En este flujo de información se le conoce como el

dogma central. Aunque también hay genes no llegan a ser codificantes (genes que producen RNA funcionales), pueden hacer lo mismo en transcribir para producir RNA, pero este RNA no se traduce en un polipéptido (cadena de aminoácidos). Para cualquier tipo de gen, el proceso de pasar de DNA a producto funcional se conoce como **expresión génica** (Khan Academy, 2015; Alberts, Johnson, Lewis, Morgan, Raff, Roberts & Hunt, 2010; Reece, Meyers, Urry, Cain, Wassermans & Minorsky, 2015; Sadava & Purves, 2009).

6.1.3 Aplicación de la nanotecnología en la purificación del RNA

Actualmente, las partículas de Sílice Mesoporosas han empezado a ganar auge en la biomedicina al ser útiles como vehículos de entrega, por sus singularidades de tener altos valores de área superficial y volumen de poro, morfología controlable y excelente biocompatibilidad, y por ende permite tanto encapsular como proteger, por lo cual pueden ser útiles en la liberación controlada de fármacos e incluso en los procesos de extracción y purificación de macromoléculas como proteínas, Ácidos Desoxirribonucleicos (DNA) y Ácidos Ribonucleicos (RNA) (Beltrán & Ángela, 2017; Mehmood, Yaqoob, Gohar & Ahmad, 2017; Narayan, Nayak, Raichur & Gars, 2018).

6.1.4 Métodos en la extracción y aislamiento del RNA

En la actualidad, los métodos de purificación se basan en cuatro pasos claves: la interrupción eficaz de las células o tejidos; la desnaturalización de proteínas complejas; inactivación de nucleasas, por ejemplo, las RNAsas de la extracción del RNA y la separación de contaminantes (Tan & Yiap, 2009). La selección de ácidos nucleicos debería ser libre de contaminantes incluyendo proteínas, carbohidratos, lípidos, u otro ácido nucleico, por ejemplo, RNA libre de DNA. La calidad y además de la integridad del aislamiento del ácido nucleico afectan directamente los resultados que se obtienen.

Por otro lado, el RNA es una molécula inestable y tiene un tiempo de vida muy corta una vez extraído de las célula o tejidos. Hay varios tipos de RNAs que existen naturalmente

incluyendo RNA ribosomal (rRNA) (80%-90%), RNA mensajero (mRNA) (2.5%-5%) y RNA transferencia (tRNA). Por lo cual, se debe tener una precaución especial en el aislamiento del RNA al ser susceptible a la degradación.

Los métodos más comunes en la extracción y aislamiento se dividen en dos clases: la utilización de 4M tiocianato de guanidinio y la utilización de fenol y dodecilsulfato sódico (SDS).

6.1.4.1 Métodos convencionales

El método es laborioso y se utiliza el tiocianato de guanidinio como un agente caotrópico en la degradación de proteínas. Lo principal de este paso es la técnica de separación de sólidos RNA del DNA después de la extracción con una solución ácida que consiste de tiocianato de guanidinio, acetato de sodio, fenol y cloroformo. Aunque su principal desventaja es su incompleta disociación de proteínas del RNA, aunque se puede evitar con el uso del isopropanol (Tan & Yiap, 2009; Vomelova, Vaníčková & Šedo, 2009).

6.1.4.2 Extracción en fase sólida

La mayoría de los kits comerciales disponibles en el mercado se basan en la extracción en fase sólida. Una de sus principales ventajas es su rapidez y eficacia en la purificación de ácidos nucleicos comparado con los métodos convencionales. Aunque, una de sus principales problemas encontrados es la extracción de los ácidos nucleicos en fase líquida-líquida.

Un sistema de fase sólida se basa en la absorbancia de ácidos nucleicos, y el proceso de extracción depende del pH y del contenido de sal del buffer. El proceso de absorción se basa en los siguientes: la interacción de enlaces hidrógenos con una matriz hidrofílica bajo condiciones caotrópicas, intercambio iónico bajo condiciones acuosas, es decir, un intercambio de aniones, la afinidad y los mecanismos de exclusión de tamaños (Tan & Yiap, 2009).

6.1.5 Materiales Mesoporosos

Los materiales mesoporosos se pueden clasificar en tres clases de acuerdo con la IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) a partir del diámetro del poro (d_p) que presenten: microporosos ($d_p < 2$ nm), mesoporosos ($2 < d_p < 50$ nm) y macroporosos ($d_p > 50$ nm) (Mehmood, Yaqoob, Gohar & Ahmad, 2017; Narayan, Nayak, Raichur & Gars, 2018; Peña & Vallet, 2010; Sing, 1985; Smuszkiwicz, 2017).

Los sólidos inorgánicos microporosos y mesoporosos son dos clases de materiales que se han utilizado extensamente como soportes para catalizadores heterogéneos y medios de adsorción. La utilidad de estos materiales se relaciona con su estructura, la cual permite el acceso de moléculas a superficies internas grandes y cavidades en las cuales se favorece la actividad catalítica y la capacidad adsorptiva. Una clase de materiales microporosos son las mallas moleculares como las zeolitas, en las cuales los microporos son arreglos de cavidades de tamaño uniforme.

Los materiales mesoporosos en su mayoría son sólidos amorfos como silicatos o materiales en capas pilareados. Los poros en estos materiales están generalmente espaciados en forma irregular.

Los primeros avances en la síntesis de estos materiales mesoporosos fueron realizados en 1992 por los investigadores de Toyota y Mobil, quienes descubrieron las primeras familias de tamices moleculares mesoporosos altamente ordenados conocidos como sílices mesoporosas ordenadas (SMOs). Las cuales se forman por la interacción de un componente inorgánico (I) y un surfactante (S) o conocido como agente director de la estructura (Kresge, Leonowicz, Roth, Vartuli & Beck, 1992; Beck, Vartuli, Leonowicz, Kresge, Schmitt, Chu, Olson, Sheppard, McCullen, Higgings & Schlenker, 1992). Una de ellas y que pertenece a la familia conocida como M41S, es la MCM-41, que se caracteriza por tener un arreglo hexagonal de poros, con diámetros de poro uniformes, con diámetros de poro entre 2 y 10 nm. Además de poseer elevadas áreas superficiales (> 900 m²/g), altos volúmenes de poro (>0.7 cm³/g) y exhibir canales unidireccionales uniformes (Beck, Vartuli, Leonowics, Kresge, Schmitt & Higgins, 1992; Kresge, Leonowics, Roth, Vartuli & Beck, 1992).

En 1998, se desarrolla una nueva familia de materiales Mesoporosos, SBA (Santa Barbara Amorphus), con la SBA-15 (Santa Barbara Amorfo No. 15) como su mayor exponente, fue desarrollado por Stucky y colaboradores (Zaho, Feng, Huo, Melosh, Chmelka & Stuck, 1998). Tiene una estructura hexagonal de poros uniformes (honeycomb-like). Puede ser preparado en un amplio rango de tamaños de poros (4.6 nm a 30 nm) y espesores de pared de poro grandes (3.1 nm a 6.4 nm), que le confiere alta estabilidad térmica, mecánica e hidrotérmica. Superando por mucho a la MCM-41, la cual posee espesores de pared muy delgados (menores de 2 nm). Esto se logra variando la temperatura (35°C a 140°C) y tiempo de reacción (11 h a 72 h) durante su preparación. En ocasiones el tamaño de poro se puede incrementar agregando un agente de hinchamiento como el 1,3,5- trimetilbenceno (mesitileno). El surfactante se puede recuperar por extracción con un solvente (etanol) o se puede eliminar por calcinación, en ambos casos se obtiene un material altamente ordenado y con estabilidad térmica e hidrotérmica.

6.1.6 Síntesis de materiales Mesoporosos por el método de sol-gel

La SBA-15 se sintetiza por el método de sol-gel y por medio de un mecanismo neutral que involucra interacciones del tipo de enlaces de hidrogeno entre surfactantes neutros (copolímeros anfifílicos de bloques) como agentes directores de estructura y precursores inorgánicos neutros (**Figura 2**). El papel del surfactante es el de guiar la formación de la estructura mesoporosa. El copolímero de bloques es un surfactante que en solución tiene dos partes dentro de la misma molécula (un grupo de cabeza hidrofílico y una larga cola hidrofóbica) las cuales se agregan y auto-organizan de tal manera que minimizan el contacto entre sus extremos incompatibles. Con la adición del precursor inorgánico, las especies inorgánicas participan en interacciones del tipo de enlaces de hidrogeno con los grupos de cabeza del surfactante dando como resultado la formación de una mesoestructura (inorgánico-surfactante) ordenada de forma hexagonal. Durante la etapa de madurado la mesoestructura se consolida adquiriendo sus características finales. Finalmente, el surfactante se elimina por extracción con un solvente o por calcinación para obtener el material mesoporoso ordenado (Beltrán & Ángela, 2017; Mehmood, Yaqoob,

Gohar & Ahmad, 2017; Narayan, Nayak, Raichur & Gars, 2018; Peña & Vallet, 2010; Sing, 1985; Smuszkiewicz, 2017).

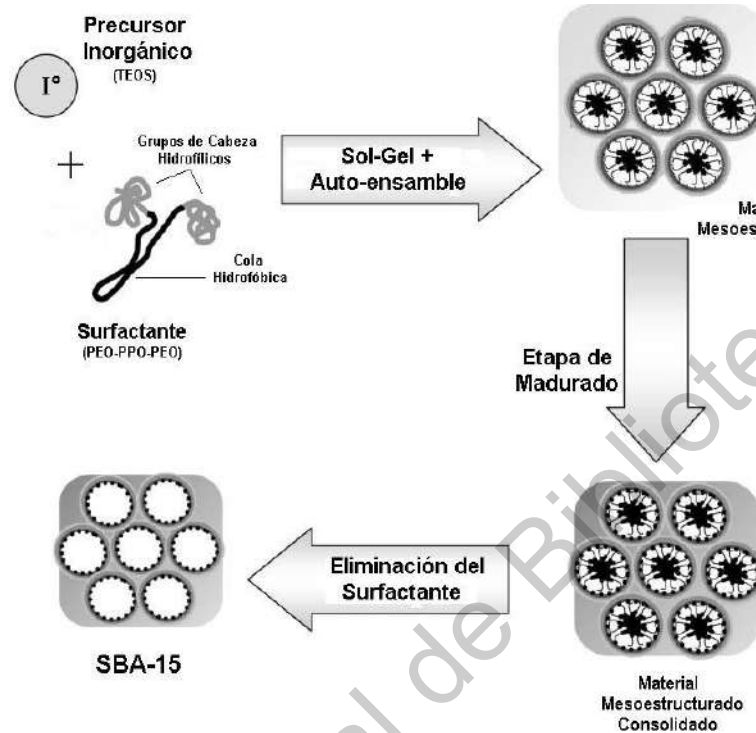


Figura 2. Mecanismo de síntesis del material mesoporoso SBA-15

6.1.7 Funcionalización por grupos orgánicos

Para poder funcionalizar las partículas de sílice mesoporosas se utilizan agentes dopantes que presentan al menos dos sitios, uno para poder enlazarse a la superficie de la sílice y la otra quedando intacta (el grupo funcional orgánico), que permite cambiar las características superficiales del material al enlazarse químicamente a su superficie.

Con esto se puede mejorar la afinidad del material funcionalizándolo con diferentes grupos orgánicos, a través de los cuáles permite realizar una aplicación en especial, como la de ser un material adsorbente de otras especies químicas.

En este trabajo se utilizarán los grupos amino y mercapto (Felicza-Guzik et al., 2016) para funcionalizar la superficie de la sílice mesoporosa y utilizarlo como un material de adsorción, para la purificación de RNAs. Este proceso, se realizará mediante el método de post-síntesis (exsitu), es decir, partiendo de la sílice mesoporosa previamente preparada, tal como se reporta en Hernández-Morales et al., 2012, una publicación de nuestro grupo de trabajo.

La forma en que los grupos funcionales se incorporan al soporte previamente sintetizado y calcinado, ocurre a través de los grupos silanoles (Si-OH) en la superficie de la matriz sílicea, y estos actúan como puntos de anclaje para la funcionalización de los grupos orgánicos (**Figura 3**). El proceso de sililación ocurre en la superficie del soporte. La modificación de sílices por el método de post-síntesis requiere el uso del material completamente seco antes de la funcionalización, para evitar que se forme la condensación de los precursores debido a la presencia del agua (Smuszkiewicz, A, 2017).

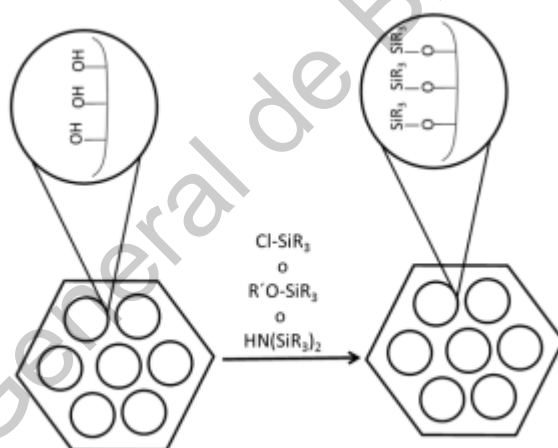


Figura 3. Post-síntesis de los grupos funcionales

6.1.8 Nanopartículas de Sílice Mesoporosas en la transportación ácidos nucleicos

En cuanto al uso de partículas de sílice para la entrega de ácidos nucleicos, en un principio se exploraron las nanopartículas de sílice no porosas. Al modificar las partículas de sílice con elementos orgánicos cargados positivamente, es posible el transporte de

ácidos nucleicos sea por vía intracelular, al menos in vitro. Las partículas no porosas de sílice no sólo pueden utilizarse para la transferencia de genes, sino que Miyata et al. han demostrado también que los poliplejos (complejos de polímeros catiónicos con ácidos nucleicos) pueden funcionalizarse con grupos orgánicos para mejorar su rendimiento como sistemas de vehiculización. De manera más interesante, han sido aprovechadas sus propiedades de acuerdo con el apartado anterior como transporte de ácidos nucleicos con diferentes tipos de células.

En primer lugar, la superficie de las MSNs puede ser alteradas para obtener partículas con carga positiva que permitan interactuar con los ácidos nucleicos con carga negativa. La segunda opción, que es el método más utilizado comúnmente en la transferencia de genes con las MSNs, consiste en recubrirlas con un componente policationico, en donde se le insertará un ácido nucleico cargado negativamente para su transporte. En esta estrategia, el polication puede ser adsorbido en la superficie del MSN a través de interacciones electrostáticas o puede ser incorporado de forma covalente, lo que modificará el comportamiento del material. Y para el último método, es un procedimiento nuevo que se ha introducido actualmente, y consiste en preparar nuevas MSN con tamaños de poro incrementados, y lo que permite transportar el ácido nucleico. Esto deja la superficie de las nanopartículas disponibles para experimentar con diferentes propiedades químicas destinadas a proporcionar con distintas capacidades, como una orientación celular específica o la circulación prolongada, entre otras (París y Vallet-Regí, 2020).

La estrategia más común para el transporte de ácidos nucleicos mediante MSNs funcionalizadas es mejorar la superficie de las nanopartículas con grupos amino cargados positivamente (por ejemplo, utilizando (3-Aminopropyl) trietoxisilano o APTES). Debido a que los grupos amino interactúan con los grupos fosfato de los ácidos nucleicos al ser de carga negativa, lo que permite llevar los ácidos nucleicos al interior de los poros (París y Vallet-Regí, 2020).

6.1.9 Electroforesis en gel

La electroforesis en gel es una técnica utilizada para separar fragmentos de DNA (u otras macromoléculas, como RNA y proteínas) por su tamaño y carga. A través de aplicar corriente al gel las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con el de separar de unas de otras. Generalmente, las biomoléculas de DNA tienen la misma cantidad de carga por masa. Por ende, la electroforesis en gel separa los fragmentos de DNA únicamente por su tamaño. Y lo que permite ver cuántos fragmentos diferentes de DNA están presentes en una muestra y cuán grande son unos con respecto a otros (Reece, 2012).

Los geles para separar biomoléculas suelen estar hechos de un polisacárido agarosa. Cuando la agarosa se calienta en una solución de buffer (agua mezclada con algunas sales) y se deja enfriar, se forma un gel sólido ligeramente blando. A nivel molecular, el gel es una matriz de moléculas de agarosa que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y que forman pequeños poros.

En un extremo, el gel tiene muescas en forma de ranuras llamadas pozos, que son donde se colocarán las muestras DNA o RNA, como se muestra en la **Figura 4**. Uno de los extremos de la cámara se conecta a un electrodo positivo y el otro extremo se conecta a un electrodo negativo. El cuerpo principal de la cámara, donde se coloca el gel, se llena con solución de buffer con sales que pueda conducir la corriente.

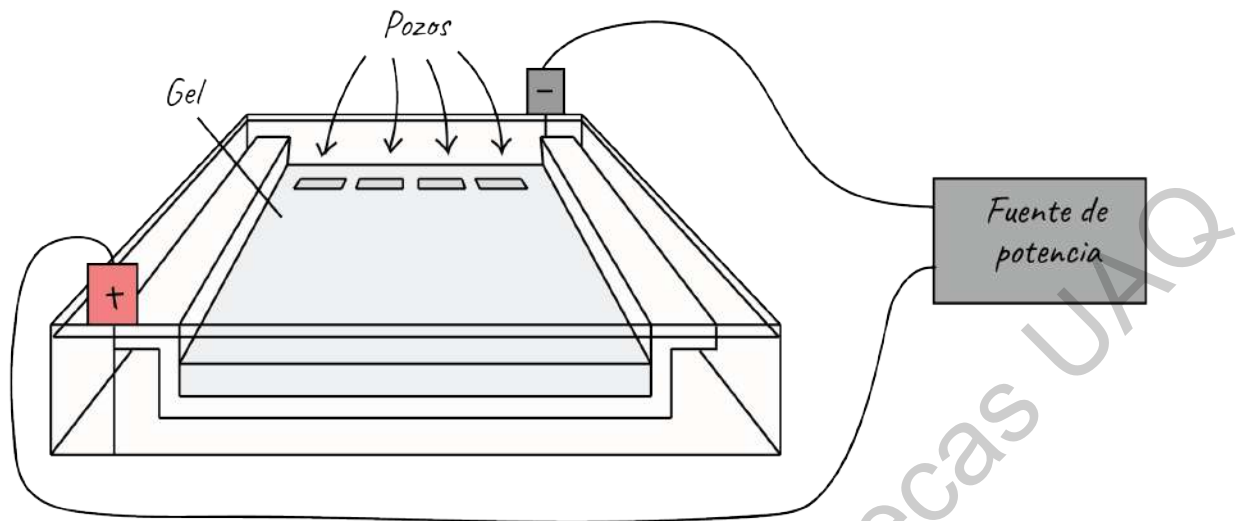


Figura 4. Sistema de electroforesis en gel

Una vez que el gel está en la cámara, cada una de las muestras de DNA que se quiere analizar (por ejemplo, cada reacción de PCR o cada plásmido digerido con enzimas de restricción) se transfiere cuidadosamente a uno de los pozos. Un pozo se reserva para el marcador de peso molecular, un estándar de referencia que contiene fragmentos de DNA de longitudes conocidas. Los marcadores de DNA comerciales cubren diferentes intervalos de tamaños, por lo que se trata de usar uno con buena "cobertura" en el intervalo de tamaños en el que espera encontrar los fragmentos. Conforme corre el gel, los fragmentos más cortos de DNA viajan más rápido a través de los poros de la matriz del gel que los fragmentos más grandes. Después de un rato que ha corrido el gel, los fragmentos más cortos de DNA estarán más cerca del extremo positivo del gel y los más largos se mantendrán cerca de los pozos.

VII. Metodología

En esta sección se describen los materiales y los procesos que se utilizaron para la obtención de las sílices mesoporosas de SBA-15 funcionalizadas con los grupos amino y mercapto, y el procedimiento que se siguió en la purificación del RNA.

7.1 Materiales

Pluronic (BASF, EO20-PO70-EO20, P123), Mesitileno (1,3,5-Trimetilbenceno, Aldrich, 99 %), Agua desionizada (Meyer, ACS), Ácido Clorhídrico (HCl 4M, J.T. Baker, 36.6%), Tetraetil ortosilicato (TEOS, Aldrich, 98%), 3-aminopropil trimetoxisilano (APTES, Aldrich, 97%) 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS, Aldrich, 95%), Etanol (Sigma, 99%), DEPC-Treated water (Thermo Scientific, grado biomolecular biológica), Fenol (Sigma, equilibrado con 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, solución 8 pH), Acetato de sodio (Meyer, 99%), Lysozyme (USB, 97%), Alcohol etílico absoluto ACS (Fermont, 99.9%) y Cepa de Bacillos.

7.2 Métodos

7.2.1 Procedimientos de preparación de la sílice mesoporosa SBA-15

El material mesoporoso de sílice SBA-15 se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Flodström y Alfredsson (Flodström & Alfredsson, 2003) y modificado por Nava y colaboradores (Nava, Ortega, Alonso, Ornelas, Pawelec & Fierro, 2007; Huirache, Pawelec, Rivera, Nava, Espino & Fierro, 2009; Nava, Pawelec, Castaño, Álvarez, Loricera & Fierro, 2009) se utilizó el copolímero de tres bloques Pluronic (BASF, EO20-PO70-EO20, P123) como agente director de la estructura y tetraetil ortosilicato (TEOS, 98%, Aldrich) como la fuente de sílice. Generalmente en la síntesis, el copolímero de tres bloques se disuelve en una solución de agua y HCl 4M (HCl, J.T. Baker, 36.6%) con agitación constante y a una

temperatura de 35°C. Posteriormente, se adiciona a la solución anterior la cantidad requerida de TEOS y la reacción se mantiene a 35°C y con agitación constante durante 24 h. Una vez que transcurra este tiempo, la mezcla de reacción se transfiere a un bote de polipropileno y se calienta a 80°C durante 24 h sin agitación. Después de la síntesis, el sólido que se obtiene se recupera por filtración, se lava varias veces con agua destilada, se seca a 110°C y finalmente se calcina a 550°C durante 4 h para eliminar el molde orgánico.

En la **Figura 5** se presenta un esquema del procedimiento de preparación de la SBA-15.

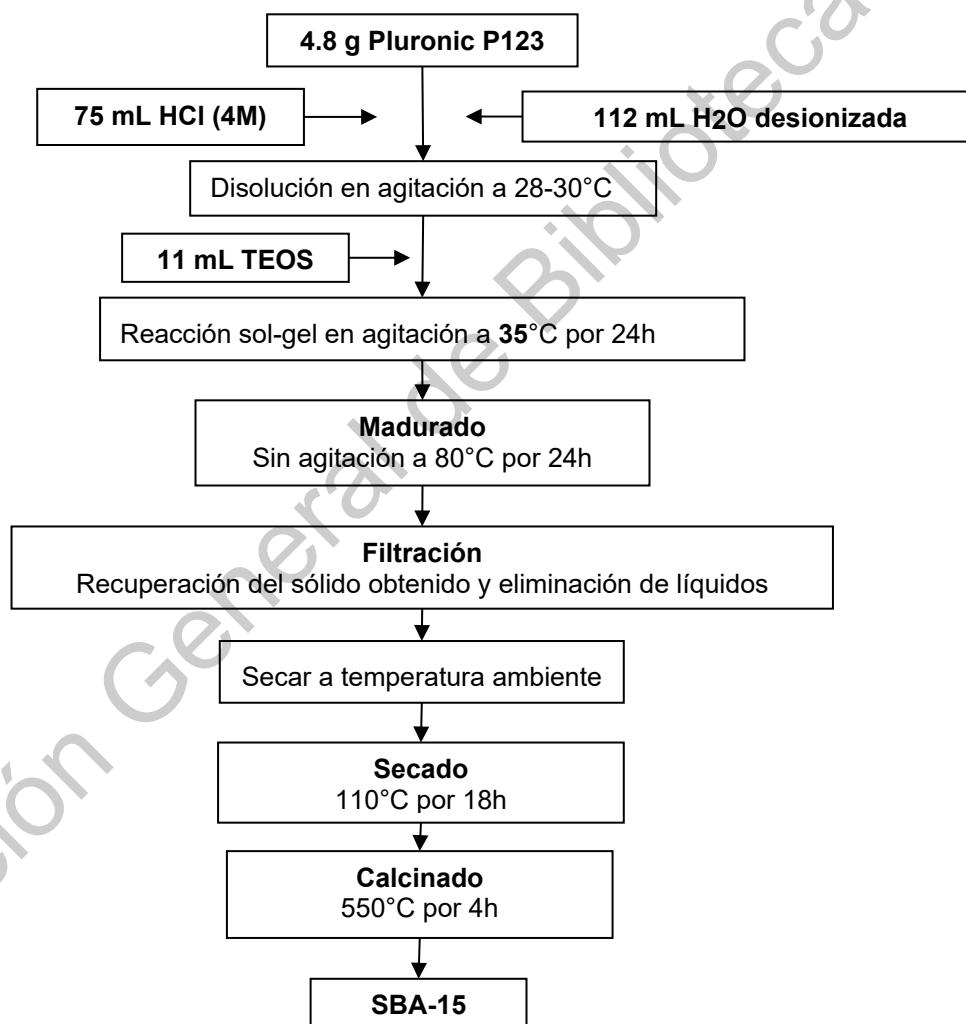


Figura 5. Esquema del procedimiento de preparación de la SBA-15 (Zhao, Yang, Margolese, Chmelka & Stuck, 1998).

7.2.1.1 Procedimientos funcionalización de la SBA-15 con grupos amino (NH₂)

La funcionalización superficial de la SBA-15 se efectuó por el método de post-síntesis (ex-situ), a partir de la SBA-15 previamente sintetizada, descrito por Nava y colaboradores (2012). La SBA-15 se dispersa en una solución de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES) (precursor de los grupos funcionales NH₂) en etanol.

La cantidad de APTES se calcula con el fin de obtener 0.3 moles de APTES por cada mol de TEOS.

La reacción se realiza a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de N₂ por 60 minutos. Posteriormente, se adiciona agua desionizada y se mantiene en agitación por 60 minutos. Se recupera el sólido por filtración y se seca a temperatura ambiente y posteriormente a 110°C por 18 horas.

Un esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 se presenta en la **Figura 6**.

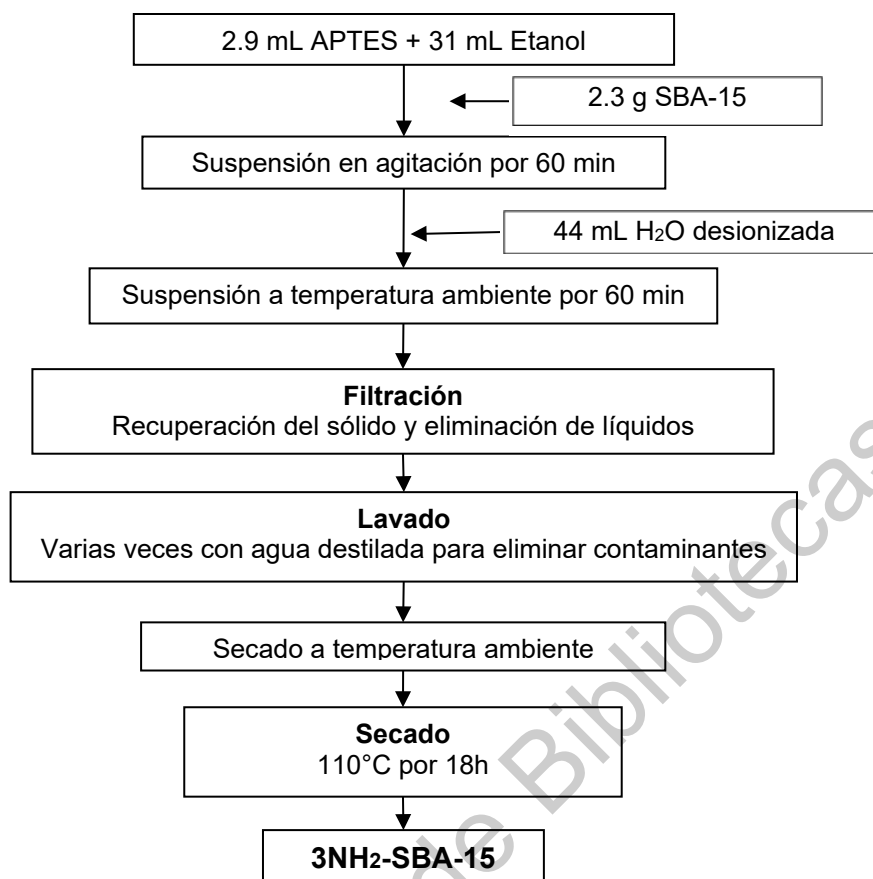


Figura 6. Esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 con grupos amino.

7.2.1.2 Procedimientos funcionalización de la SBA-15 con grupos mercapto (SH)

La funcionalización superficial de la SBA-15 se realiza por el método de post-síntesis (exsitu), a partir de la SBA-15 previamente sintetizada, descrito por Nava y colaboradores (2012). La SBA-15 se dispersa en una solución de 3-mercaptopropil trimetoxisilano (MPTMS) (precursor de los grupos funcionales mercapto) en etanol.

La cantidad de MPTMS se calcula con el fin de obtener 0.3 moles de MPTMS por cada mol de TEOS.

La reacción se realiza a temperatura ambiente y en atmósfera inerte de N₂ por 60 minutos. Posteriormente, se adiciona agua desionizada y se mantiene en agitación por 60 minutos. Se recupera el sólido por filtración y se seca a temperatura ambiente y posteriormente a 110°C por 18 horas.

Un esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 se presenta en la **Figura 7**.

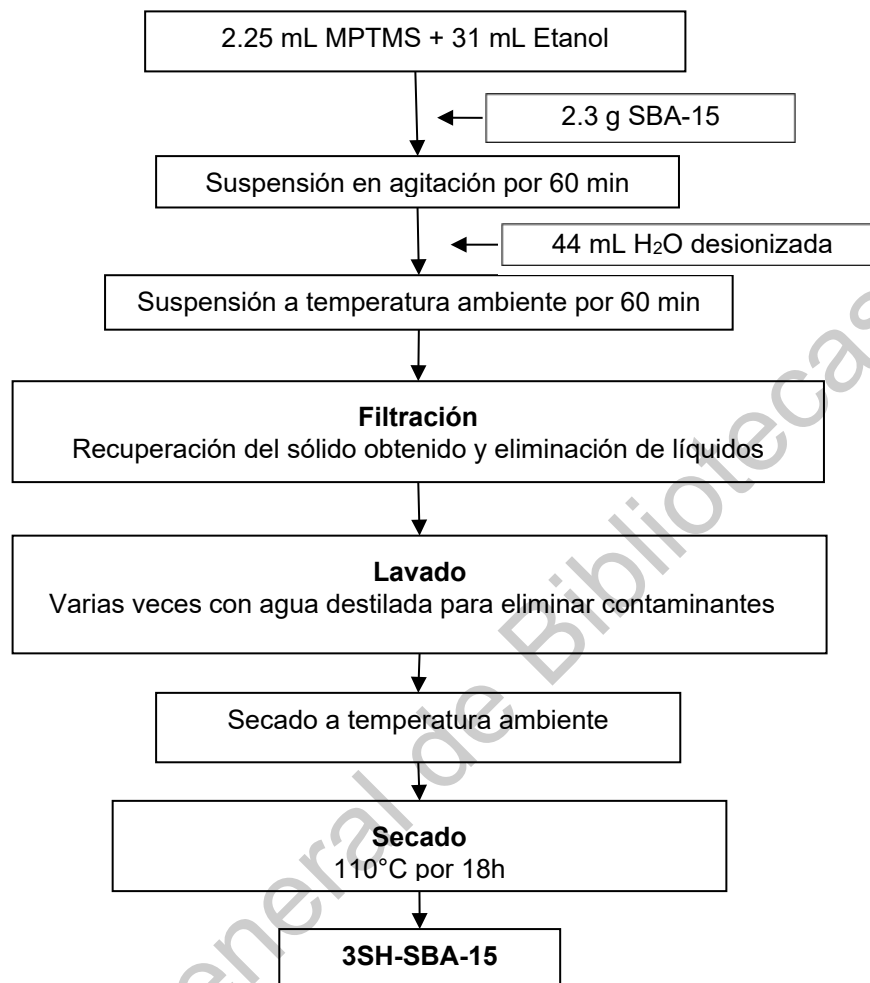


Figura 7. Esquema del procedimiento de funcionalización de la SBA-15 con grupos mercapto.

7.2.2 Síntesis de la esponja mesoporosa de sílice (EMS-15)

La síntesis de la esponja mesoporosa de sílice EMS-15 se realizó por el método sol-gel, utilizando como agente director de la mesoestructura el surfactante no iónico Pluronic 123, un copolímero de tres bloques (P123, Aldrich, 99%) y como precursor de la sílice el tetraetil ortosilicato (TEOS, Aldrich 99%) y Mesitileno (MES, Aldrich 99%) como agente de hinchamiento.

Se disolvieron 4.8 g del surfactante neutro pluronic 123 en una solución con 75 ml de ácido clorhídrico 4M y 112.5 ml de agua desionizada con agitación constante a 35°C. Posteriormente, después de que se disolvió por completo el P123 se agregaron 5.8 ml del agente de hinchamiento MES y, una vez dispersado totalmente, se agregaron 8 ml de TEOS. La reacción se conservó a 35°C con agitación constante durante 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción fue transferida a un bote de polipropileno para efectuar el proceso de madurado, siendo calentada a 80°C durante 24 horas sin agitación dentro de una mufla. Terminado el proceso, se dejó enfriar y se recuperó el sólido por filtración, lavándolo 3 veces con agua desionizada. El sólido recuperado se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se secó a 100°C por 18 horas y, para la eliminación del molde orgánico, se calcinó la muestra a 550°C por 4 horas.

7.2.2.1 Funcionalización de la EMS-15 con grupos amino

La funcionalización superficial de la MCF con grupos aminos se realizó por el método de post-síntesis (*ex-situ*), es decir, a partir de la EMS-15 previamente sintetizada, descrito por Nava y colaboradores (Nava y colaboradores (2012)).

En una síntesis representativa, 2.1 g de EMS-15 se dispersó en una solución de 2.7 ml de 3-aminopropil trietóxisilano (APTES, Aldrich, 99%) (precursor de los grupos funcionales NH₂) en 31 ml etanol absoluto (Aldrich, 99%).

La reacción se incubó bajo agitación constante a temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, se agregaron 41 ml de agua desionizada y se continuó agitando por 60 minutos. El sólido se recuperó por filtración y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, el secado fue completado en una mufla a 110°C por 18 horas.

7.2.3 Procedimiento de Extracción del RNA

Para el proceso de purificación fue necesario preparar primero los materiales que se van a utilizar durante el procedimiento. Lo que se hizo fue preparar un medio de cultivo nutritivo, para ello se utilizó 16 g agar de soya con 1000 mL de agua desionizada, donde luego son fundidas y esterilizadas. Una vez hecho todo el procedimiento son sembradas las bacterias con la técnica de estrella e incubándolas a 37°C durante 24 hrs.

En seguida se preparó el acetato de sodio en base una solución de 0.3 M con un pH aproximadamente a 8.8. Se usó 2.486 g de acetato de sodio (Meyer, 99%) con 100 mL de agua desionizada, con el fin de obtener un pH 8.8 se utilizó gotas de NaOH al 20% para incrementar la base y HCl al 1% como el ácido para disminuirlo. Y para su esterilización fue en una autoclave a una presión de 15 psi durante 15 min junto con las pipetas y tubos de eppendorf.

En el proceso de purificación lo primero que se realizó fue una suspensión del paquete celular bacteriano en 0.3 mL de solución reguladora (0.3 M de acetato de sodio pH 8.8, 10 mM de EDTA y lisozima 3 mg/mL) y se incubó por 10 min a 37°C para favorecer la lisis de la bacteria. Se efectuaron 2 extracciones con un volumen igual de fenol que será equilibrado con la solución reguladora. Durante la primera extracción, las células se agitan en un vortex por períodos de 30, 60 y 60 s entre cada paso. Después se centrifuga por 15 min en una microcentrifugadora Eppendorf, quedando una fase acuosa que se transfirió a tubos que contienen 0.3 mL de fenol, y se agitó en vortex por 60 s y se centrifugó por 10 min.

La fase acuosa se pasa a otro tubo limpio con 0.3 mL fenol, donde se deja incubar por 20 min en una agitadora a una temperatura ambiente, se centrifuga nuevamente por otros 10 min. Al final se le agrega la SBA-15 funcionalizada con 0.05 mL de DERPEC-agua pura, luego se incubó nuevamente por 20 min y al final se centrifuga por 10 min. Al final, se agregó las SBAs-15 tanto nativas como funcionalizadas en concentraciones de 100, 200 y 400 µg al igual que las EMS-15, posteriormente se mantienen agitadas en un micro-vibrador (Civeq amp) por 20 min. Al finalizar, se vuelven a ser centrifugadas a 10,000 rpm y se transfiere el sobrenadante a otro tubo, y se agregó 0.05 mL de agua pura (Thermo Scientific, grado biomolecular biológica), luego son agitadas en el micro-vibrador por 30 min, y entonces se centrifugó por 10 min a 10,000 rpm. Y se agregó otros 0.05 mL de agua pura.

Para observar la calidad de RNA se realizó electroforesis en gel, usando un gel de agarosa 1.2% y tiñéndolo con bromuro de etidio, debido al ser un material fluorescente podrá verse bajo la luz ultravioleta El instrumento que se utilizó fue una cámara Mini-PROTEAN II® (Bio-Rad) y manteniéndolo con un voltaje de 60 V (~ 12 V/ cm) durante una 1 h a temperatura ambiente.

VIII. Resultados y Discusiones

8.1 Isothermas de adsorción-desorción de N₂ a 77K.

8.1.1 SBA-15 nativa y funcionalizada.

En la **Figura 8** se presenta la isoterma de adsorción-desorción de N₂ de nuestro material de sílice mesoporoso SBA-15. Como se puede ver de la figura, nuestro material SBA-15 exhibe una isoterma de adsorción del tipo IV con una curva de histéresis H1 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC [K.S.W. Sing, D.H. Everet, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniewska, Pure Appl. Chem. 57 (1985) 603].

Esta isoterma es característica de los materiales mesoporosos que contienen poros cilíndricos de tamaño y forma regulares. La isoterma muestra una región bien definida en el rango de presiones relativas altas ($0.6 < P/P_0 < 0.8$) que representa el llenado espontáneo de los mesoporos debido a la condensación capilar, indicando la presencia de mesoporos uniformes. La curva de adsorción-desorción de nitrógeno de nuestro material es similar a la reportada en la literatura para el material de sílice mesoporoso SBA-15 [K. Flodström, V. Alfredsson, Micropor. Mesopor. Mater. 59 (2003) 167; Z. Luan, E.M. Maes, P.A. W. van der Heide, D. Zhao, R.S. Czernuszewics, L. Kevan, Chem. Mater. 11 (1999) 3680; A. Tuel, L.G. Hubert-Pfalzgraf, J. Catal. 217 (2003) 343].

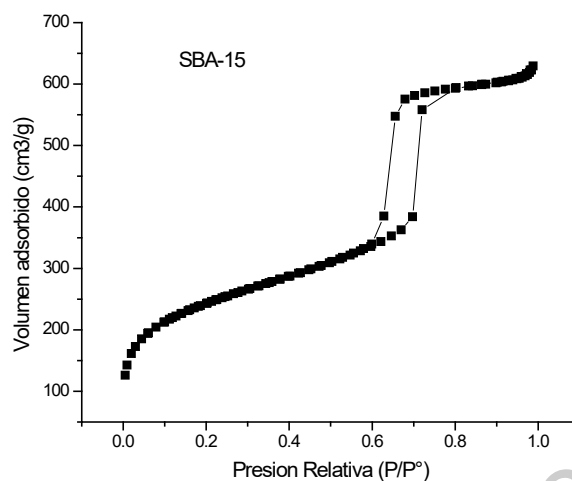


Figura 8. Isotherma de adsorción-desorción de N₂ del material de sílice mesoporoso SBA-15.

La **Figura 9** exhibe la isoterma de adsorción-desorción de N₂ de la sílice mesoporosa SBA-15 funcionalizada con grupos amino (SBA-15-NH₂).

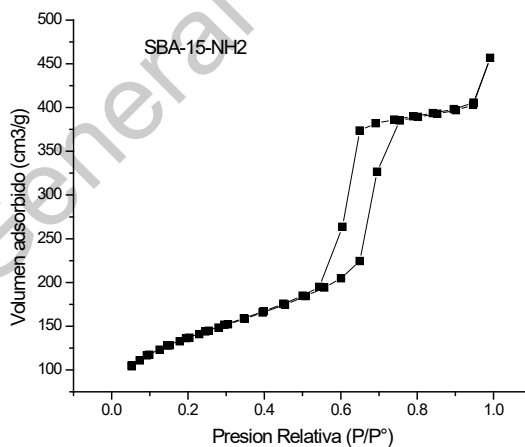


Figura 9. Isotherma de adsorción-desorción de N₂ del material de sílice mesoporoso SBA-15 funcionalizado con grupos amino.

La isoterma de la SBA-15-NH₂ es muy similar a la de la SBA-15 pura, por lo que podemos afirmar que la funcionalización de la SBA-15 con grupos amino no destruye la estructura mesoporosa de la SBA-15.

La **Figura 10** presenta la distribución del tamaño de poro del material de sílice mesoporoso SBA-15. La distribución se calculó con los datos de la isoterma de desorción mediante el método B.J.H. Nuestro material de sílice mesoporoso SBA-15 muestra una distribución uniforme en el tamaño de poro centrado aproximadamente en 6.0 nm.

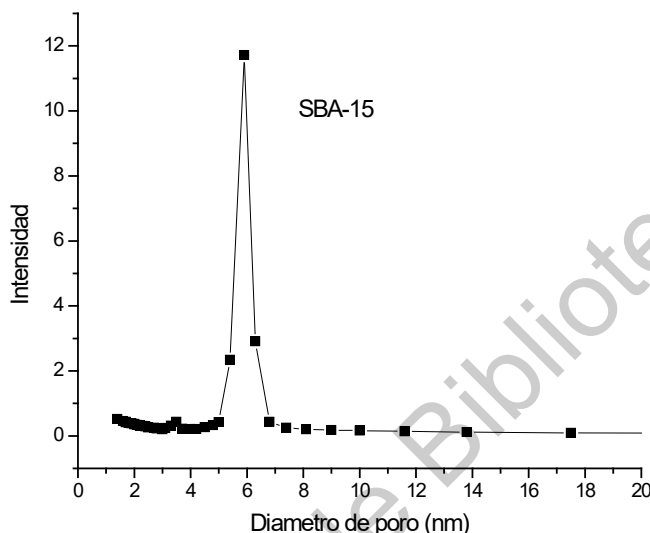


Figura 10. Distribución del diámetro de poro del material de sílice mesoporoso SBA-15.

En la **Figura 11** se exhibe la distribución del tamaño de poro de la SBA-15 funcionalizada con grupos amino (SBA-15-NH₂). Esta distribución es más amplia en comparación con la de la SBA-15 pura y con un máximo en el diámetro de poro 5.3 nm. Estos resultados ponen en evidencia que los grupos funcionales amino se han distribuido uniformemente en la superficie interna de los poros de la SBA-15.

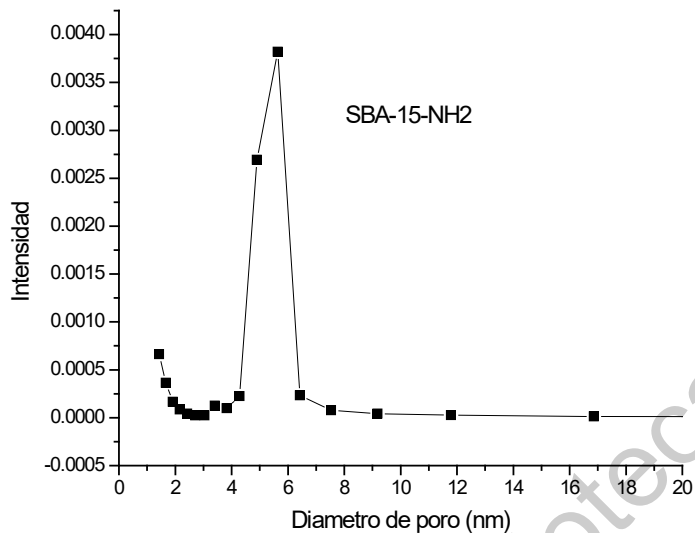


Figura 11. Distribución del diámetro de poro de la sílice mesoporosa SBA-15-NH₂.

En la **Tabla 1** se presenta un resumen de las propiedades texturales (área superficial, volumen promedio de poro y diámetro de poro) de la sílice mesoporosa SBA-15 y de la SBA-15-NH₂.

En ella se observa que nuestro material de sílice mesoporosa SBA-15 presenta una alta área superficial de 932 m²/g y un alto volumen de poro de 1.0 cm³/g.

La incorporación de los grupos funcionales amino en la superficie interna de los poros de la SBA-15 provoca una importante disminución tanto en el área superficial como en el volumen de poro. Esta situación se puede atribuir a un posible bloqueo de poros por el precursor de los grupos aminos. Sin embargo, tanto el área superficial como el volumen de poro de la SBA-15-NH₂ son apropiadas para encapsular una adecuada cantidad de compuestos bioactivos.

Tabla 1. Propiedades texturales de los catalizadores

Material	Área superficial (m²/g)	Volumen de poro (cm³/g)
SBA-15	932.0	1.00
SBA-15-NH₂	525.0	0.70

8.1.2 EMS-15 nativa y funcionalizada

En la **Figura 12** se presentan las isotermas de adsorción-desorción de N₂ de la esponja mesoporosa de sílice EMS-15 nativa y funcionalizada con grupos amino 0.3NH₂-EMS-15. Como se puede ver de la figura, tanto la EMS-15 nativa como funcionalizada exhiben una isoterma de adsorción del tipo IV con una curva de histéresis H1 de acuerdo a la clasificación de la IUPAC y que corresponde con los materiales mesoporosos [K.S.W. Sing, D.H. Everet, R.A.W. Haul, L. Moscou, R.A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, Pure Appl. Chem. 57 (1985) 603].

Las isotermas muestran una región amplia en el rango de presiones relativas (0.45<P/P₀<0.95) que representa el llenado espontáneo de los mesoporos debido a la condensación capilar, indicando la presencia de mesoporos con una distribución relativamente amplia en diámetro y sin arreglo en los mismos. La curva de adsorción-desorción de nitrógeno de nuestro material es similar a la reportada en la literatura para un material de esponja de sílice mesoporoso derivado de una SBA-15 [J. Ma, Q. Liu, D. Chen, S. Wen and T. Wang. 2015. Synthesis and characterization of pore-expanded mesoporous silica materials. Micro and Nano Letters, 10 (2) 140-144].

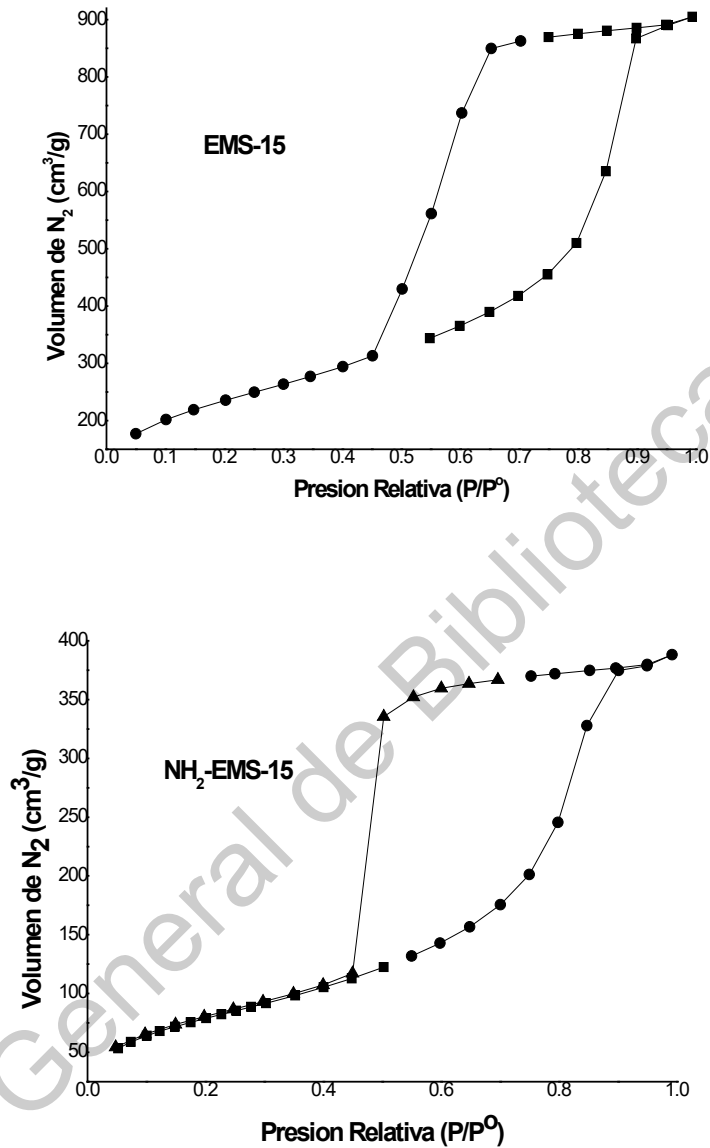


Figura 12. Isothermas de adsorción-desorción de N₂ de la EMS-15 y de la EMS-15-NH₂.

La **Figura 13** presenta la distribución del tamaño de poro de la esponja mesoporosa de sílice EMS-15 nativa y funcionalizada con grupos amino 3NH₂-EMS-15. La distribución se calculó con los datos de la isoterma de desorción mediante el método B.J.H.

La esponja mesoporosa de sílice pura EMS-15 muestra una distribución relativamente amplia (de 40 a 70 nm) en el tamaño de poro centrado aproximadamente en 50 nm.

La esponja mesoporosa de sílice funcionalizada con grupos amino 3NH₂-EMS-15, presenta una distribución más uniforme en el diámetro de poro, centrado alrededor de 40 nm, en comparación la EMS-15 sin funcionalizar. Este resultado indica que los grupos amino se han incorporado (han decorado) de manera uniforme la superficie interna de los poros de la EMS-15.

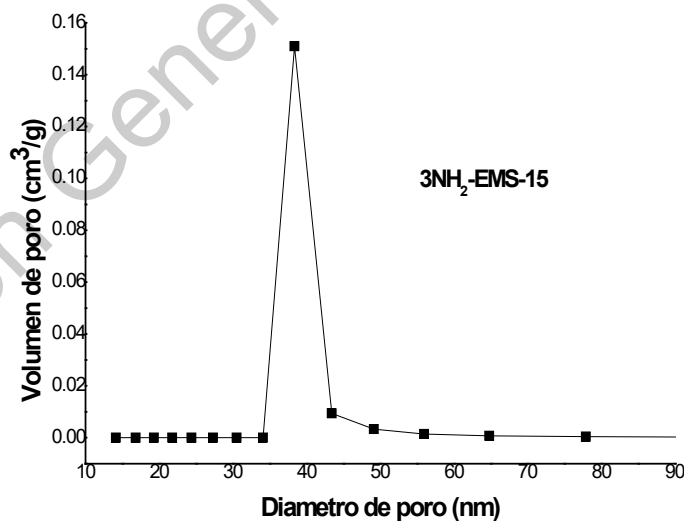
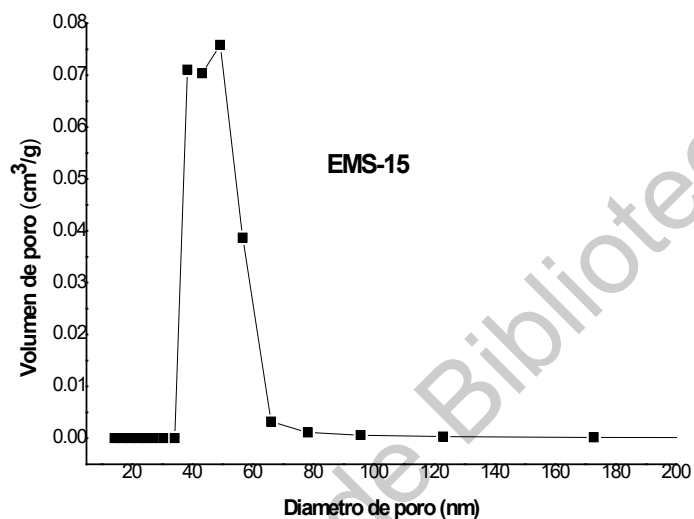


Figura 13. Distribución del tamaño de poro de la EMS-15 y EMS-15-NH₂.

En la **Tabla 2** se presenta un resumen de las propiedades texturales (área superficial, volumen promedio de poro y diámetro de poro) de la esponja mesoporosa de sílice nativa (EMS-15) y funcionalizada con grupos amino.

En ella se observa que nuestro material EMS-15 nativa presenta una alta área superficial de 816.2 m²/g y un alto volumen de poro de 1.4 cm³/g.

La incorporación de los grupos funcionales amino en la superficie interna de los poros de la EMS-15 provoca una importante disminución tanto en el área superficial como en el volumen de poro. Esta situación se puede atribuir a un posible decorado y bloqueo de poros por el precursor de los grupos aminos. Sin embargo, el grande diámetro de poro y la alta área superficial y volumen de poro de la EMS-15-NH₂, le proporcionará al material una alta capacidad de adsorción.

Tabla 2. Propiedades texturales de los materiales.

Material	Área superficial (m ² /g)	Volumen de poro (cm ³ /g)
EMS-15	816.20	1.40
EMS-15-NH ₂	472.6.0	0.73

8.2 Difracción de rayos-X a bajos ángulos.

8.2.1 SBA-15 nativa y funcionalizada

Los patrones de difracción de Rayos-X a bajos ángulos de las muestras de sílices mesoporsas preparadas a diferentes temperaturas de madurado (80, 100 y 120°C) se exhiben en la **Figura 14**.

En el difractograma de la muestra madurada a 80°C (SBA-15-80) se observa una primera reflexión muy intensa en 0.9° en 2θ , seguida por otras dos reflexiones muy débiles en 1.6° y 1.8° en 2θ , que de acuerdo a la literatura corresponden a las reflexiones [1 0 0], [1 1 0] y [2 0 0], respectivamente, asociadas con la simetría hexagonal [K. Flodström, V. Alfredsson, Micropor. Mesopor. Mater. 59 (2003) 167; Z. Luan, E.M. Maes, P.A. W. van der Heide, D. Zhao, R.S. Czernuszewics, L. Kevan, Chem. Mater. 11 (1999) 3680; A. Tuel, L.G. Hubert-Pfalzgraf, J. Catal. 217 (2003) 343]. Estos resultados indican que se han obtenido una sílice mesoporosa con arreglo hexagonal de poros y que corresponden con la SBA-15.

Los difractogramas de las muestras maduradas a 100 y 120°C (SBA-15-100 y SBA-15-120) se aprecian las mismas tres reflexiones características de la SBA-15-80, pero ligeramente desplazadas a más bajos ángulos, indicando que, con el incremento en la temperatura de madurado, muy probablemente se incrementa el diámetro del mesoporo.

En resumen, podemos afirmar que las sílices mesoporosas preparadas a las diferentes temperaturas de madurado, poseen un arreglo hexagonal de poros, que corresponde con la SBA-15.

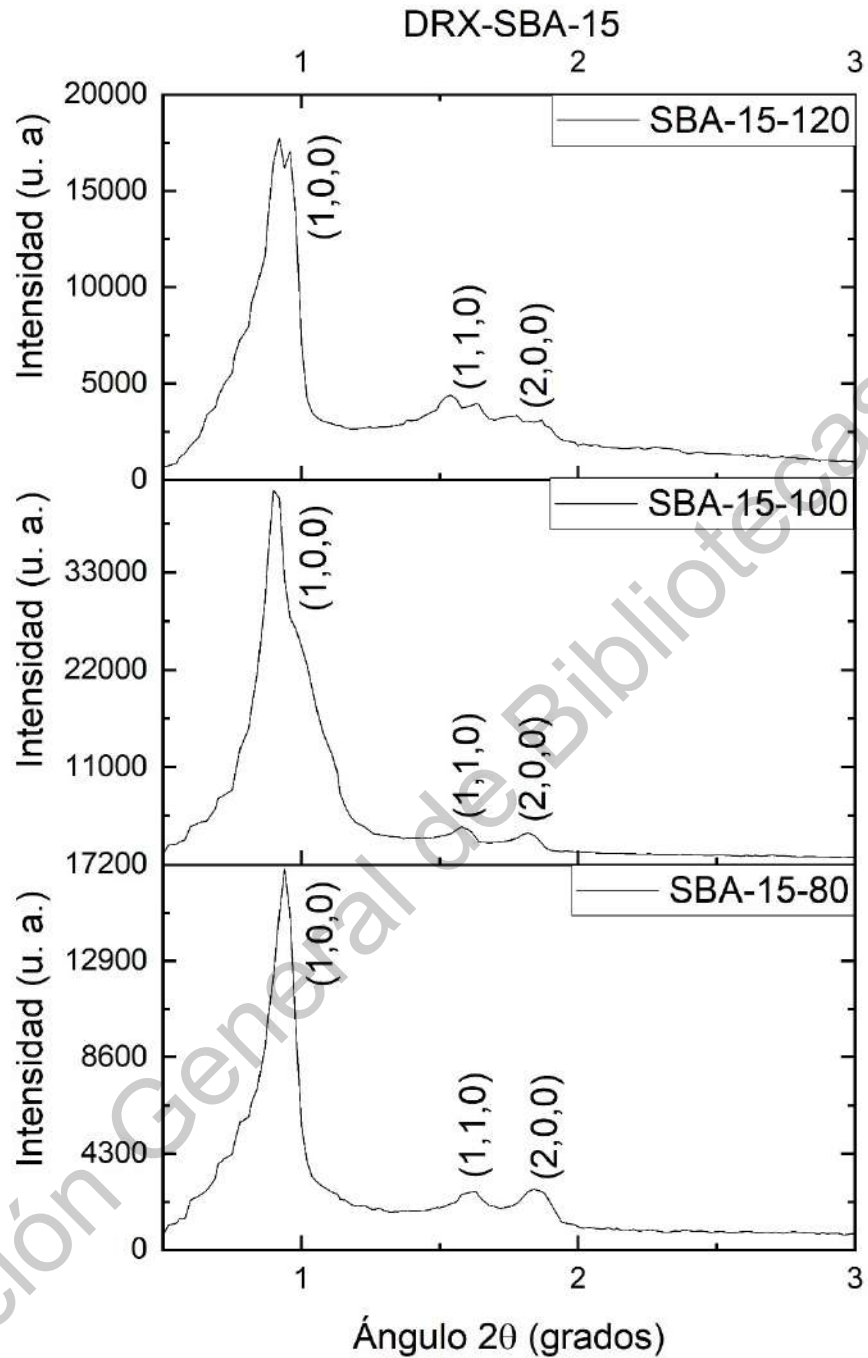


Figura 14. Patrones de Difracción de Rayos-X a bajos ángulos de las sílices mesoporosas.

En la **Figura 15** se presentan los patrones de difracción de rayos-X a bajos ángulos de las sílices mesoporosas SBA-15 maduradas a 100°C funcionalizadas con grupos amino (SBA-15-NH₂) y mercapto (SBA-15-SH) y se compara con el patrón de difracción de la

SBA-15 pura madurada a 100°C.

Se observa claramente que los patrones de difracción de las sílices mesoporosas funcionalizadas son muy similares a la de la SBA-15 pura, indicando que la incorporación de los grupos funcionales amino y mercapto en la superficie interna de los poros de la SBA-15, no altera su estructura mesoporosa.

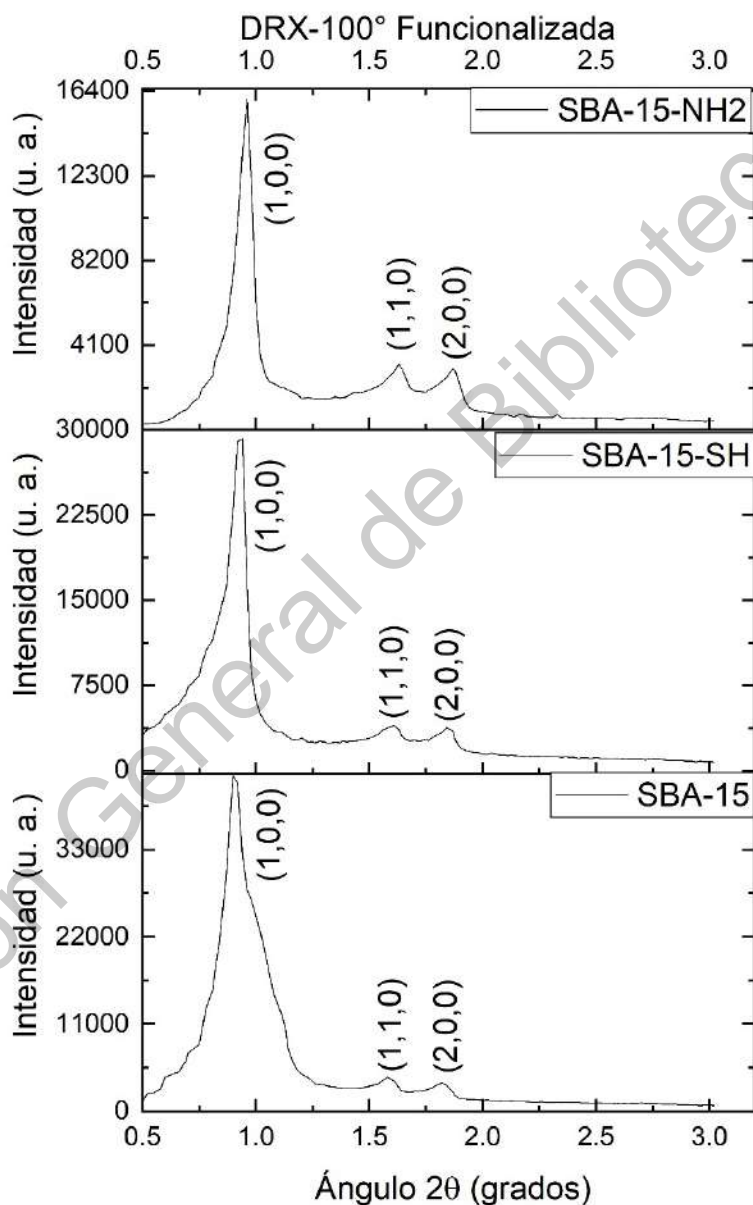


Figura 15. Patrones de Difracción de Rayos-X a bajos ángulos de las sílices mesoporosa nativa y funcionalizada con grupos -NH₂ y -SH.

8.2.2 EMS-15 nativa y funcionalizada

La **Figura 16** presenta los patrones de difracción de rayos-X a bajos ángulos de la pura MCF y funcionalizada con grupos amino MCF-NH₂. En ellas se presenta una reflexión muy intensa aproximadamente centrada en 0.3° en 2θ, lo cual se asocia con el tipo de porosidad que presenta el material, en este caso, efectivamente se trata de un material mesoporoso y específicamente de una esponja mesoporosa. Con diámetros de mesoporos grandes, de alrededor de 20 hasta 50 nm. Estos resultados coinciden con los de la distribución de diámetro de poro analizada anteriormente. La presencia de los grupos amino en la MCF no provoca grandes cambios en la estructura mesoporosa de la espuma de sílice mesocelular, lo que está de acuerdo con lo reportado por Goscianska *et al.* en 2017.

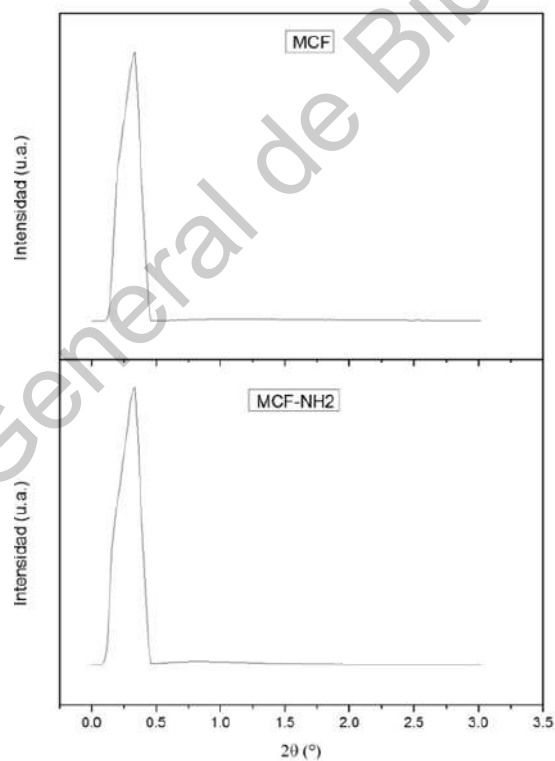


Figura 16. Difractogramas de los materiales: a) EMS-15 nativa y b) EMS-15 funcionalizada (EMS-15-NH₂).

8.3 Microscopías Electrónicas de Transmisión y Barrido de Alta Resolución.

8.3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM): SBA-15 nativa

La imagen obtenida por HRTEM de nuestro material de sílice mesoporoso se presenta en la **Figura 17**. En ella se puede observar que nuestro material de sílice mesoporoso SBA-15 corresponde a una estructura mesoporosa altamente ordenada con un arreglo hexagonal de poros uniformes y que corresponde a la estructura de la sílice mesoporosa SBA-15 reportada en la literatura [K. Flodström, V. Alfredsson, Micropor. Mesopor. Mater. 59 (2003) 167; Z. Luan, E.M. Maes, P.A. W. van der Heide, D. Zhao, R.S. Czernuszewics, L. Kevan, Chem. Mater. 11 (1999) 3680; A. Tuel, L.G. Hubert-Pfalzgraf, J. Catal. 217 (2003) 343].

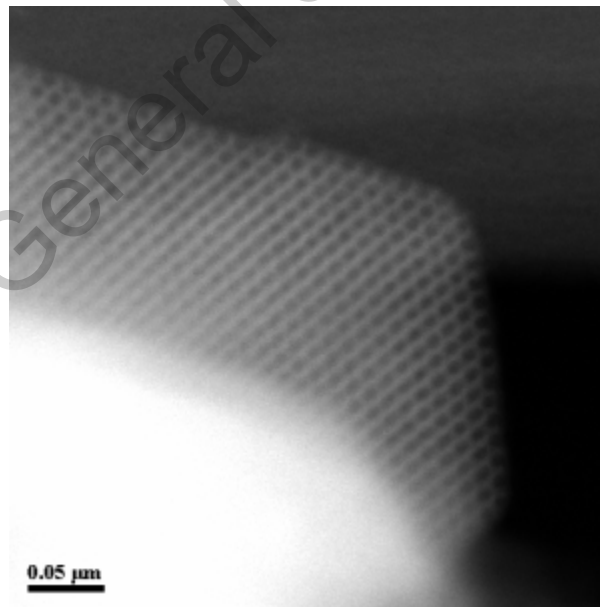


Figura 17. Imagen de HRTEM del material de sílice mesoporoso SBA-15.

8.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HRSEM): SBA-15 nativa

La **Figura 18** muestra la imagen de SEM de nuestro material de sílice mesoporoso SBA-15. En ella se evidencia que las partículas de nuestro material de sílice mesoporoso SBA-15 tiene la forma de cilindros curvados de tamaño altamente uniforme (aproximadamente de 400-500 nm de diámetro y de 1-1.2 μm de longitud).

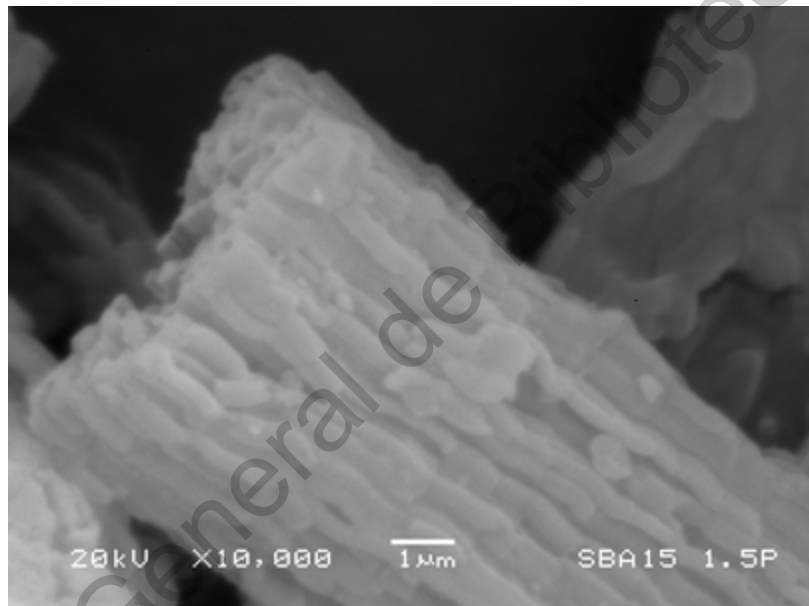


Figura 18. Imagen de SEM del material de sílice mesoporoso SBA-15.

8.3.3 Microscopía Electrónica de Barrido de Alta Resolución (HRSEM): EMS-15 nativa

La **Figura 19** muestra la imagen de SEM de la esponja mesoporosa de sílice EMS-15. En la **Fig. 19A** se evidencia que las partículas de nuestro material EMS-15 tiene la forma de esferas de tamaño altamente uniforme, de aproximadamente 3.5 μm de diámetro.

Además, en la **Fig. 19B** se aprecia un material altamente poroso, es decir, con una alta cantidad de cavidades, con un diámetro entre 20-30 nm y un espesor de pared de aproximadamente 18 nm. Por lo tanto, este material corresponde a una esponja de sílice mesoporosa.

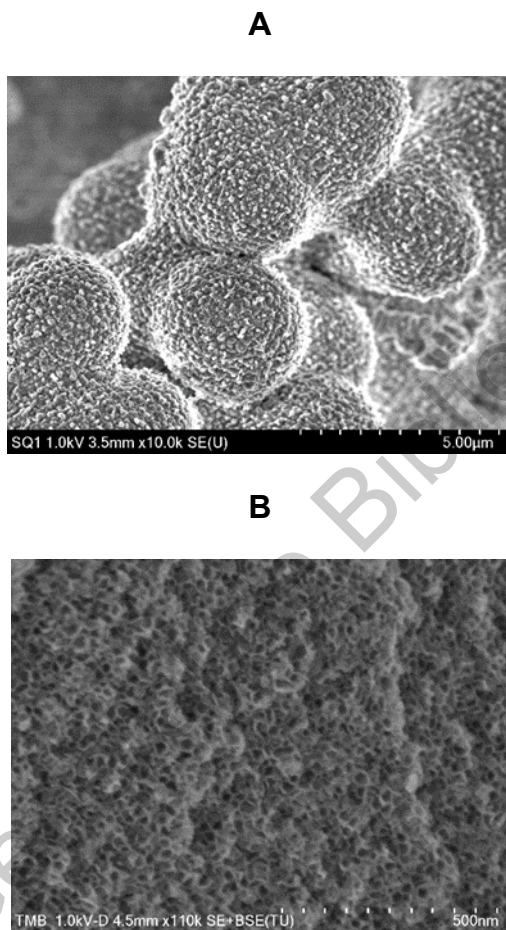


Figura 19. Imagen de SEM de la esponja de sílice mesoporosa ESM-15.

8.4 Análisis termogravimétrico (TGA)

8.4.1 SBA-15 nativa y funcionalizada

En la **Figura 20** se pueden visualizar las curvas de los análisis termogravimétricos para las muestras de SBA-15 nativa y funcionalizada con grupos amino y mercapto. Como se ve, todos los sólidos mostraron una pérdida de peso continua. La pérdida de peso total es

de aproximadamente entre el 12-18%, de temperatura ambiente a 600°C. El primer punto de inflexión centrado en aproximadamente 50°C, puede atribuirse a la deshidratación de las muestras, es decir a la pérdida de moléculas de agua fisi-adsorbidas en la SBA-15 (Luan, Fournier, Wooten, & Miser, 2005).

Teniendo en cuenta que el material nativo de la SBA-15 no exhibió la pérdida de peso por encima de 300°C, la pérdida de peso observada en el rango de temperatura 300-600°C se debe a la descomposición de los grupos de amino y mercapto de las sílices mesoporosas SBA-15 funcionalizadas (Luan, Fournier, Wooten, & Miser, 2005). Por lo tanto, los resultados del análisis termogravimétrico confirmaron la funcionalización exitosa de la SBA-15.

Notablemente, en un buen acuerdo con la literatura (Payne, Horst, & Godwin, 1999), se puede observar que tanto los grupos amino y mercapto presentes en la SBA-15, empiezan a descomponerse a partir de 300°C, temperatura que es superior al punto de ebullición de los precursores de los grupos amino (APTES) y mercapto (MPTES), lo que indica que ocurrió una unión química entre el 3-aminopropilsilano y el 3-mercaptopropilsilano con los grupos -OH- superficiales de la SBA-15.

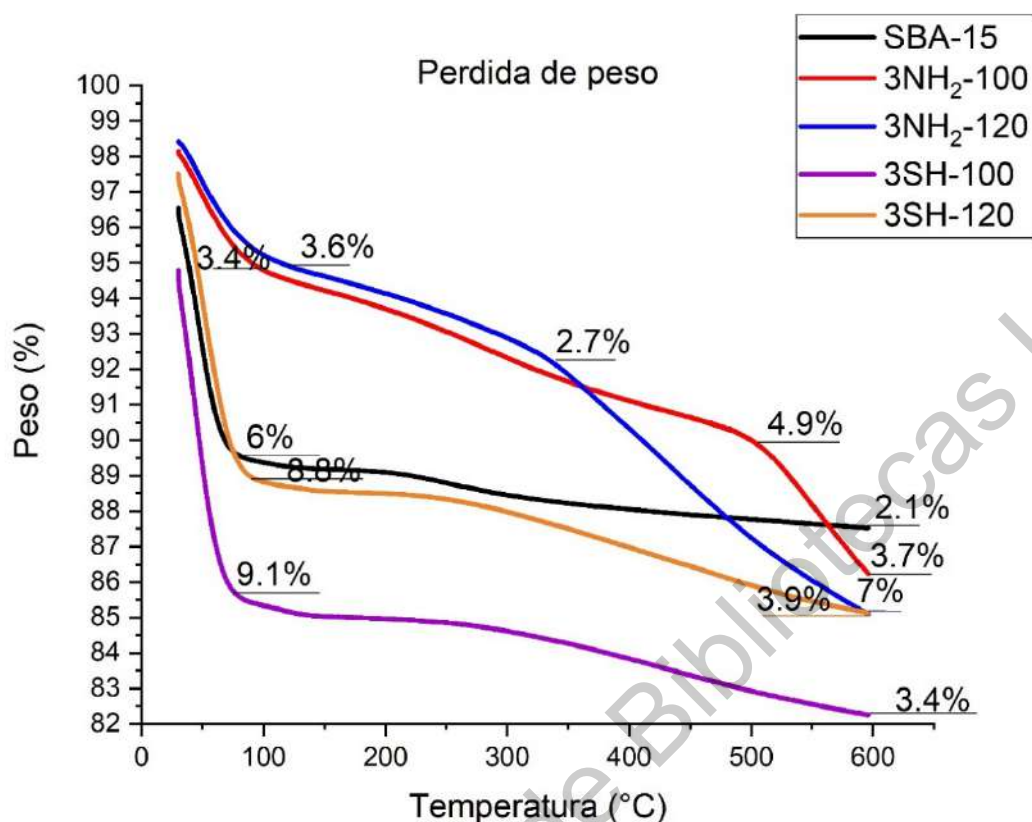


Figura 20. Termogrrama de la pérdida de peso para las sílices mesoporosas nativa y funcionalizadas.

Por otro lado, en la **Figura 21** se muestra la derivada de pérdida de peso para los materiales de SBA-15 nativa y funcionalizadas, este tipo de gráficas indican las temperaturas máximas a la cuáles ocurre la pérdida significativa de peso en los materiales analizados. En la figura mencionada se puede ver un pico a temperaturas bajas, por debajo de los 100°C, y como ya se ha mencionado, esto puede atribuirse a la pérdida de humedad. La muestra de SBA-15 pura (línea en color negro) exhibe una descomposición centrada en aproximadamente 250°C, que se asigna a la deshidroxilación de la muestra. Finalmente, todas las muestras funcionalizadas con grupos amino y mercapto, presentan temperaturas de descomposición a partir de los 300°C y que se atribuye, precisamente a la

descomposición de los grupos aminos y mercaptos presentes en los materiales 3NH₂-SBA-15 y 3SH-SBA-15.

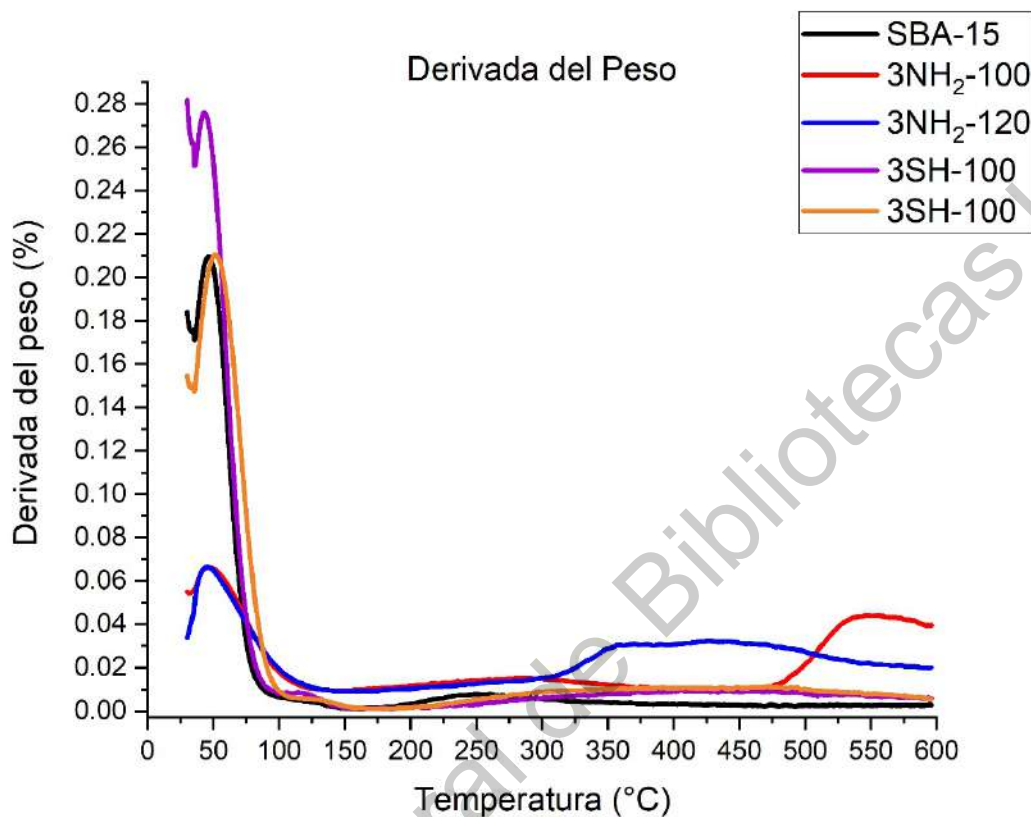


Figura 21. Primera derivada de la pérdida de peso (DTG) para las sílices mesoporosas nativa y funcionalizadas.

8.4.2 EMS-15 nativa y funcionalizada

En el siguiente termograma exhibido en la **Figura 22** se pueden observar las curvas de porcentaje de pérdida de peso de la EMS-15 nativa (curva azul) y su primera derivada (DTG, curva roja), con respecto al incremento en la temperatura, en un rango de 30 a 600°C. Como se ve, la EMS-15 exhibe una pérdida de peso continua, con una pérdida de peso total de aproximadamente 15% en ese rango de temperatura de 30 a 600°C. El primer punto de inflexión en la curva de pérdida de peso, centrado en aproximadamente 55°C

(visto en la curva de la primera derivada), se puede atribuir a la deshidratación de la muestra, es decir a la pérdida de moléculas de agua fisi-adsorbidas en la EMS-15. Un segundo punto de inflexión en la curva de pérdida de peso, que se observa centrado en aproximadamente 300°C (como se ve en la curva de la primera derivada), corresponde con la deshidroxilación de la muestra, es decir, a la pérdida de grupos -OH superficiales (Luan *et al.*, 2005).

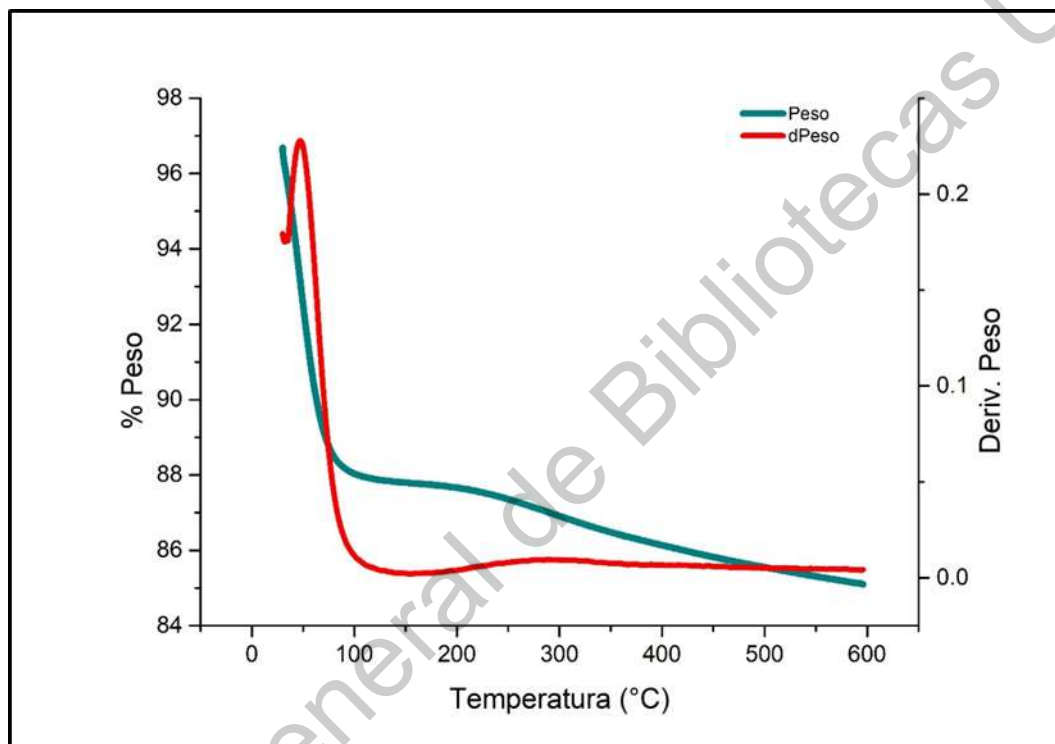


Figura 22. Termograma de la EMS-15.

En la **Figura 23** se presentan las curvas de porcentaje de pérdida de peso de la EMS-15 funcionalizada con grupos amino (curva marrón) y su primera derivada (DTG, curva roja), de igual modo que con el termograma anterior (Figura 12) el análisis se realizó bajo las mismas condiciones de temperatura. La esponja mesoporosa de sílice funcionalizada 0.3NH₂/EMS-15 presenta una pérdida de peso continua de aproximadamente el 15%. Similar al termograma de la EMS-15 sin funcionalizar, esta muestra 0.3NH₂/EMS-15 exhibe un primer punto de inflexión en la curva de pérdida de peso, centrado en aproximadamente 70°C (visto en la curva de la primera derivada), que se atribuye a la deshidratación de la

muestra, es decir a la pérdida de moléculas de agua fisi-adsorbidas en el material (Luan *et al.*, 2005). También, se observa un segundo punto de inflexión en la curva de pérdida de peso, que se observa centrado en aproximadamente 290°C (como se ve en la curva de la primera derivada), se debe a la descomposición de los grupos amino localizados en la superficie de la EMS-15 (Gao *et al.*, 2020).

Por lo tanto, los resultados del análisis termogravimétrico confirmaron la funcionalización exitosa de la EMS-15 con APTES.

Es importante destacar, que los grupos amino empiezan a descomponerse a una temperatura de 290°C, más alto que el punto de ebullición del líquido APTES, lo que indica que ocurre una unión química entre los grupos hidróxidos (del APTES hidrolizado) y los grupos -OH de la superficie de la EMS-15, lo cual coincide con lo reportado por Gao *et al.* (2020).

Finalmente, la muestra presenta un tercer punto de inflexión, centrado alrededor de 540°C y que se atribuye a la descomposición de residuos carbonosos.

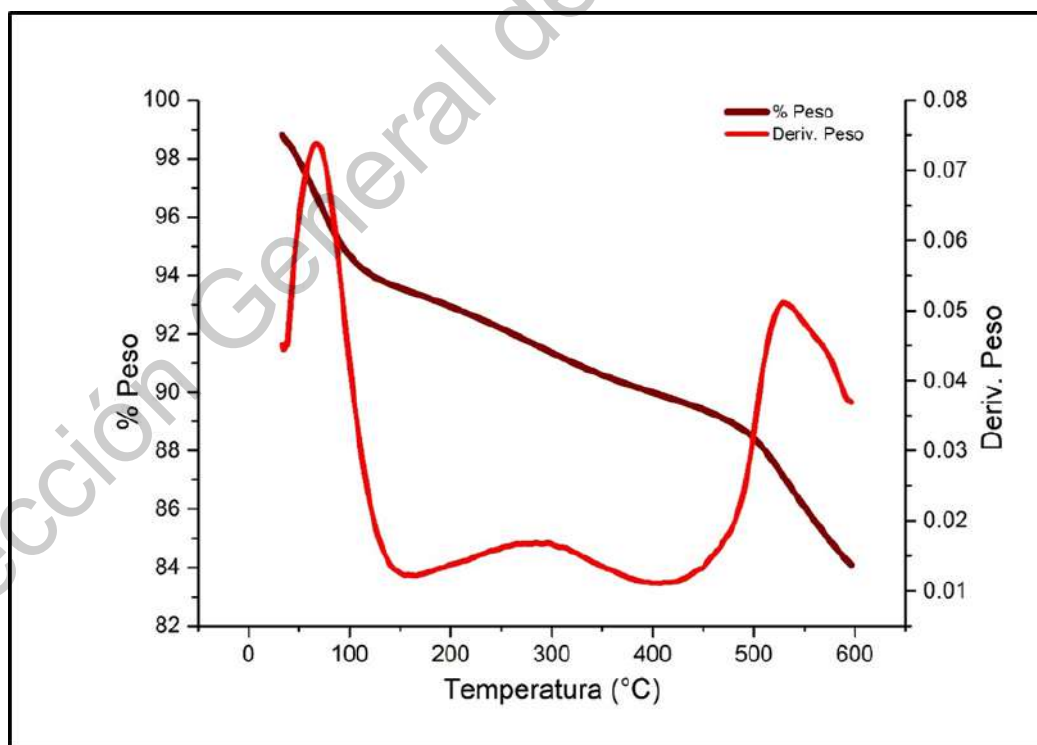


Figura 23. Termograma de la muestra NH₂/EMS-15.

8.5 Micro-espectroscopía Raman de la SBA-15 nativa y funcionalizada

En la **Figura 24** se presenta el espectro Raman de la sílice mesoporosa SBA-15 pura. Las bandas en 341, 494, 591 y 1039 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones del enlace Si-O-Si (Walrafe, Hokmabadi, & Holmes, 1986; Tallant, Bunker, Brinker, & Balfe, 1986; Panitz & Wokaun, 1997; Cheng-Kuang & I-Ming, Effect of hydrogen bonding on the glass transition behavior of poly(acrylic acid)/silica hybrid materials prepared by sol-gel process, 2001; Cheng-Kuang, Shu-Ling, I-Ming, & Sheng-Chung, 2001). La banda en 971 y 2329 cm^{-1} pertenece a los grupos silanoles (Si-OH) (Walrafe, Hokmabadi, & Holmes, 1986; Cheng-Kuang, Shu-Ling, I-Ming, & Sheng-Chung, 2001). La banda en 2933 y 2932 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3-$ del solvente (Gnado, Dhamelincourt, Pélégis, Traisnel, & Le Maguer Mayot, 1996; Panitz & Wokaun, 1997), que permanece incluido en la estructura de la sílica gel.

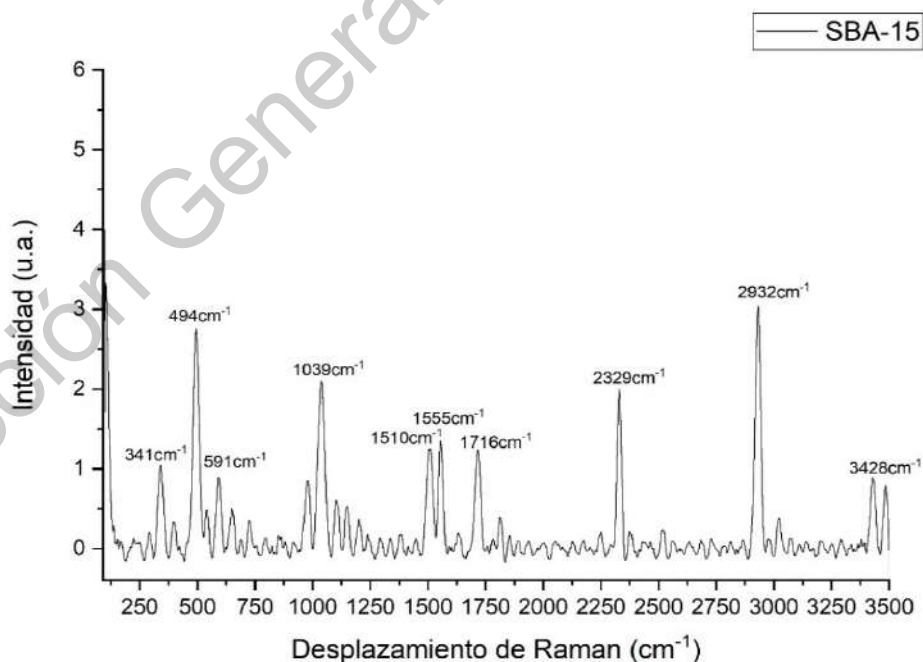


Figura 24. Espectro Raman de la SBA-15 nativa.

En la **Figura 25** se exhiben los espectros de los materiales mesoporosos funcionalizados con grupos amino ($-\text{NH}_2$) (Larkin, 2018) . Las bandas en 2898 y 3311 cm^{-1} corresponden con las vibraciones de los grupos aminos $-\text{NH}_2$ - (Larkin, 2018).

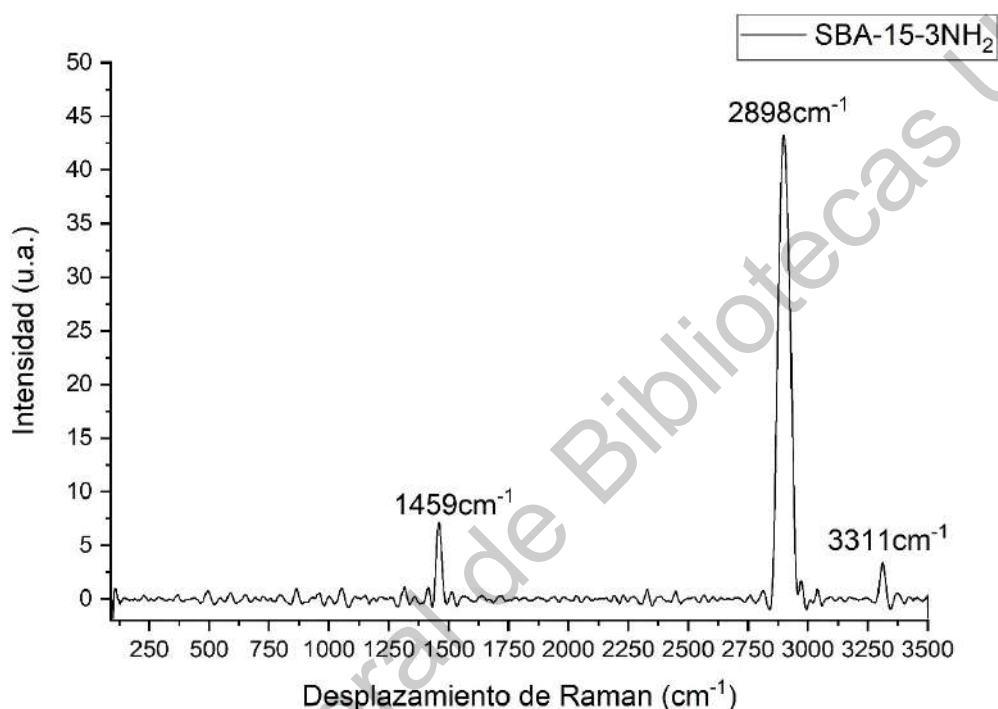


Figura 25. Espectro Raman de la SBA-15 funcionalizada con grupos amino.

El espectro Raman de la muestra SBA-15-SH se exhibe en la **Figura 26**. En el cual se vuelven a observar las bandas características de los enlaces siloxanos (Si-O-Si) y silanoles (Si-OH) de la SBA-15. Además, se observan las bandas en 2328 , 2931 y 3071 cm^{-1} que se atribuyen a los grupos mercapto ($-\text{SH}$).

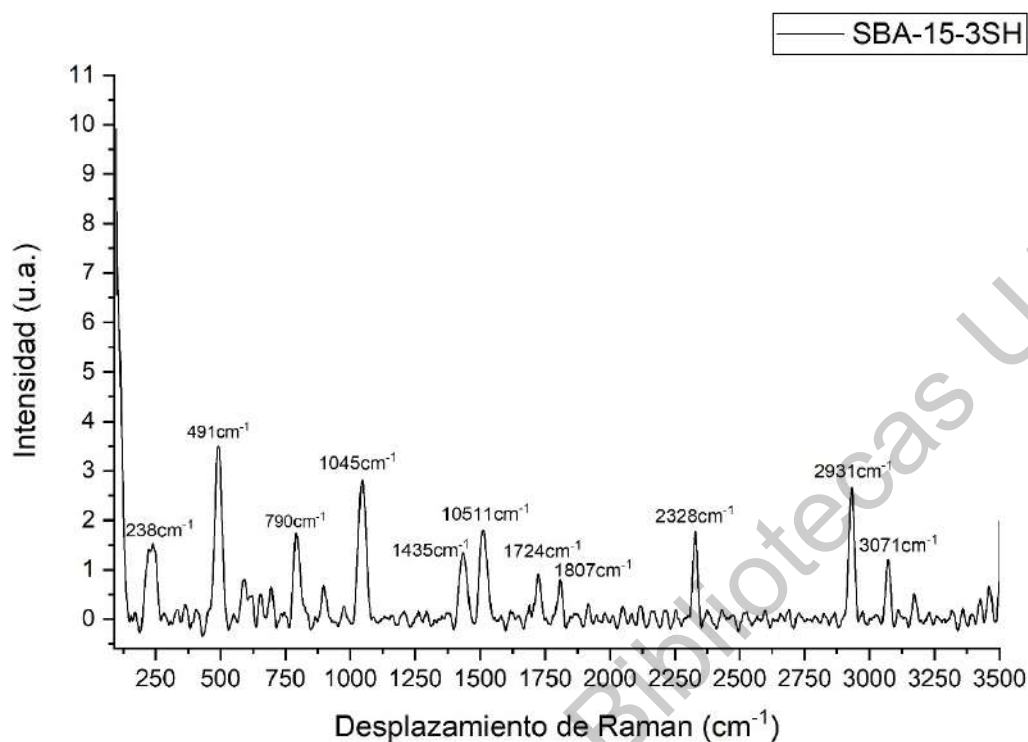


Figura 26. Espectro Raman de la SBA-16 funcionalizada con grupos mercapto.

8.6 Espectroscopía de Infrarrojo (FT-IR) de la EMS-15 nativa y funcionalizada

En la **Figura 27** se presenta la gráfica FT-IR para las partículas de EMS-15 nativa y de EMS-15-NH₂ las cuales presentan bandas de vibraciones correspondientes al enlace siloxano (Si-O-Si) en 1062 cm⁻¹ y en 804 cm⁻¹. En 3436 cm⁻¹, 963 cm⁻¹ se presentan los grupos silanoles (Si-OH). Para las partículas funcionalizadas con grupos aminos se presentan vibraciones en 941 cm⁻¹, 1559 cm⁻¹, 3273 cm⁻¹, que indican la presencia de enlaces N-H. Además, ambas graficas presentan una vibración en 1630 cm⁻¹ que pertenece a las moléculas de H₂O libres en las muestras. Con los resultados de FT-IR se comprueba que las partículas sintetizadas cuentan con la composición de las partículas de sílice, además de que solo la muestra funcionalizada cuenta con los grupos aminos provenientes

del APTES (Hernández-Morales et al., 2012).

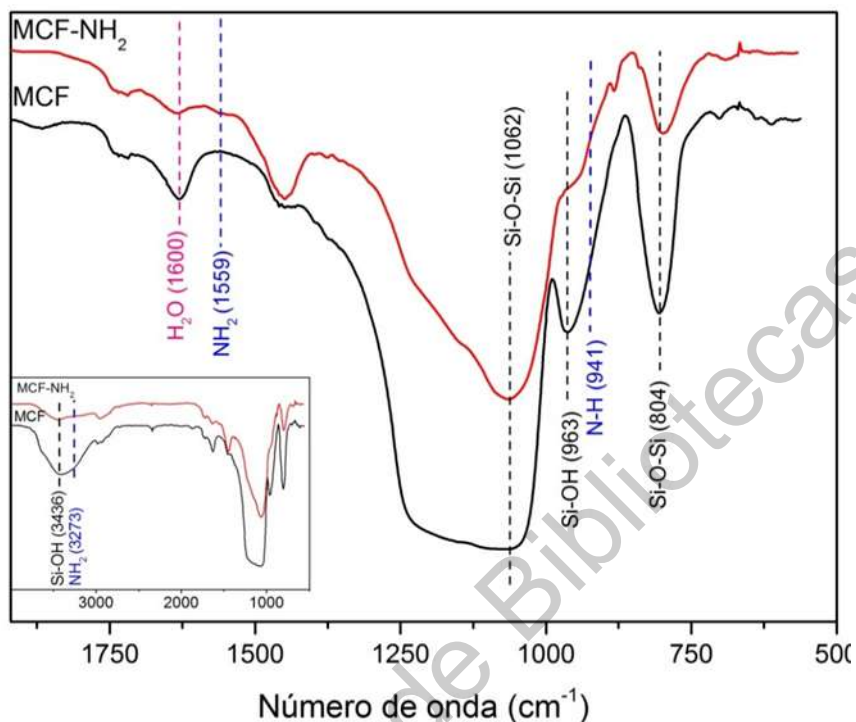


Figura 27. Espectro FT-IR de la EMS-15 y de la EMS-15-NH₂.

8.7 Purificación del RNA

Una vez realizada la extracción y la purificación del RNA en las sílices mesoporosas utilizadas en este estudio, se procedió a realizar el análisis mediante electroforesis en gel de las sílices mesoporosas nativas y funcionalizadas, con el propósito de verificar la incorporación de los RNAs en los poros de las sílices mesoporosas.

En la **Figura 28** se presenta el resultado del análisis de electroforesis en gel de la SBA-15 nativa y funcionalizada cargadas con los RNAs extraídos. Donde son colocados bajo luz UV, y donde los fragmentos de RNA mostraron un brillo, indicándonos que hay RNA

presente. Se puede apreciar unas líneas bien definidas que son las bandas de DNA de las bacterias, y las bandas que corresponden RNA. En donde el sobrenadante de SBA-15 nativa hubo una acumulación de fragmentos de RNA a lo largo del carril indicando que la SBA-15 nativa posee una carga débil para atraer los fragmentos de RNA.



Figura 28. Electroforesis en gel de la SBA-15 nativa y con grupos funcionalizados usando un Mini-Protean II y expuesta a través de la luz UV. En los carriles se componen de acuerdo con las etiquetas que es control, SBA-15 nativa, funcionalizadas con mercapto y amino, respectivamente y las S es el sobrenadante.

En la **Figura 29** se puede observar la división en 8 carriles, cada carril se compone de la siguiente manera:

- Control, nuestra fuente principal para comparar si el metodo funciona.
- SBA-15 nativa con una concentración de 50 µg.
- SBA-15-NH₂ 50 µg de concentración.

- SBA-15-SH 50 μg de concentración.
- Sobrenadante de SBA-15 nativa.
- Sobrenadante del SBA-15-NH₂.
- Sobrenadante del SBA-15-SH.

Con el control podremos comparar las bandas para poder determinar los tamaños aproximados de las SBAs y EMS.

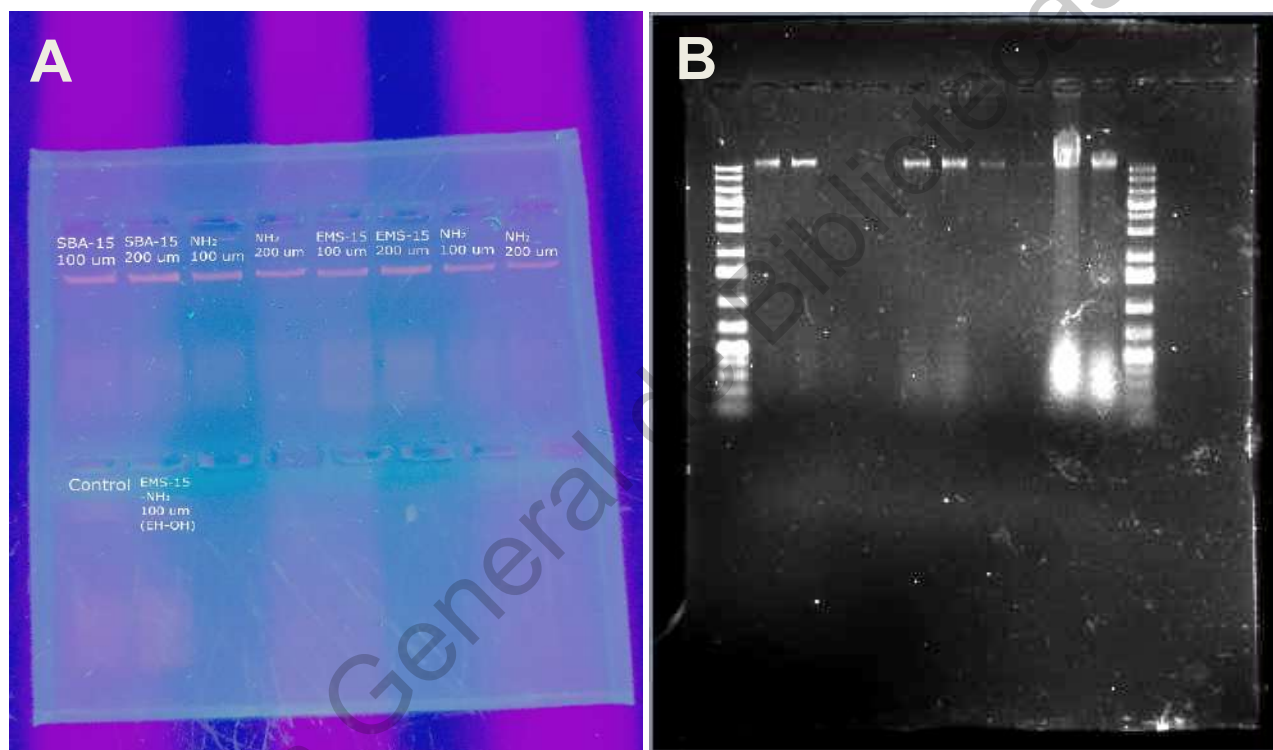


Figura 29. A) Electroforesis en gel donde la cantidad de SBA-15 y EMS-15 nativos y funcionalizados varía de acuerdo con la concentración que se utilizó. B) Se aprecia el DNA genómico (banda superior), y diversas formas de RNA. El tRNA se encuentra en la parte inferior (aunque no es apreciable), mientras que el mRNA se encuentra a lo largo del carril (fondo). Los carriles de los extremos contienen el marcador de peso molecular.

En la **Figura 29** se realizó la misma prueba, en esta ocasión variando la concentración de las sílices mesoporosas, aumentando la concentración a 100 y 200 μg de las sílices mesoporosas. También, se reemplazaron las sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos mercapto, por esponjas mesoporosas de sílice EMS-15-NH₂, debido a que este

material posee diámetros de poro mayores que las de la SBA-15.

Se comprueba la purificación y se obtiene una mayor pureza, aunque al incrementar a 100 μg de concentración, no se mejora la purificación. Además, con las EMS-15 se obtiene una pureza de mayor calidad comparandolo con las SBA-15. Pero, en las sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos amino no se presentan señales de fragmentos de RNA en todo el carril, tanto en las SBAs-15 como EMS-15, lo que nos informa que no es lo suficiente adecuado para extraer las moléculas de RNA. Sin embargo, la esponja mesoporosa de sílice EMS-15 mostró RNA con una buena visibilidad con etanol, indicando que al precipitarlo en el etanol brinda una mejor purificación.

En la **Figura 30** se reporta los resultados de un experimento que se realizó con el propósito de comprobar que, al precipitar las sílices mesoporosos en etanol mostraría, una mejor purificación en comparación con el experimento anterior (**Figura 29**). El resultado fue que se obtuvo una purificación más sobresaliente.

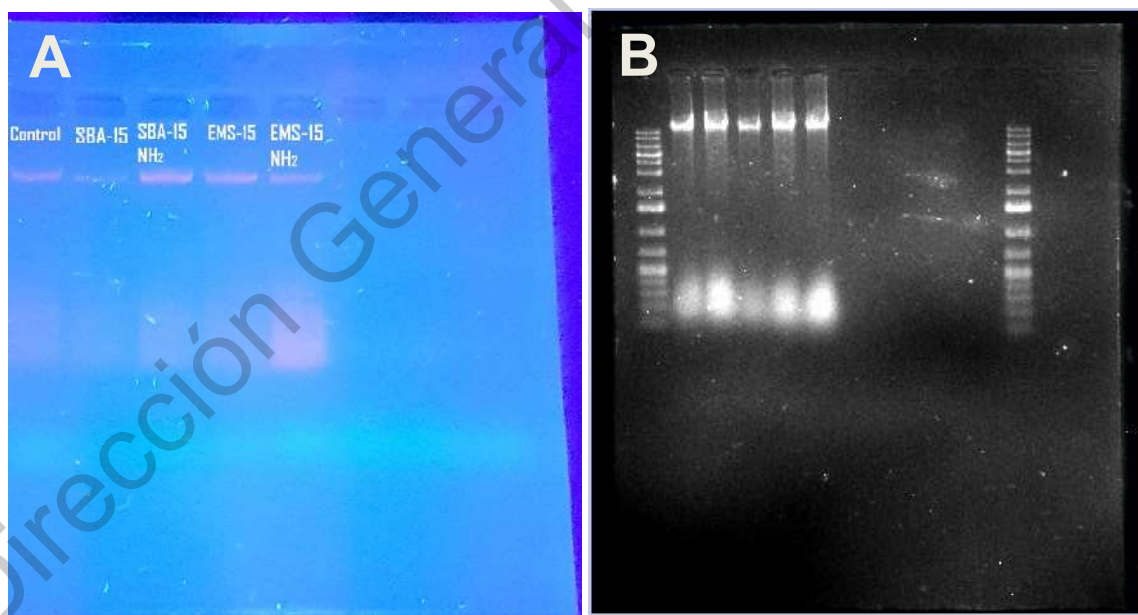


Figura 30. A) Electroforesis en gel de la SBA-15 y EMS-15 precipitados en etanol expuestas a través de la luz UV. B) En los extremos de los carriles es el peso molecular, en los carriles se encuentra el control, SBA-15 nativa con una concentración a 100 μg y funcionalizada con grupos amino, al igual se hace con la EMS-15.

En la **Figura 31** se exhiben los resultados de un experimento realizado con el fin de demostrar que la EMS-15-NH₂ fue capaz de extraer RNA en diferentes bacterias. Lo que permitió comprobar dos situaciones, la primera que el método es capaz de purificar el RNA de diferentes bacterias y la segunda de que solamente con la aplicación directa de las partículas, ocurrió la purificación, lo que permitirá disminuir el número de etapas en el proceso de purificación.

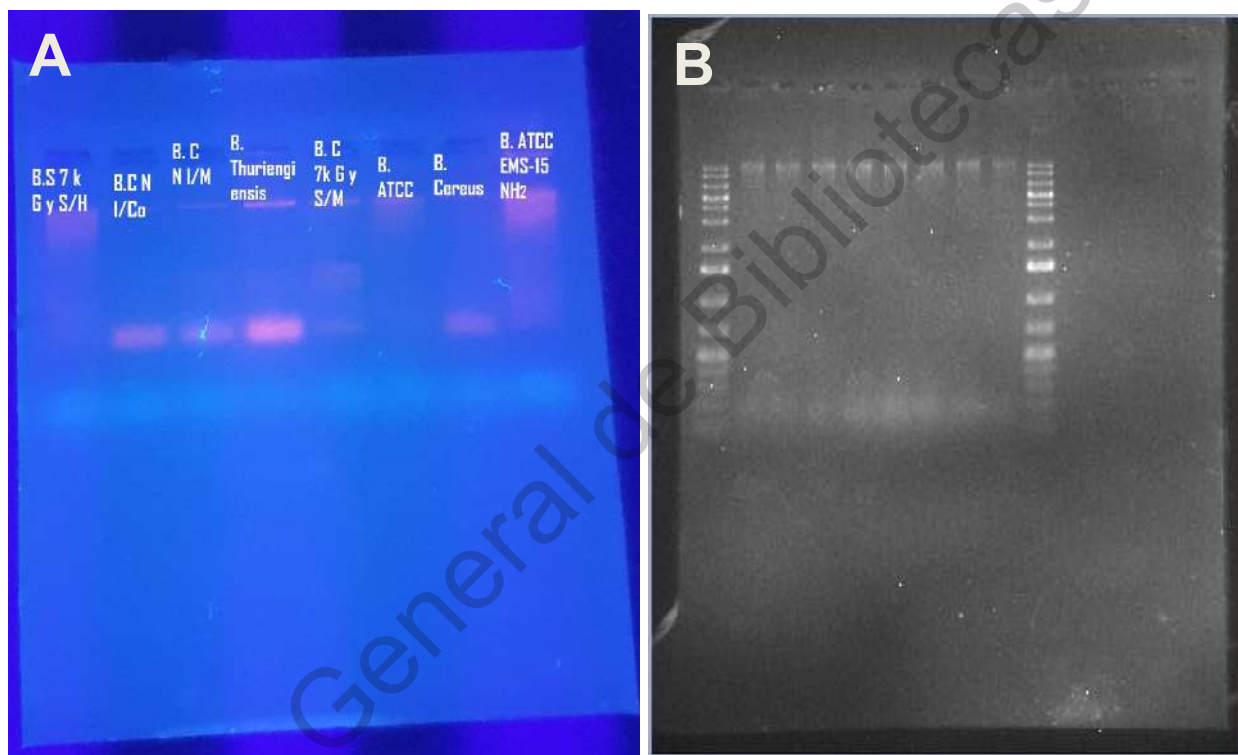


Figura 31. A) Electroforesis en gel utilizando 3NH₂-EMS-15 en diferentes bacterias. B) En los extremos de los carriles es el peso molecular, en los carriles se encuentran familias de *Bacillus*.

En la **Figura 32** se presentan los resultados de un experimento que permitió comprobar que además de precipitarlos en etanol y que al incrementar la concentración de las partículas de las sílices mesoporosas funcionalizadas con grupos NH₂, se logró adsorber más fragmentos de RNA. Lo primero que se puede destacar es que las SBA-15-NH₂ a 100 µg de concentración fueron las que manifestaron la mayor cantidad de fragmentos de RNA, al mismo tiempo que indica una visibilidad del mRNA en todo el carril. Lo segundo es que al incrementar la concentración de la SBA-15-NH₂ y EMS-15-NH₂ (a 200 y 400 µg),

disminuyó la cantidad de fragmentos obtenidos.

Por otra parte, en las EMS-15-NH₂ en la que se obtuvo la mayor cantidad de fragmentos de RNA fue cuando se utilizó 200 µg de concentración, a diferencia de las otras en 100 y 400 µg de concentración en las que fue de menor cantidad de fragmentos obtenidos. Y que en el sobrenadante estuvo la mayor parte de los fragmentos.

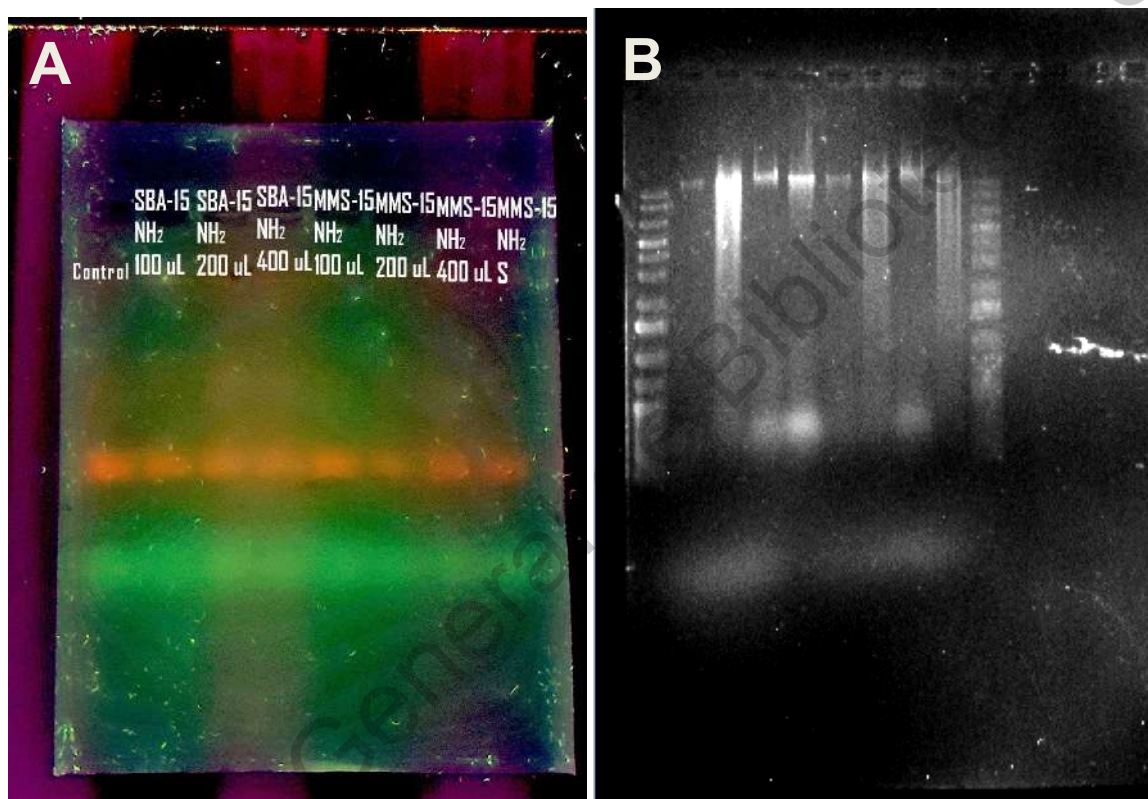


Figura 32. A) Electroforesis en gel con 3NH₂-SBA-15 y 3NH₂-EMS-15 con diferentes variaciones en la concentración y expuestas a través de la luz UV. B) En los extremos de los carriles es el peso molecular, en los carriles se encuentra el control, SBA-15 nativa con una concentración a 100, 200 y 400 µg y funcionalizadas con grupos amino, al igual se hace con la EMS-15.

IX. Conclusiones

La metodología utilizada en este estudio permitió la preparación de la sílice mesoporosa SBA-15 y la modificación de las condiciones experimentales típicas, a través de la adición de un agente de hinchamiento, permitió la preparación de una sílice mesoporosa tipo esponja (EMS-15). La EMS-15 obtenida presentó tamaño de poro mayor (30-50 nm), en comparación con la SBA-15 (5-7 nm).

Las dos sílices mesoporosas manifestaron diferencias bien marcadas tanto en la morfología de las partículas como en su tamaño y en su porosidad, como así lo demostraron los resultados en las imágenes de microscopía electrónica de barrido, los difractogramas de rayos-X a bajos ángulos y las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno a 77K.

Las frecuencias vibracionales en los espectros de micro-Raman y de infrarrojo constataron la existencia de los enlaces siloxanos (Si-O-Si) y de los grupos silanoles (Si-OH), pertenecientes a la sílice y verificaron la funcionalización exitosa de las sílices mesoporosas con los grupos amino.

Los resultados de los ensayos de electroforesis en gel demostraron que las diferentes sílices mesoporosas obtenidas en este estudio; con sus diferentes morfologías de partículas, diferente tamaño de partículas, diferentes porosidades y presencia de los grupos amino en sus superficies; poseen un efecto benéfico y claramente marcado en la purificación del RNA. Sin embargo, es necesario repetir los experimentos con diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de las nanopartículas.

Entre las sílices mesoporosas estudiadas, la sílice mesoporosa tipo esponja funcionalizada con grupos amino presentó el mayor efecto benéfico en la purificación del RNA, debido muy probablemente al tamaño superior de sus poros.

Los resultados de la electroforesis en gel ponen de manifiesto que los materiales mesoporosos tienen el potencial de encapsular RNA y mantenerlos intactos, lo que

puede ser útil en el campo de la nanomedicina.

Además, se encontró que incluso colocando la SBA-15 en los canales del gel se puede purificar el RNA durante el proceso, demostrando que los materiales mesoporosos son muy efectivos para extraer RNA y además de tener ventajas de ser materiales baratos en comparación con los kits disponibles comercialmente.

Según la investigación, una concentración de sal permite que las moléculas se adsorban a través de la interacción electrostática y, por lo tanto, una alta concentración de sal disminuye la interacción entre una molécula y la superficie. Por lo tanto, la elución de acetato de sodio como buffer con etanol evitó que las biomoléculas interactuaran en la superficie de las SBAs-15 y EMS-15.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

x. Bibliografía

- [1] Guo, P. (2011). RNA Nanotechnology: methods for synthesis, conjugation, assembly and application of RNA nanoparticles. *Methods*, 2(54), 201-203.
- [2] Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., & Garg, S. (2018). Mesoporous silica nanoparticles: A comprehensive review on synthesis and recent advances. *Pharmaceutics*, 10(3), 118.
- [3] Mora Raimundo, P. (2016). Nanopartículas de sílice mesoporosa para aplicaciones biomédicas.
- [4] Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C., & Kummel, A. C. (2014). Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface science reports*, 69(2-3), 132-158.
- [5] Yang, S., Song, S., Han, K., Wu, X., Chen, L., Hu, Y., ... & Liu, B. (2019). Characterization, in vitro evaluation and comparative study on the cellular internalization of mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers. *Microporous and Mesoporous Materials*, 284, 212-224.
- [6] Slowing, I.I.; Trewyn, B.G.; Lin, V.S.-Y. Mesoporous Silica Nanoparticles for Intracellular Delivery of Membrane-Impermeable Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 8845–8849.
- [7] Cha, W.; Fan, R.; Miao, Y.; Zhou, Y.; Qin, C.; Shan, X.; Wan, X.; Li, J. Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Intracellular Delivery of Nucleic Acids and Subsequent Therapeutic Applications. *Molecules* 2017, 22, 782.
- [8] Tao, C.; Zhu, Y.; Xu, Y.; Zhu, M.; Morita, H.; Hanagata, N. Mesoporous silica nanoparticles for enhancing the delivery efficiency of immunostimulatory DNA drugs. *Dalton Trans.* 2014, 43, 5142–5150.
- [9] Möller, K.; Müller, K.; Engelke, H.; Bräuchle, C.; Wagner, E.; Bein, T. Highly efficient siRNA delivery from core–shell mesoporous silica nanoparticles with multifunctional polymer caps. *Nanoscale* 2016, 8, 4007–4019.
- [10] Hanafi-Bojd, M.Y.; Ansari, L.; Malaekheh-Nikouei, B. Codelivery of anticancer drugs and siRNA by mesoporous silica nanoparticles. *Ther. Deliv.* 2016, 7, 649–655.
- [11] Beck, J. S., Vartuli, J. C., Roth, W. J., Leonowicz, M. E., Kresge, C. T., Schmitt, K. D., ... & Higgins, J. B. (1992). A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(27), 10834-10843.

[12] Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C., & Beck, J. S. (1992). Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *nature*, 359(6397), 710-712.

[13] Angelos, S., Liong, M., Choi, E., & Zink, J. I. (2008). Mesoporous silicate materials as substrates for molecular machines and drug delivery. *Chemical Engineering Journal*, 137(1), 4-13.

[14] Heikkilä, T., Salonen, J., Tuura, J., Hamdy, M. S., Mul, G., Kumar, N., ... & Hirvonen, J. (2007). Mesoporous silica material TUD-1 as a drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 331(1), 133-138.

[15] Aktas, O., Yasyerli, S., Dogu, G., & Dogu, T. (2011). Structural variations of MCF and SBA-15-like mesoporous materials as a result of differences in synthesis solution pH. *Materials Chemistry and Physics*, 131(1-2), 151-159.

[16] A. Mehmood, H. Ghafar, S. Yaqoob, U. Gohar, and B. Ahmad. Mesoporous silica nanoparticles: a review. *J. Dev. Drugs*, 6(02), 2017.

[17] A. Nieto Peña. *Aplicaciones biomedicas de materiales mesoporosos de sílice y de carbón*. PhD thesis, Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 2011.

[18] A. Smuszkiewicz. Sílices mesoporosas como nanocatalizadores activos en la síntesis de sistemas heterocíclicos con propiedades terapeuticas. PhD thesis, UNED. Universidad Nacional de Educacion a Distancia (España), 2017.

[19] Á. A. Beltrán Osuna, "Estudio de la síntesis de nanopartículas mesoporosas y su recubrimiento con un polímero zwitteriónico", Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, 2017.

[20] Wang, J., Ali, Z., Wang, N., Liang, W., Liu, H., Li, F., ... & Li, Z. (2015). Simultaneous extraction of DNA and RNA from *Escherichia coli* BL 21 based on silica-coated magnetic nanoparticles. *Science China Chemistry*, 58(11), 1774-1778.

[21] T. J. Pinnavaia y W. ZHANG, "Catalytic properties of mesoporous molecular sieves prepared by neutral surfactant assembly", *ChemInform*, vol. 29, nº 44, 1998.

[22] Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(5258), 561-563.

[23] (2015) Khan Academy (Online) Available: <https://es.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/central-dogma-transcription/a/intro-to-gene-expression-central-dogma>.

[24] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.

[25] J. B. Reece, L. A. Urry, M. L. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky y R. B. & Jackson, "Genes specify proteins via transcription and translation", de *Campbell biology*, San Francisco, CA: Pearson., 2011, pp. 334-340.

- [26] Vomelova, I., Vaníčková, Z., & Šedo, A. (2009). Technical note methods of RNA purification. All ways (should) lead to Rome. *Folia Biologica (Praha)*, 55, 243-251.
- [27] Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009.
- [28] Flodström, K., & Alfredsson, V. (2003). Influence of the block length of triblock copolymers on the formation of mesoporous silica. *Microporous and Mesoporous Materials*, 59(2-3), 167-176.
- [29] Halachev, T., Nava, R., & Dimitrov, L. (1998). Catalytic activity of (P) NiMo/Ti-HMS and (P) NiW/Ti-HMS catalysts in the hydrogenation of naphthalene. *Applied Catalysis A: General*, 169(1), 111-117.
- [30] Hernández, A., VASALLO, P. M., Torres, A., & Salido, E. (1994). Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Nefrología*, 14(2), 145-162.
- [31] Huirache-Acuña, R., Pawelec, B., Rivera-Muñoz, E., Nava, R., Espino, J., & Fierro, J. L. G. (2009). Comparison of the morphology and HDS activity of ternary Co-Mo-W catalysts supported on P-modified SBA-15 and SBA-16 substrates. *Applied Catalysis B: Environmental*, 92(1-2), 168-184.
- [32] Zhao, D., Yang, P., Melosh, N., Feng, J., Chmelka, B. F., & Stucky, G. D. (1998). Continuous mesoporous silica films with highly ordered large pore structures. *Advanced Materials*, 10(16), 1380-1385.
- [33] Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- [34] Feliczak-Guzik, A., Jadach, B., Piotrowska, H., Murias, M., Lulek, J., & Nowak, I. (2016). Synthesis and characterization of SBA-16 type mesoporous materials containing amine groups. *Microporous and Mesoporous Materials* (220), 231-238.
- [35] Ríos, J. M. (2006). El gran mundo de los RNAs pequeños. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 73-78.
- [36] Flodström, K., Teixeira, C. V., Amenitsch, H., Alfredsson, V., & Lindén, M. (2004). In situ synchrotron small-angle X-ray scattering/X-ray diffraction study of the formation of SBA-15 mesoporous silica. *Langmuir*, 20(12), 4885-4891.
- [37] Luan, Z., Hartmann, M., Zhao, D., Zhou, W., & Kevan, L. (1999). Alumination and ion exchange of mesoporous SBA-15 molecular sieves. *Chemistry of materials*, 11(6), 1621-1627.
- [38] Tuel, A., & Hubert-Pfalzgraf, L. G. (2003). Nanometric monodispersed titanium oxide particles on mesoporous silica: synthesis, characterization, and catalytic activity in oxidation reactions in the liquid phase. *Journal of Catalysis*, 217(2), 343-353.

- [39] Liberman, A., Mendez, N., Trogler, W. C., & Kummel, A. C. (2014). Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. *Surface science reports*, 69(2-3), 132-158.
- [40] Yang, S., Song, S., Han, K., Wu, X., Chen, L., Hu, Y., ... & Liu, B. (2019). Characterization, in vitro evaluation and comparative study on the cellular internalization of mesoporous silica nanoparticle-supported lipid bilayers. *Microporous and Mesoporous Materials*, 284, 212-224.
- [41] Wang, L., Zhao, W., & Tan, W. (2008). Bioconjugated silica nanoparticles: development and applications. *Nano Research*, 1(2), 99-115.
- [42] Payne, J. C., ter Horst, M. A., & Godwin, H. A. (1999). Lead fingers: Pb²⁺ binding to structural zinc-binding domains determined directly by monitoring lead–thiolate charge-transfer bands. *Journal of the American Chemical Society*, 121(29), 6850-6855.
- [43] Walrafen, G. E., Hokmabadi, M. S., & Holmes, N. C. (1986). Raman spectrum and structure of thermally treated silica aerogel. *The Journal of chemical physics*, 85(2), 771-776.
- [44] Tallant, D. R., Bunker, B. C., Brinker, C. J., & Balfe, C. A. (1986). Raman spectra of rings in silicate materials. *MRS Online Proceedings Library Archive*, 73.
- [45] Panitz, J. C., & Wokaun, A. (1997). Characterization of the sol-gel process using Raman spectroscopy organically modified silica gels prepared via the formic acid-alkoxide route. *Journal of sol-gel science and technology*, 9(3), 251-263.
- [46] Chan, C. K., & Chu, I. M. (2001). Effect of hydrogen bonding on the glass transition behavior of poly (acrylic acid)/silica hybrid materials prepared by sol–gel process. *Polymer*, 42(14), 6089-6093.
- [47] Chan, C. K., Peng, S. L., Chu, I. M., & Ni, S. C. (2001). Effects of heat treatment on the properties of poly (methyl methacrylate)/silica hybrid materials prepared by sol–gel process. *Polymer*, 42(9), 4189-4196.
- [48] Gnado, J., et al. "Raman spectra of oligomeric species obtained by tetraethoxysilane hydrolysis-polycondensation process." *Journal of non-crystalline solids* 208.3 (1996): 247-258.
- [49] Larkin, P. J. (2018). General Outline for IR and Raman Spectral Interpretation. *Infrared and Raman Spectroscopy; Elsevier Ltd.: MA, USA*, 135-151.
- [50] Hikosaka, R., Nagata, F., Tomita, M., & Kato, K. (2018). Elucidating the effect of different amino-functionalized spherical mesoporous silica characteristics on ribonucleic acid selectivity and adsorption capacity. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 6(1), 70-81

[51] Cha, W.; Fan, R.; Miao, Y.; Zhou, Y.; Qin, C.; Shan, X.; Wan, X.; Li, J. Mesoporous Silica Nanoparticles as Carriers for Intracellular Delivery of Nucleic Acids and Subsequent Therapeutic Applications. *Molecules* **2017**, *22*, 782

[52] Paris, J. L., & Vallet-Regí, M. (2020). Mesoporous Silica Nanoparticles for Co-Delivery of Drugs and Nucleic Acids in Oncology: A Review. *Pharmaceutics*, *12*(6), 526.

[53] Smuszkiewicz, A. (2017). *Sílices mesoporosas como nanocatalizadores activos en la síntesis de sistemas heterocíclicos con propiedades terapéuticas* (Doctoral dissertation, UNED. Universidad Nacional de Educación a Distancia (España)).

Dirección General de Bibliotecas UIQ