



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:  
QUÍMICA MEDICINAL

**DISEÑO DE UN BIOMATERIAL BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE ADN  
POR LA TÉCNICA DE SOL-GEL**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

QFB. ELANI JULISSA CABRERA VEGA  
2162800126

COMITÉ TUTORAL

COTUTOR: M. en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA  
COTUTOR: DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ  
ASESOR: DRA. GEORGINA ALARCÓN ÁNGELES

ENERO, 2019



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
QUÍMICA MEDICINAL

**DISEÑO DE UN BIOMATERIAL BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE ADN  
POR LA TÉCNICA DE SOL-GEL**

Vo.Bo DEL COMITÉ TUTORAL

---

COTUTOR: M. en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

---

COTUTOR: DR. MARTÍN GÓMEZ HERNÁNDEZ

---

ASESOR: DRA. GEORGINA ALARCÓN ÁNGELES

ALUMNO

---

QFB. ELANI JULISSA CABRERA VEGA  
2162800126



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN  
QUÍMICA MEDICINAL

**DISEÑO DE UN BIOMATERIAL BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE ADN  
POR LA TÉCNICA DE SOL-GEL**

PRESENTA  
QFB. ELANI JULISSA CABRERA VEGA

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

---

PRESIDENTE: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

---

VOCAL: DRA. LENA RUÍZ AZUARA

---

SECRETARIO: M. en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

ENERO, 2019

*“Pues todo lo puedo hacer por medio de Cristo, quien me da las fuerzas”*  
Filipenses 4:13

## RESUMEN

En el área de investigación de la química farmacéutica el ácido desoxirribonucleico (ADN) inmovilizado podría emplearse como agente de biorreconocimiento para la identificación de compuestos bioactivos de interés farmacéutico; considerando que el ADN es una diana biológica para muchos antibióticos, antivirales y fármacos antineoplásicos y también se utiliza para la evaluación de efectos genotóxicos y carcinogénicos de diversos compuestos químicos. Existen diferentes métodos de inmovilización de biomoléculas entre los que se incluye soportes orgánicos, poliméricos o inorgánicos; sin embargo, muchos de estos métodos no pueden ser aplicados a todas las biomoléculas, pues las interacciones no específicas entre éstas y el material de soporte pueden producir una desnaturalización de la biomolécula afectando su actividad biológica. Una alternativa para el diseño de biomateriales que incluyan ácidos nucleicos es el atrapamiento en matrices inorgánicas de silicatos, que se forman a bajas temperaturas mediante un método llamado sol-gel. Este método de preparación de sol-gel ofrece la ventaja de utilizar una fase acuosa a temperaturas bajas; condiciones que no comprometen la actividad biológica de este tipo de biomoléculas.

En el presente trabajo se logró la obtención de un biomaterial a partir de esperma de salmón como fuente de ADN, el cual se inmovilizó mediante el método de sol-gel. El biomaterial sintetizado presentó afinidad por el sulfóxido de albendazol, el metabolito primario del fármaco albendazol, el cual es causante de efectos embriotóxicos y teratogénicos. La capacidad de retención del biomaterial se evaluó mediante un análisis frontal comparativo entre el sulfóxido de albendazol y la cafeína usada como control, utilizando geles blanco (sin ADN inmovilizado) y el biomaterial. En el caso de los geles blancos fue detectable una retención no específica y débil, diferente a la interacción de afinidad por el ADN. Se propone que la utilización de este tipo de biomateriales permita identificar fármacos cuyos patrones de retención por afinidad faciliten la realización de estudios *in vitro* para la confirmación de interacciones fármaco-ADN, detección de efectos genotóxicos como en el caso de metabolitos teratogénicos, así como de efectos terapéuticos de nuevas moléculas que actúen sobre el ADN como diana biológica.

## AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES



Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, también agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Campus Xochimilco (UAM-X) por su apoyo para la realización de este trabajo de investigación.

Así mismo, expreso mi gratitud a la División de Ciencias Biológicas de la UAM-X, al departamento de Sistemas Biológicos, y Laboratorio de Farmacocinética y Farmacodinamia por brindarme las condiciones necesarias, materiales y equipos para el desarrollo experimental de esta investigación científica.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Antes que a nadie agradezco a Dios, por todas sus bendiciones, guianza y sabiduría para poder empezar y terminar cada una de mis metas personales. Él es mi camino, mi verdad y mi vida; sin Él no llegaría a ningún camino seguro. Él es mi luz, mi guianza y mi hogar y cualquier nuevo proyecto que realice, sé que Él estará a mi lado recordándome cuánto me ama. Sin su bondad y misericordia este proyecto de investigación no podría haberse concluido.

### ***A mi familia***

A mis padres y pastores **Julio César Cabrera Jain** y **Amparo Soledad Vega Hinojosa** quienes han sido unos ángeles para mí durante estos 27 años; sin su ayuda y apoyo incondicional no podría ser lo que soy, ni concretar mi desarrollo en el ámbito de la investigación científica. Agradezco que crean en mí y me impulsen a seguir siendo cada día mejor persona, así como su guianza espiritual y oraciones diarias. Ellos son mi motivación a hacer todo con excelencia y dedicación.

A mi hermanita **Keren Estefanía Cabrera Vega**, quien ha sido una amiga incondicional y fiel para mí así como mi compañera de aventuras. Gracias por su apoyo emocional y espiritual que le da a mi vida, ella fue un bálsamo para mí cuando lo necesite en medio de la ansiedad, preocupación y cansancio.

A mi tía **Mary** y prima **Aris** por todo su apoyo desde el inicio de mis estudios de maestría y la culminación de este posgrado, por acompañarme en los trámites y documentación final para la presentación de este trabajo de investigación, así como su hospedaje brindado con amor durante mi estadía en CDMX. Soy feliz de que sean parte de mi familia.

### ***A mi novio***

**Gonzalo Campillo**, quien ha sido mi compañero de vida estos 7 años, agradecida estoy por todo su apoyo y consejos dados para el mejoramiento de mi proyecto de investigación; también por su ayuda en la presentación de este trabajo en congresos nacionales e internacionales. Gracias por creer en mí y recordarme que Dios me ha dado la capacidad de lograr sueños nobles. Agradezco todo su amor y apoyo incondicional que me acompañe incansablemente, él es un ejemplo para mí de perseverancia, disciplina y dedicación en la investigación científica. Admiro su amor por mí y fe en mí, lo cual no tiene precio ni fin  $\infty$ .

### ***A mis tutores***

A mi tutora **M.C Marcela Hurtado Y De la Peña** por todo su apoyo académico y la dirección experimental en este proyecto de investigación; por ayudarme en creer en el potencial y aporte científico de este trabajo. Agradezco toda su disposición de tiempo, consejos, preocupación, guía, mentoreo y por compartir todos sus conocimientos conmigo en el área de investigación de los biomateriales. Agradezco toda la fe que depositó en mi para llevar a cabo con dedicación y perseverancia este trabajo, su ejemplo ha dejado una huella en mi, un aporte imborrable en mi trayecto académico y de investigación; todo lo que ella hace y su trabajo de investigación es admirable y digno de reconocerse. Gracias profesora por creer en mi y ser pionera de esta área de investigación.

A mi asesora la **Dra. Georgina Alarcón Ángeles** y tutor **Dr. Martín Gómez Hernández** por sus consejos en la realización y redacción de este trabajo de investigación. Agradezco su tiempo de revisión, corrección y apoyo otorgado; así como su motivación para que continúe hacia mis estudios de doctorado.

### ***A mis amigos***

A mi amiga **QFB. Karla Morales** quien fue mi compañera de aventuras y laboratorio durante mis estudios de maestría, siempre animándome en días difíciles y días cansados. Con ella aprendí lo que es tener una mejor amiga en el área de la investigación científica. Gracias amiga por estar siempre ahí, y aún en la distancia nuestra amistad permanece.

A mi amigo **QFB. José Luis** por su apoyo desde mi llegada a la UAM, por esas largas jornadas de estudio y esfuerzo en fisicoquímica y otras materias, por su amistad en una etapa de mi vida que era completamente nueva. Gracias por estar ahí desde el primer día de clases cuando más lo necesitaba.

A mi colega **QFB. Oscar** por su apoyo en el desarrollo de los métodos analíticos en HPLC para las muestras, sin duda su aporte en este trabajo en la parte analítica fue muy importante. Le deseo el mejor de los éxitos en sus estudios de posgrado.



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
2.1 Uso del método de sol-gel .....	12
2.2 Inmovilización de ADN por el método de sol-gel.....	12
2.3 Inmovilización de ADN por otros métodos.....	14
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1 Biomoléculas .....	15
3.2 Interacciones biomoleculares .....	15
3.3 Cromatografía de afinidad .....	16
3.4 Cromatografía de afinidad frontal .....	17
3.5 Biomateriales.....	18
3.6 Métodos de inmovilización.....	19
3.6.1 Métodos de inmovilización químicos .....	20
3.6.2 Métodos de inmovilización Físicos .....	21
3.7 Ventajas y aplicaciones del método de sol-gel.....	23
3.8 Ácido desoxirribonucleico (ADN).....	25
3.9 Fuente de ADN .....	25
3.10 Fármacos modelo para evaluar el biomaterial.....	26
3.11 Aplicación farmacéutica de un biomaterial .....	27
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>29</b>
<b>7. OBEJTIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>29</b>
<b>8. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
8.1 Materiales .....	30
8.2 Preparación de reactivos.....	30
8.3 Fuente de ADN .....	31
8.3.1 Preparación del ADN de esperma de salmón .....	32
8.4 Selección de moléculas.....	32
8.5 Condiciones cromatográficas .....	34
8.6 Inmovilización de ADN por el método de sol-gel.....	34
8.6.1 Geles blanco por el método de sol-gel .....	35
8.6.2 Secado: Obtención del xerogel.....	35
8.6.3 Empaquetamiento de cartuchos fuera de línea .....	36
8.7 Cromatografía frontal.....	37

8.7.1 Curva de calibración .....	37
8.7.2 Adición y elución de las muestras .....	38
8.7.3 Filtración e inyección de las muestras.....	38
8.7.4 Análisis frontal de las muestras .....	39
8.8 Reutilización del biomaterial .....	39
8.9 Evaluación del patrón de retención de las muestras en el biomaterial en reposo a 4°C por 24 horas.....	39
8.9.1 Preparación del biomaterial y geles blanco .....	39
8.9.2 Preparación e incubación de las muestras.....	40
8.9.3 Análisis por espectrofotometría .....	40
8.10 Pruebas colorimétricas para evaluar la presencia de ADN .....	41
8.10.1 Prueba con reactivo de Bial u orcinol .....	41
8.10.2 Prueba con difenilamina .....	41
<b>9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
9.1 Cantidades de biomaterial y gel blanco obtenido .....	42
9.2 Cantidad de ADN inmovilizado .....	42
9.3 Análisis por cromatografía frontal .....	43
9.4 Evaluación del patrón de retención de cafeína y sulfóxido de albendazol .....	49
9.5 Lavados del biomaterial.....	51
9.6 Evaluación del patrón de retención de cafeína y sulfóxido de albendazol en el biomaterial, en reposo, a 4°C por 24 horas.....	52
9.6.1 Retención no específica .....	55
9.6.2 Funcionalidad del biomaterial .....	58
9.7 Pruebas complementarias .....	60
9.8 Estabilidad del biomaterial.....	61
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación del principio de cromatografía de afinidad.....	17
<b>Figura 2.</b> Curvas sigmoideas de la cromatografía de afinidad frontal.....	18
<b>Figura 3.</b> Métodos de inmovilización de agentes biológicos mediante retención física y unión química.....	19
<b>Figura 4.</b> Proceso del método de sol-gel..	23
<b>Figura 5.</b> Estructura química del precursor tetraetoxisilano.....	23
<b>Figura 6.</b> Fotografía del reactivo de ADN extraído de esperma de salmón empleado.....	32
<b>Figura 7.</b> Estructura química del sulfóxido de albendazol. ....	32
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la cafeína. ....	33
<b>Figura 9.</b> Xerogel obtenido y pulverizado. ....	36
<b>Figura 10.</b> Empaquetamiento a vacío y cartuchos del biomaterial y gel blanco....	36
<b>Figura 11.</b> Diagrama que representa la preparación del biomaterial y geles blanco mediante el método de sol-gel.....	37
<b>Figura 12.</b> Adición y elución de muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína..	38
<b>Figura 13.</b> Filtración e inyección a HPLC de muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína. ....	38
<b>Figura 14.</b> Piezas gelificadas circulares (bottom glass) de hidrogeles blanco y biomaterial. ....	40
<b>Figura 15.</b> Incubación de las muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína en bottom glass del biomaterial e hidrogel blanco en reposo.....	40
<b>Figura 16.</b> 0.2 g de biomaterial, bottom glass obtenido por el método de sol-gel..	45
<b>Figura 17.</b> Análisis frontal de cafeína en gel blanco; utilizando un empaque de 4.28 g.....	43
<b>Figura 18.</b> Análisis frontal de cafeína en el biomaterial; utilizando un empaque de 3.86 g.....	44
<b>Figura 19.</b> Análisis frontal de sulfóxido de albendazol en gel blanco; utilizando un empaque con 4.04 g. ....	45
<b>Figura 20.</b> Análisis frontal de sulfóxido de albendazol en el biomaterial; utilizando un empaque con 1.93 g. ....	46
<b>Figura 21.</b> Análisis frontal de sulfóxido de albendazol en el biomaterial; utilizando un empaque con 3.70 g. ....	47
<b>Figura 22.</b> Comparación de cromatogramas de cafeína, fracción 5 eluida del gel blanco y biomaterial.....	49
<b>Figura 23.</b> Comparación de cromatogramas de sulfóxido de albendazol, fracción 5 eluida del gel blanco y biomaterial.....	50
<b>Figura 24.</b> Comparación de lavados continuos de 1.5 ml cada uno con PBS 0.1M + 0.2 % TEA, pH 6.50 del biomaterial y del gel blanco; mediante el monitoreo de la fracción eluida de sulfóxido de albendazol. ....	51

<b>Figura 25.</b> Comparación de los espectros de absorción UV-VIS de cafeína posterior a la prueba de incubación en el biomaterial y en el gel blanco en reposo durante 24 horas.....	53
<b>Figura 26.</b> Comparación de los espectros de absorción UV-VIS del sulfóxido de albendazol posterior a la prueba de incubación con el biomaterial y con el gel blanco en reposo durante 24 horas.....	54
<b>Figura 27.</b> Porcentajes retenidos de moléculas carcinogénicas (bisfenil-Bip, dibenzofurano-DF, bisfenol-A) así como moléculas control (naftaleno-NP y dietilestilbestrol-DES) en geles blanco, biomaterial con ADN y en biomaterial híbrido con ciclodextrinas. ....	57
<b>Figura 28.</b> Porcentajes retenidos de sulfóxido de albendazol (SA) y cafeína (CA) en biomaterial y geles blanco .....	57
<b>Figura 29.</b> Estructura química de trietilamina .....	58
<b>Figura 30.</b> Comparación del cociente de concentraciones del dibenzofurano (DF) y benzofenona (BPN). ....	59
<b>Figura 31.</b> Comparación del cociente de concentración de sulfóxido de albendazol (SA) y cafeína (CA).....	60
<b>Figura 32.</b> Comparación de las pruebas colorimétricas en geles blanco y en el biomaterial en presencia de orcinol y difenilamina. ....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones cromatográficas para sulfóxido de albendazol y cafeína.....	34
<b>Tabla 2.</b> Condiciones para la inmovilización del ADN por el método de sol-gel.....	35
<b>Tabla 3.</b> Valores de absorbancia y porcentajes de muestra retenidos en el biomaterial y gel blanco posterior a la prueba de incubación durante 24 horas.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

**HPLC** (por sus siglas en inglés), Cromatografía líquida de alta resolución

**HPAC** (por sus siglas en inglés), Cromatografía de afinidad líquida de alta resolución

**WAC** (por sus siglas en inglés), Cromatografía de afinidad débil

**FAC** (por sus siglas en inglés), Cromatografía de afinidad frontal

**ADN** (por sus siglas en inglés), Ácido desoxirribonucleico

**ARN** (por sus siglas en inglés), Ácido ribonucleico

**PCR** (por sus siglas en inglés), Reacción en cadena de la polimerasa

**TEOS** Tetraetoxisilano

**TEA** Trietilamina

**CA** Cafeína

**SA** Sulfóxido de albendazol

## 1.INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas la investigación científica ha demostrado la utilidad de las biomoléculas inmovilizadas como agentes de reconocimiento de compuestos específicos. Los métodos utilizados para la inmovilización de biomoléculas en soportes orgánicos, poliméricos o inorgánicos, se basan en la adsorción, unión covalente a superficie, inmovilización por atrapamiento en membranas semipermeables y microencapsulación en microesferas poliméricas e hidrogeles. Sin embargo, muchos de estos métodos no pueden ser aplicados a todas las biomoléculas, pues las interacciones no específicas entre éstas y el material de soporte producen una desnaturalización de la biomolécula afectando su actividad nativa (Rupcich *et al* 2005; Kapusuz-Durucan, 2012).

Una alternativa para la bio-inmovilización es el atrapamiento de biomoléculas en matrices inorgánicas de silicatos formadas a bajas temperaturas mediante un método llamado “sol-gel”. Este método ofrece la ventaja de inmovilizar biomoléculas en soportes, utilizando una fase acuosa a temperaturas bajas y por lo tanto las condiciones de experimentación no comprometen la actividad biológica de las biomoléculas (Walcarius y Collison, 2009).

El ácido desoxirribonucleico (ADN) inmovilizado se emplea como agente de bio-reconocimiento para una diversidad de aplicaciones y se ha convertido en un tema emergente de investigación. Dos ejemplos importantes de dichas aplicaciones son: 1) La identificación de compuestos bioactivos en el área farmacéutica; considerando que el ADN es una diana biológica para muchos antibióticos, antivirales y fármacos antineoplásicos. 2) La evaluación de efectos genotóxicos y carcinogénicos de sustancias (Tian *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2007).

En el presente trabajo de investigación, se logró la obtención de un biomaterial utilizando esperma de salmón como fuente de ADN, la biomolécula se inmovilizó mediante el método de sol-gel. Este biomaterial permitirá identificar fármacos cuyos patrones de retención por afinidad orienten a la realización de posteriores estudios *in vivo* y en líneas celulares para la confirmación de interacciones fármaco-ADN y detección de los posibles daños o de los efectos terapéuticos sobre el ADN.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Uso del método de sol-gel**

El proceso de sol-gel fue desarrollado hace más de tres décadas y los primeros reportes en los años setenta sobre el uso de este método para desarrollar biomateriales involucran la inmovilización de enzimas. Posteriormente en 1990 un grupo de investigadores de Israel desarrollaron más extensivamente el método de sol-gel para la encapsulación de biomoléculas lábiles, describieron las propiedades de las enzimas atrapadas en matrices de sol-gel con precursores como tetraetoxisilano (TEOS). Este método se extendió rápidamente hacia la inmovilización de anticuerpos, células y microorganismos, así como su utilización para el diseño de biosensores y bioreactores (Dunn *et al.*, 1998; Gupta y Chaudhury, 2007; Avnir *et al.*, 2005). Recientemente, el método sol-gel se ha utilizado para la inmovilización de ácidos nucleicos como el ADN que funciona como biomaterial para identificar interruptores endocrinos y compuestos mutágenos o carcinogénicos (Pierre *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2003, Satoh *et al.*, 2005, Yamada-Aono, 2008).

### **2.2 Inmovilización de ADN por el método de sol-gel**

En los últimos 11 años, la utilización del ADN como biomaterial ha tenido un gran desarrollo dentro de las aplicaciones analíticas; ya que se puede fijar con alta afinidad y especificidad a un soporte sólido que funcione como fase estacionaria. Este tipo de biomateriales se ha utilizado ampliamente en el reconocimiento, separación y purificación de diversidad de moléculas incluyendo proteínas, péptidos, y fármacos (Su *et al.*, 2007).

La cromatografía de afinidad que incluye al ADN inmovilizado en la fase estacionaria fue un método diseñado primeramente por Gilham, quien inmovilizó el ácido timidílico (dT) con otras cadenas simples de nucleótidos como ácido adenílico (dA), guanílico (dG), citidílico (dC) a la celulosa como soporte sólido. En 1990, se logró inmovilizar nucleótidos de ADN en microporos de sílica mediante



una unión covalente; desde entonces la inmovilización de ADN se ha utilizado en la cromatografía de afinidad (Goss *et al.*, 1990).

La inmovilización de ADN por el método de sol-gel ha sido posible porque los ácidos nucleicos presentan ciertas propiedades fisicoquímicas que les permite retenerse físicamente en soportes derivados de sílica, durante su atrapamiento las cadenas de ADN mantienen su actividad biológica sin desnaturalizarse y no forman enlaces con los grupos silanoles de la superficie; quedando atrapados en los poros del gel. Así mismo, los ácidos nucleicos presentan una alta solubilidad en medios acuosos y estabilidad a pH cercanos al sanguíneo (7.4) (Zhou *et al.*, 2001).

El primer informe de la inmovilización exitosa de ADN por el método de sol-gel fue realizado por Pierre y colaboradores, en el 2001 diseñaron un material híbrido con ADN en geles de sílica y alcohol polivinílico; demostraron el atrapamiento de este ácido nucleico en los microporos de la matriz del gel (Pierre *et al.*, 2001). Posteriormente en el periodo del 2002-2012, investigadores japoneses y turcos comenzaron a utilizar el ADN inmovilizado por el método de sol-gel para la identificación de moléculas contaminantes y carcinogénicas en agua y aire (moléculas policíclicas aromáticas y planares como: dibenzofurano, difenil, bisfenol A). Se han diseñado materiales híbridos que combinan ciclodextrinas para identificar polifenoles tóxicos. La funcionalidad del biomaterial diseñado con ADN por este método fue evaluada por la capacidad de retención de moléculas que pueden intercalarse en el ADN, como el bromuro de etidio y los polifenoles contaminantes, mediante cromatografía y espectroscopia UV-VIS (Yamada *et al.*, 2002; Satoh *et al.*, 2005; Fujiwara *et al.*, 2005; Rupcich *et al.*, 2005; Yamada-Aono, 2008; Kapusuz- Durucan, 2012; Yamada-Nakayama, 2012).

Sin embargo, en el área farmacéutica las aplicaciones del ADN inmovilizado por el método de sol-gel han sido limitadas. En el 2007 se informó la inmovilización de oligonucleótidos de ADN para su utilización como biosensor, y su aplicación en el

análisis terapéutico y genotóxico de sustancias que se utilizaban como tratamiento anticancerígeno dentro de la Medicina Tradicional China (TCMs); muchos de esos medicamentos herbolarios contenían una gran cantidad de metabolitos, sin embargo sólo unos cuantos eran responsables de los efectos terapéuticos o genotóxicos. Utilizando el método de sol-gel se demostró que la retención de los analitos en la fase estacionaria se debía a su afinidad por el ADN, esto evidenció un método efectivo para la identificación, análisis y separación de los compuestos que específicamente eran bioactivos y que posteriormente se constató eran responsables de los efectos terapéuticos y genotóxicos (Su *et al.*, 2007).

### **2.3 Inmovilización de ADN por otros métodos**

Se ha reportado la inmovilización del ADN por atrapamiento en soportes de isopropilacrilamida, polímeros sintéticos y resinas. Sin embargo, la utilización de este tipo de soportes presenta la desventaja de la no solubilidad en el medio del ADN. Así mismo, los movimientos rotacionales de la biomolécula se restringen ocasionando la disminución de su interacción o afinidad con otras moléculas (Wright *et al.*, 1995; Umeno *et al.*, 1998). También se ha inmovilizado el ADN en superficies de vidrio poroso (Yamada *et al.*, 2002), en electrodos de carbono y oro para el diseño de biosensores (Wong *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2011; Lee, 2017).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Biomoléculas**

Las biomoléculas son aquellas moléculas que integran los seres vivos, aparte del agua, la cual es la biomolécula fundamental, están las que se clasifican como inorgánicas (gases como O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, aniones como bicarbonato HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, y cationes como Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) y las orgánicas (carbohidratos, lípidos, proteínas como enzimas, receptores y ácidos nucleicos como ADN y ARN) (Macarulla-Goñi, 1994; Stryer *et al.*, 2008).

Las biomoléculas de alto peso molecular o llamadas macromoléculas en los organismos vivos varían en tamaño, forma y función. A algunas de éstas también se les llama biopolímeros porque están formados por largas cadenas de unidades monoméricas, los cuales pueden ser de diferentes tipos. En el ADN y ARN, los monómeros constituyentes son los nucleótidos; mientras que en las proteínas son los aminoácidos. Tanto los ácidos nucleicos como proteínas son considerados fundamentales para el funcionamiento celular (Kumar-Li, 2010).

#### **3.2 Interacciones biomoleculares**

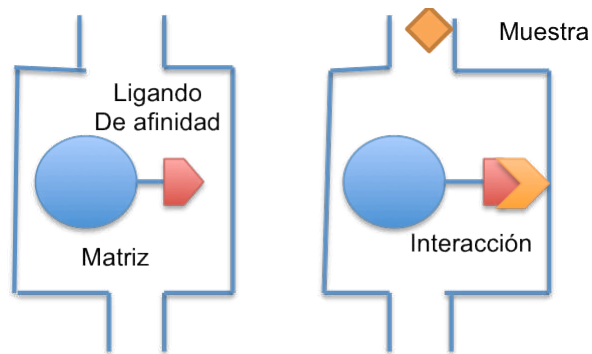
Las interacciones biomoleculares constituyen un componente importante de muchas vías metabólicas y de respuestas fisiológicas que están presentes en los sistemas biológicos. Estas interacciones incluyen la unión o enlace de diferentes biomoléculas con otros compuestos, por ejemplo: sustratos y cofactores a enzimas, antígenos a anticuerpos, proteínas a otras proteínas, azúcares a lectinas; y en el caso de los fármacos que se unen a diferentes receptores proteicos o dianas biológicas como ADN y ARN (Parikh-Cuatrecasas, 1994; Stryer *et al.*, 2008).

Para identificar y analizar las interacciones biomoleculares se han utilizados diferentes métodos instrumentales, entre ellos: cristalografía por rayos X, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de absorción, ultrafiltración, electroforesis capilar y resonancia magnética nuclear. Entre estos procedimientos

hay dos métodos que han incrementado su utilidad para el estudio de interacciones biomoleculares, son la cromatografía de afinidad y la cromatografía de afinidad líquida de alta resolución (HPAC, por sus siglas en inglés). Estos métodos utilizan una columna cromatográfica que contiene un soporte con algún agente biológico inmovilizado (proteínas, enzimas, anticuerpos) formando parte de la fase estacionaria; de esta forma, la biomolécula inmovilizada puede ser utilizada para estudiar la unión específica que se origina con diferentes compuestos. (Cserhádi-Klára, 1993; Hage, 2002).

### **3.3 Cromatografía de afinidad**

La cromatografía de afinidad es una técnica de cromatografía líquida que utiliza un agente biológico o también llamado ligando de afinidad como parte de una fase estacionaria para separar y analizar los componentes de una muestra (Figura 1). La retención y separación de los analitos de las muestras se basan en las interacciones biológicas reversibles que se presentan, sí la interacción que se da entre el compuesto y la biomolécula es fuerte (con una constante de asociación mayor a  $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), el compuesto de interés será retenido y para eluirlo de la fase estacionaria se requiere un cambio en el pH del buffer utilizado, cambios en la temperatura, o en la composición de la fase móvil. Por otra parte, si existe una interacción biomolecular débil (con una constante de asociación igual o menor a  $10^4 \text{ M}^{-1}$ ), es posible que la elución de la muestra se lleve a cabo sin dificultad bajo condiciones isocráticas; cuando esto sucede generalmente se le llama cromatografía de afinidad débil (WAC, por sus siglas en inglés). La variedad de las formas para eluir las muestras, los métodos de inmovilización de biomoléculas y los tipos de columnas que se utilizan en la cromatografía de afinidad, hacen que este método se convierta en la herramienta más usada e importante para el estudio de las interacciones biomoleculares (Turková, 1978; Kline, 1993; Ohlson-Zopf, 1994; Bailon *et al.*, 2000; Hage, 2002; Hage, 2005; Zachariou, 2008).



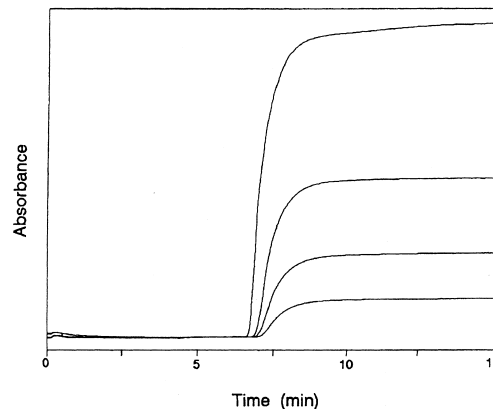
**Figura 1.** Representación del principio de cromatografía de afinidad. Tomado y adaptado de Voet, 2006.

### **3.4 Cromatografía de afinidad frontal**

El análisis frontal o la cromatografía de afinidad frontal (FAC, por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada en la cromatografía de afinidad para el estudio de interacciones biomoleculares. El análisis frontal fue usado por primera vez en los años setenta, en columnas de afinidad tradicional; más tarde a principios de los años noventa este tipo de técnica se utilizó en cromatografía de afinidad líquida de alta resolución para el estudio de las interacciones biomoleculares que se daban entre proteínas de transporte y fármacos (Hage 2002; Hage, 2005; Zheng *et al* 2014).

En el método de análisis frontal un analito de concentración conocida es constantemente aplicado a una columna que contiene el ligando de afinidad inmovilizado, mientras se monitorea la cantidad de muestra que va eluyendo. En la medida que el analito o la muestra se une al ligando de afinidad o biomolécula inmovilizada en la fase estacionaria, la columna comenzará a saturarse y la cantidad de muestra que eluye de ésta comenzará a incrementar con el tiempo o con el volumen de muestra que se aplique. El resultado es la obtención de una curva sigmoidea, como se ilustra en la Figura 2, donde la posición de la curva de rompimiento se relaciona con la concentración de analito utilizado, la cantidad de ligando de afinidad inmovilizado en la fase estacionaria y las constantes de asociación que hay entre el analito y la biomolécula. Este tipo de análisis presenta diversas ventajas y desventajas, ya que requiere de mayor cantidad de muestra,

así como altas concentraciones del ligando de afinidad inmovilizado; sin embargo, este análisis permite conocer el número de sitios de unión (sitio únicos o multisitios) que presenta el ligando de afinidad cuando interactúa con la muestra y simultáneamente las constantes de afinidad de las interacciones biomoleculares (Zheng *et al* 2014).



**Figura 2.** Curvas sigmoideas de la cromatografía de afinidad frontal. Tomada de Hage, 2002, con permiso de Elsevier.

Para la medición de las constantes de afinidad y el número de sitios de unión se utilizan el número de moles del analito que satura los sitios de unión en la columna de afinidad a la concentración utilizada del analito, el cual se calcula mediante el punto medio de la curva de rompimiento que se obtiene de las curvas sigmoideas de diferentes concentraciones de analito aplicados; relacionando a las concentraciones molares del analito y ajustando los datos resultantes a ecuaciones matemáticas basadas en varios modelos de adsorción (Hage, 2002).

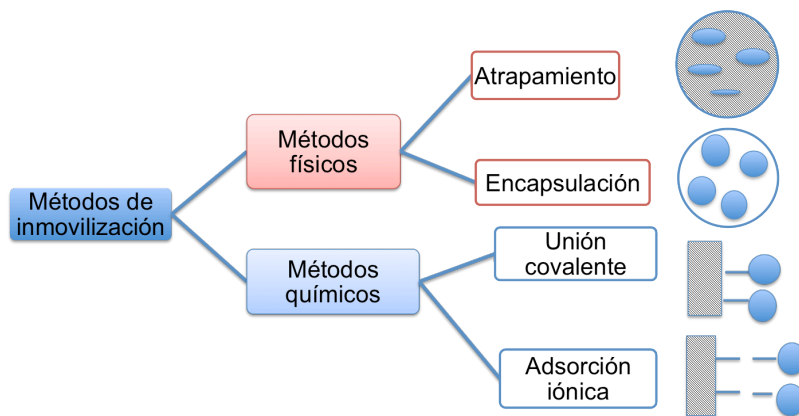
### **3.5 Biomateriales**

La combinación de materiales con agentes biológicos se ha convertido en una importante línea de investigación, el desarrollo de biomateriales es de gran utilidad para aplicaciones farmacéuticas, químicas y biomédicas así como para la industria de productos biotecnológicos que requieren de procesos de inmovilización o encapsulación de biomoléculas en soportes sólidos. Para la inmovilización de

biomoléculas es importante preservar la actividad biológica nativa de cada una de ellas y utilizar el tipo de soporte más adecuado (Kapusuz-Durucan, Avnir *et al.*, 2005, Arroyo, 1998).

### 3.6 Métodos de inmovilización

La inmovilización es el proceso por el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de biomoléculas orgánicas y agentes biológicos como proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, orgánulos y células; por su unión a un soporte sólido o superficie. Los procesos de inmovilización pueden proteger a las biomoléculas orgánicas de cambios de temperatura, presencia de sustancias inhibitoras o solventes orgánicos, así como pH extremos. Cada método de inmovilización se selecciona con base en algunas propiedades como la fácil recuperación y reutilización de las biomoléculas, y su capacidad de mantener la estabilidad biológica de éstas, así como la disminución de interacciones no específicas que pueden darse con los soportes utilizados. En general, los métodos de inmovilización se suelen clasificar en dos grandes categorías: Métodos físicos y químicos, los cuales se representan en forma organizada en la Figura 3 (Akkoyun *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2007; Arroyo, 1998).



**Figura 3.** Métodos de inmovilización de agentes biológicos mediante retención física y unión química. Tomada y adaptada de Arroyo, 1998.

### **3.6.1 Métodos de inmovilización químicos**

Estos métodos involucran la unión de agentes biológicos por enlaces iónicos o covalentes a diferentes matrices o soportes sólidos; por lo que estos procesos de inmovilización son irreversibles.

#### *a) Unión covalente*

Las biomoléculas orgánicas se unen a un soporte sólido o superficie mediante enlaces covalentes (enlaces de grupos amino terminales provenientes de enzimas, reacciones de aminación, reacciones de intercambio tiol-disulfuro, puentes peptídicos y reacciones de alquilación). La metodología de la unión covalente se basa en la activación de grupos químicos del soporte para que reaccionen con los nucleófilos de agentes biológicos (grupos hidroxilo, amino, amida y carboxilo, por ejemplo). Sin embargo, este método presenta algunas desventajas ya que es necesario conocer la densidad de grupos activos por unidad de superficie del soporte para que se formen las uniones estables con los agentes biológicos, además este tipo de inmovilización puede alterar la estructura activa de las biomoléculas orgánicas; tampoco puede llevarse a cabo con enzimas, o ácidos nucleicos muy sensibles a cambios de pH y fuerza iónica (Brena-Batista, 2006; Wong-Jameson, 2012).

#### *b) Unión iónica*

Se basa en la unión de agentes biológicos a un soporte sólido o superficie cargada mediante enlaces iónicos. Mientras mayor sea la densidad de carga en la superficie, mayor es la cantidad de agente biológico que se une al soporte sólido o matriz. En ocasiones el agente biológico inmovilizado mediante enlaces iónicos también se retiene por adsorción física, por lo que ambos métodos de inmovilización son similares. Los soportes sólidos que generalmente se utilizan son derivados de polisacáridos como por ejemplo dietilaminoetilcelulosa, dextrano, carboximetilcelulosa y quitosano (Brena-Batista, 2006).



### **3.6.2 Métodos de inmovilización Físicos**

Estos métodos involucran una retención física de las biomoléculas orgánicas o agentes biológicos que puede ser en la superficie, matriz o porosidad de un soporte sólido, por lo que no hay un cambio en la estructura química de los agentes biológicos y la retención física que se presenta es reversible.

#### *a) Adsorción física*

La adsorción es un método de inmovilización simple y económico que utiliza interacciones físicas. La adsorción física resulta de las interacciones hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, que se dan entre el soporte sólido o superficie y la biomolécula orgánica. Este método consiste en adicionar directamente sobre la superficie o soporte sólido una cantidad de agente biológico. Sin embargo, la adsorción física presenta algunas desventajas ya que las biomoléculas suelen desprenderse fácilmente en medios acuosos porque las uniones al soporte son débiles. Las fuerzas no covalentes que se llevan a cabo son reversibles por cambios de fuerza iónica, temperatura o polaridad del disolvente; de ahí que este método físico de inmovilización no se utilice con mucha frecuencia. Los soportes sólidos que más se utilizan para este método suelen ser tanto orgánicos como inorgánicos (cerámica, alúmina, carbón activado, vidrio poroso, quitosano, dextrano y celulosa) (Datta *et al.*, 2013).

#### *b) Encapsulación*

La encapsulación es un método de atrapamiento que protege a una biomolécula orgánica del ambiente externo; este método consiste en la retención física en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa constituida generalmente por polímeros del tipo poliacrilamida, colágeno, alginato, carraginato o resinas. Los agentes biológicos son inmovilizados en membranas semipermeables poliméricas en forma esférica y presentan valores de porosidad definidos (1-100  $\mu\text{m}$ ); las proteínas inmovilizadas por este método presentan una gran superficie de contacto lo cual favorece su eficiencia catalítica, sin embargo una de las desventajas de este método es que agentes biológicos como enzimas y ácidos

nucleicos han demostrado disminuir su actividad biológica debido a procesos de desnaturalización (Brady-Jordaan, 2009; Pérez y Hernández, 2006).

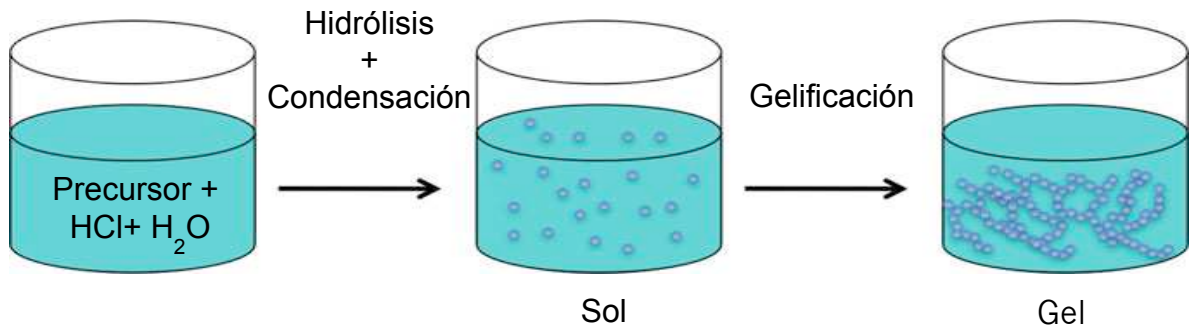
#### *c) Atrapamiento*

El atrapamiento físico es un método que utiliza una red de polímeros los cuales pueden ser orgánicos o inorgánicos, (como en el caso del sol-gel) y que involucra un entrecruzamiento con los agentes biológicos. El atrapamiento protege a las biomoléculas orgánicas de inestabilidad mecánica y del contacto con burbujas de oxígeno, ya que éstas quedan atrapadas en el poro del soporte sólido. El atrapamiento generalmente se lleva a cabo en geles y fibras que forman microporos y mesoporos, protegiendo a la proteína o ácido nucleico de procesos de desnaturalización. Este método presenta diversas ventajas ya que no hay modificaciones químicas en la estructura de proteínas y ácidos nucleicos, se requiere de cantidades pequeñas de agentes biológicos y los soportes que se utilizan pueden tener diversas formas y tamaños (Tampion-Tampion, 1987; Arroyo, 1998).

#### *d) Método de sol-gel*

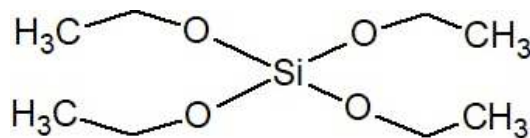
Uno de los métodos emergentes que no compromete la actividad biológica de las biomoléculas es el método de sol-gel, el cual es un proceso químico que se lleva a cabo a temperaturas bajas para la fabricación de materiales a partir de precursores hidrolizables mediante reacciones de hidrólisis y condensación. Los precursores suelen contener ligandos más débiles en comparación con el agua, como haluros, nitratos, sulfatos, alcóxidos o carboxilatos; una vez hidrolizados se condensan para formar pequeñas nanopartículas coloidales suspendidas en un líquido llamado "sol" (Figura 4). La policondensación adicional de las partículas de sol conduce a la formación de un gel poroso que contiene una cantidad sustancial de disolvente, por lo que el secado lento de los geles en condiciones ambientales o temperaturas elevadas conduce a la evaporación de la fase de disolvente; estos geles secos, son llamados xerogeles ya que son menos porosos que los geles húmedos. Los precursores mayormente usados en el método de sol-gel son los

alcoxisilanos, cuando estos se utilizan generalmente se requiere del uso de catalizadores, reflujo o el uso de ultrasonidos para que la reacción proceda a un ritmo apreciable (Wright-Sommerdijk, 2001; Sakka, 2005; Chen-Dionysiou, 2007; Levy-Zayat, 2015).



**Figura 4.** Proceso del método de sol-gel. Tomada y adaptada de Levy-Zayat, 2015.

Dentro del grupo de alcoxisilanos, está el tetraetoxisilano (Figura 5), el cual es uno de los precursores utilizados con mayor frecuencia en el método de sol-gel, ya que es hidrolíticamente inestable y el producto de su hidrólisis es etanol; el cual es fácil de evaporar del material (Levy-Zayat, 2015).



**Figura 5.** Estructura química del precursor tetraetoxisilano

### **3.7 Ventajas y aplicaciones del método de sol-gel**

El proceso químico del sol-gel es factible con cualquier precursor de metal que sea hidrolíticamente inestable. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, los precursores típicos más utilizados son los alcóxidos; los cuales unidos a la química del silicio, se realizan modificaciones orgánicas para incorporar una mayor funcionalidad de los materiales. Debido a que se utilizan estos precursores moleculares, se pueden obtener perspectivas atractivas para el diseño de

nanomateriales con diferentes estructuras, composición, dimensiones, morfología, organización y geometría; el método de sol-gel también es útil en la fabricación de fibras, polvos, películas delgadas y revestimientos en superficies de vidrio. Además de esto, los precursores moleculares pueden usarse solos o en combinación con otros para obtener materiales o compuestos híbridos; con una modificación química del precursor a nivel molecular, la funcionalidad del material también cambia, por lo que pueden obtenerse materiales con ciertas propiedades deseables. Finalmente, antes de la gelificación, otras moléculas orgánicas, inorgánicas e incluso, biomoléculas y polímeros se pueden agregar al sol (fase líquida) para obtener materiales funcionales. Cuando se añaden biomoléculas grandes como proteínas y ácidos nucleicos generalmente quedan atrapadas físicamente en el gel, pero conservan su estructura y propiedades, por lo que los materiales resultantes presentan actividades y funciones biológicas (Levy-Zayat, 2015).

Las aplicaciones en la utilización del método de sol-gel son diversas, debido a su versatilidad, este método ha encontrado aplicaciones en ámbitos de la ciencia e ingeniería, incluidos la óptica, microelectrónica y biotecnología. Las propiedades intrínsecas de los materiales fabricados con el método de sol-gel como la transparencia óptica, la porosidad, área superficial, estabilidad química y física le confieren una gran ventaja a sus aplicaciones en diferentes áreas; específicamente en el área biotecnológica, donde se ha utilizado para la producción de biomateriales a través de la integración de agentes biológicos. Así mismo, los materiales derivados de la sílica ofrecen ventajas como material de soporte, dando estabilidad mecánica y química, ya que es estructuralmente inerte y funcionalmente inactivo, previniendo la desnaturalización de las biomoléculas. Por lo tanto, al inmovilizar selectivamente los agentes biológicos de interés, es posible obtener biomateriales con las propiedades estructurales y funcionales deseadas para identificar moléculas que presenten afinidad biológica o interacciones biomoleculares (Livage *et al.*, 1994; Sakka, 2005; Chen-D Dionysiou, 2007; Levy-Zayat, 2015).

### **3.8 Ácido desoxirribonucleico (ADN)**

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una molécula única, que tiene propiedades físicas y químicas interesantes y una estructura inusual de doble hélice. Recientemente, el uso del ADN como biomolécula ha atraído la atención de investigadores en el área de los materiales, ya que posee características adecuadas tales como sus propiedades electrostáticas, siendo un polielectrolito altamente cargado, el apareamiento de bases complementarias y las características de intercalación inducida y unión entre los surcos; todas estas propiedades se deben a la estructura de doble hélice del ADN. Como resultado, el ADN se considera una biomolécula ideal para crear nuevos materiales funcionales, los cuales presentan diversidad de aplicaciones en electrónica, en la óptica, en la catálisis para reacciones enantioselectivas y como biomaterial para la identificación de moléculas tóxicas en el medio ambiente (Liu *et al.*, 2006, Liu *et al.*, 2008).

En el área farmacéutica podemos aprovechar estas propiedades del ADN para diseñar un biomaterial que permita: 1) La identificación de compuestos bioactivos; considerando que el ADN es una diana biológica para muchos antibióticos, antivirales y fármacos antineoplásicos. 2) La evaluación de efectos genotóxicos y carcinogénicos de compuestos (Tian *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2007; Yamada-Aono, 2008; Yamada *et al.*, 2002, Yamada *et al.*, 2010, Yamada-Nakayama, 2012).

### **3.9 Fuente de ADN**

La investigación de materiales basados en ADN también depende de la facilidad para obtener una fuente sencilla de ADN, ya que puede ser complicado utilizar síntesis automatizada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias específicas de ADN. Sin embargo, se pueden emplear fuentes naturales de ADN, especialmente de organismos marinos que se utilizan en la pesca como el salmón, ya que el contenido de ADN en el esperma de salmón es superior al 10% de su peso en seco, y su proceso de extracción es sencillo. Se estima que la producción mundial de salmón aumentó a 2.4 millones de toneladas, con base en esta cantidad se calcula que alrededor de 3000

toneladas de ADN pueden ser obtenidas sólo a partir del suministro de salmón. Esta fuente sencilla de ADN es una razón más que promueve la investigación sobre el diseño de biomateriales basados en ADN (Liu *et al.*, 2006).

### **3.10 Fármacos modelo para evaluar el biomaterial**

#### **a) Sulfóxido de albendazol: Metabolito teratogénico**

El albendazol (metil-5-propilsulfanil-3H-benzoimidazol-2-il amino) es un potente antihelmíntico o agente antiparasitario indicado para el tratamiento de infecciones por *Enterobius vermicularis* y *Ascaris lumbricoides*. Este benzoimidazol produce diversos cambios bioquímicos en los parásitos como la inhibición de la enzima fumarato reductasa en la mitocondria, reducción del transporte de glucosa y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa; así mismo impide la polimerización de microtúbulos por unión a Beta-tubulina, inhibiendo el proceso celular de la mitosis. El albendazol es considerado un profármaco debido a que su metabolito primario, el sulfóxido de albendazol, es el responsable de la potente actividad antiparasitaria. Se ha reportado que el sulfóxido de albendazol presenta actividad teratogénica en ratas, conejos y otras especies de animales durante la etapa de gestación, disminuyendo el peso fetal y produciendo malformaciones en el sistema músculo-esquelético. Por lo anterior, el albendazol está contraindicado en el embarazo y pertenece a la categoría C de la clasificación teratogénica dada por la FDA; lo cual significa que no se han reportado casos de daño teratogénico en humanos, pero no se puede descartar el riesgo debido a los estudios realizados en animales. Dado que el albendazol es altamente metabolizado, se asocia la toxicidad prenatal con la acción del sulfóxido de albendazol (Guía de clasificación teratogénica FDA, 2012; Capece *et al.*, 2003; Eckardt *et al.*, 2012).

Se ha reportado que el efecto genotóxico que tiene el sulfóxido de albendazol se relaciona con un cambio en las cromátidas hermanas, el huso mitótico y aberraciones cromosomales, afectando así al ADN. Así mismo, los derivados de benzimidazoles como el albendazol, presentan unión en el surco menor del ADN en las regiones ricas de adenina y timina produciendo espaciamientos entre 4 y 5

pares de bases e inhibiendo la transcripción de genes específicos (Hannon, 2006; Nuray *et al.*, 2007).

#### ***b) Cafeína***

La cafeína es un derivado metilado de la xantina (1,3,7-trimetilxantina), en el área farmacéutica se utiliza en combinación con otros analgésicos para el tratamiento de algunos tipos de cefaleas y migrañas por su efecto constrictor de los vasos cerebrales, también se utiliza como estimulante del sistema nervioso central, y para el aumento del metabolismo de grasas. Se ha reportado que la cafeína es capaz de reducir la toxicidad de un intercalador de ADN como es el bromuro de etidio, o disminuye la eficacia de algunos fármacos anticancerígenos con estructura aromática como la doxorubicina y sus análogos mitoxantrono y elipticina. El hecho de que la cafeína presente tres aceptores de enlaces de hidrógeno, pero ningún grupo donador de protones en la molécula, la imposibilita para formar algún tipo de complejo que contenga dos enlaces de hidrógeno con alguna de las bases nitrogenadas del ADN, por lo que la cafeína no interactúa con esta biomolécula ni produce daños genotóxicos. Hasta ahora no se ha reportado algún daño carcinogénico, mutaciones en el ADN, ni daño teratogénico por la cafeína; por lo que la FDA clasifica a esta molécula que también se utiliza en fármacos analgésicos dentro de la categoría A. Es decir, que en estudios controlados en mujeres no evidencian riesgo para el feto durante el primer trimestre y la posibilidad de daño fetal aparece remota (Kihlman, 1977; Piosik *et al.*, 2002; Porta *et al.*, 2003; Deriabina *et al.*, 2004).

#### ***3.11 Aplicación farmacéutica de un biomaterial***

El diseño de biomateriales para la identificación de moléculas con posibles efectos terapéuticos, constituye una herramienta de diagnóstico importante; debido a que el blanco terapéutico de muchos fármacos son receptores proteicos, enzimas y ácidos nucleicos. La inmovilización del ADN, ha permitido sintetizar biomateriales que se utilicen como fase estacionaria de la cromatografía de afinidad, constituyendo una herramienta analítica en el área biotecnológica para la identificación de compuestos aromáticos policíclicos cancerígenos y disruptores

endocrinos que son contaminantes del agua. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones enfocadas a la utilización de biomateriales que constituya una herramienta *in vitro* para la identificación de fármacos y moléculas con posible efecto terapéutico. Es aquí donde se encuentra la importancia de aprovechar el diseño de biomateriales en el área farmacéutica.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La cromatografía de afinidad se define como una técnica que utiliza agentes de bio-reconocimiento en la fase estacionaria para la purificación y análisis de diversos componentes de una muestra. La retención de los compuestos por este método está basado en las interacciones específicas y reversibles entre éstos y las biomoléculas de la fase estacionaria. En la línea de investigación de química medicinal se trabaja a su vez con dos líneas importantes: 1) la síntesis de nuevas moléculas y 2) la identificación y purificación de metabolitos secundarios a partir de plantas y microorganismos. Ambas líneas buscan moléculas con actividad terapéutica y en las primeras etapas de la investigación, la evaluación *in vitro* de la interacción de dichas moléculas con el ADN originará información para el planteamiento de investigaciones farmacológicas. Con este trabajo de investigación se puede aportar una herramienta de evaluación *in vitro* para evidenciar la interacción significativa de moléculas con el ADN. Se desarrolla un biomaterial con ADN proveniente de esperma de salmón por la técnica sol-gel que constituye una fase estacionaria de cromatografía de afinidad, y permite identificar patrones de retención de moléculas con alta afinidad por el ADN como diana biológica.

#### **5. HIPÓTESIS**

Al inmovilizar ADN mediante el método de sol-gel, se obtendrá un biomaterial estable y funcional que pueda ser utilizado como fase estacionaria en la cromatografía de afinidad, y permitirá mediante análisis frontal identificar aquellas moléculas que presenten interacción con el ADN.



## **6. OBJETIVO GENERAL**

Diseñar y sintetizar un biomaterial por el método de sol-gel, que incluya ADN inmovilizado, y evaluar su funcionalidad mediante la retención de moléculas que tienen afinidad por el ADN.

## **7. OBEJTIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Desarrollar los métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta presión en fase reversa y con detección UV para el análisis cuantitativo de las moléculas seleccionadas: cafeína y sulfóxido de albendazol.
- 2) Seleccionar las concentraciones adecuadas de la molécula teratogénica y control para su posterior evaluación en el biomaterial.
- 3) Seleccionar la concentración de ADN que se inmovilizará para el diseño del biomaterial.
- 4) Obtener las condiciones de inmovilización del ADN por la técnica de sol-gel para el diseño de un biomaterial estable.
- 5) Evaluar y comparar el patrón de retención de las moléculas seleccionadas: cafeína y sulfóxido de albendazol en el biomaterial, mediante cromatografía frontal en cartuchos de baja presión fuera de línea.
- 6) Comparar la funcionalidad del biomaterial contra geles blanco, mediante el análisis frontal de la molécula teratogénica: sulfóxido de albendazol.
- 7) Comparar la funcionalidad del biomaterial contra geles blanco, mediante el análisis frontal de la molécula control: cafeína.
- 8) Evaluar el patrón de retención en reposo de la molécula teratogénica y control en el biomaterial mediante pruebas de espectrofotometría en UV-VIS.

## 8. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Materiales

El ADN esperma de salmón, tetraetoxisilano (TEOS), trietilamina (TEA), dimetilsulfóxido, cafeína (CA) fueron obtenidos de Sigma Aldrich; fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), metanol grado HPLC, acetonitrilo grado HPLC, ácido acético glacial, ácido clorhídrico (HCl) al 37% fueron comprados de la marca J.T Baker. Reactivo difenilamina, orcinol y ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) al 98% marca Meyer; agua grado HPLC (sistema Simplicity Milipore) filtrada por membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . Cartuchos de extracción en fase sólida reciclados y vacíos, acrodiscos de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  marca Membrane Solutions.

### 8.2 Preparación de reactivos

8.2.1 Ácido clorhídrico 0.1M: Se utilizaron 1.8 g de ácido clorhídrico al 37% equivalente a 4.1 mL y se aforaron en un volumen final de 500 mL para la obtención de una concentración de 0.1M.

8.2.2 Buffer de fosfatos 0.1M: Se pesaron 12.25 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y 7.50 g de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), se disolvieron en 1 L de agua grado HPLC para obtener una concentración de 0.1M; previo al aforo final se ajustó el pH de la solución a un valor de 6.50 con NaOH 0.1M. La solución amortiguadora se mantuvo en refrigeración a 4°C.

8.2.3 Buffer de fosfatos 0.04 M: Se utilizó un volumen de 400 mL del buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.50 y se aforo en un volumen de 1 L de agua grado HPLC para obtener una concentración final de 0.04 M. La solución amortiguadora se mantuvo en refrigeración a 4°C.

8.2.4 Buffer de fosfatos 0.1 M + 0.2 % trietilamina (TEA): Se pesaron 12.25 g de fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) y 7.50 g de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) y se disolvieron en 1 L de agua grado HPLC para obtener una

concentración de 0.1M; previo al aforo final se adicionaron 2 mL del reactivo trietilamina para obtener una solución porcentual al 0.2%, v/v y se ajustó el pH de la solución a un valor de 6.50 con HCl 0.1 M. La solución amortiguadora se mantuvo en refrigeración a 4°C.

8.2.5 Buffer de fosfatos 0.1M + 1% tween 20: Se utilizaron 99 mL de buffer de fosfatos 0.1 M y se adicionó una alícuota de 1mL de tween 20 para obtener una solución porcentual al 1%, v/v; previo al aforo final se ajustó el pH de la solución a un valor de 6.20 con HCl 0.1M.

8.2.6 Reactivo de Bial u orcinol: Para la preparación del reactivo de Bial se utilizaron dos reactivos: Reactivo A y B. Para el reactivo A se pesaron 0.025 g de cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) y se disolvieron en 50 mL de HCl al 37% para obtener una solución porcentual al 0.05%, w/v. Para el reactivo B se preparó una solución de orcinol 0.42M disuelta en etanol al 95%. Ambos reactivos se mezclaron en proporciones 15:1 respectivamente. La mezcla de ambos reactivos constituye al reactivo de Bial para la identificación de azúcares como pentosas. El reactivo se mantuvo en refrigeración a 4°C.

8.2.7 Reactivo de Dische o difenilamina: Se pesaron 0.04 g de difenilamina y se disolvieron en 25 mL de ácido acético glacial, adicionando posteriormente 0.04 mL de ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). El reactivo se mantuvo en refrigeración a 4°C.

### **8.3 Fuente de ADN**

Para el diseño del biomaterial, se utilizó como fuente biológica, al ADN extraído de esperma de salmón obtenido comercialmente por Sigma Aldrich. Las especificaciones del producto por parte del fabricante indican que el ADN presentaba estructura de doble cadena de polinucleótidos con un peso molecular mayor a  $5 \times 10^6$  pares de bases (Figura 6).



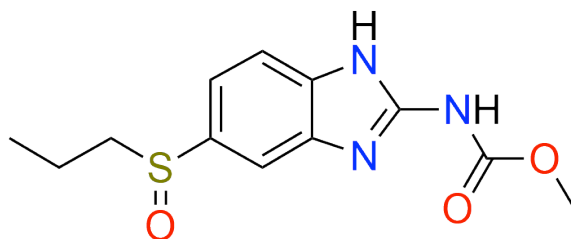
**Figura 6.** Fotografía del reactivo de ADN extraído de esperma de salmón empleado.

### **8.3.1 Preparación del ADN de esperma de salmón**

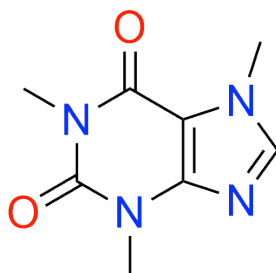
Solución de ADN (14 mg/mL): Se pesaron 35 mg de ADN extraído de esperma de salmón, se disolvieron en 2 mL de buffer de fosfatos pH 6.20, 0.1M + 1% tween 20; posteriormente se mantuvo en sonicación durante 20 minutos y se adicionaron 0.5 mL más del mismo medio de disolución, agitando la solución durante un minuto en vórtex.

### **8.4 Selección de moléculas**

Con base en la clasificación teratogénica dada por la FDA, se seleccionaron dos moléculas: El sulfóxido de albendazol (Figura 7), metabolito activo del albendazol, el cual ha demostrado tener interacción con el ADN, ocasionando malformaciones en el feto durante el embarazo (categoría C); y la cafeína (Figura 8) que se utiliza como control negativo, ya que es una molécula inocua que no ha evidenciado daño al ADN ni efectos teratogénicos (categoría A) (Guía de clasificación teratogénica FDA, 2012; Gallego et al., 2014).



**Figura 7.** Estructura química del sulfóxido de albendazol.



**Figura 8.** Estructura química de la cafeína.

**8.4.1 Preparación de las muestras de cafeína (0.5, 1.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ):** Se prepararon dos soluciones stock (I,II); de la solución II se tomaron diferentes volúmenes para obtener las concentraciones deseadas. Se pesaron 10 mg de cafeína y se disolvieron en 10 mL de metanol grado reactivo (stock I); posteriormente se tomó una alícuota de 1 mL y se disolvió en 10 mL de agua destilada (stock II). A partir de la solución stock II se tomaron volúmenes de 50, 150 y 500  $\mu\text{L}$  para obtener las concentraciones deseadas respectivamente, y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M + 0.2% TEA, pH 6.50, en matraces aforados de 10 mL.

**8.4.2 Preparación de las muestras de sulfóxido de albendazol (0.5, 1.5, 5  $\mu\text{g/mL}$ ):** Se prepararon dos soluciones stock (I,II); de la solución II se tomaron diferentes volúmenes para obtener las concentraciones deseadas. Se pesaron 10 mg de sulfóxido de albendazol, el cual fue sintetizado por un grupo de investigación de química orgánica de la unidad interdisciplinaria de docencia, investigación y servicio, laboratorio de síntesis y aislamiento de compuestos bioactivos. Posteriormente se disolvió en 10 mL de metanol grado reactivo y 0.5 mL de dimetil sulfóxido para favorecer su solubilidad (Stock I); se tomó 1 mL del stock I y se disolvió en 10 mL de metanol grado reactivo. A partir del stock II se tomaron volúmenes de 50, 150 y 500  $\mu\text{L}$  y se disolvieron en 10 mL de buffer de fosfatos 0.1 M + 0.2% TEA, pH 6.50 en matraces aforados de 10 mL.

### 8.5 Condiciones cromatográficas

Primero se desarrollaron los métodos analíticos por cromatografía de líquidos de alta presión en fase reversa y con detección UV en un equipo HPLC *varian-pro star*, con el fin de cuantificar la molécula que interacciona con el ADN: sulfóxido de albendazol, así como el control negativo: cafeína. Las condiciones cromatográficas para ambas moléculas se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas para sulfóxido de albendazol y cafeína.

<b>Sulfóxido de albendazol</b>	<b>Cafeína</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Columna: C8</li><li>• Fase móvil: 40% de ácido acético al 1%, 5% de acetonitrilo, 55% de metanol.</li><li>• Longitud de onda: 286 nm</li><li>• Volumen de inyección: 40 µL</li><li>• Velocidad de flujo: 1 mL/min</li><li>• Temperatura: 35°C</li><li>• Tiempo de retención: 5.7 min</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Columna: C18</li><li>• Fase móvil: 60% de agua, 40% de acetonitrilo</li><li>• Longitud de onda: 273 nm</li><li>• Volumen de inyección: 40 µL</li><li>• Velocidad de flujo: 1 mL/min</li><li>• Temperatura: 37°C</li><li>• Tiempo de retención: 3.4 min</li></ul>

### 8.6 Inmovilización de ADN por el método de sol-gel

En la primera etapa del proceso de sol-gel se realizó una hidrólisis ácida en frascos de vidrio limpios, seguida de reacciones de condensación para la formación de un sol. Se mezclaron 2.5 mL de TEOS (tetraetoxisilano) con 0.1 mL de HCl 0.1M y 0.4 mL de agua, sonificándose por 30 min en baño de hielo en un sonicador marca Cole-Parmer modelo 8890; posteriormente se mantuvo bajo agitación mecánica en un agitador marca Sol-Bat a temperatura ambiente durante 4 horas, hasta la obtención de un sol viscoso.

En la segunda etapa, se adicionó la solución de ADN proveniente de esperma de salmón (14 mg/mL). Para aumentar la solubilidad y distribución homogénea de la biomolécula se adicionó posteriormente 0.5 mL de isopropanol (Tabla 2). La gelación se produjo en 20-30 minutos, el ADN se homogeneizó completamente en

todo el gel formado y se dejó en reposo durante 10 minutos con 10 mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 6.50. Posteriormente se filtró a vacío y se realizaron lavados con 10-20 mL de agua y buffer de fosfatos 0.04 M pH 6.50. La tabla 2 muestra las condiciones obtenidas para una correcta inmovilización del ADN.

**Tabla 2.** Condiciones para la inmovilización del ADN por el método de sol-gel.

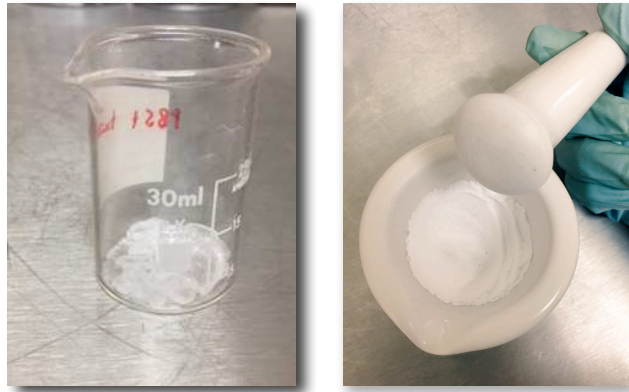
<b>ADN inmovilizado</b>	14 mg/mL
<b>Medio de disolución</b>	2.5 mL de buffer de fosfatos 0.1 M + 1% de tween 20 + 0.5 mL de isopropanol
<b>Temperatura</b>	25° C
<b>pH</b>	6.20
<b>Tiempo de gelificación</b>	20-30 min

#### **8.6.1 Geles blanco por el método de sol-gel**

Para la obtención de geles blanco (geles sin ADN) se llevó a cabo el mismo procedimiento de hidrólisis ácida y reacciones de condensación descritas en el apartado 8.6, sólo que antes del punto de gelificación se adicionaron 2 mL de buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.50 en lugar de la muestra de ADN.

#### **8.6.2 Secado: Obtención del xerogel**

El hidrogel formado tanto del biomaterial como gel blanco se dejó madurar, secándolo muy lentamente en refrigeración para reforzar su estructura hasta que perdiera el 50% de su peso inicial. El monitoreo del peso se llevó a cabo en una balanza analítica marca Explorer Ohaus. Una vez deshidratado, se pulverizó el xerogel en un mortero, y resuspendió en solución de buffer de fosfatos 0.04 M pH 6.50 (Figura 9).



**Figura 9.** Xerogel obtenido y pulverizado.

### **8.6.3 Empaquetamiento de cartuchos fuera de línea**

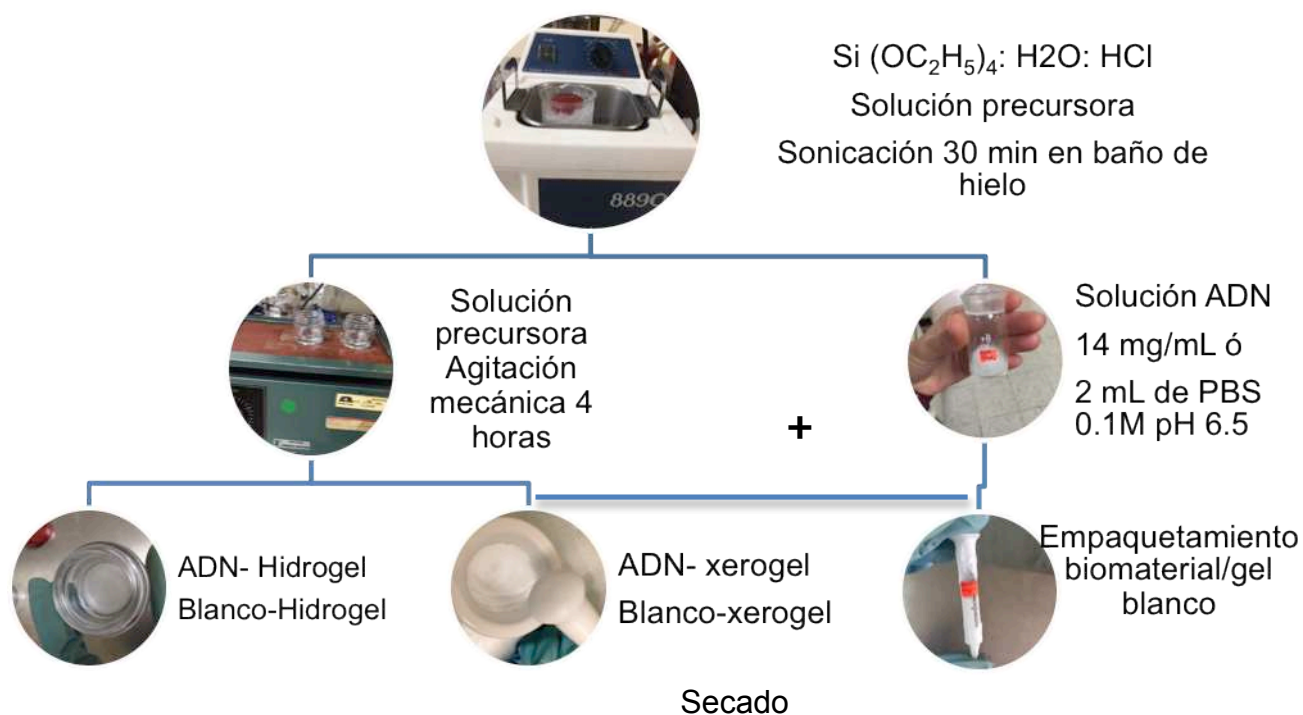
Una vez obtenido el xerogel, se empaquetó en cartuchos de baja presión fuera de línea, adicionando lentamente el biomaterial o gel blanco por las paredes del cartucho conectado a vacío mediante un matraz kitazato (Figura 10).



**Figura 10.** Empaquetamiento a vacío y cartuchos del biomaterial y gel blanco.

El proceso completo de diseño del biomaterial y geles blanco mediante el método de sol-gel se ilustra en la Figura 11





**Figura 11.** Diagrama que representa la preparación del biomaterial y geles blanco mediante el método de sol-gel.

### **8.7 Cromatografía frontal**

Para la evaluación de la funcionalidad del biomaterial, se analizó la retención del sulfóxido de albendazol y cafeína en el biomaterial (con ADN inmobilizado) y geles blanco. Se prepararon las muestras de 25 mL en tres diferentes concentraciones (5, 1.5 y 0.5 µg/mL) disueltas en buffer de fosfatos 0.1M + 0.2 % de TEA, pH 6.50 (como se describe en el apartado 8.4). Cada muestra se sometió al análisis frontal a baja presión fuera de línea en el biomaterial y gel blanco empaquetado.

#### **8.7.1 Curva de calibración**

Previo al análisis frontal de las muestras se realizaron curvas de calibración para la cuantificación de sulfóxido de albendazol y cafeína. Se utilizaron dos soluciones stock de concentraciones de 1 mg/mL y 0.1 mg/mL, de la cual se prepararon cinco soluciones estándar en un intervalo de concentraciones de 0.5-25 µg/mL; cada una disuelta en buffer de fosfatos 0.1M + 0.2 % de TEA, pH 6.50.

### **8.7.2 Adición y elución de las muestras**

Se adicionaron con una pipeta Pasteur, un total de 25 mL de la muestra de sulfóxido de albendazol y cafeína en concentraciones de 0.5, 1.5 y 5 µg/mL (cada una por separado) a los cartuchos empaquetados con biomaterial y geles blanco. Las muestras se eluyeron mediante la aplicación manual de presión de aire con una jeringa introducida en la entrada del cartucho (Figura 12). Se recolectaron manualmente 15-16 fracciones de 1.5 mL en tubos Eppendorf.



**Figura 12.** Adición y elución de muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína.

### **8.7.3 Filtración e inyección de las muestras**

Una vez obtenidas las fracciones de sulfóxido de albendazol y cafeína, se filtraron mediante acrodiscos de nylon de 0.45µm y se inyectaron automáticamente en un equipo de HPLC *varian-pro star* (Figura 13).



**Figura 13.** Filtración e inyección a HPLC de muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína.

#### **8.7.4 Análisis frontal de las muestras**

El análisis frontal del sulfóxido de albendazol y cafeína eluidos en geles blanco y en el biomaterial, se realizó identificando el número de fracción en la cual eluía el analito; e integrando la señal analítica o área del pico cromatográfico de todas las fracciones consecutivas. Se determinó la concentración de la muestra eluida y se relacionó con la concentración inicial adicionada.

#### **8.8 Reutilización del biomaterial**

Para la reutilización del biomaterial se realizaron lavados con 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M + 0.2 % de TEA pH 6.50, posterior al análisis frontal de cada concentración de muestra adicionada.

#### **8.9 Evaluación del patrón de retención de las muestras en el biomaterial en reposo a 4°C por 24 horas.**

Otra forma de evaluar la capacidad de retención del biomaterial y gel blanco para sulfóxido de albendazol y cafeína, fue en hidrogel y evaluando mediante una prueba espectrofotométrica. Se utilizó el biomaterial y geles blanco en reposo, es decir, sin un flujo constante de fase móvil. La retención en reposo del metabolito activo del albendazol: sulfóxido de albendazol, se evaluó en comparación con la retención de cafeína bajo las mismas condiciones.

##### **8.9.1 Preparación del biomaterial y geles blanco**

Se utilizaron piezas gelificadas circulares del biomaterial y geles blanco (hidrogeles en forma circular que no han perdido el 50% de agua) como se muestra en la figura 14. Los hidrogeles blanco y biomaterial se obtuvieron como se describe en el apartado 8.6 y 8.6.1; éstos se dejaron en vasos de precipitado con 10 mL de buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.5 y se refrigeraron a una temperatura de 4 °C para reforzar su estructura. Se utilizaron diferentes pesos de hidrogeles blancos (3.70 y 3.81g) y biomaterial (3.61 y 4.27g).



**Figura 14.** Piezas gelificadas circulares (bottom glass) de hidrogeles blanco y biomaterial.

### **8.9.2 Preparación e incubación de las muestras**

Se prepararon soluciones de 5  $\mu\text{g/mL}$  tanto de sulfóxido de albendazol como de cafeína en un volumen de 10 mL, disueltos en buffer de fosfatos 0.1 M+ 0.2 % de TEA, pH 6.50. Las muestras se dejaron incubando en vasos de precipitado de 25 mL que contenían las piezas gelificadas circulares de biomaterial y geles blanco, en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 24 horas (Figura 15).



**Figura 15.** Incubación de las muestras de sulfóxido de albendazol y cafeína en bottom glass del biomaterial e hidrogel blanco en reposo.

### **8.9.3 Análisis por espectrofotometría**

Trascurridas 24 horas, el biomaterial y gel blanco fue separado de las muestras, y la solución sobrenadante fue analizada en un espectrofotómetro UV-VIS, marca Perkin Elmer. Se realizó un barrido espectral en el rango de 200-400 nm para sulfóxido de albendazol y para cafeína; con el fin de apreciar y comparar las bandas de máxima absorción. La cantidad de muestra retenida fue determinada

por la comparación entre los valores de absorbancias de las soluciones de sulfóxido de albendazol y cafeína en ausencia y presencia del biomaterial y geles blanco.

#### **8.10 Pruebas colorimétricas para evaluar la presencia de ADN**

Las pruebas colorimétricas, son pruebas complementarias que nos indicaron mediante coloración la presencia de ADN en el biomaterial. Se utilizó el biomaterial y geles blanco empaquetados en cartuchos de baja presión fuera de línea, los cuales habían sido reutilizados tres veces, y se encontraban bajo refrigeración a 4°C, con un periodo de almacenamiento de cuatro meses.

##### **8.10.1 Prueba con reactivo de Bial u orcinol**

Esta prueba se basa en reconocer las pentosas de ácidos nucleicos como el ADN y ARN. La prueba se realizó por triplicado en el biomaterial y geles blanco, se utilizaron diferentes cantidades para ambos (0.3, 0.5 y 0.7g) y se adicionó 1 mL del reactivo de orcinol, cuya preparación se menciona en el apartado 8.2.6. Las muestras se dejaron en baño maría durante 20 minutos hasta la aparición de color.

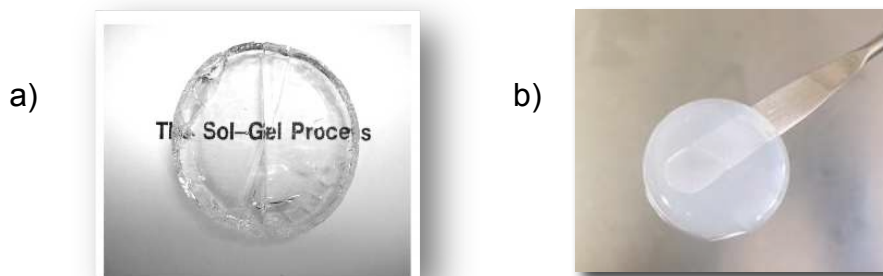
##### **8.10.2 Prueba con difenilamina**

Es una prueba más específica para ADN, ya que identifica la presencia de desoxirribosas. La prueba se realizó por triplicado en el biomaterial y geles blanco, se utilizaron diferentes cantidades para ambos (0.3, 0.5 y 0.7g) y se adicionó 1 mL del reactivo de difenilamina, cuya preparación se menciona en el apartado 8.2.7. Las muestras se dejaron en baño maría durante 20 minutos hasta la aparición de color.

## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1 Cantidades de biomaterial y gel blanco obtenido

Se obtuvieron 3.14, 3.46, 3.70 y 3.86 g de biomaterial con 15 mg de ADN inmovilizado, así mismo 2.35, 4.04 y 4.28 g de geles blanco. La cantidad de biomaterial obtenido es mayor al reportado por Avir y colaboradores en el 2005, quienes informan que mediante el método de sol-gel se obtiene 0.2 g de biomaterial (Figuras 16). El rendimiento de biomaterial obtenido aquí depende mucho de las condiciones de inmovilización del ADN, para que todo el sol viscoso polimerice por completo sin la formación de una solución bifásica; donde se obtiene una fase acuosa y otra gelificada.



**Figura 16.** a) 0.2 g de biomaterial, bottom glass obtenido por el método de sol-gel. Tomada de Avnir *et al.*, 2005 con permiso de Royal Society of Chemistry. b) 3.7 g de biomaterial “bottom glass” obtenido en este trabajo por el método de sol-gel.

### 9.2 Cantidad de ADN inmovilizado

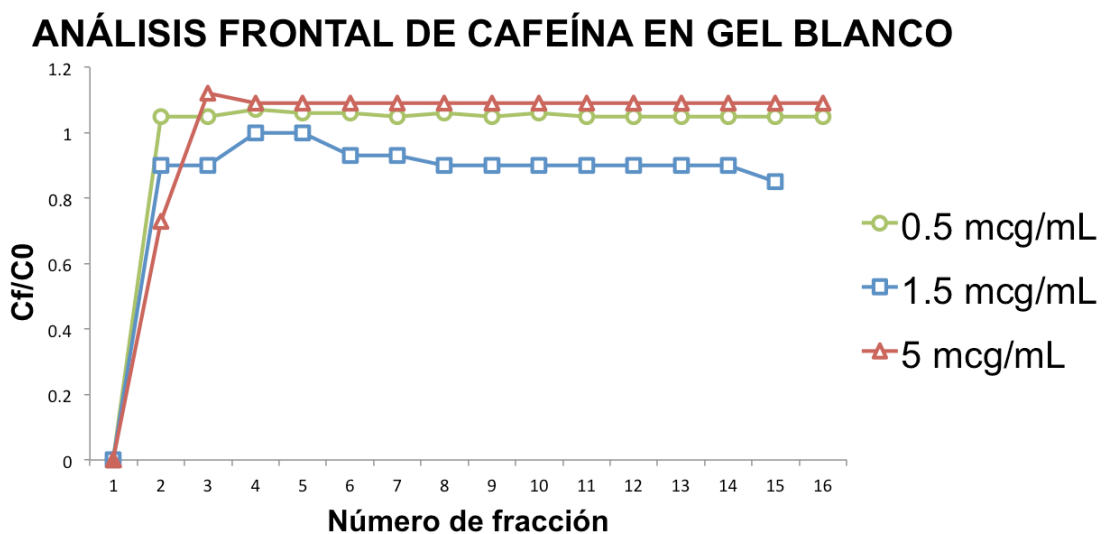
Se logró inmovilizar cerca de 15 mg de ADN por el método de sol-gel, en comparación con otros investigadores quienes han reportado la inmovilización de 1, 3, 5 y 10 mg de ADN por el mismo método (Yamada *et al.*, 2002; Yamada 2005, Satoh *et al.*, 2005; Yamada-Aono, 2008; Kapusuz-Durucan, 2012; Avnir *et al.*, 2005). Las condiciones de inmovilización mencionadas en el apartado 8.6 demostraron ser las adecuadas para inmovilizar mayor cantidad de ADN. Así mismo, la utilización del medio de disolución del ADN (buffer de fosfatos 0.1M + 1 % tween 20, pH 6.20) y la adición de isopropanol favorecen la solubilidad y la distribución homogénea de la biomolécula en toda la matriz porosa del gel.

### 9.3 Análisis por cromatografía frontal

La mayoría de los investigadores reportan la funcionalidad de los biomateriales mediante la señal analítica de muestras en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o espectroscopia UV; sin embargo, la cromatografía frontal es un método analítico que nos permite realmente identificar si hay una interacción biomolecular entre una molécula y el ligando de afinidad (Hage, 2002). Al utilizar este método analítico se tiene mayor evidencia de la presencia o ausencia de interacción de los compuestos seleccionados con el ADN.

#### 9.3.1 Análisis frontal de cafeína

La funcionalidad del biomaterial se evaluó mediante la cromatografía frontal. En el caso de la cafeína, ésta demostró no tener una retención en el biomaterial y gel blanco empaquetado en cartuchos fuera de línea (Figuras 17 y 18). La relación  $C_f/C_0$  se define como  $C_f$  = concentración de la fracción final y  $C_0$  = concentración inicial del analito al entrar al cartucho.

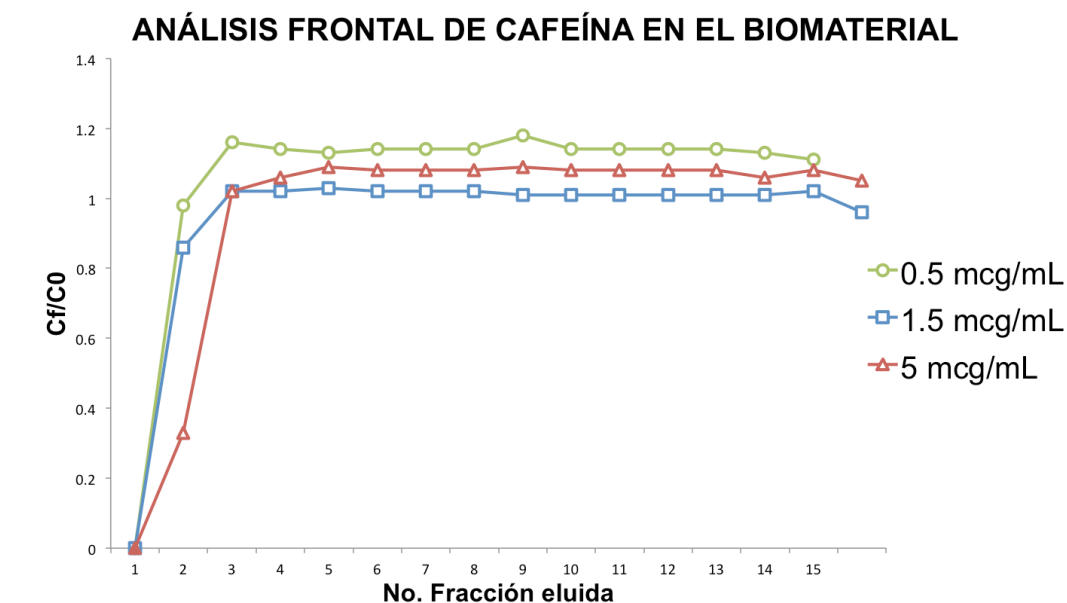


**Figura 17.** Análisis frontal de cafeína (0.5, 1.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en gel blanco; utilizando un empaque de 4.28 g.

Como se esperaba, las curvas de rompimiento o sigmoideas que representan el análisis frontal de cafeína poseen una misma posición del punto de rompimiento, esto lo apreciamos en la posición de las tres pendientes iniciales de las curvas en la figura 18, eluyendo la muestra desde la fracción 1. Debido a que la cafeína no presenta una alta afinidad por el gel blanco en las condiciones ensayadas, la muestra comienza a eluir rápidamente de los cartuchos.

Así mismo, el punto medio de las tres curvas de rompimiento permanece en la misma posición. Como se aprecia en la figura 18, sin importar la concentración de muestra aplicada de cafeína a un gel blanco, ésta comenzará a salir rápidamente de los cartuchos, sin variar la posición del frente. Esto nos indica que no hay ninguna interacción de tipo específico entre el analito y el material.

Cuando se adiciona la muestra de cafeína en el biomaterial se aprecia el mismo comportamiento que en geles blanco (Figura 18).



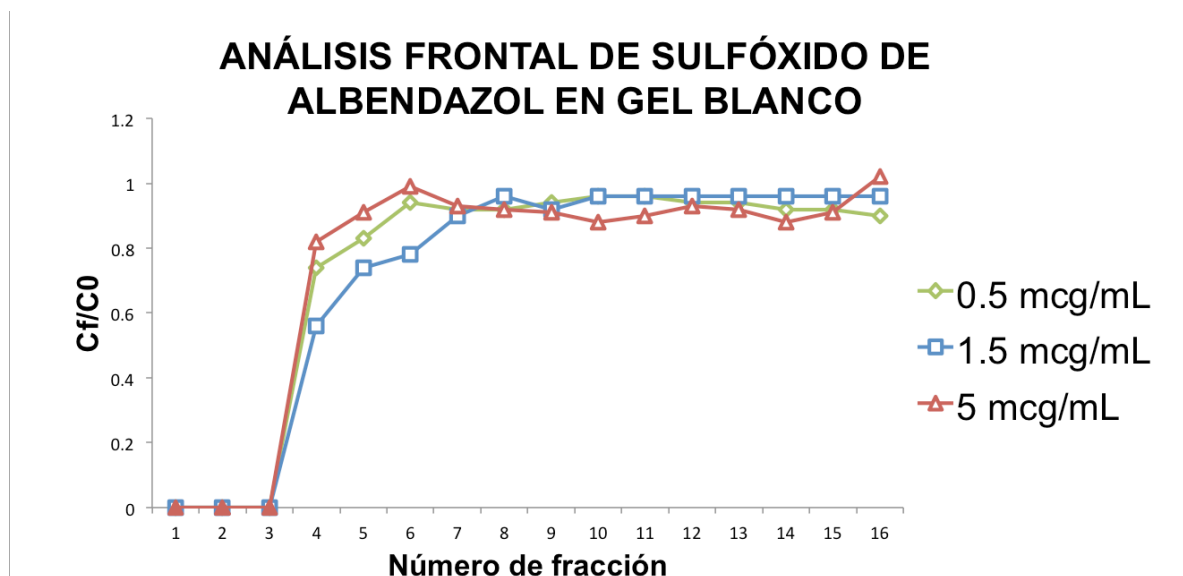
**Figura 18.** Análisis frontal de cafeína (0.5, 1.5 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el biomaterial; utilizando un empaque de 3.86 g.



En la figura 18 tampoco se observa un cambio significativo en la posición del frente de las curvas de rompimiento (posición de la pendiente inicial), por ende, no hay un desplazamiento del punto medio de rompimiento (punto medio de la pendiente inicial). Esto indica que no hay una interacción específica biomolecular entre el ADN inmovilizado y la cafeína; sin importar la variación de las concentraciones (2.6  $\mu$ M, 7.7  $\mu$ M, 26  $\mu$ M), la cafeína eluye del biomaterial en la misma fracción porque no se une al ligando de afinidad: ADN.

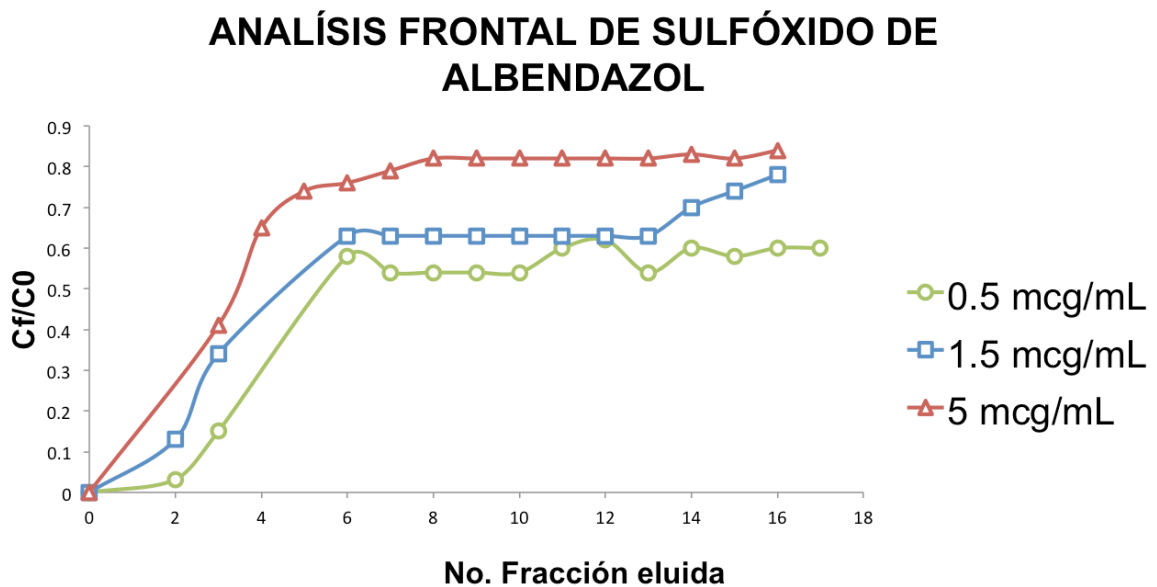
### 9.3.2 Análisis frontal del sulfóxido de albendazol

El análisis del sulfóxido de albendazol, mostró tener una retención no específica en geles blanco mayor a la cafeína, las curvas de rompimiento del análisis frontal obtenido en las tres concentraciones se encuentran desplazadas hacia la fracción 3, sin embargo no evidencian un desplazamiento del punto medio de la curva de rompimiento (Figura 19), eluyendo la muestra en la misma fracción.

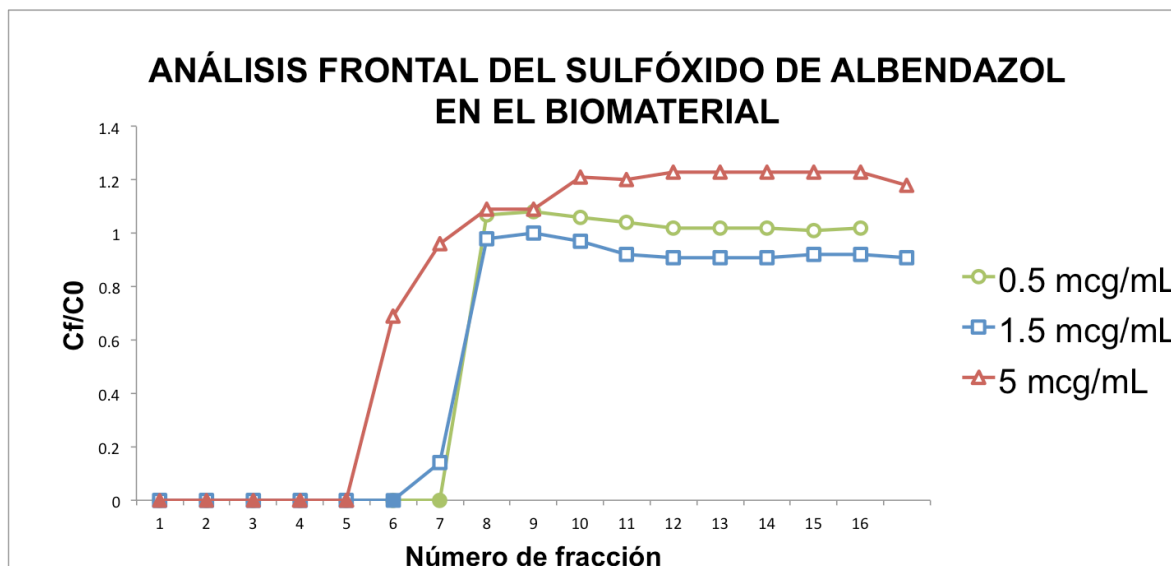


**Figura 19.** Análisis frontal de sulfóxido de albendazol (0.5, 1.5 y 5  $\mu$ g/mL) en gel blanco; utilizando un empaque con 4.04 g.

Para el análisis frontal del sulfóxido de albendazol en el biomaterial se utilizaron dos cantidades de empaque diferentes, cartuchos con 1.93 g y 3.70 g de biomaterial empaquetado a vacío. Las figuras 20 y 21 muestran los análisis frontales de este analito en las diferentes cantidades de biomaterial respectivamente.



**Figura 20.** Análisis frontal de sulfóxido de albendazol (0.5, 1.5 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ) en el biomaterial; utilizando un empaque con 1.93 g.



**Figura 21.** Análisis frontal de sulfóxido de albendazol (0.5, 1.5 y 5  $\mu\text{g/mL}$ ) en el biomaterial; utilizando un empaque con 3.70 g.

En la figura 20, se aprecia que la posición media de la curva de rompimiento del frente de migración del sulfóxido de albendazol en el biomaterial, está desplazada respecto al gel blanco; conforme disminuyen las concentraciones del sulfóxido de albendazol, como se esperaría para un gel bioactivo. En la figura 21 se presentan los resultados de desplazamiento obtenidos con un incremento en el lecho de biomaterial de 1.93 a 3.70 g. La variación en la posición del frente se hace muy significativa con respecto a un gel blanco, en relación a la cafeína y entre las concentraciones de 5 a 1.5  $\mu\text{g/mL}$  (eluyendo el analito hasta la fracción 6 y 7), lo cual hace evidente la retención del sulfóxido de albendazol en el biomaterial. Respecto al frente de 0.5  $\mu\text{g/mL}$ , su desplazamiento es muy parecido al de 1.5  $\mu\text{g/mL}$ , esto se atribuye a la pequeña diferencia de concentraciones (1.8 $\mu\text{M}$ , 5.3 $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$ ).

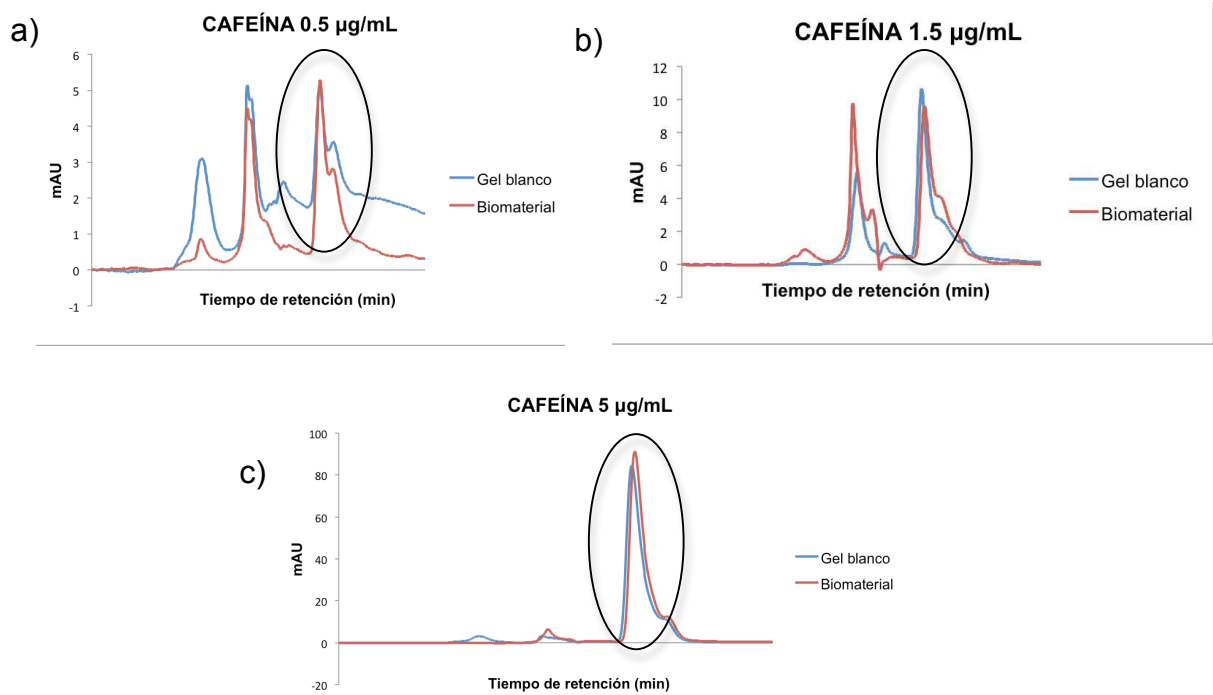
El análisis frontal del sulfóxido de albendazol demuestra que en la medida que el analito aumenta de concentración, éste se une al ligando de afinidad o al ADN inmovilizado en el gel y el biomaterial contenido en el cartucho comienza a saturarse. La muestra de 5  $\mu\text{g/mL}$  eluye antes (fracción 5) que las de 1.5 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (fracción 6 y 7), porque éstas concentraciones tardarán más en saturar los sitios de unión del ADN en el biomaterial.

Es importante contrastar los resultados mencionados con los obtenidos en el gel blanco (Figura 19), ya que no se visualiza un desplazamiento de las curvas de rompimiento como en el biomaterial. Estos resultados indican que efectivamente el biomaterial es funcional porque retiene moléculas con actividad teratogénica reportada, como el sulfóxido de albendazol, que interacciona con el ADN. En comparación con la interacción de la cafeína con el biomaterial y gel blanco, donde las diferentes concentraciones ensayadas no varían la posición del frente en ningún caso. La cafeína no se retiene en geles blanco ni en el biomaterial, presentando el mismo comportamiento y posición del frente (Figuras 17 y 18). Por lo tanto, la retención del sulfóxido de albendazol en el biomaterial, se puede atribuir únicamente por la afinidad que presenta hacia el ADN.

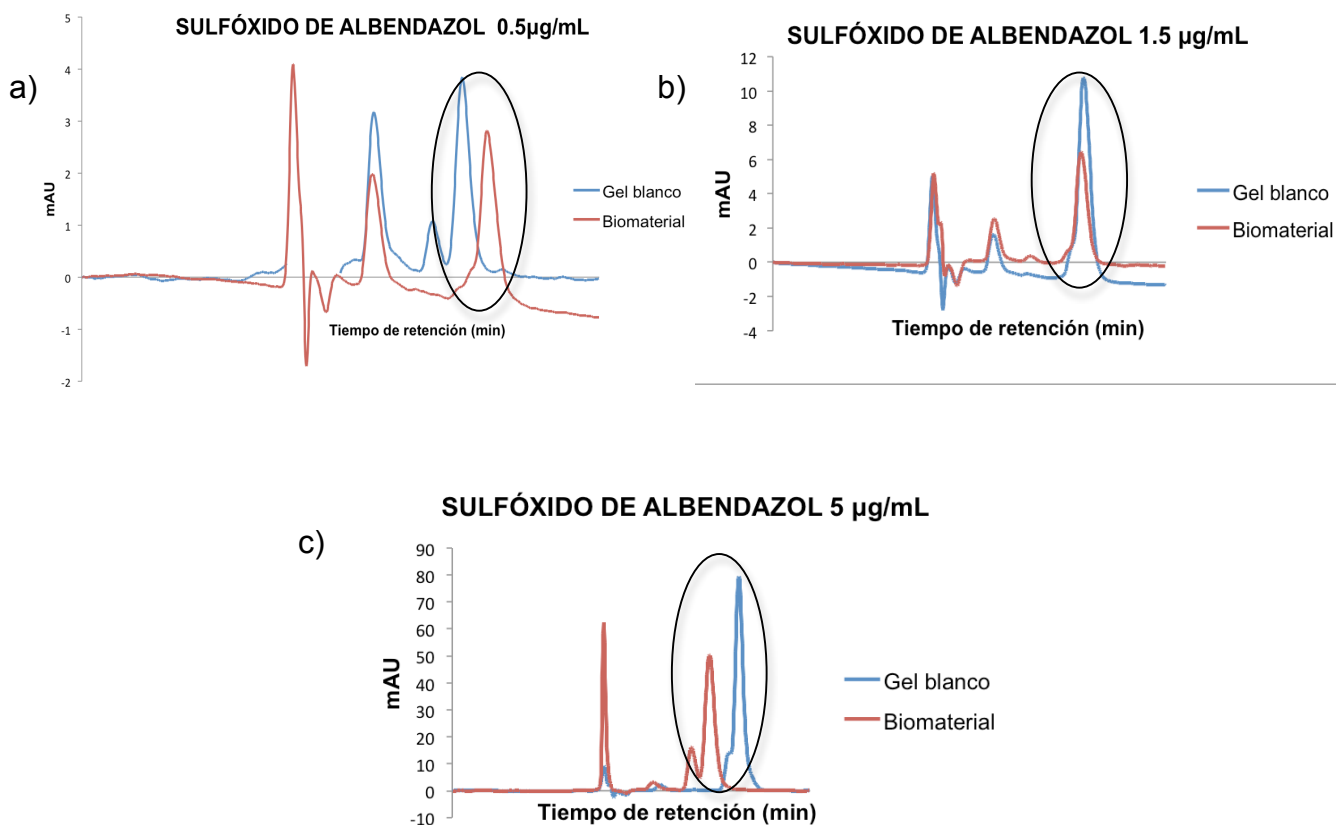
En la literatura se han reportado los posibles mecanismos por los cuales el sulfóxido de albendazol daña al ADN, éstos son diversos ya que la molécula posee aceptores y puentes de hidrógenos que pueden unirse a las bases nitrogenadas, también posee zonas electrófilas que le confieren a la molécula un riesgo mayor de mutagenésis porque es reactiva con zonas nucleofílicas del ADN. Otro tipo de interacciones que puede tener el sulfóxido de albendazol con el ADN son las interacciones electrostáticas que se generan con los grupos fosfatos debido a la formación de cargas parciales entre la unión del azufre y oxígeno (S=O) en el sulfóxido de albendazol; así mismo pueden llevarse a cabo interacciones CH- $\pi$ , donde el carbono del azúcar desoxirribosa del ADN puede donar su hidrógeno e interaccionar con la nube de electrones del anillo aromático del sulfóxido de albendazol. Los derivados de benzimidazoles como el albendazol también presentan interacciones supramoleculares en el surco menor del ADN, uniéndose a las regiones ricas de adenina y timina; produciendo espaciamientos entre 4 y 5 pares de bases e inhibiendo procesos de transcripción de genes específicos (Dervan, 2001; Hannon, 2006; Nuray *et al.*, 2007; Almaqwashi *et al.*, 2016).

#### 9.4 Evaluación del patrón de retención de cafeína y sulfóxido de albendazol

Para evaluar el patrón de retención del sulfóxido de albendazol y cafeína en el biomaterial, se sobreponen la señal analítica o los cromatogramas de cada analito eluido en geles con ADN inmovilizado y en geles blanco. Las figuras 22 y 23 muestran los cromatogramas correspondientes al análisis de la fracción no.5 de cafeína (Tiempo de retención = 3.4 minutos) y sulfóxido de albendazol (Tiempo de retención = 5.7 minutos) eluida en cartuchos de baja presión fuera de línea, en concentraciones de 0.5, 1.5 y 5 µg/mL respectivamente.



**Figura 22.** Comparación de cromatogramas de cafeína, fracción 5 eluida del gel blanco y biomaterial. a) 0.5 µg/mL; b) 1.5 µg/mL; c) 5 µg/mL

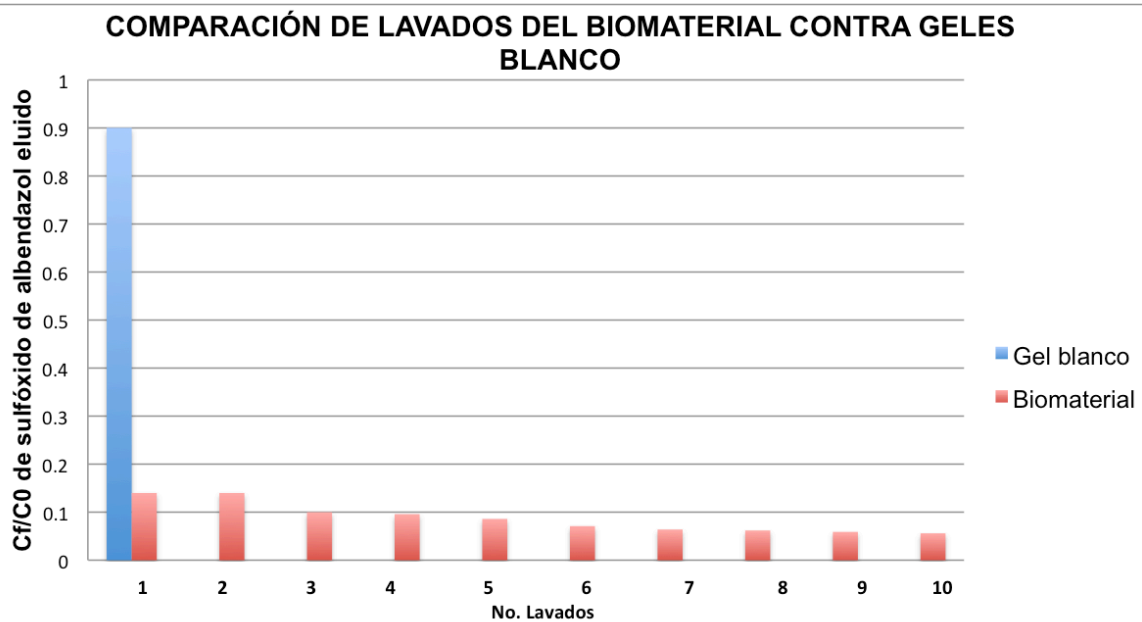


**Figura 23.** Comparación de cromatogramas de sulfóxido de albendazol, fracción 5 eluida del gel blanco y biomaterial. a) 0.5 µg/mL; b) 1.5 µg/mL; c) 5 µg/mL.

La capacidad de retención del biomaterial sintetizado se evidencia en la figura 23, en donde el pico cromatográfico del sulfóxido de albendazol, eluido en geles blanco presenta un mayor área que el correspondiente al biomaterial. La diferencia de la señal analítica aún cuando se adiciona la misma concentración de muestra para ambos geles, se debe a la retención que presenta el sulfóxido de albendazol en el biomaterial. En comparación con la cafeína (molécula control) donde eluye la misma cantidad de muestra tanto en el gel blanco como en el biomaterial, ya que al sobreponer ambas señales analíticas éstas son muy similares en sus áreas cromatográficas (Figura 22).

### 9.5 Lavados del biomaterial

Otro aspecto que indica la retención del sulfóxido de albendazol (molécula teratogénica) en el gel con ADN inmovilizado, es el volumen requerido para lavar el biomaterial posterior al análisis frontal. Para que se logre eluir cerca del 90% del analito retenido en el biomaterial se necesitaron 15 mL de buffer de fosfatos 0.1 M + 0.2% de TEA, pH 6.50, que se recolectó y cuantificó en 10 fracciones continuas de 1.5 mL; en comparación con el gel blanco que únicamente requirió de un lavado con una fracción de 1.5 mL para eluir cerca del 90% del sulfóxido de albendazol (Figura 24). Con esto se demuestra que la afinidad que presenta el sulfóxido de albendazol por el biomaterial, provoca que se requiera mayor volumen de lavado para eluir completamente el analito retenido. Estos resultados evidencian la capacidad de retención que presenta el biomaterial diseñado para moléculas con afinidad por el ADN.



**Figura 24.** Comparación de lavados continuos de 1.5 ml cada uno con PBS 0.1M + 0.2 % TEA, pH 6.50 del biomaterial y del gel blanco; mediante el monitoreo de la fracción eluida de sulfóxido de albendazol.

**9.6 Evaluación del patrón de retención de cafeína y sulfóxido de albendazol en el biomaterial, en reposo, a 4°C por 24 horas.**

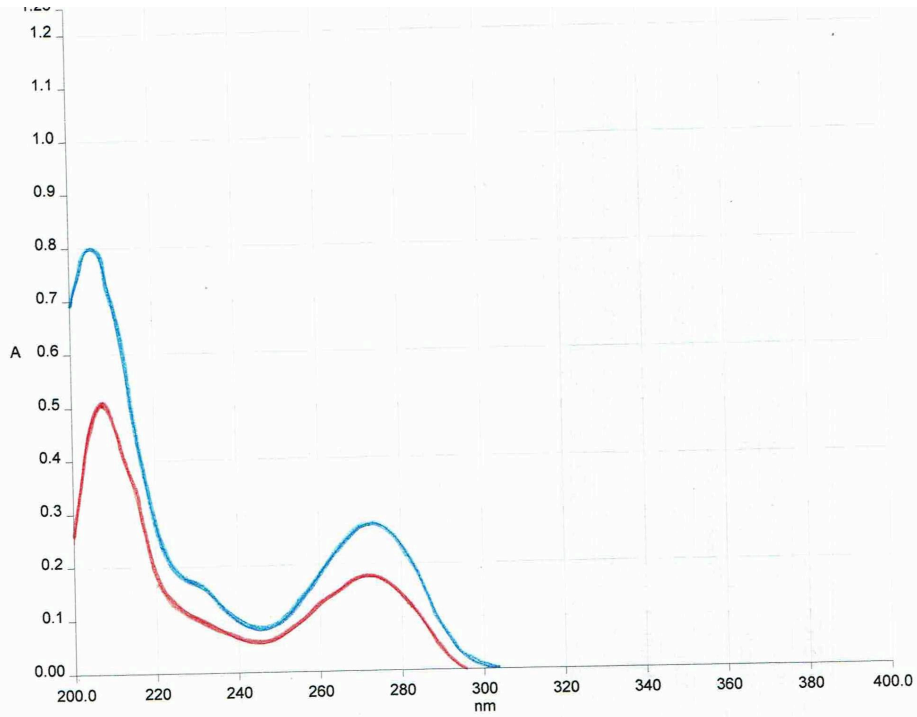
Este ensayo se llevo a cabo como se describe en el apartado 8.9. Las variaciones en los espectros de absorbancia UV obtenidos (Figuras 25 y 26) demostraron la retención de cafeína (CA) y sulfóxido de albendazol (SA) en el biomaterial y geles blanco en reposo (sin flujo continuo de fase móvil), bajo condiciones de incubación, durante 24 horas y refrigeración a 4°C. Se evaluó la diferencia entre los espectros de absorción de las muestras en geles blanco y biomaterial en comparación con las soluciones estándar. La tabla 3 muestra de forma organizada los valores de absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción de cada compuesto en el sobrenadante posterior a la incubación; también se presenta el porcentaje de analito en el sobrenadante y el porcentaje retenido en geles blanco y biomaterial.

**Tabla 3.** Valores de absorbancia y porcentajes de muestra retenidos en el biomaterial y gel blanco posterior a la prueba de incubación durante 24 horas.

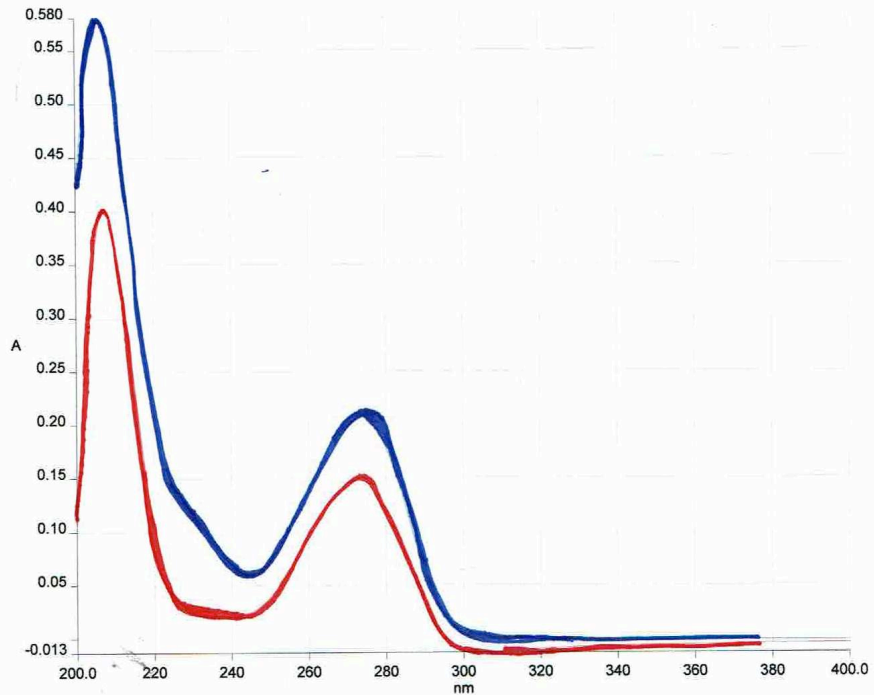
<b>Muestra en biomaterial/gel blanco</b>	<b>Concentración de la muestra</b>	<b>Absorbancia del sobrenadante de la muestra</b>	<b>% Sobrenadante</b>	<b>% Retenido</b>
<b>SA-solución estándar</b>	5.4 µg/mL	0.301	100%	0%
<b>SA-gel blanco</b>	5.5 µg/mL	0.141	46.73%	53.26%
<b>SA-biomaterial</b>	5.4 µg/mL	0.051	16.89%	83.10%
<b>CA-solución estándar</b>	5.5 µg/mL	0.210	100%	0%
<b>CA-gel blanco</b>	5.4 µg/mL	0.157	74.97%	25.03%
<b>CA-biomaterial</b>	5.5 µg/mL	0.178	84.68%	15.32%



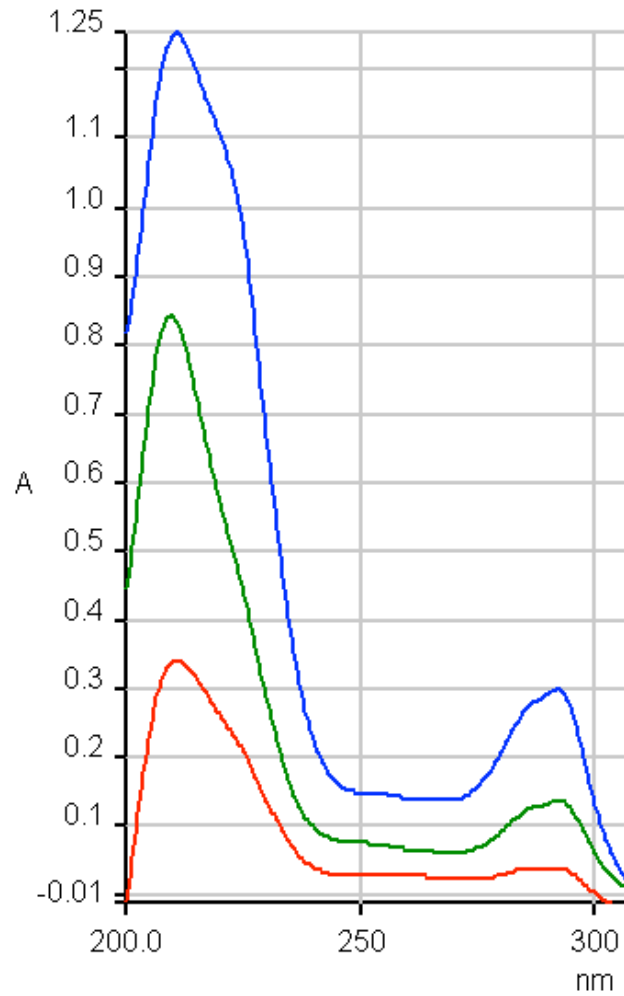
a)



b)



**Figura 25.** Comparación de los espectros de absorción UV-VIS de cafeína posterior a la prueba de incubación en el biomaterial y en el gel blanco en reposo durante 24 horas. a) cafeína (5.4 µg/mL) en solución estándar (línea azul) y en presencia del gel blanco (línea roja). b) cafeína (5.5 µg/mL) en solución estándar (línea azul) y en presencia del biomaterial (línea roja).



**Figura 26.** Comparación de los espectros de absorción UV-VIS del sulfóxido de albendazol posterior a la prueba de incubación con el biomaterial y con el gel blanco en reposo durante 24 horas. Sulfóxido de albendazol en solución estándar (línea azul), en gel blanco (línea verde) y en biomaterial (línea roja).

### **9.6.1 Retención no específica**

La prueba de incubación en el biomaterial y gel blanco en condiciones de reposo, durante 24 horas es de gran utilidad para apreciar la retención no específica. Cuando ambos geles se encuentran con un flujo constante de buffer de fosfatos como fase móvil, la retención no específica atribuida a las interacciones no relacionadas con el ADN son menos evidentes que en condiciones de reposo y en contacto con la muestra durante 24 horas. En reposo se estimó, una retención no específica significativa y esperada para ambos analitos en geles blanco; como también lo reportan en sus experimentos Yamada-Nakayama, 2012.

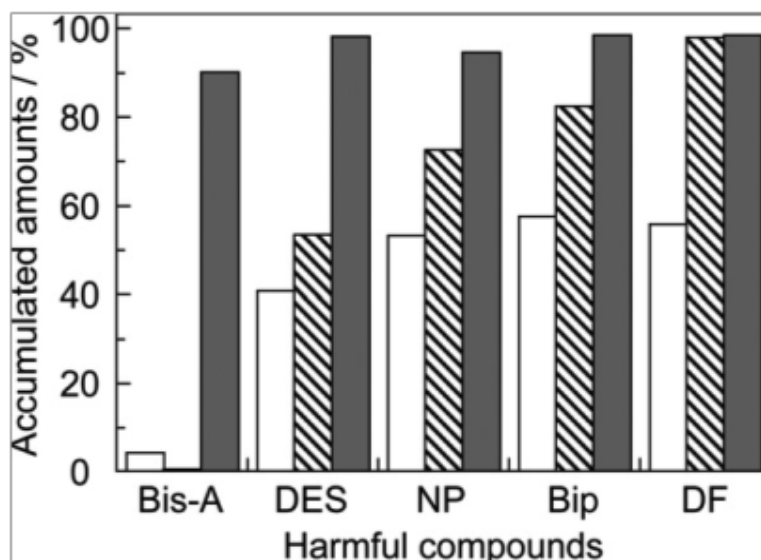
Los espectros de absorción de la cafeína (molécula control) en gel blanco y biomaterial nos indican una disminución de la absorbancia con respecto a su solución estándar; esto demuestra que se retiene analito en ambos geles (Figura 26). De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 3, se retiene un 25.03% de cafeína en gel blanco y 15.32% en el biomaterial con ADN. Estos porcentajes de retención se relacionan con procesos de retención no específica que se dan por adsorción física e interacción electrostática con grupos silanoles del material como lo reporta Satoh *et al*, 2005; Yamada-Nakayama, 2012. La diferencia en los porcentajes, se puede atribuir a diferencias en la cantidad de material obtenido y cantidad de grupos de silanoles libres, pero en general el comportamiento se puede considerar igual en el gel blanco y en el biomaterial.

Por otra parte, los espectros del sulfóxido de albendazol (molécula teratogénica) demuestran que la retención no específica en geles blanco es de un 53.26% (tabla 3) y que en el caso del biomaterial hay una mayor retención del SA (83.10%) que se atribuye a las diferentes y posibles interacciones no covalentes que puede tener este metabolito con el ADN (unión por puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones CH- $\pi$ ). Como se mencionó anteriormente, la visualización de la retención no específica es más evidente con la prueba de incubación de ambos geles en reposo durante un periodo de 24 horas. En los cartuchos empaquetados con geles blanco y biomaterial, lo que observamos es un

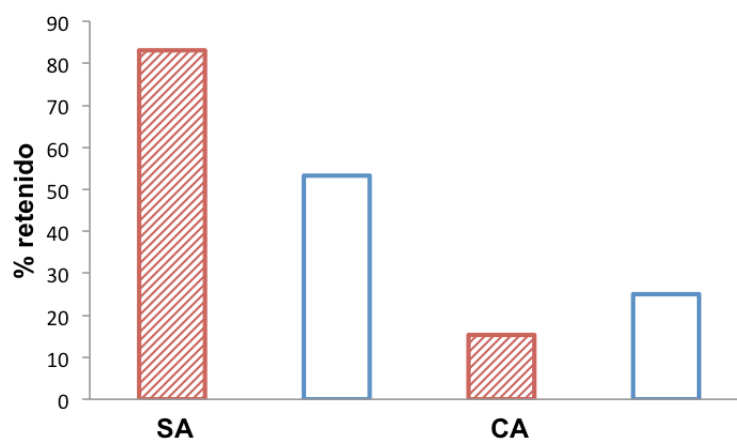
retraso en la elución hasta la fracción 3 para el sulfóxido de albendazol en geles blanco (Figura 19), con respecto a la elución de cafeína en la primera fracción tanto en geles blanco como en el biomaterial (Figuras 17 y 18), esto indica una mayor retención no específica para el sulfóxido de albendazol pero no da información sobre la cantidad o porcentaje de ésta. Mediante la prueba de retención en reposo podemos estimar la participación de este tipo de retención en el proceso.

En la evaluación UV-VIS, los espectros de sulfóxido de albendazol demuestran que hay una mayor retención de éste en el biomaterial (Figura 26), porque la banda de absorción asociada a su concentración en el sobrenadante es significativamente menor a la absorbancia de solución estándar y a la del gel blanco cuando se comparan los datos en las mismas condiciones. Respecto a las interacciones no específicas es importante mencionar que son de baja afinidad, con respecto a las interacciones de tipo biológico que presentan constantes de interacción altas (Hage, 2002; Hage, 2005; Zheng *et al.*, 2014).

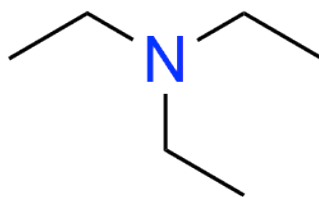
Yamada-Nakayama en el 2012 diseñaron un biomaterial híbrido con ADN y ciclodextrinas, sin embargo, ellos reportan una retención no específica de moléculas no planas como naftaleno y dietilestilbestrol (moléculas control) en geles blanco (sílica) del 40-55% y asocian esta retención a una adsorción física en la superficie (Figura 27). Comparando los resultados de este trabajo con los obtenidos por Yamada-Nakayama, la retención no específica de cafeína (molécula control) en geles blanco es del 25.03% (Figura 28). La disminución de la retención no específica en geles blanco la atribuimos a la presencia de trietilamina (Figura 29) en el buffer de fosfatos 0.1M, pH 6.50 utilizado como medio de disolución, ya que ésta molécula puede bloquear grupos silanoles libres en la superficie del gel.



**Figura 27.** Porcentajes retenidos de moléculas carcinogénicas (bisfenil-Bip, dibenzofurano-DF, bisfenol-A) así como moléculas control (naftaleno-NP y dietilestilbestrol-DES) en geles blanco (barra libre), biomaterial con ADN (barra diagonal) y en biomaterial híbrido con ciclodextrinas (barra sólida). Tomada de Yamada-Nakayama, 2012 con permiso de Elsevier.



**Figura 28.** Porcentajes retenidos de sulfóxido de albendazol (SA) y cafeína (CA) en biomaterial (barra diagonal) y geles blanco (barra libre).



**Figura 29.** Estructura química de trietilamina

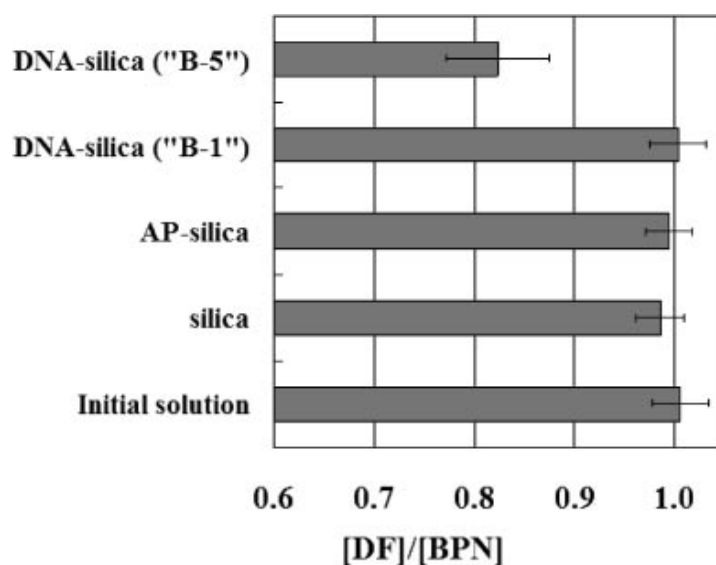
### **9.6.2 Funcionalidad del biomaterial**

La funcionalidad del biomaterial diseñado se identifica por la retención y selectividad que presenta hacia moléculas con afinidad por el ADN, como es el caso del sulfóxido de albendazol. Satoh y colaboradores en el 2005, diseñaron un biomaterial con ADN que interactuaba con moléculas planas; utilizaron como muestras al dibenzofurano (molécula carcinogénica) y benzofenona (molécula control). Tomando como referencia los resultados obtenidos por estos investigadores, se muestra un mayor funcionamiento del biomaterial diseñado en el presente trabajo.

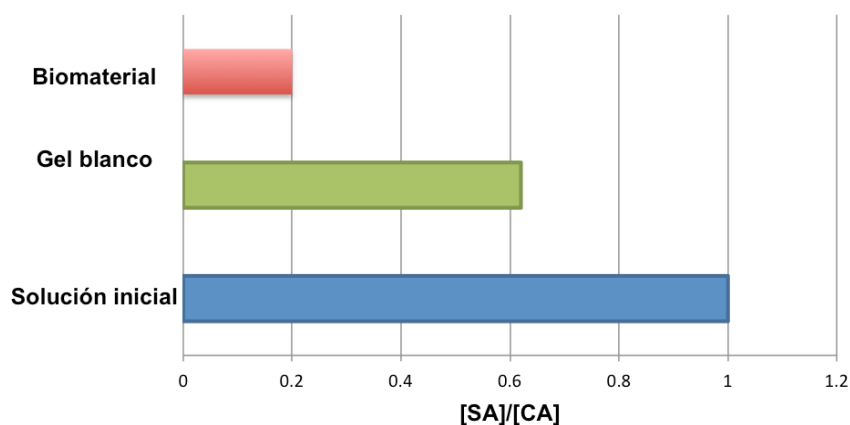
En la figura 30 se aprecia que el cociente de las concentraciones de dibenzofurano y benzofenona es muy cercano a la unidad cuando se encuentran en geles blanco, lo cual indica que ambas moléculas se retienen en la misma cantidad sin que el gel muestre selectividad entre las moléculas. Las cantidades de ambas moléculas cuando se encuentran en presencia del biomaterial (DNA-sílica "B1") presentan el mismo comportamiento que en geles blanco (sílica); esto indica la escasa selectividad del biomaterial hacia la retención del dibenzofurano (molécula carcinogénica). Únicamente se aprecia una diferencia significativa en la retención del dibenzofurano con respecto a la benzofenona en el biomaterial "B5", con un cociente de concentraciones de 0.85.

Ordenando los datos obtenidos para CA y SA de la misma forma que estos investigadores, se puede apreciar que los resultados obtenidos en el diseño del presente biomaterial (ADN-sol-gel), muestran que éste es más selectivo hacia el sulfóxido de albendazol (molécula teratogénica) respecto a la cafeína (molécula

control) tal como se muestra en la figura 31. El cociente de concentraciones del sulfóxido de albendazol respecto a la cafeína en el sobrenadante analizado por espectroscopia UV-VIS y en presencia del gel blanco es de 0.62; y en el biomaterial de 0.20, lo cual indica una diferencia entre el comportamiento de ambos materiales (gel blanco y biomaterial) en presencia de las moléculas analizadas. Así mismo se evidencia la funcionalidad del biomaterial por su selectividad y retención de moléculas que presentan afinidad por el ADN como es el sulfóxido de albendazol.



**Figura 30.** Comparación del cociente de concentraciones del dibenzofurano (DF) y benzofenona (BPN). La selectividad fue estimada usando biomateriales de ADN-silica y geles control. Tomada de Satoh *et al* 2005, con permiso de Nature Research Journals.



**Figura 31.** Comparación del cociente de concentración de sulfóxido de albendazol (SA) y cafeína (CA). La selectividad fue estimada con las cantidades analizadas por espectroscopia UV-VIS en geles blanco y biomaterial (Consultar tabla 3) y las formulas:

$$\frac{[SA]}{[CA]} = \frac{[SA] \text{ en sobrenadante del gel blanco}}{[CA] \text{ en sobrenadante del gel blanco}}$$

$$\frac{[SA]}{[CA]} = \frac{[SA] \text{ en sobrenadante del biomaterial}}{[CA] \text{ en sobrenadante del biomaterial}}$$

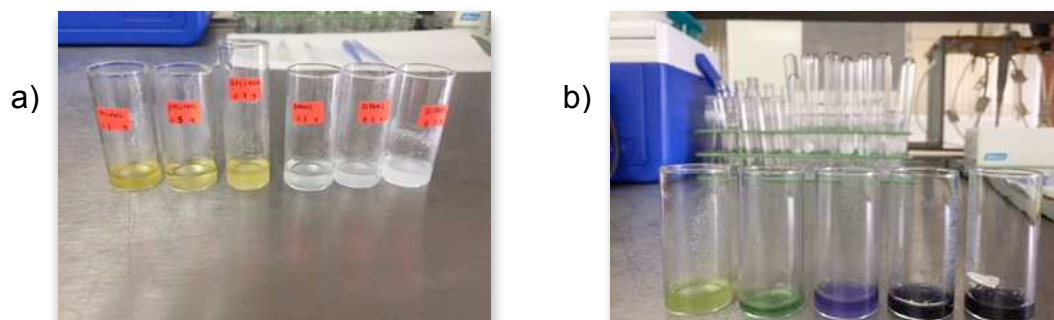
### 9.7 Pruebas complementarias

Dentro de estas pruebas se encuentran los ensayos colorimétricos, en donde la aparición de un color característico indica la presencia de ADN en el biomaterial y ausencia de la biomolécula en geles blanco. Los ensayos colorimétricos se realizaron como se describió en el apartado 8.10.

El color asociado a la reacción con orcinol y difenilamina indica la presencia de pentosas provenientes de ácidos nucleicos, este resultado fue positivo en el biomaterial con ADN inmovilizado aún cuando había sido reutilizado tres veces y presentaba un periodo de almacenamiento de 4 meses bajo refrigeración. La aparición de un color verde en la prueba con orcinol y azul-morado en la prueba con difenilamina realizadas en el biomaterial indican la hidrólisis de uniones



fosfodiéster que libera a las pentosas (desoxirribosa del ADN). Este azúcar en medio ácido se deshidrata formando furfural y *b*-hidroxilevulino aldehído respectivamente; el cual al reaccionar con orcinol y difenilamina genera la aparición de un complejo color verde y azul-morado, respectivamente. La reacción realizada en geles blanco demostró una coloración amarilla característica del reactivo orcinol, mientras que el gel blanco con difenilamina no mostró color (Figura 32).



**Figura 32.** Comparación de las pruebas colorimétricas en a) geles blanco y b) en el biomaterial en presencia de orcinol y difenilamina.

Las pruebas colorimétricas muestran la estabilidad del ADN retenido, durante el periodo de tiempo y durante el uso del biomaterial. La aparición de los colores característicos en ambas reacciones cuando se llevan a cabo en el biomaterial; indica una inmovilización estable del ADN, ya que aún bajo las condiciones mencionadas de reutilización y almacenamiento se mantiene la presencia de este ácido nucleico, por atrapamiento físico en los poros del gel.

### **9.8 Estabilidad del biomaterial**

El biomaterial mostró que mantiene sus propiedades para ser reutilizable en la retención de moléculas con afinidad por el ADN, después de realizar lavados con 15 mL de buffer de fosfatos 0.1M + 0.2%TEA, pH 6.50; el biomaterial se logró reutilizar un total de tres veces en un periodo de un mes, bajo condiciones de refrigeración a 4°C. Se sugiere que los lavados con trietilamina son necesarios para la elución completa de los analitos que se retienen en el biomaterial y así volverlo a utilizar.

Posterior a cada uno de los lavados, el ADN inmovilizado sigue siendo funcional para retener la muestra de sulfóxido de albendazol, evaluando la retención mediante cromatografía frontal. Así mismo, posterior a los lavados o después de un periodo de almacenamiento no se detectó la elución de éste ácido nucleico del gel empaquetado en cartuchos. Las pruebas colorimétricas y la reutilización del biomaterial demuestran la estabilidad del ADN; al mantenerse inmovilizado y funcional en un periodo de tiempo de hasta un mes. El resultado de reutilización del biomaterial es el mismo que el reportado por Yamada-Nakayama en el 2012; quienes lograron la reutilización de tres veces continuas de un biomaterial con ADN diseñado por el método de sol-gel.

## 10. CONCLUSIONES

Se logró diseñar un biomaterial por el método de sol-gel, las condiciones experimentales utilizadas permitieron inmovilizar 14 mg de ADN extraído de esperma de salmón, y obtener mayores rendimientos en la síntesis del biomaterial en comparación con lo reportado por otros investigadores. El biomaterial también demostró ser estable y funcional. Su funcionalidad se evidenció por la cromatografía frontal y la prueba de evaluación del patrón de retención del biomaterial en reposo a 4°C por 24 horas; donde el sulfóxido de albendazol mostró tener retención en el biomaterial, debido a su afinidad por el ADN. En contraste con la cafeína (molécula control), el análisis frontal no demostró una interacción biomolecular con el ADN y su retención era similar a la presentada en los geles blanco.

La retención no específica detectada en el biomaterial y geles blanco en reposo fue menor a la reportada en diferentes referencias bibliográficas, esto se debió a la utilización de trietilamina en el buffer de fosfatos; esta amina, actúa como un bloqueador de grupo silanoles libres.

Respecto a la estabilidad del biomaterial sintetizado éste puede ser reutilizado tres veces continuas sin que pierda su capacidad de retención de moléculas con afinidad por el ADN. Las pruebas colorimétricas demostraron la presencia de ADN inmovilizado en el gel bajo condiciones de almacenamiento en un periodo de 4 meses y después de haber sido reutilizado tres veces. Esto indica la estabilidad del atrapamiento físico de la biomolécula en un soporte poroso como el gel.

Por último, los resultados de rendimiento, afinidad, estabilidad y reuso permiten proponer la aplicación de este biomaterial en el área farmacéutica para ser utilizado en la identificación de moléculas nuevas que presenten interacciones con el ADN, y que pueda redituar en efectos terapéuticos donde el ADN actúa como diana biológica. Se puede variar la utilidad y funcionalidad de este tipo de biomateriales al inmovilizar por el método de sol-gel una variedad de agentes biológicos y ampliar las perspectivas para su uso en análisis farmacéutico.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almaqwashy A, Paramanathan T, Rouzina I, & Williams M. (2016). Mechanisms of small molecule-DNA interactions probed by single-molecule force spectroscopy. *Nucleic Acids Research*, 44(9), 3971-3988.

Akkoyun T, Arslan A, Turhan I, & Karhan M. (2011). Immobilization techniques in biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, (22), S61.

Avnir D, Coradin T, Lev O, Livage J. (2005). Recent bio-applications of sol-gel materials. *Journal of Materials Chemistry*, 16(1), 1013-1030.

Arroyo, M. (1998). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-39.

Bailon P, Ehrlich G, Fung W, Berthold W. (2000). *Affinity chromatography: methods and protocols*, Totowa, United States of America, Human Press.

Brady D, & Jordaan J. (2009). Advances in enzyme immobilization. *Biotechnology letters*, 31(11), 1639.

Brena B, & Batista-Viera F. (2006). *Immobilization of enzymes and cells*. Human Press.

Capece B, Navarro M, Arcalis T, Castells G, Toribio L, Perez F, & Cristofol C. (2003). Albendazole sulphoxide enantiomers in pregnant rats embryo concentrations and developmental toxicity. *The Veterinary Journal*, 165(3), 266-275.

Cserhádi T, & Valkó K. (1993). *Chromatographic Determination of Molecular Interactions Applications in Biochemistry, Chemistry, and Biophysics*. CRC Press.

Datta S, Christena L, & Rajaram Y. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *Biotech*, 3(1), 1-9.

Deriabina A, Cruz A, González E, Grokhlina T, & Poltev V. (2004). Simulación de los mínimos de interacción de cafeína con las bases de los ácidos nucleicos y sus rutas de transición. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 25(1), 34-43.

Dervan P. (2001). Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 9(9), 2215-2235.

Dunn B, Miller J, Dave B, Valentine J, Zink J. (1998). Strategies for encapsulating biomolecules in sol-gel matrices. *Elsevier Science*, 46(3): 737-741.

Eckardt K, Kaltenhäuser J, Kilb C, Seiler A, & Stahlmann R. (2012). Relative potency of albendazole and its sulfoxide metabolite in two in vitro tests for developmental toxicity: The rat whole embryo culture and the mouse embryonic stem cell test. *Reproductive Toxicology*, 34(3), 378-384.

Fujiwara M, Yamamoto F, Okamoto K, Shiokawa K, & Nomura R. (2005). Adsorption of duplex DNA on mesoporous silicas: possibility of inclusion of DNA into their mesopores. *Analytical Chemistry*, 77(24), 8138-8145.

Gallego U, Delgado T, Campos M, Pinto L, & Gómez F. (2014). Actualización del uso de fármacos durante el embarazo: categorías de riesgo. *Farmacia Hospitalaria*, 38(4), 364-378.

FDA. (2012). Guía de clasificación teratogénica. EUA: ficha técnica de productos FDA. Recuperado de <http://www.fda.gov/drugs>

Goss A, Bard M. (1990). High-performance affinity chromatography of DNA. *Journal of Chromatography A*, 508, 279-287.

Gupta R, Chaudhury N. (2007). Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Journal Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2387-2399.

Hage D. (2002). High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding. *Journal of Chromatography*, 768,3-30.

Hage D. (2005). *Handbook of affinity chromatography*. United States of America: chromatographic science series.

Hannon Michael J. (2007). Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews*, 36(2), 280-295.

Rupcich N (2005). Applications of biomolecule entrapment for sensing and screening of small molecules. Thesis of Graduate studies. McMaster University.

Kapusuz D, Durucan C. (2012). Synthesis of DNA-encapsulated silica elaborated by sol-gel routes. *Journals Cambridge*, 28(2), 175-184.

Kihlman B, Sturelid S, Hartley-Asp B, & Nilsson K. (1977). The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 26(2), 105-122.

Klein L, (Ed.). (2013). *Sol-gel optics: processing and applications* (Vol. 259). Springer Science & Business Media.

Kline T. (1993). *Handbook of affinity chromatography*. CRC Press.

Lee H, & Lee S. (2017). Label-free quantitative detection of nucleic acids based on surface-immobilized DNA intercalators. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 1310-1315.

Levy D, & Zayat M. (Eds.). (2015). *The Sol-Gel Handbook, 3 Volume Set: Synthesis, Characterization, and Applications* (Vol. 2). John Wiley & Sons.

Liu X, Diao H, & Nishi N. (2008). Applied chemistry of natural DNA. *Chemical Society Reviews*, 37(12), 2745-2757.

Liu X, Yamada M, Matsunaga M, & Nishi N. (2006). Functional materials derived from DNA. *In Functional Materials and Biomaterials* (pp. 149-178). Springer, Berlin, Heidelberg.

Lin Z, Li X, & Kraatz H. (2011). Impedimetric immobilized DNA-based sensor for Simultaneous detection of  $Pb^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ , and  $Hg^{2+}$ . *Analytical chemistry*, 83(17), 6896-6901.

Livage J, Coradin T, & Roux C. (2001). Encapsulation of biomolecules in silica gels. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 13(33), R673.

Macarulla J, & Goñi, F. (1994). *Bioquímica humana: curso básico* (Vol. 5). Reverté.

Mateo C, Palomo J, Fernández-Lorente G, Guisan J, Fernández-Lafuente R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1451-1463.

Nuray A, Orenay S, Reyhan E, Turk M, Asci M, Turel S... & Nazmiye A. (2007). Genotoxic effects of albendazole in patients medicated for cystic echinococcosis. *Helminthologia*, 44(2), 57-61.

Ohlson S, & Zopf D. (1994). Weak-affinity chromatography. *In Molecular Interactions in Bioseparations* (pp. 15-25). Springer, Boston, MA.

Parikh I, & Cuatrecasas P. (1994). Affinity chromatography. *In Molecular Interactions in Bioseparations* (pp. 3-13). Springer, Boston, MA.

Pierre A, Bonnet J, Vekris A, & Portier J. (2001). Encapsulation of deoxyribonucleic acid molecules in silica and hybrid organic-silica gels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 12(1), 51-55.

Piosik J, Zdunek M, & Kapuscinski J. (2002). The modulation by xanthenes of the DNA-damaging effect of polycyclic aromatic agents: part II. The stacking complexes of caffeine with doxorubicin and mitoxantrone. *Biochemical pharmacology*, 63(4), 635-646.

Porta M, Vioque J, Ayude D, Alguacil J, Jarrod M, Ruiz L, & Murillo J. (2003). Coffee drinking: the rationale for treating it as a potential effect modifier of carcinogenic exposures. *European journal of epidemiology*, 18(4), 289-298..

Sakka S, & Kozuka H. (Eds.). (2005). *Handbook of sol-gel science and technology. 1. Sol-gel processing* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.

Salazar-Leyva J, Lizardi-Mendoza J, Ramírez-Suarez J, García-Sánchez G, Ezquerro-Brauer J, Valenzuela-Soto E, Pacheco-Aguilar R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(1), 129-150.

Satoh S, Fugetsu B, Nomizu M, Nishi N. (2005). Functional DNA-silica composite prepared by sol-gel method. *Journal Polymer*, 37(2), 94-101.

Stryer L, & Tymoczko J. (2008). Bioquímica. *Barcelona, España: Editorial Reverté*, 766-775.

Su X, Hu L, Kong L, Lei X, Zou H. (2007). Affinity chromatography with immobilized DNA stationary phase for biological fingerprinting analysis of traditional chinese medicines. *Journal of Chromatography*, 1154, 132-137.



Tampion J, & Tampion M. (1987). *Immobilized cells: principles and applications* (Vol. 5). Cambridge University Press.

Tian X, Song Y, Dong H, Ye B. (2008). Interaction of anticancer herbal drug barberine with DNA immobilized on the glassy carbon electrode. *Journal Bioelectrochemistry*, 73, 18-22.

Turková J. (1978). *Affinity chromatography*, Amsterdam, The Netherlands, Elsevier North-Holland.

Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Ed. Médica Panamericana.

Walcarius A, Collison M. (2009). Analytical chemistry with silica sol-gel: traditional routes to new materials for chemical analysis. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2, 121-143.

Wong S, & Jameson D. (2011). *Chemistry of protein and nucleic acid cross-linking and conjugation*. CRC Press.

Wright J, & Sommerdijk N. (2014). *Sol-gel materials: chemistry and applications*. CRC press.

Wong E, Chow E, & Gooding J. (2007). The electrochemical detection of cadmium using surface-immobilized DNA. *Electrochemistry communications*, 9(4), 845-849.

Yamada M, Shikano J, Harada Y. (2010). Accumulation of harmful compounds by the composite of DNA and cyclodextrin: Effect on intramolecular cavity of cyclodextrin. *Journal Materials Chemistry and Physics*, 124, 623-627.

Yamada M, Nakayama E. (2012). Preparation of DNA-cyclodextrin-silica composite by sol-gel method and its utilization as an environmental material. *Journal Materials Chemistry and Physics*, 133, 278-283.

Yamada M, Kato K, Nomizu M, Ohkawa K, Yamamoto H, & Nishi N. (2002). UV-irradiated DNA matrixes selectively bind endocrine disruptors with a planar structure. *Environmental science & technology*, 36(5), 949-954.

Yamada M, & Aono H. (2008). DNA-inorganic hybrid material as selective absorbent for harmful compounds. *Polymer*, 49(21), 4658-4665.

Zachariou M. (2008). *Affinity chromatography: methods and protocols*, Totowa, United States of America, Humana Press.

Zheng X, Li Z, Beeram S, Podariu M, Matsuda R, Pfaunmiller E, Hage D. (2014). Analysis of biomolecular interactions using affinity microcolumns: a review. *Journal of Chromatography B*, 968, 49-63.

## 12. ANEXOS

Presentación de este trabajo de investigación en Congresos nacionales e Internacionales

# DISEÑO DE UN BIOMATERIAL BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE ADN POR LA TÉCNICA DE SOL-GEL

Elani Cabrera Vega<sup>a</sup>, Marcela Hurtado Y De la Peña<sup>a</sup> y Georgina Alarcón Ángeles<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México, México.  
elanijulissa@gmail.com

### Introducción

El ácido desoxirribonucleico (ADN) inmovilizado puede emplearse como agente de biorreconocimiento para la identificación de compuestos bioactivos en el área farmacéutica; considerando que el ADN es una diana biológica para muchos antibióticos, antivirales y fármacos antineoplásicos. Así mismo para la evaluación de efectos genotóxicos y carcinogénicos de diversos compuestos.<sup>1</sup> Se han utilizado diferentes métodos de inmovilización de biomoléculas los cuales incluyen: soportes orgánicos, poliméricos o inorgánicos. Sin embargo, muchos de estos métodos no pueden ser aplicados a todas las biomoléculas, pues las interacciones no específicas entre éstas y el material de soporte producen una desnaturalización de la biomolécula afectando su actividad biológica.<sup>2</sup> Una alternativa para el diseño de biomateriales con ácidos nucleicos es su atrapamiento en matrices inorgánicas de silicatos formadas a bajas temperaturas mediante un método llamado: sol-gel. Este método se basa en reacciones de hidrólisis y condensación consecutivas; ofrece la ventaja de utilizar una fase acuosa a temperaturas bajas y por lo tanto no se compromete la actividad biológica de este tipo de biomoléculas.<sup>3,4</sup>

### Resultados y discusión

En el presente trabajo, se logró la obtención de un biomaterial utilizando esperma de salmón como fuente de ADN, el cual se inmovilizó mediante el método de sol-gel. Este biomaterial presentó afinidad por el sulfóxido de albendazol, el metabolito primario del fármaco albendazol, el cual es

causante de efectos embriotóxicos y teratogénicos. La capacidad de retención del biomaterial se evaluó mediante un análisis frontal comparativo entre el sulfóxido de albendazol y un control (cafeína) tanto en geles blanco (sin ADN inmovilizado) y el biomaterial (Figuras 1 y 2). Por otro lado, no se apreció una retención no específica en los geles blancos utilizados.

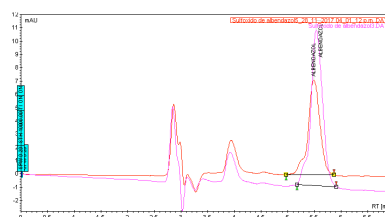


Figura 1. Comparación de cromatogramas de sulfóxido de albendazol en geles blanco y biomaterial.

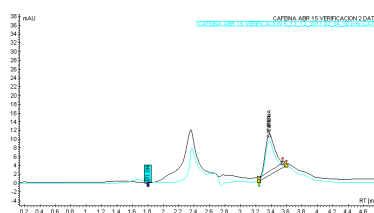


Figura 2. Comparación de cromatogramas de cafeína en geles blanco y biomaterial.

### Conclusiones

Se logró diseñar un biomaterial funcional que identificara moléculas con afinidad por el ADN. Se espera que la utilización de este tipo de biomateriales, permita identificar fármacos cuyos patrones de retención por afinidad faciliten la realización de estudios *in*

*in vitro* para la detección de interacciones fármaco-ADN, posibles efectos genotóxicos como en el caso de metabolitos teratogénicos, así como de efectos terapéuticos de nuevas moléculas que actúen sobre el ADN como diana biológica

## Referencias

1. Su, X.; Hu, L.; Kong, L.; Lei, X.; Zou, H., *J. Chromatogr. A* **2007**, *1154* (1-2), 132-137.
2. Kapusuz, D.; Durucan, C., *J. Mater. Res.* **2013**, *28* (2), 175-184.
3. Walcarius, A.; Collinson, M. M., *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, *2* (1), 121-143.
4. Yamada, M.; Nakayama, E., *Mater. Chem. Phys.* **2012**, *133* (1), 278-283.



XXVII INTERNATIONAL MATERIALS RESEARCH CONGRESS

MRS MATERIALS RESEARCH SOCIETY  
Advancing materials. Improving the quality of life.



## DESIGN OF A BIOMATERIAL BASED ON DNA IMMOBILIZATION BY THE SOL-GEL METHOD

Elani Cabrera Vega<sup>1</sup>, Marcela Hurtado y de la Peña<sup>1</sup>, Georgina Alarcón Ángeles<sup>1</sup>, Martín Gómez Hernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas biológicos, Mexico.

Immobilized deoxyribonucleic acid (DNA) can be used as a biorecognition agent for the identification of bioactive molecules in the pharmaceutical field; considering that DNA is a biological target for many antibiotics, antivirals and antineoplastic drugs. DNA is also employed for the evaluation of genotoxic and carcinogenic effects of various molecular agents. Different immobilization methods of biomolecules have been explored and include: organic, polymeric and inorganic supports. However, many of these methods can not be applied to all biomolecules, since non-specific interactions between them and the support material produce a denaturation of the biomolecule affecting its biological activity. An alternative for the design of biomaterials with nucleic acids is their immobilization in inorganic matrices of silicates formed at low temperatures by a method called sol-gel. This method offers the advantage of using an aqueous phase at low temperature and therefore does not compromise the biological activity of this type of biomolecules. In this contribution, a biomaterial was obtained using salmon sperm as a source of DNA, which was further immobilized by the sol-gel method. This biomaterial showed affinity for albendazole sulfoxide (i.e. the primary metabolite of the drug albendazole), which is the cause of embryotoxic and teratogenic effects. The holding capacity of the biomaterial was evaluated by a comparative frontal analysis between albendazole sulfoxide and a control (i.e. caffeine) in both DNA-free gel and DNA-containing biomaterial. No non-specific holding affinity was observed in the DNA-free gel. We anticipate that the use of this type of biomaterials can be implemented to evaluate drugs whose holding affinity patterns facilitate the assesment of *in vitro* studies for the detection of DNA-drug interactions, possible genotoxic effects as in the case of teratogenic metabolites, as well as therapeutic effects of new molecules that act on DNA as the specific biological target.

**Keywords:** DNA, sol-gel, drugs

### Acknowledgment:

This work was supported by the National Council for Science and Technology (CONACYT) and the Metropolitan Autonomous University- Campus Xochimilco (UAM), department of biological systems.

**Presenting author's email:** elanijulissa@gmail.com



August 2018

**TO WHOM IT MAY CONCERN**  
P r e s e n t

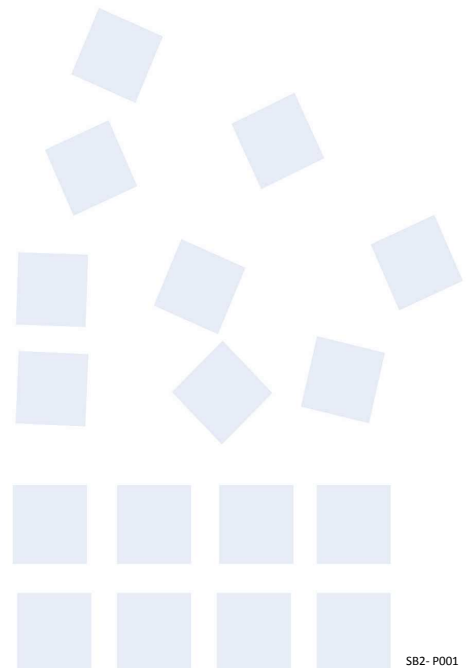
This is to certify that *Elani Cabrera Vega, Marcela Hurtado y de la Peña, Georgina Alarcón Ángeles, Martín Gómez Hernández* presented the contribution: **DESIGN OF A BIOMATERIAL BASED ON DNA IMMOBILIZATION BY THE SOL-GEL METHOD** as **Poster** modality, in the Micro and Nanoscale Biomaterials Symposium at the XXVII International Materials Research Congress held in Cancun, Mexico from August 19th to 24th, 2018.

Sincerely,

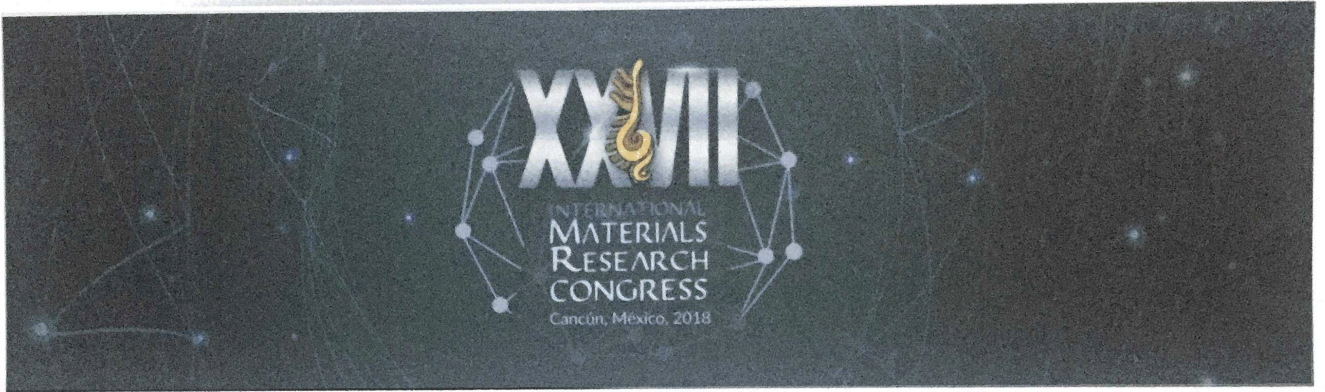


Sociedad Mexicana  
de Materiales A.C.

*Claudia Gutiérrez-Wing*  
President



SB2-P001



This Certificate is hereby awarded to:

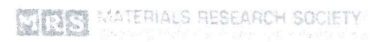
**Elani Cabrera Vega**

For obtaining the **THIRD PLACE** in the poster session on Monday August 20th  
with the abstract entitled:

**DESIGN OF A BIOMATERIAL BASED ON DNA IMMOBILIZATION  
BY THE SOL-GEL METHOD**

During the XXVII International Materials Research Congress

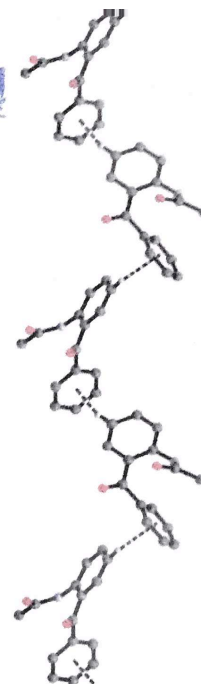
Claudia Gutiérrez-Wing  
President (2017-2018)



# IV

**SIMPOSIO  
MEXICANO de  
QUÍMICA SUPRAMOLECULAR**

COLIMA 15—17 - AGOSTO - 2018



La RED TEMÁTICA de QUÍMICA SUPRAMOLECULAR  
otorga la presente

# CONSTANCIA

a

ELANI CABRERA VEGA, MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA Y GEORGINA ALARCÓN  
ÁNGELES

por la presentación del trabajo libre en modalidad ORAL , titulado:

DISEÑO DE UN BIOMATERIAL BASADO EN LA INMOVILIZACIÓN DE ADN POR LA TÉCNICA DE  
SOL-GEL

como parte de la actividades del IV SIMPOSIO MEXICANO DE QUÍMICA SUPRAMOLECULAR  
realizado del 15 al 17 de agosto de 2018 en la ciudad de Colima, México.

Dra. Rosa Elena Navarro Gautrin  
Responsable técnico  
Red Temática de Química Supramolecular

Dr. Francisco Javier Barragán Vázquez  
Director  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad de Colima



UNIVERSIDAD  
DE COLIMA  
FACULTAD DE  
CIENCIAS QUÍMICAS

Dr. Francisco Javier Martínez Martínez  
Coordinador IV SMQS  
Universidad de Colima