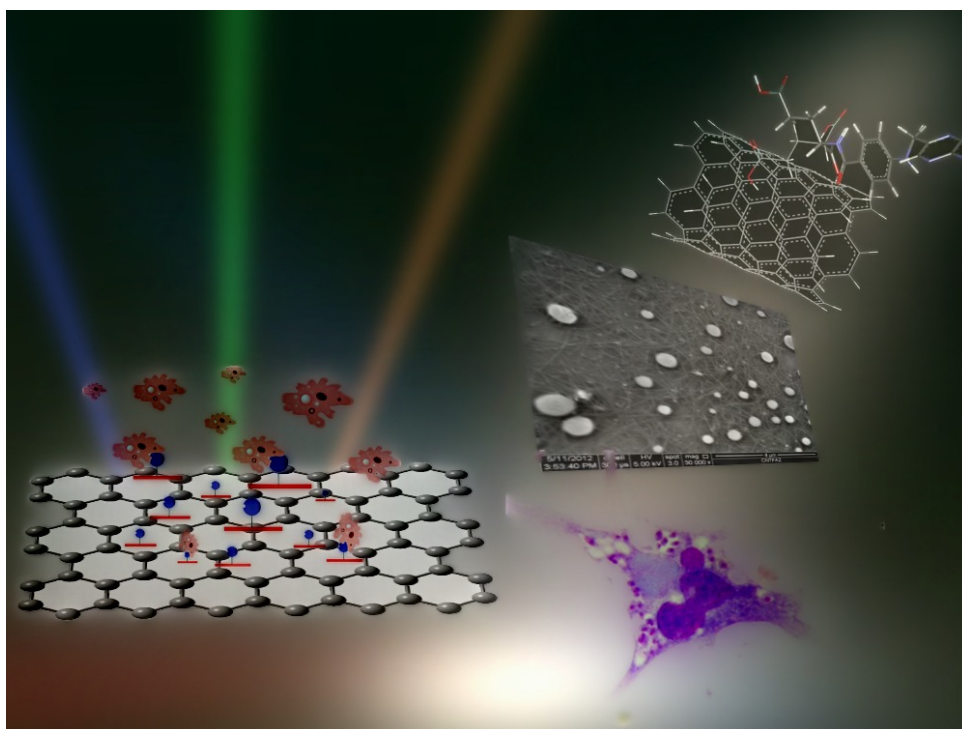


DISEÑO Y PREPARACIÓN DE NANOCOMPUESTOS FUNCIONALIZADOS CON ÁCIDO FÓLICO Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS



JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN

Qco.

Escuela de Química

Universidad Industrial de Santander

2012

**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE NANOCOMPUESTOS FUNCIONALIZADOS
CON ÁCIDO FÓLICO Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS**

JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN
(Químico)

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Facultad de Ciencias-Escuela de Química
Postgrado en Química-Doctorado en Química
Bucaramanga, 2012

**DISEÑO Y PREPARACIÓN DE NANOCOMPUESTOS FUNCIONALIZADOS
CON ÁCIDO FÓLICO Y SUS APLICACIONES BIOMÉDICAS**

JOHN JAIRO CASTILLO LEÓN
(Químico)

Tesis de grado como requisito para optar el título de:

DOCTOR EN QUÍMICA

Director:

Fernando Martínez Ortega, Ph.D.

Codirectores:

Patricia Escobar Rivero, Ph.D.

Edgar A. Páez Mozo, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Facultad de Ciencias-Escuela de Química
Postgrado en Química-Doctorado en Química
Bucaramanga, 2012

Agradecimientos

A **Dios**, a la vida y a la naturaleza.

A mis padres **Jaime y Nelly** por todo su apoyo, incondicionalidad y por su ejemplo de amor a la familia y a la vida.

A mi esposa **Silvia** por la paciencia, amor y compañía durante estos 5 años.

A mi hermano **Jaime** por su ejemplo de lucha y sacrificio por lo que se quiere y por su hospitalidad durante mi estancia en Dinamarca y Suecia.

A mi hermana **Pilar** por su apoyo incondicional.

A mis seis hermosos sobrinos: **Sebastian, Dana, Sarita, Dani, Sofi y Silvana**.

A **Ana** por su calor de hogar y hospitalidad en Lund, Suecia.

A la familia **Rizo Vivas** y a mí ahijado **Sebas**.

Agradecimiento al profesor **Fernando Martínez** por darme la oportunidad de trabajar en el CICAT y realizar esta tesis doctoral.

A la profesora **Patricia Escobar** por todas sus enseñanzas y aportes tanto científicos como personales.

Agradecimiento especial al profesor **Edgar Páez**, quien fue el gestor y el que colocó la primera piedra para construir este trabajo.

Al Profesor **Daniel Molina** y a **Mary H. Torres** por la toma de espectros de RMN.

A los profesores **Enrique Mejía** y **Rafael Cabanzo** por sus ideas y aportes.

A **Ciro E. Roza** por los cálculos computacionales.

A **Linda Bertel** por su colaboración en los experimentos de irradiación.

A la profesora **Winnie Svendsen** y su grupo NaBIS del departamento de micro y nanotecnología de la Universidad Técnica de Dinamarca.

*Agradecimiento a la profesora **Noemi Rozlosnik** y al Dr. **Tomas Rindzevicius** del grupo de micro y nanotecnología de la Universidad Técnica de Dinamarca por los análisis AFM y espectros Raman.*

*A las compañeras del CINTROP por los experimentos biológicos: **Viviana, Bety, Sandra, y Aracelly.***

A los profesores y directivos de la facultad de ciencias básicas de la Universidad de Santander.

*A todos los amigos y compañeros de postgrado en química que me acompañaron durante este largo proceso: **Oveimar, Ciro, Nelson, Andres, Nando, Diego, Andelfo, Camila, Pilar, Laura y Arnold.***

Agradecimiento especial a COLCIENCIAS por su programa de apoyo a Doctorados Nacionales 2008 y por el proyecto de investigación 1102-459-21468.

A la Universidad Industrial de Santander por la beca de sostenimiento durante el 2 semestre del año 2011.

Dedicado a:

*Mi esposa **Silvia Carolina.***

Tabla de Contenido

Introducción	24
Capítulo 1. Marco de referencia y estado del arte	31
1.1. Nanotecnología	31
1.2. Nanotubos de carbono	32
1.2.1. Estructura de NTC	33
1.2.2. Síntesis de NTC	35
1.2.3. Funcionalización de NTC	35
1.2.4. Caracterización de NTC	38
1.2.5. Propiedades ópticas de NTC	38
1.2.6. Estructura electrónica	38
1.2.7. Aplicaciones biomédicas	39
1.3. Nanotubos de péptido	47
1.3.1. Síntesis de NTP	47
1.3.2. Funcionalización de NTP	49
1.3.3. Caracterización de NTP	49
1.3.4. Aplicaciones	50
1.4. Ácido fólico	54
1.4.1. Generalidades	54
1.5. Tratamientos contra la leishmaniasis	56
1.5.1. Nanotecnología aplicada al tratamiento contra la leishmaniasis	57
1.6. Bibliografía	60
 Capítulo 2. Síntesis, preparación y caracterización de nanotubos de carbono y nanotubos de péptido con ácido fólico	 71
2.1. Introducción	72
2.2. Parte experimental	73
2.2.1. Lista de reactivos	73
2.2.2. Funcionalización de NTC con AF	74
2.2.2.1. Funcionalización covalente de NTC con AF	74
2.2.2.2. Funcionalización no covalente de NTC con AF	75

2.2.3.	Caracterización espectroscópica de NTC-AF	76
2.2.4.	Determinación del potencial z de dispersiones NTC-AF	76
2.2.5.	Caracterización microscópica de NTC-AF	77
2.2.6.	Síntesis de NTP funcionalizados con AF	77
2.2.6.1.	Síntesis de NTP	77
2.2.6.2.	Funcionalización de NTP con AF	77
2.2.6.3.	Funcionalización de NTP con AF y NHS-atto 532	78
2.2.7.	Caracterización espectroscópica de NTP y NTP-AF	79
2.2.8.	Caracterización microscópica de NTP y NTP-AF	79
2.3.	Resultados y discusión	81
2.3.1.	Estudio de la dispersión de los NTC en soluciones acuosas de quitosano	81
2.3.2.	Análisis de la fluorescencia del quitosano por NTC	82
2.3.3.	Análisis Raman de dispersiones de NTC en quitosano	83
2.3.4.	Análisis de NTC-quitosano por AFM	84
2.3.5.	Análisis UV-Vis de los NTC funcionalizados con el AF	87
2.3.6.	Estudio por fluorescencia de los NTC-AF	88
2.3.7.	Estudio Raman de los NTC-AF	88
2.3.8.	El estudio de coeficiente de difusión por RMN de NTC y los NTC-AF permitió la caracterización de la unión del AF a los NTC	93
2.3.9.	Los NTC-AF fueron estables a pHs fisiológicos	97
2.3.10.	La microscopia SEM evidencio la unión NTC-AF	98
2.3.11.	Las imágenes de AFM mostraron al AF cubriendo las paredes de los NTC	101
2.3.12.	Funcionalización de NTP con AF	105
2.3.12.1.	La espectroscopia UV-Vis mostró la formación NTP-AF	105
2.3.12.2.	La espectroscopia Raman evidenció la funcionalización de los NTP con el AF	106
2.3.12.2.1.	Ampliación del efecto Raman de NTP-AF	109
2.3.12.3.	Los NTP presentaron fluorescencia en presencia	

del AF	113
2.3.12.4. La microscopia SEM comprobó la unión de NTP-AF	116
2.3.12.5. La presencia de defectos superficiales sobre los NTP-AF fue evidenciada por AFM	117
2.4. Conclusiones	120
2.5. Bibliografía	123
Capítulo 3. Fotoactivación y actividad <i>in vitro</i> de nanotubos de carbono-ácido fólico	125
3.1. Introducción	126
3.2. Parte experimental	130
3.2.1. Parásitos y células	130
3.2.2. Compuestos	130
3.2.3. Sistema de irradiación	131
3.2.4. Calentamiento de los NTC-AF en sistemas acuosos sin células	131
3.2.5. Ensayos de internalización	131
3.2.6. Ensayos de toxicidad	132
3.2.6.1. Ensayos de toxicidad en células de mamífero sin irradiar	132
3.2.6.2. Ensayos de toxicidad en células de mamífero irradiadas	133
3.2.6.3. Ensayos de toxicidad en amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i>	133
3.3. Resultados y discusión	134
3.3.1. Los NTC-AF presentaron en efecto térmico en presencia de un haz de luz láser de 808 nm	134
3.3.2. Actividad <i>in vitro</i> de NTC-AF	138
3.3.2.1. Los NTC-AF no fueron tóxicos en células de mamíferos	138
3.3.2.2. Los NTC-AF fueron internalizados por células THP-1	139
3.3.2.2.1. Resultados con inmunofluorescencia	139
3.3.2.2.2. Resultados con microscopia óptica	141
3.3.2.3. Actividad fotóxica de NTC-AF en amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i>	147
3.4. Conclusiones	148
3.5. Bibliografía	150

Capítulo 4. Construcción de un biosensor nanotubo de péptido-ácido fólico para detección de células cancerígenas	153
4.1. Introducción	154
4.2. Parte experimental	155
4.2.1. Preparación electrodos modificados con NTP-AF	156
4.2.2. Modificación de electrodos de carbono y grafeno	156
4.2.3. Modificación de electrodos de oro	157
4.2.4. Caracterización microscópica de los electrodos modificados con NTP-AF	157
4.2.5. Caracterización electroquímica de los electrodos no modificados	157
4.2.6. Caracterización electroquímica de los electrodos modificados con NTP y NTP-AF	158
4.2.7. Detección de receptores de folato	158
4.2.8. Detección de células HeLa	159
4.3. Resultados y discusión	160
4.3.1. El conjugado NTP-AF fue adsorbido sobre la superficie de los electrodos	160
4.3.2. Los NTP-AF exhibieron excelentes propiedades electroquímicas	162
4.3.3. El biosensor fue sensible a diferentes concentraciones de receptores de folato	169
4.3.3.1. El biosensor NTP-AF fue selectivo hacia receptores de folato	173
4.3.4. Estudio en el comportamiento en la intensidad de corriente del biosensor NTP-AF en presencia de células cancerígenas HeLa	174
4.4. Conclusiones	179
4.5. Bibliografía	180
Recomendaciones generales	182
Anexos	183

Lista de Figuras

1. Escala del tamaño de objetos nano y microscópicos	31
2. Vitrales y la copa de Licurgo formados por nanopartículas de oro y de plata	32
3. Formas alotrópicas del carbono: grafito y diamante Estructura química del AF	33
4. Modelo de la hoja de grafeno que explica la formación de los NTC	34
5. Modelos moleculares de NTC con diferentes quiralidades	34
6. NTC según el número de capas	35
7. A) NTC en una solución acuosa de AF (5 mM) antes de sonicación, B) NTC-AF luego de sonicación	36
8. Metodologías de funcionalización de NTC	36
9. Singularidades de van Hove	39
10. Incorporación de carboplatina en NTC	42
11. Evolución del tratamiento de un tumor cancerígeno en ratones tratados con NTC y luz IR cercano	44
12. Estructura energética más estable de la difenilalanina	48
13. Mecanismo de formación de NTP	48
14. Estructura química del AF	54
15. Funcionalización covalente de NTC-AF	74
16. Funcionalización no covalente de NTC-AF	76
17. Síntesis de NTP funcionalizados con AF	79
18. Nanotubos de carbono antes (a) y después de la solubilización en quitosano (b)	81
19. Espectro UV-vis de NTC-quitosano	82
20. Espectro de emisión del quitosano y del quitosano conjugado a NTC	83
21. Espectro Raman de (a) nanotubos de carbono y (b) nanotubos de carbono-quitosano	84
22. Esquema del funcionamiento de la AFM	85
23. AFM imágenes de una dispersión de NTC-quitosano	86
24. Espectro UV-vis NTC-AF	87
25. Espectros de emisión de AF libre y conjugado a los NTC (λ_{exc} = 364 nm)	88
26. Espectros Raman de NTC utilizando dos láseres a 785 nm y 532 nm	89
27. Modos vibracionales característicos de NTC	90
28. Comparación de los RBM de NTC y NTC-AF	91

29. Espectros Raman de NTC y NTC-AF	92
30. Espectro 2D DOSY para cuatro especies	94
31. Espectros de RMN: a) carbodiimida (EDC), b) AF, c) quitosano y d) NTC-AF	95
32. Espectros 2D DOSY de a) AF y b) NTC-AF	96
33. Potencial zeta de dispersiones de NTC-AF a diferentes valores de pH	97
34. (a) Imagen SEM de NTC sin funcionalizar y (b) espectro EDX	98
35. (a) Imagen SEM de NTC-AF y (b) espectro EDX	100
36. Imagen SEM de NTC-AF presentes como nanotubos individuales	101
37. Imagen AFM de NTC-AF y líneas de perfil topológico para varios NTC-AF	102
38. Imagen AFM en 3D de NTC-AF	103
39. Imagen AFM de NTC-AF	103
40. Imagen ampliada AFM de NTC-AF y líneas de perfil topológico para un NTC recubierto por diferentes cantidades de AF	105
41. Imagen AFM 3D del NTC-AF	105
42. Espectro UV-vis de NTP funcionalizados con AF	105
43. Comparación de espectros Raman de NTP a 785 nm y de excitación (10 mW)	108
44. Comparación de espectros Raman de NTP-AF, AF y NTP	109
45. Imágenes SEM de superficies modificadas con nanopartículas de oro utilizadas en los experimentos SERS	111
46. Comparación de espectros Raman del AF (normal, línea azul) y del AF SERS (línea rosa) a 785 nm de excitación	112
47. Modos vibracionales del AF utilizando la técnica SERS	113
48. Espectros Raman SERS del NTP-AF	113
49. Imágenes de microscopia óptica de NTP antes y después de funcionalizar con AF	114
50. Imágenes de microscopia de fluorescencia de (a-c) NTP-AF filtro DAPI, (d) NTP filtro DAPI	115
51. Imágenes de microscopia de fluorescencia de (a) NTP-AF, (b) NTP-AF y (c) NTP-AF filtro Texas Red (TR)	116
52. Imágenes de microscopia SEM de (a) NTP, (b) NTP funcionalizados con AF	116

53. Imagen AFM de un NTP y la correspondiente línea de perfil topológico	117
54. Imagen AFM de un NTP-AF y la correspondiente línea de perfil topológico	118
55. Comparación de la estructura 3D de un NTP y un NTP funcionalizado con AF	119
56. Esquema de la síntesis de NTC-AmB	128
57. Sistema diodo laser para experimentos de fotoactivación de NTC	131
58. Dispositivo de calentamiento de dispersiones NTC-AF por medio de un diodo laser de 808 nm	134
59. Curvas de calentamiento de NTC-AF utilizando un diodo laser de 808 nm a tres potencias diferentes (200, 400 y 600 mW)	135
60. Curva de calentamiento de una solución de NTC-AF 0.5 mg/mL utilizando un diodo laser de 808 nm (600 mW)	136
61. Curva 3D de calentamiento de tres soluciones acuosas de NTC-FA	137
62. Calentamiento de agua sin la presencia de NTC-AF a una potencia de 600 mW	137
63. Internalización de NTC-AF en células THP-1 (microscopia fluorescente)	140
64. Porcentajes de internalización de NTC-AF en células THP-1	141
65. Internalización de NTC-AF en células THP-1 (microscopia óptica)	142
66. Internalización de NTC-AF en células THP-1 infectadas por <i>Leishmania</i>	142
67. Montaje utilizado para irradiación de células con NTC-AF	144
68. Irradiación láser de NTC-AF en amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i>	146
69. Características del electrodo serigrafiado	155
70. Modificación de electrodos de oro con NTP-AF	156
71. Montaje utilizado para las mediciones electroquímicas	157
72. Imágenes de microscopia óptica de (a-c) electrodos de carbono, grafeno y oro sin modificar, (d-f) electrodos carbono, grafeno y oro modificados con NTP, NTP-AF y (g-i) electrodos modificados con NTP-AF	158
73. Imágenes de microscopia fluorescentes de (a) electrodos de carbono/NTP-AF	159
74. Imágenes de microscopia SEM de electrodos de grafeno, electrodos de grafeno/NTP y electrodos de grafeno-NTP-AF	160
75. Ejemplo de un voltamograma cíclico	161

76. Electroodos modificados con NTP y NTP-AF: (a, b) grafeno, (c,d) carbono y (e) oro	162
77. VCs de electrodos de oro, carbono y grafeno sin modificar	163
78. VCs de electrodos de oro, carbono y grafeno sin modificar y modificados con NTP	164
79. Comparación de VCs de electrodos sin modificar y modificados con NTP y NTP-AF	167
80. VCs de electrodos modificados con NTP y NTP-AF luego de 24 horas de preparación	169
81. VCs de electrodos de grafeno NTP-AF a diferentes concentraciones de soluciones de RF	170
82. Gráfica de corriente contra concentración de RF	172
83. Curva de calibración corriente vs RF	172
84. Selectividad del biosensor NTP-AF	173
85. Imagen microscopia óptica de células HeLa	175
86. (a) VCs de electrodos de grafeno NTP-AF a diferentes concentraciones de soluciones de células HeLa, (b) curva de calibración corriente contra concentración de células HeLa	176
87. VCs de electrodos de grafeno NTP-AF para diferentes tiempos de inmersión	177
88. Disminución de la intensidad de corriente variando el tiempo de inmersión de los electrodos de grafeno NTP-AF	177

Lista de Tablas

1. Metodologías covalentes para funcionalizar NTC	38
2. Entrega controlada de fármacos por NTC	40
3. Ablación térmica de NTC bajo la acción de radiación del IR cercano	45
4. Estudios tóxicos de NTC solubilizados y funcionalizados con diferentes agentes dispersantes	46
5. Caracterización de NTP por microscopia	49
6. Aplicaciones biológicas de NTP	50
7. Biosensores basados en NTP	52
8. Sistemas de detección de células HeLa	53
9. Conjugados de AF en la detección y tratamiento en células cancerígenas	55
10. Tratamientos actuales usados contra la leishmaniasis cutánea	56
11. Tratamientos para leishmaniasis basados en nanoestructuras	58
12. Lista de reactivos empleados	73
13. Cálculo de la relación de intensidades de las bandas G y D para NTC y NTC-AF	92
14. Asignación de las vibraciones Raman más importantes de NTP utilizando dos láseres de excitación: 785 nm y 532 nm	107
15. Modos vibracionales del AF	112
16. Tratamientos fisicoquímicos evaluados como terapia contra leishmaniasis	126
17. Actividad del conjugado NTC-AF sobre células THP-1 por el método MTT	138
18. Actividad fototóxica del conjugado NTC-AF sobre células infectadas con amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i> irradiados durante 10 minutos	144
19. Valores de las corrientes para los electrodos de oro, carbono y grafeno sin modificar y modificados con NTP y NTP-AF	167

Lista de Anexos

Anexo A. Modelo computacional de la interacción nanotubo de carbono- Ácido fólico	184
Anexo B. Publicaciones	189

Resumen

Título:

Diseño y preparación de nanocompuestos funcionalizados con ácido fólico y sus aplicaciones biomédicas*.

Autor:

John Jairo Castillo León[‡]

Palabras claves:

Nanotubos de carbono, nanotubos de péptido, ácido fólico, funcionalización, leishmaniasis, biosensor.

Descripción:

La preparación de nanocompuestos funcionalizados con biomoléculas ha permitido su aplicación en la entrega de fármacos, detección y diagnóstico de enfermedades. En este trabajo se prepararon y caracterizaron nanotubos de carbono (NTC) y de péptido (NTP) funcionalizados con ácido fólico (AF) para: 1) el estudio de la actividad *in vitro* en células infectadas con *Leishmania panamensis* irradiadas con un láser infrarrojo cercano (IRC) y 2) la construcción de un biosensor electroquímico para la detección de células cancerígenas HeLa. Los nanotubos-AF fueron preparados por funcionalización covalente y no covalente y la unión nanotubo-AF se evidenció por métodos espectroscópicos (ultravioleta-visible (UV-Vis), fluorescencia, 2D-DOSY Espectroscopia Bidimensional de Difusión Ordenada (RMN) y Raman) y microscópicos (fluorescencia, Microscopia Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)). La internalización celular y la actividad antiparasitaria y citotóxica de los NTC-AF se determinó en células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. panamensis* antes y después de irradiación con IRC. El biosensor para la detección de células HeLa se construyó acoplado el NTP-AF a un electrodo de grafeno.

Los conjugados obtenidos presentaron: estabilidad química, alta solubilidad, baja toxicidad y presentaron tamaños nanométricos de 2000 a 50 nm. Los NTC-AF alcanzaron una temperatura máxima de 44°C después de irradiarlos con IRC. Fueron internalizados por las células THP-1 (infectadas y no infectadas). El tratamiento de NTC-AF seguido de irradiación con IRC mostró baja o nula toxicidad.

El electrodo de grafeno/NTP-AF registró un valor de corriente de 444 μ A. Registró un nivel mínimo de detección de 250 células HeLa/mL para las células cancerígenas. Experimentos control mostraron la selectividad del biosensor los RF.

Los nanotubos-AF fueron utilizados en la exploración de nuevas aplicaciones biomédicas, principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas como la leishmaniasis y en el desarrollo de un biosensor electroquímico de células cancerígenas.

*Tesis doctoral

[‡]Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Fernando Martínez O., Patricia Escobar R., Edgar A. Páez Mozo.

Abstract

Title:

Design and preparation of nanostructures functionalized with folic acid and biomedical applications^{*}.

Author:

John Jairo Castillo León[‡]

Keywords:

Carbon nanotubes, peptide nanotubes, folic acid, functionalization, leishmaniasis, biosensor.

Description:

Functionalization of nanostructures with biomolecules has allowed their use in a broad range of biomedical applications as: drug delivery, diagnostics and therapies of many diseases. In this work carbon nanotubes (CNT) and peptide nanotubes (PNT) functionalized with folic acid (FA) were prepared for the study of *in vitro* activity against cells infected with *Leishmania panamensis* irradiated with near infrared light (NIR) and for the construction of a biosensor for detection of HeLa cells. Nanotubes-FA were prepared by covalent and noncovalent methodologies and it was evidenced through spectroscopic (ultraviolet-visible (UV-Vis), fluorescence, 2D-DOSY NMR and Raman) and microscopic techniques (fluorescence, SEM, AFM). Photothermic effect of CNT-FA was studied measuring temperature (°C) after irradiation with NIR. Cell internalization, antiparasitic and cytotoxic effect of CNT-FA was measured in THP-1 cells non infected and infected with *L. panamensis* before and after irradiation with NIR. The biosensor for cancer cell detection was prepared through the integration of PNT-FA in a graphene electrode.

Nanotubes-FA showed: chemical stability, solubility, low toxicity and micro and nanometric size (2000-50 nm). CNT-FA reached a temperature of 44°C after irradiation with NIR. CNT-FA were internalized by THP-1 cells (infected and non infected) and showed an internalization percentage of 60% after 72 h of incubation. CNT-FA showed low values of toxicity below of 39% and low inhibition percentages below 22%. Nanotubes-FA were no toxic at dark conditions.

Graphene electrode and graphene electrode/PNT-FA showed signal currents of 444 μ A and 138 μ A respectively. Biosensor showed a low limit of 250 HeLa cells/mL for cancer cells. Control experiments showed selectivity towards HeLa cells and FR.

Functionalized nanotubes with FA were used in the exploration of new biomedical applications, mainly in the therapy of infectious diseases as leishmaniasis and in the construction of a biosensor for cancer cells.

^{*} Doctoral thesis

[‡] Science Faculty. School of Chemistry. Directors: Fernando Martínez O., Patricia Escobar R., Edgar A. Páez Mozo.

Lista de Abreviaturas

NTC	Nanotubos de carbono
NTP	Nanotubos de péptido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido fólico
HeLa	Células de carcinoma cervical
IR CERCANO	Infrarrojo cercano
NTC-AF	Nanotubo de carbono acoplado a ácido fólico
NTP-AF	Nanotubo de péptido acoplado a ácido fólico
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visible
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
2D-DOSY	Espectroscopia bidimensional de difusión ordenada
AFM	Microscopia de fuerza atómica
SEM	Microscopia de barrido electrónico
VC	Voltametría cíclica
RF	Receptores de folato
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad
NTCCM	Nanotubos de carbono de capa múltiple
NTCCU	Nanotubos de carbono de capa única
DCV	Deposición catalítica en fase vapor
TEM	Microscopia de transmisión electrónica
HiPco	Alta presión con monóxido de carbono
ATG	Análisis termogravimétrico
1D	Unidimensional
DEE	Densidad de estados electrónicos
vHs	Singularidad de van Hove
ZF	Zona de plegado
ALA	Alginato-poli-L-lisina-alginato

PEG	Polietilenglicol
HER	Factor de crecimiento epitelial
NADPH	Dinucleótido adenina nicotinamida fosfato oxidasa
HFIP	Hexafluoropropanol
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
AmB	Anfotericina B
THP-1	Células de leucemia monocítica aguda
EDC	Carbodiimida
Kd	Constante de disociación
FF	Difenilalanina
kHz	kilohertzio
RBM	Modos de respiración radial
CD	Coeficiente de difusión
PZ	Potencial zeta
EDX	Detector de fluorescencia de rayos x
eV	Electrón-voltios
SERS	Espectroscopia resonante superficial Raman amplificada
TC	Transferencia de carga
TR	Texas red
3D	Tridimensional
SBFi	Suero bovino fetal inactivado
PMA	Forbolmiristato acetato
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazon-2-il)-2-difeniltetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido
OD	Densidad óptica
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración inhibitoria 90
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50

CC ₉₀	Concentración citotóxica 90
MCF-7	Células de cáncer de seno
MSTO-211H	Células de mesotelioma de pulmón humano
HEK	Células de riñón humano
ASE	Área superficial específica
CHO	Células de cáncer de ovario
FT1	Transportador de folato
BT1	Transportador de biopterinas
PC3	Células de cáncer de próstata
HSP	Proteínas de choque térmico
kDa	Kilodaltons
SPEs	Electrodos serigrafiados
PBS	Buffer salino fosfato
rpm	revoluciones por minuto
ipa	Corriente de pico anódico
ipc	Corriente de pico catódico
Ea	Potencial anódico
Ec	Potencial catódico
Glu	Ácido glutámico
PABA	para-amino benzoico
ET	Electrodo de trabajo
ER	Electrodo de referencia
LC	Leishmaniasis cutánea
RF	Receptores de folato

Introducción

La nanotecnología ha permitido el desarrollo de nuevos materiales cuyo uso en medicina han generado tratamientos alternativos a las enfermedades así como la detección de las mismas, logrando centrar la atención de la comunidad científica en los últimos 20 años debido al alcance y a las múltiples aplicaciones alcanzadas principalmente en el campo de la biomedicina.

Los nanotubos poseen características estructurales únicas, por ejemplo los nanotubos de carbono (NTC) y los nanotubos de péptidos (NTP) son estructuras cilíndricas de tamaño nanométrico formadas exclusivamente por átomos de carbono y por aminoácidos respectivamente. Uno de los requisitos fundamentales para lograr la aplicación de los nanotubos es la posibilidad de ser modificados químicamente en un proceso conocido como funcionalización. La funcionalización con biomoléculas (ADN, anticuerpos, proteínas, péptidos y enzimas) de las nanopartículas como los nanotubos de carbono, nanopartículas de oro y plata, nanopartículas poliméricas, liposomas y nanotubos biológicos han permitido aumentar el número de aplicaciones biomédicas. Entre las más importantes se tienen: la entrega controlada de fármacos, diagnóstico y detección de enfermedades y la terapia fotodinámica.

El ácido fólico (AF) es una de las biomoléculas más utilizadas en aplicaciones biomédicas, además es una molécula de vital importancia en la síntesis del ADN y es un suplemento vitamínico que ayuda a las mujeres en estado de embarazo a prevenir defectos congénitos en los recién nacidos. Ha sido utilizada como blanco estratégico en la detección, diagnóstico y tratamiento en enfermedades como el cáncer. Sin embargo, sus aplicaciones se han limitado precisamente al tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Son pocos los estudios relacionados con la utilización de NTC y NTP funcionalizados con AF para el tratamiento de otro tipo enfermedades como la leishmaniasis y menos común, estudios relacionados con la detección de células cancerígenas utilizando nanotubos biológicos funcionalizados con AF.

Esta tesis doctoral está enmarcada dentro de un proyecto financiado por Colciencias (1102-459-21468) y por la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) ([FTP 271-08-0968](#)). El proyecto estaba enfocado en la búsqueda de una alternativa al tratamiento de la

leishmaniasis y a la búsqueda de nuevas aplicaciones en el campo de la biomedicina por medio de la utilización de nanotubos de carbono y nanotubos biológicos funcionalizados con ácido fólico.

El aporte de éste trabajo doctoral fue el desarrollo de procedimientos que permiten la funcionalización con AF de los NTC y NTP generando nuevos nanocompuestos. La caracterización de los nanotubos funcionalizados por diferentes técnicas analíticas y microscópicas y la exploración de nuevas aplicaciones biomédicas, principalmente en el tratamiento de enfermedades infecciosas como la leishmaniasis y en el desarrollo de un sistema de detección electroquímico de células cancerígenas. El desarrollo de estos nuevos nanocompuestos funcionalizados abre nuevas posibilidades para el desarrollo de tratamientos alternativos a los tradicionales y sistemas de detección tanto en enfermedades infecciosas como en el cáncer.

▪ **Objetivo de la tesis**

El objetivo general de esta tesis fue preparar, funcionalizar y caracterizar nanotubos de carbono (NTC) y de péptidos (NTP) funcionalizados con AF para dos tipos de aplicaciones biomédicas específicas: (a) actividad *in vitro* de NTC-AF irradiados con láser del infrarrojo cercano en células infectadas con el parásito de la *Leishmania panamensis* y (b) detección de células cancerígenas HeLa utilizando NTP-AF.

Para alcanzar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- ✚ Evaluar procedimientos de funcionalización de los nanotubos NTC y NTP con el ácido fólico.
- ✚ Caracterizar espectroscópicamente y microscópicamente los NTC y los NTP funcionalizados con ácido fólico.
- ✚ Evaluar el efecto de la radiación infrarroja cercana sobre los NTC funcionalizados con ácido fólico
- ✚ Estudiar la internalización y la fototoxicidad de los NTC funcionalizados en macrófagos infectados y no infectados con *Leishmania panamensis*.
- ✚ Construir y caracterizar electroquímicamente un biosensor de NTP-FA para la detección de células HeLa.

Para lograr los objetivos se seleccionaron, por una parte (1) los NTC debido a su tamaño nano, sus propiedades ópticas y a la posibilidad de ser funcionalizado con biomoléculas pueden facilitar su ingreso en las células y con la ayuda de radiaciones electromagnéticas inocuas (IR cercano) generar un efecto fototóxico y así eliminar selectivamente a las células infectadas con el parásito de la *Leishmania*. Por otra parte (2) los NTP, son estructuras biológicas auto-ensambladas espontáneamente, dado a su tamaño micro y nanométrico y a su funcionalización con AF tienen la posibilidad de ser incorporados en elementos transductores para la construcción de biosensores. El aprovechamiento de la interacción AF-receptor de folato fue utilizada para generar un sistema de detección electroquímico, económico y de rápida respuesta en la detección de células cancerígenas del tipo HeLa.

- **Pregunta de investigación**

La investigación realizada fue motivada para buscar respuesta a las siguientes preguntas: Pueden los NTC-AF producir la muerte selectiva mediante su interacción con la radiación IR cercano de células infectadas con la *Leishmania*. Y pueden los NTP-AF ser incorporados como elemento biológico de un biosensor para la detección selectiva de células HeLa?

- **Hipótesis**

Los NTC-AF ingresan selectivamente en células infectadas con *L. panamensis* y eliminan amastigotes intracelulares luego de su activación con IR cercano.

Los NTP-AF son incorporados en un biosensor como elementos de reconocimiento biológico para la detección selectiva de receptores de folato presentes en células HeLa.

- **Resumen de la tesis**

Los resultados del trabajo de investigación se presentan en 4 capítulos que incluyen la siguiente información:

- o **Capítulo 1**

Aquí se hace una breve revisión del estado del arte y los conceptos teóricos involucrados en la síntesis, funcionalización y aplicaciones biomédicas de los NTC y los NTP.

o Capítulo 2

Este capítulo se describe la preparación y métodos empleados en la síntesis, funcionalización y caracterización de los nanocompuestos. Para la caracterización espectroscópica se usaron los equipos de UV-vis, fluorescencia, Raman, 2D DOSY-RMN, potencial zeta. Se presentan los resultados y la discusión de la preparación y caracterización de los nanotubos-AF mediante estrategias de funcionalización covalente y no covalente. La unión específica se evidenció por medio de UV-vis, Raman, fluorescencia y se utilizó la técnica bidimensional de RMN conocida como 2D-DOSY. A nivel estructural las técnicas microscópicas como la AFM, SEM y microscopia fluorescente mostraron el enlazamiento del AF a la superficie de los nanotubos.

Capítulo 3

Se indican los experimentos de la fotoactivación de los NTC-AF y su posterior actividad *in vitro* en células infectadas con el parásito de la *Leishmania panamensis*. La fotoactivación de los NTC fue evidenciada mediante un aumento de la temperatura de la dispersión NTC-AF luego de ser irradiada con un láser IR cercano 808 nm. Los NTC-AF ingresaron y se internalizaron en las células infectadas y la irradiación con el láser produjo una leve disminución en el número de amastigotes intracelulares. Los experimentos biológicos se realizaron en el CINTROP bajo la dirección de la Profesora Patricia Escobar.

o Capítulo 4

Se indica el procedimiento para la construcción de un biosensor mediante la modificación de electrodos de grafeno con el conjugado NTP-AF. Se observó una alta respuesta electroquímica de los electrodos de grafeno/NTP-AF, la cual permitió la detección de receptores de folato (RF) y de células cancerígenas, que sobre expresan este tipo de receptores, principalmente con células del tipo HeLa. La caracterización mediante la voltametría cíclica (VC) mostró la selectividad del biosensor hacia los RF. Estos experimentos se realizaron en los laboratorios del grupo NaBis (Nano Bio Integrated Systems) del departamento de Micro y Nanotecnología de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU) bajo la supervisión de los profesores Winnie Svendsen y Jaime Castillo.

o Anexos

En los anexos se incluye una breve revisión del estado actual del arte de la leishmaniasis. Además contienen un estudio computacional basado en el uso de la técnica DFT, que demuestra la interacción entre los NTC y el AF, este estudio se realizó en colaboración con el MSc en Química Ciro Roza. Además se mencionan los resultados que fueron publicados en diferentes revistas internacionales y nacionales. También se muestran los resultados presentados en los congresos internacionales relacionados con los temas de esta tesis doctoral.

Finalmente, en este trabajo de investigación se lograron realizar dos aportes significativos en el campo de la biomedicina. Primero, la funcionalización de NTC con el AF y la fotoactivación con IR cercano permitió la aplicación por primera vez de este nanoconjugado en el tratamiento de la leishmaniasis. Segundo, este es el primer trabajo que reporta la funcionalización de NTP con AF y su aplicación en biomedicina mediante la construcción de un biosensor para la detección de células cancerígenas del tipo HeLa.

CAPÍTULO I

Marco de Referencia y Estado del Arte

Dado que el objeto de investigación son los NTC y NTP se mostrará inicialmente una revisión general del concepto de la nanotecnología y sus principales campos de aplicación. Con respecto a los NTC y NTP se hará una revisión de los aspectos más importantes como son: síntesis, propiedades y aplicaciones. Posteriormente se abordarán los aspectos generales del AF como molécula estratégica en la funcionalización de los NTC y NTP. Finalmente dado que los nanocompuestos serán evaluados como agente potencial para el tratamiento de la leishmaniasis y como elemento de reconocimiento biológico para la construcción de un biosensor que permita la detección de células cancerígenas, se hará una revisión general de cada uno de estos dos tópicos.

En el estado del arte se mostrarán los avances más significativos en la aplicación de este tipo de nanoestructuras en el tratamiento y/o diagnóstico en leishmaniasis y cáncer así como la ventaja estratégica de la funcionalización con AF.

1. Marco de referencia y estado del arte

1.1. Nanotecnología

La nanotecnología es el proyecto de ciencia e ingeniería que el hombre lleva a cabo para perfeccionar el arte de la fabricación de materiales en la escala de lo muy pequeño (Takeuchi, 2009). El prefijo *nano-* proviene del latín *nanus*, que significa “enano” y actualmente significa una milmillonésima parte de un metro, llamado nanómetro (nm) (1/1 000 000 000). Para tener una idea más clara qué tan pequeño es un nanómetro, se puede imaginar que el diámetro de un cabello mide aproximadamente 75000 nm.

La nanociencia es el estudio de los sistemas cuyo tamaño es de unos nanómetros y es la encargada de comprender su comportamiento a esta escala. La nanotecnología por su parte es un campo de la ciencia que estudia, diseña, manipula y fabrica materiales a escala nanoscópica y les da alguna aplicación práctica (Martin-Palma y col.,2010). En la figura 1 se puede apreciar la escala de tamaños de algunos materiales en el micro y nanomundo.

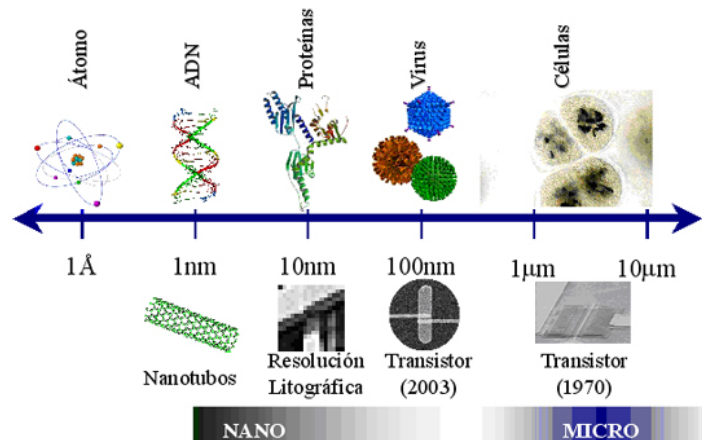


Figura 1. Escala del tamaño de objetos nano y microscópicos.

Las propiedades físicas, químicas y biológicas presentadas por los materiales a escala nanométrica son diferentes de sus propiedades a escala macroscópica (absorción de la luz, tamaño, toxicidad, etc).



Figura 2. Vitrales y la copa de Licurgo formados por nanopartículas de oro y de plata (Qui y col., 2010).

La nanotecnología ha permitido el descubrimiento y fabricación de diferentes tipos de nanopartículas, entre las que se tienen: nanoestructuras de carbono, nanopartículas metálicas y biológicas, puntos y alambres cuánticos, etc (Kim y col., 2010; Scalon y col., 2011).

En este trabajo se hará especial énfasis en los nanotubos de carbono (NTC) y nanotubos biológicos (péptidos) (NTP) debido a que es el objeto de estudio de ésta investigación.

1.2. Nanotubos de carbono

El carbono es un elemento muy abundante e importante en la naturaleza. Tiene la particularidad de existir en diferentes formas alotrópicas debido a su capacidad de hibridación. La hibridación es un fenómeno que consiste en un reacomodo de electrones del mismo nivel de energía (orbital 2s) al orbital 2p (Carey y col., 2007). Esto es con el fin de que cada orbital p tenga 1 electrón en “P_x”, uno en “P_y” y uno en “P_z” para formar la tetravalencia del carbono.

En el grafito, los átomos de carbono se acomodan formando capas, en las que cada átomo está rodeado por otros tres en un arreglo en forma de panal de abejas (figura 4 y 3). Estas capas están apiladas unas sobre otras. Una sola capa de grafito es muy estable, fuerte y flexible, pero entre capa y capa la adhesión es muy débil. Por otro lado, en el diamante cada átomo de carbono está enlazado a cuatro vecinos iguales, dispuestos en forma de tetraedro,

como se observa en la figura 4 y 3. El diamante sólo se consigue sometiendo el carbono a presiones muy altas; por eso es tan difícil de encontrar.

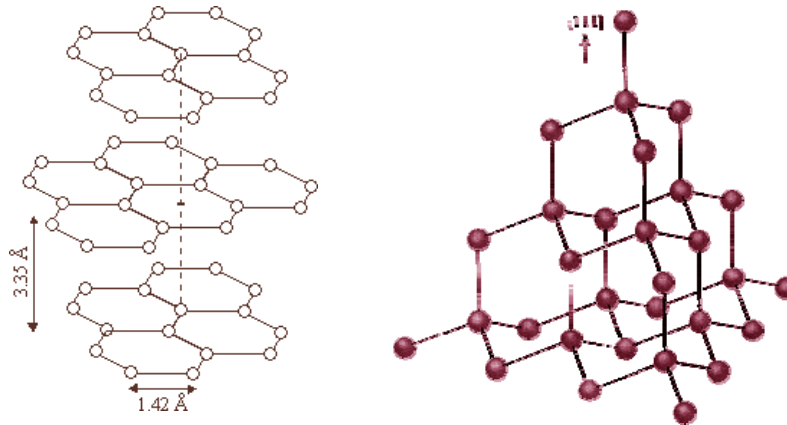


Figura 3. Formas alotrópicas del carbono: grafito y diamante

En 1991 (Iijima, 1991) el científico japonés Sumio Iijima encontró otra forma alotrópica del carbón con forma cilíndrica: los nanotubos de carbono (NTC), los cuales son nanoestructuras cilíndricas que pueden tener una o varias capas concéntricas. Poseen un tamaño transversal de unos pocos nanómetros y un tamaño longitudinal que puede alcanzar los centímetros (Singh y col., 2009). Los NTC poseen enlaces C-C tipo sp^2 “deformados”, debido a la curvatura producida cuando son sintetizados. Esta curvatura además produce un confinamiento cuántico que es responsable de sus propiedades físicas como: alta resistencia mecánica, buena conductividad eléctrica y altos coeficientes de absorción espectroscópicos (Sgobba y col., 2008).

1.2.1. Estructura de NTC

La forma y estructura de los NTC está definida por parámetros específicos como: vector quiral, ángulo quiral y el diámetro del tubo. En la figura 4 se aprecia el modelo para la formación de los NTC.

El modelo de estudio para la formación de los NTC es explicado por medio de la estructura del grafeno. Según la figura 4, T es el vector de traslación, C_n es el vector quiral, θ es el ángulo quiral y a_1 y a_2 son los vectores de la red. El vector quiral define la posición relativa de

dos sitios en la red de grafeno 2D (O, A), está definido mediante dos números enteros (n , m) y por los vectores unitarios de la red hexagonal a_1 y a_2 .

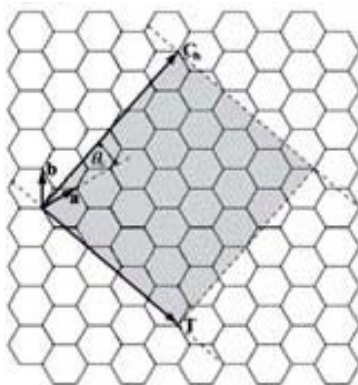


Figura 4. Modelo de la hoja de grafeno que explica la formación de los NTC (Balasubramanian y cols., 2005).

De acuerdo con los números n y m y así como se enrolle la hoja de grafeno los NTC se clasifican como:

- Nanotubos brazo de silla: los nanotubos tendrán esta denominación si ($n=m$) y si además posee un ángulo quiral de $\theta=0^\circ$.
- Nanotubos zigzag: se llamarán así cuando ($m=0$) y poseen además un ángulo quiral $\theta=30^\circ$
- Nanotubos quirales: los nanotubos son tipo quiral si ($n>m>0$) y si además poseen un ángulo quiral $0^\circ<\theta<30^\circ$.

En la figura 5 se encuentran los 3 tipos de nanotubos según la forma como se enrolla la hoja de grafeno.

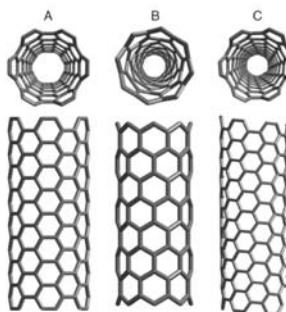


Figura 5. Modelos moleculares de NTC con diferentes quiralidades; A) Brazo de silla, B) Zigzag, C) Quiral (Klumpp y col., 2006).

De acuerdo al número de capas los NTC pueden clasificarse como:

- Nanotubos de capa múltiple (NTCCM): son aquellos formados por capas concéntricas de forma cilíndrica, las cuales están separadas aproximadamente una distancia similar a la distancia interplanar del grafito, ver figura 6.
- Nanotubos de capa única (NTCCU): son los que pueden describir como una capa bidimensional de grafito enrollada formando un cilindro de décimas de micrones de longitud y radio del orden de los nanómetros, los cuales además poseen en sus extremos semiestructuras de fullerenos.



Figura 6. NTC según el número de capas: a) NTC de capa múltiple, b) NTC de capa única (Zhao y col., 2009).

1.2.2. Síntesis de NTC

Desde el descubrimiento de los NTC se han desarrollado varias metodologías para su síntesis, entre las más destacadas se encuentran: ablación laser, descarga de arco, deposición catalítica en fase de vapor (DCV) (Chiang y col., 2001; Cassell y col., 1999).

1.2.3. Funcionalización de NTC

Uno de los principales requisitos para que los NTC puedan ser utilizados en diferentes aplicaciones es la posibilidad de ser funcionalizados. Los NTC disponibles comercialmente presentan residuos de catalizadores, nanopartículas metálicas y formas alotrópicas de carbono que requieren y dificultan los procesos de purificación, solubilización y funcionalización (Hirsch y col., 2005; Hamony col., 1999). Luego de su preparación y síntesis los NTC adquieren un aspecto de polvo esponjoso difícil de manipular, por lo que es necesario su funcionalización química para obtener un material más homogéneo y soluble (figura 7).

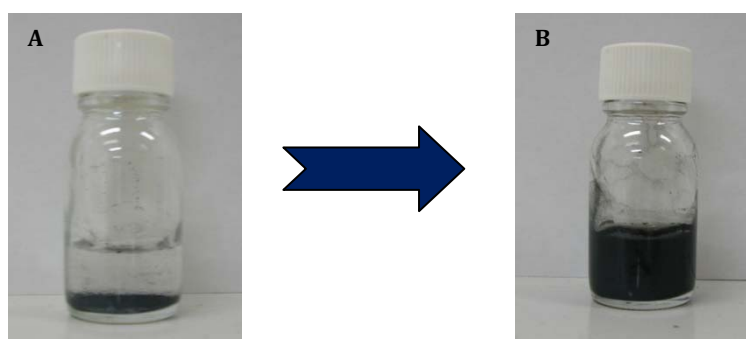


Figura 7. A) NTC en una solución acuosa de AF (5 mM) antes de sonicación, B) NTC-AF luego de sonicación.

El procedimiento de purificación más ampliamente utilizado consiste en el tratamiento de los NTC a altas temperaturas (80°C) con una mezcla de ácidos fuertes ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$) (Pumera y col., 2009). Bajo estas condiciones se produce la disolución del residuo metálico junto con la oxidación del NTC. A pesar de ser una de las estrategias más utilizadas, el tratamiento oxidativo con esta mezcla de ácidos produce NTC con defectos en su estructura electrónica limitando algunas veces el rango de aplicaciones (Swierczewska y col., 2012). Debido a lo anterior se han utilizado estrategias que hacen uso de procedimientos no covalentes mediante el uso de surfactantes, proteínas, ADN y otro tipo de biomolécula (Tasis y col., 2006). A continuación se describen los métodos covalentes y no covalentes más utilizados para la funcionalización de NTC. La figura 8 muestra el esquema de los métodos más utilizados para la funcionalización de los NTC.

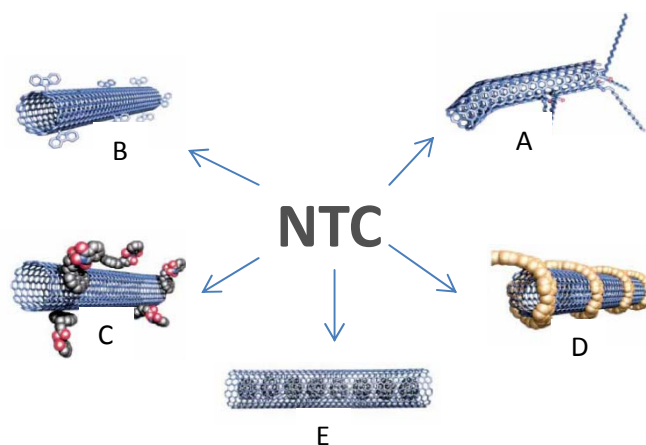


Figura 8. Metodologías de funcionalización de NTC: A) Funcionalización a través de defectos superficiales, B) Funcionalización covalente en las paredes, C) Funcionalización exoédrica no

covalente con surfactantes, D) Funcionalización exoédrica no covalente con polímeros, E) Funcionalización endoédrica.

- Funcionalización no covalente

La funcionalización no covalente está basada en interacciones del tipo van der Waals, hidrofóbicas y de tipo π - π . Una de las ventajas de este tipo de funcionalización es que la estructura aromática de los NTC es preservada, sin modificar la estructura electrónica de los NTC que no se ve afectada (Azamian y col., 2002). Dentro de las metodologías más utilizadas para la funcionalización no covalente se tienen aquellas que hacen uso de surfactantes y algunas biomoléculas como ADN, carbohidratos, proteínas, etc (Thuy y col., 2012; Carson y col., 2012; Yang y col., 2012). Un estudio comparativo para mejorar la dispersión de NTC, utilizó cuatro surfactantes diferentes (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 y dodecilsulfato de sodio) demostrando que el Triton X-100 y el dodecilsulfato de sodio fueron los surfactantes que exhibieron respectivamente la mayor y la menor calidad en la dispersión respectivamente. Las dispersiones fueron caracterizadas por UV-Vis y microscopia de transmisión electrónica (TEM) (Hagenmueller y col. 2008). Moléculas de la familia de los pirenos han sido utilizadas exitosamente para la funcionalización no covalente de NTC para aplicaciones en biosensores, la parte planar o aromática de la molécula de pireno se une al NTC a través de interacciones de apilamiento π - π (Haddad y col., 2010).

- Funcionalización covalente

La funcionalización covalente es una funcionalización irreversible caracterizada por la modificación de las paredes laterales y la punta de los NTC, mediante el uso de ácidos inorgánicos fuertes (Liu y col., 2005). Los nanotubos primero son oxidados con ácidos fuertes como: ácido clorhídrico, sulfúrico y nítrico. Esta oxidación crea defectos en las paredes de los NTC, de tal manera que se generan grupos carboxílicos que incrementan la dispersión y solubilidad en soluciones acuosas (Maurin y col., 2001). Por ejemplo los NTC pueden ser cortados de manera controlada mediante la oxidación con soluciones “piraña” constituidas por mezclas concentradas de ácido sulfúrico y ácido nítrico (Ziegler y col., 2005). En la tabla 1 se pueden apreciar otras metodologías similares.

Tabla 1. Metodologías covalentes para funcionalizar NTC

Tipo de NTC	Método	Referencia
HiPco, CoMoCat	Sonicación en 8M HNO ₃ y reflujo en 2.6M HNO ₃	(Touchl y col., 2009)
HiPco	Calentamiento de HNO ₃ diluido	(Martínez y col., 2003)
HiPco	Sonicación de mezclas de H ₂ SO ₄ y H ₂ O ₂ (96% y 30%)	(Chidawanyka y col., 2010)
HiPco	Oxidación con KMnO ₄	(Dillon y col., 2003)

1.2.4. Caracterización de NTC

Los nanotubos de carbono pueden ser caracterizados por técnicas tradicionales como RMN, UV-Vis e IR, etc. Debido al tamaño nano de estas estructuras de carbono su caracterización se hace más complicada por lo que es necesario el uso de técnicas sofisticadas como: Análisis Termogravimétrico (ATG), Espectroscopia RMN 2D de Difusión Ordenada (DOSY 2D), Espectroscopia Raman, Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopia de Fuerza Atómica (AFM) (Hsieh y col., 2010; Castillo y col., 2012; Li y col., 2002; Journet y col., 1997).

1.2.5. Propiedades ópticas de NTC

Las propiedades ópticas de los NTC dependen fundamentalmente de su carácter unidimensional (1D). Particularmente se tiene el caso de los nanotubos de carbono de pared simple, en donde el confinamiento y la consecuente cuantización de los estados de energía electrónica y vibracional de la dirección radial dan lugar a la aparición de las singularidades de van Hove (vHSs) en la densidad de estados electrónicos (DEE). Estas singularidades son distintas para cada nanotubo (Kataura y col., 1999).

Las transiciones ópticas en los NTC ocurren entre las singularidades de vHSs de las respectivas bandas electrónicas de valencia y de conducción, resultando en transiciones discretas comparadas con las bandas anchas presentadas en sólidos no unidimensionales. Para NTC con diámetros entre 0.5 y 3 nm pueden encontrarse transiciones con energías entre 1 y 3 eV.

1.2.6. Estructura electrónica

La estructura de bandas electrónicas 1D de los NTC se obtiene a partir de una lámina de grafito 2D mediante el modelo de plegado de zona (Zone Folding ZF) y está determinado por los números (n,m). Esto se debe al confinamiento de la función de onda electrónica en la dirección radial que da lugar al desdoblamiento de cada una de las bandas del grafito (una

enlazante π y otra antienlazante π^*) en N bandas, donde N es el número de hexágonos que contiene la celda unidad del nanotubo. Se produce un cambio sustancial en la DEE, de manera que la DEE 1D presenta unos picos agudos que son singularidades de van Hove. Las singularidades agrupan un elevado número de estados y son únicas para cada NTC. La figura 9 muestra las correspondientes singularidades vHS en la densidad de estados de dos NTC con características geométricas muy similares.

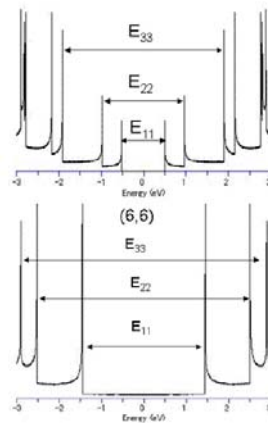


Figura 9. Singularidades de van Hove en la densidad de estados electrónicos de los nanotubos (7,5) y (6,6). (Carlson y col., 2008)

La estructura electrónica de los NTC es única y particular en la física del estado sólido en el sentido de que los nanotubos son metálicos o semiconductores dependiendo de su diámetro y quiralidad. Así, son metálicos todos los nanotubos en que $n-m=3p$, con p entero, (1/3 del total) y semiconductores todos los demás (2/3 del total).

1.2.7. Aplicaciones biomédicas de NTC

Las propiedades fisicoquímicas de los NTC como: tamaño nanométrico, biocompatibilidad, facilidad de funcionalización, etc, los han llevado a convertirlos en candidatos excelentes en diversos tipos de aplicaciones en el campo de la biología y la medicina principalmente (Bianco y col., 2005; Akasaka y col., 2009; Lu y col., 2009).

• Entrega controlada de fármacos

En los últimos años los NTC han llamado la atención de la comunidad científica debido a su capacidad para la entrega de fármacos de manera específica y controlada (Bianco y col., 2005). Los fármacos pueden ser acoplados dentro de la estructura de los NTC o funcionalizados directamente sobre las paredes laterales. Esta facilidad de inserción y

funcionalización es debida probablemente a la capacidad de formar enlaces covalentes y no covalentes mediante interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals. Varios estudios (Bianco y col., 2005; Wu y col., 2005) han demostrado que los NTC cargados con algún fármaco atraviesan la membrana celular con una tendencia a ingresar al núcleo de la célula, propiedad que puede ser aprovechada para el ingreso de fármacos a nivel del núcleo (Lacerda y col., 2007). El grupo de Pantorrato y cols ha sido uno de los que más han utilizado los NTC en la entrega controlada de fármacos. En uno de sus trabajos examinaron la toma de NTC a nivel celular y concluyeron que esta entrega se realiza más efectivamente cuando los NTC son funcionalizados y además demostraron que el factor que determina el destino final de los NTC en el cuerpo es su tamaño. Recientes avances han mostrado que algunos NTC funcionalizados con fármacos presentan inconvenientes en la liberación de su contenido. El grupo de Kulamarva y cols encapsularon los NTC en una novedosa microcápsula compuesta por una membrana polimérica de alginato-poli-L-lisina-alginato (ALA). Luego de su ingreso al cuerpo esta nanoestructura exhibió un promisorio perfil de liberación del fármaco, además de una protección segura y efectiva de los NTC durante su paso por el torrente sanguíneo (Kulamarva y col., 2009). En la tabla 2 se aprecian diversos ejemplos de NTC funcionalizados con fármacos para el tratamiento y terapia de varias enfermedades.

Tabla 2. Entrega controlada de fármacos por NTC

Fármaco	Aplicación	Metodología de funcionalización de NTC	Referencia
Metotrexato	Cáncer	Funcionalización lateral de las paredes mediante reacciones de cicloadición 1,3-dipolares	(Liu y col., 2008)
Paclitaxel	Células cancerígenas de seno	Funcionalizados con polietilenglicol (PEG)	(Liu y col., 2012)
Doxorubicina	Cáncer	Funcionalizados con PEG	(Zheng y col., 2009)
Curcumina	Cáncer	Encapsulamiento del fármaco dentro de la estructura del NTC	(Dhar y col., 2008)
Cisplatina	Cáncer de ovario y pulmón	Funcionalización con AF	(Pruthi y col., 2012)
Polioxometalato	Cáncer	Funcionalización con quitosan	(Luo y col., 2011)
Dexametasona	Anti-inflamatorio	Encapsulamiento del fármaco dentro de la estructura del NTC	(Dhar y col., 2008)
Anfotericina B	Ani-fúngico	Funcionalización de las paredes laterales con Anfotericina B y fluoresceína	(Lacerda y col., 2006)

- **Terapias contra el cáncer**

Una de las grandes dificultades de las terapias contra el cáncer es la poca selectividad de los fármacos. En la mayoría de los casos la quimioterapia destruye las células cancerígenas junto con las células consideradas “sanas” provocando una serie de efectos secundarios. Actualmente el tratamiento o las terapias contra el cáncer que utilizan los NTC han venido en aumento (Madani y col., 2012, Arsawa y col., 2011). La entrega específica de fármacos anclados a NTC en las células malignas ha mejorado y con los NTC ha permitido disminuir las dosis de fármacos requeridas en un tratamiento normal debido a una mejor localización en el sitio del tumor. Actualmente los fármacos anti-cáncer se incorporan en el interior de los NTC. En un estudio realizado por Arsawang y cols (Kraemer y col., 2011) fue posible incorporar más de 5 millones de moléculas de fármaco en un NTC, con un diámetro aproximado de 80 nm. Las técnicas de química húmeda son las más utilizadas para incorporar fármacos dentro de los NTC. Por ejemplo se introdujeron 10 mg/mL de una solución de carboplatina en una suspensión de 1 mg/mL de solución de NTC, la mezcla fue sonicada durante 10 minutos y agitada por 24 horas. La evidencia óptica de la incorporación de la carboplatina quedó registrada en imágenes de TEM la cual se puede apreciar en la figura 10. La cantidad de carboplatina incorporada se determinó por medio por espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (Artl y col., 2010). Una de las desventajas de utilizar técnicas de química húmeda es que algunas moléculas de fármacos se anclan en las paredes de los NTC, luego se recomienda cubrir las paredes de los NTC previamente a la incorporación del fármaco (Klingeler y col., 2008), con el fin de mejorar la selectividad de entrega.

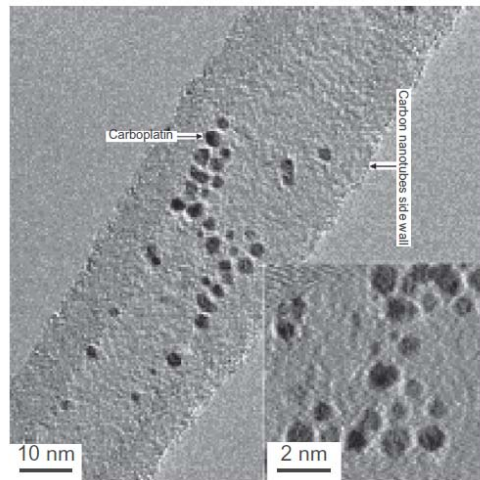


Figura 10. Incorporación de carboplatina en NTC, tomado de (Fisher y col., 2010)

Una de las alternativas que más ha tenido aplicación en los últimos 5 años esta relacionada con el aprovechamiento de las propiedades ópticas de los NTC, que bajo la acción de radiación del infrarrojo cercano (IR cercano) o de la radiofrecuencia (RF) presentan un aumento localizado de la temperatura del medio en el cual están disueltos. A continuación se describen algunos de los estudios realizados utilizando esta técnica utilizada como terapia contra el cáncer.

- **Ablación térmica por NTC**

La ablación térmica es una metodología que aprovecha diferentes tipos de frecuencias para la destrucción selectiva de tumores cancerígenos (Burlaka y col., 2010). En el caso de los NTC su interacción con la radiación IR cercano ha sido aprovechada para lograr un calentamiento local en diferentes tipos de células cancerígenas para lograr una destrucción selectiva.

- **Calentamiento de NTC mediante IR cercano**

La exposición de células al IR cercano puede causar la muerte celular por medio de la desnaturalización irreversible de proteínas o mediante el daño de la membrana celular debido a un aumento de temperatura hasta aproximadamente los 40°C (Levi y col., 2009; Bhirde y col., 2009). La producción de esta radiación se logra por medio de un rayo láser que puede ser de dos tipos: (1) pulsos cortos en el orden de los nanosegundos y (2) un láser

continúo que permite exposiciones más largas. Las exposiciones cortas se utilizan para ablación de tumores celulares que han hecho metástasis (Manthe y col., 2010; Wang y col., 2011) y se alcanzan temperaturas de aproximadamente 300°C y en algunas ocasiones se corre el riesgo de afectar tejidos que aún no están afectados por las células cancerígenas. La segunda metodología utiliza exposiciones más largas, láseres con radiación continua pero menos energéticos se utilizan para la ablación de células cancerígenas primarias que son relativamente grandes. La temperatura alcanzada en este caso es de aproximadamente 45°C-65°C y también se corre el riesgo de afectar células sanas (Robinson y col., 2010).

Los NTC surgen como una alternativa eficiente para evitar algunos de estos inconvenientes mencionados, ya que genera un calentamiento localizado y de esta forma ha permitido la ablación térmica de diferentes tipos de tumores (Moon y col., 2009). Además, la estimulación con láser de los NTC produce gradientes de temperatura que podrían penetrar más profundamente el tejido afectado comparado con la acción del láser sin NTC.

Se ha indicado que la temperatura de los NTC alcanza aproximadamente los 60°C durante 2 minutos de irradiación con un láser de longitud de onda entre 700 nm-1100 nm (Robinson y col., 2010). En un experimento realizado a un grupo de ratones que previamente se infectaron con células cancerígenas de epidermoide humano y cuando el tumor alcanzó los 70 mm³, se les inyectó una solución de NTC y posteriormente se irradió con un láser IR cercano ($\lambda = 808$ nm). Luego de 20 días del tratamiento el tumor desapareció completamente como se aprecia en la figura 11.

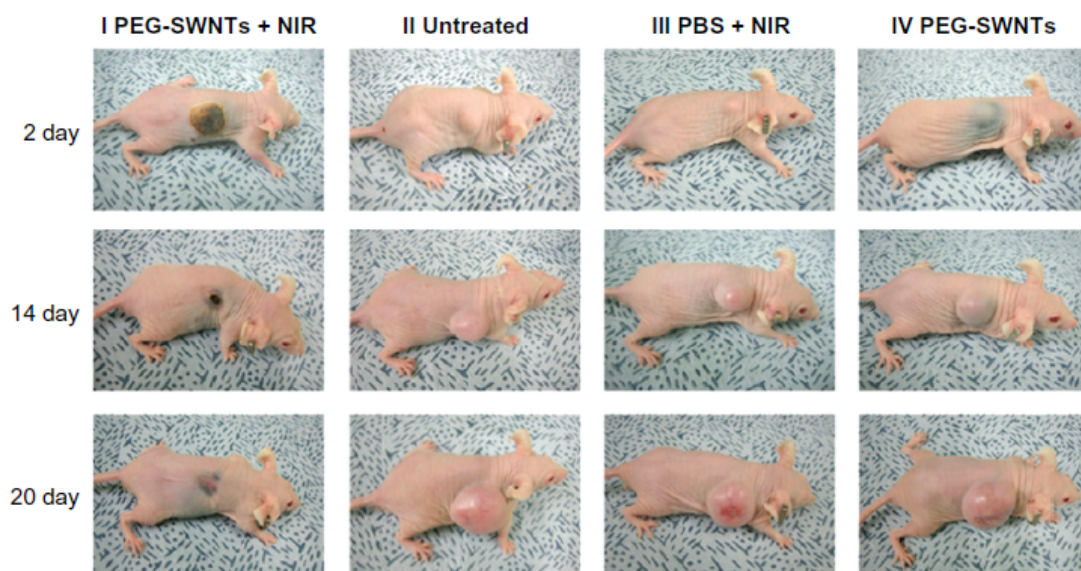


Figura 11. Evolución del tratamiento de un tumor cancerígeno en ratones tratados con NTC y luz IR cercano (Kam y col., 2007).

Un grupo de investigación de la Universidad de Stanford realizó un estudio con NTC con el objeto de lograr un transporte multifuncional biológico y la destrucción selectiva de células HeLa (Chakravarty y col., 2008). El uso de una radiación laser con una longitud de onda de 808 nm y una potencia de 1.4 W/cm^2 , se logró eliminar células HeLa *in vitro* por calentamiento localizado de los nanotubos internalizados.

En este caso los NTC fueron internalizados selectivamente mediante su funcionalización con AF y se aprovechó el alto coeficiente de absorción ($\epsilon = 7.9 \times 10^6 \text{ /M cm}$) de los NTC en la zona del IR cercano, para la generación de “*calor letal*” y lograr una ablación térmica en este tipo de células (Chakravarty y col., 2008). Adicionalmente, se ha indicado que la selectividad de NTC en la ablación térmica de células de linfoma de Burkitt fue mejorada mediante el anclaje de anticuerpos en su estructura (Chen y col., 2012), lo cual demostró la alta selectividad de NTC anclados con anticuerpos para su ingreso en la célula y permitir la muerte celular en un alto porcentaje mediante el calentamiento de los NTC por IR cercano.

En la tabla 3 se resumen otros estudios realizados usando NTC e irradiados con láseres con diferentes valores de longitud de onda de IR cercano y potencia, los cuales han permitido la muerte celular selectiva.

Tabla 3. Ablación térmica de NTC bajo la acción de radiación del IR cercano

NTC	Tipo de célula	Cáncer	Fuente de radiación láser	Referencia
Pared simple	HER 2	Seno	800 nm, 0.8W/m ² , 7 min.	(Torti y col., 2007)
Pared simple	Daudi	Linfoma de Burkitt	808 nm, 5W/cm ² , 5 min.	(Mocan y col., 2011)
Pared múltiple	Riñon	-	1064 nm, 3W/cm ² , pulsos de 30 s.	(Naderi y col., 2012)
Pared simple	HeLa	Cervical	808 nm, 3.5W/cm ²	(Chakravarty y col., 2008)

- **Diagnostico e imágenes**

Otra de las aplicaciones importantes de los NTC ha sido en el diagnóstico de enfermedades debido al potencial que tienen como agentes de contrastes de imágenes y de este modo permitir la identificación de células cancerígenas (Pramanaki y col., 2009). El metrotrexato, un fármaco anti-cáncer, fue unido a NTC y marcados con una sonda fluorescente, esto permitió una mejor visibilidad en el cuerpo debido a la fluorescencia producida por los NTC marcados. Un estudio reciente mostró la posibilidad de encapsular NTC en forma de píldoras y registrar su seguimiento en el cuerpo por medio de una cámara de video de alta resolución (Constantine y col., 2010). Este sistema sirve como alternativa a los procedimientos de endoscopia y colonoscopia que no proporcionan las imágenes apropiadas debido a la dificultad de acceso al sitio al tumor cancerígeno.

- **Toxicidad de NTC**

A pesar de las múltiples aplicaciones de los NTC en casi todos los campos de la ciencia, la toxicidad presentada en algunos casos es de vital importancia, inclusive algunos autores han comparado su toxicidad con la de las fibras de asbesto (Sayes y col., 2006). En algunos casos factores como: tamaño, tipo de funcionalización, concentración y tipo de dispersante para la solubilización de los NTC inciden directamente en la toxicidad de los nanotubos.

Los NTC disponibles comercialmente presentan diferentes limitaciones de acuerdo con el método de síntesis utilizado para su preparación y esto también influye en la toxicidad presentada por los nanotubos. Los residuos metálicos de Fe, Co y Ni limitan su aplicación en experimentos celulares además del tamaño individual de cada NTC (Lam y col., 2007). Estos defectos extrínsecos, como los residuos de catalizador en algunas ocasiones representan del 25% al 40% de la masa de un NTC, la presencia de estos metales puede catalizar la

generación de especies oxidativas en tejidos y células a través de la formación de radicales libres (Zhang y col., 2007). Tales procesos de catálisis ocurren cuando los macrófagos ingieren los NTC, un ejemplo más claro se presenta cuando la enzima dinucleótido adenina nicotinamida fosfato oxidasa (NADPH-oxidasa) se activa a nivel intracelular para producir superóxidos O_2^- , una especie reactiva capaz de matar bacterias y hongos. Los residuos metálicos interactúan con el superóxido para formar radicales hidroxilo ($OH^\cdot$), produciendo el conocido estrés oxidativo con el daño consecuente de lípidos, proteínas y el ADN celular (Donaldson y col., 2006).

Varios estudios han confirmado que los NTC funcionalizados (NTC-f) presentan una menor toxicidad comparada con los NTC sin funcionalizar (Hu y col., 2003), esto es debido a la presencia de grupos funcionales que presentan cierta bio-compatibilidad con el entorno celular en el cual están siendo aplicados. Sin embargo, otros trabajos han demostrado que el tipo de agente dispersante de los NTC puede causar toxicidad y alterar el funcionamiento del NTC, algunos ejemplos de estos estudios se observan en la tabla 4.

Tabla 4. Estudios tóxicos de NTC solubilizados y funcionalizados con diferentes agentes dispersantes

Agente dispersante	Toxicidad	Referencia
Tetrahidrofurano	Mutagénico	(Hedderman y col., 2006)
Diclorobenceno	Peligroso para organismos acuáticos	(Ishibashi y col., 2006)
Antraceno	Mutagénico	(Guldi y col., 2005)
Pireno	Carcinogénico y mutagénico	(Zhao y col., 2005; Wang y col., 2007)

Adicionalmente se ha indicado que los NTC cortos ($<0.22 \mu m$) son fagocitados más eficientemente por los macrófagos que los NTC largos ($>0.8 \mu m$). Además se evidenció que los NTC cortos inyectados en el tejido sub-cutáneo de ratones permanecieron en el citosol de los macrófagos después de 4 semanas, mientras que en experimentos similares con NTC largos no ingresaron a la célula y se agregaron provocando inflamaciones (Cui y col., 2005). En los casos en donde se ha demostrado que los NTC presentan cierta toxicidad en su interacción con las células no existen un mecanismo concluyente que explique los motivos y efectos para este problema. Sin embargo algunos avances en estudios experimentales han permitido evidenciar preliminarmente que los NTC causan daño celular cuando activan varias rutas al mismo tiempo, la mayoría de ellas involucrando daños al ADN (Jacobsen y col., 2008). En un estudio con células mesoteliales expuestas a NTC en concentraciones menores

25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ activaron rutas de reparación del ADN, cambios en el ciclo celular y la generación de señales de apoptosis (Chernyl y col., 2008). De esta manera se puede afirmar que las condiciones bajo las cuales son tóxicos los NTC son: insolubilidad, altas concentraciones ($> 2 \text{ mg/ml}$) y NTC sin funcionalizar.

1.3. Nanotubos de péptidos

En la naturaleza existen diferentes tipos de biomoléculas que poseen la capacidad de auto-ensamblarse en estructuras como fibras, filamentos, microtubos, etc (Gazit y col., 2007). Por medio de esta propiedad ha sido posible la movilidad, elasticidad y otras capacidades de las proteínas fibrilares para que el ser humano se desarrolle y lleva a cabo algunas de sus funciones vitales. En su afán por imitar algunas de estas funciones vitales, varios científicos han desarrollado un nuevo tipo de nanomateriales denominados nanotubos de péptidos (NTP).

Los NTP están formados por la interacción y auto-ensamble de dipéptidos aromáticos, como la difenilalanina y la difenilglicina (Gorbitz y col., 2006). Estos dipéptidos están presentes en polipéptidos del tipo β -amiloide, y están involucrados en la formación de nanofibras amiloideas *in vivo*, y son precursoras de enfermedades como el mal de Alzheimer (Yan y col., 2009).

Estos péptidos se autoensamblan por medio de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas en estructuras de tamaño nanométrico (Nuraje y col., 2004), lo que las convierten en candidatas para novedosas aplicaciones biotecnológicas, como la construcción de dispositivos electrónicos (Reches y col., 2007), y en el campo de la medicina como posibles transportadores de fármacos y en sistemas de detección denominados biosensores.

1.3.1. Síntesis de NTP

A diferencia de la síntesis de NTC, la síntesis de NTP es más sencilla y utiliza como precursores soluciones acuosas de dipéptidos como la difenilalanina la cual es disuelta en un alcohol polar como el hexafluoropropanol (HFIP) (Gazit y col., 2007).

De acuerdo a estudios computacionales la estructura energética más probable ilustra al dipéptido con sus grupos aromáticos interaccionando mutuamente y las partes hidrofílicas apuntando hacia afuera similar a la estructura molecular de un surfactante (Gorbitz y col., 2006) como se aprecia en la figura 12.

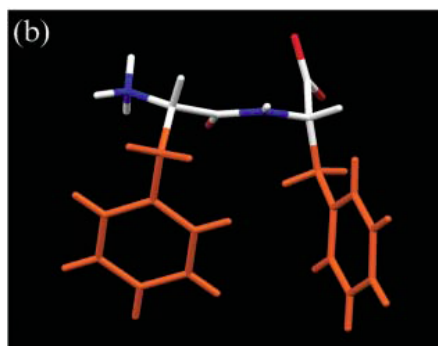


Figura 12. Estructura energética más estable de la difenilalanina (Gorbitz y col., 2006).

Los NTP se forman debido al autoensamble de la difenilalanina disuelta en HFIP. El autoensamble ocurre por medio de interacciones hidrofóbicas, interacciones del tipo π - π de apilamiento y por medio de puentes de hidrógeno. En la siguiente figura tomada de Gazit, 2006, se puede apreciar el mecanismo de formación para de los NTP (Yan y col., 2009).

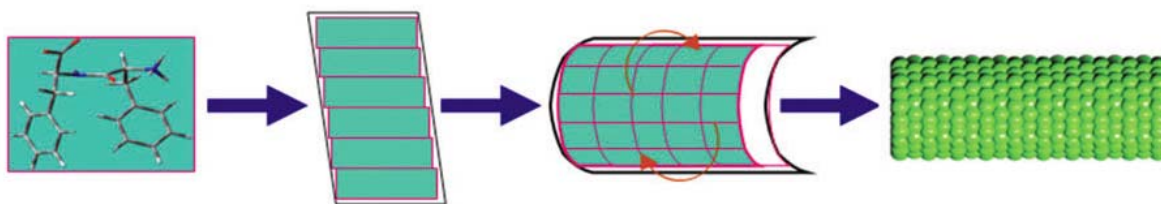


Figura 13. Mecanismo de formación de NTP

Este mecanismo está basado en interacciones de apilamiento formadas principalmente por los anillos bencénicos de la difenilalanina (interacciones π - π). Posteriormente cuando los NTP se están formando son disueltos en agua y a través de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno se autoensamblan formando los nanotubos con la presencia de grupos amino sobre su superficie.

1.3.2. Funcionalización de NTP

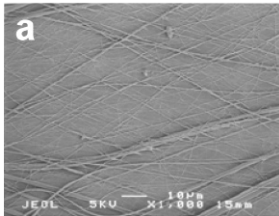
La presencia de grupos amino libres alrededor de la estructura de los NTP ha permitido funcionalizarlos con una variedad de moléculas para diferentes tipos de aplicaciones (Gan y col., 2005; Ryu y col., 2009). La estrategia más común es la activación del C=O del grupo amido mediante el uso de “linkers” como la carbodiimida, la cual convierte al C=O en un buen grupo saliente dejando el espacio disponible para el anclaje de grupos aminos (-NH₂). Aunque esta es una alternativa adecuada, la funcionalización no covalente ha sido utilizada para la unión de proteínas a los nanotubos de péptidos. El grupo de Matsui y col funcionalizó NTP con biotina, avidina y albúmina mediante dos estrategias, una covalente con formación de intermediarios del tipo éster NHS y no covalentemente por medio de la formación de puentes de hidrógeno.

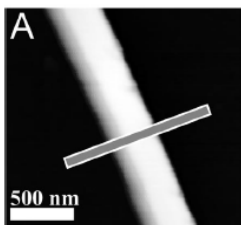
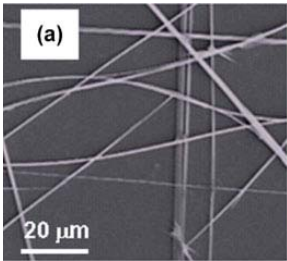
Los NTP han sido utilizados como “moldes” para la fabricación de biosensores y otros dispositivos electrónicos por medio la funcionalización con nanocristales de oro (Clausen y col., 2008). NTP fluorescentes han sido diseñados mediante el anclaje de complejos de metales de tierras raras los cuales los hacen detectables bajo la luz del microscopio óptico (Rica y col., 2008).

1.3.3. Caracterización de NTP

Para la caracterización de los NTP se han utilizado técnicas como AFM, TEM y SEM. En la siguiente tabla se puede apreciar cada una de las técnicas utilizadas y sus respectivas micrografías.

Tabla 5. Caracterización de NTP por microscopia

Técnica	Micrografía	Diaméto del NTP (nm)	Referencia
SEM		100	(Rica y col., 2004)

AFM		175	(Rica y col., 2004)
Microscopia óptica		125	(Park y col., 2012)

1.3.4. Aplicaciones de NTP

Los NTP han sido estudiados por varios grupos de investigación y han sido utilizados en aplicaciones biomédicas principalmente, algunas de ellas son: soportes tridimensionales para regeneración ósea, implantes dentales, biosensores para detección de virus, actividad anti bactericida, entrega de fármacos, genes y proteínas (Hell y col., 2010; Yemini y col., 2005).

La tabla 6 resume algunas de las aplicaciones más importantes:

Tabla 6. Aplicaciones biológicas de NTP

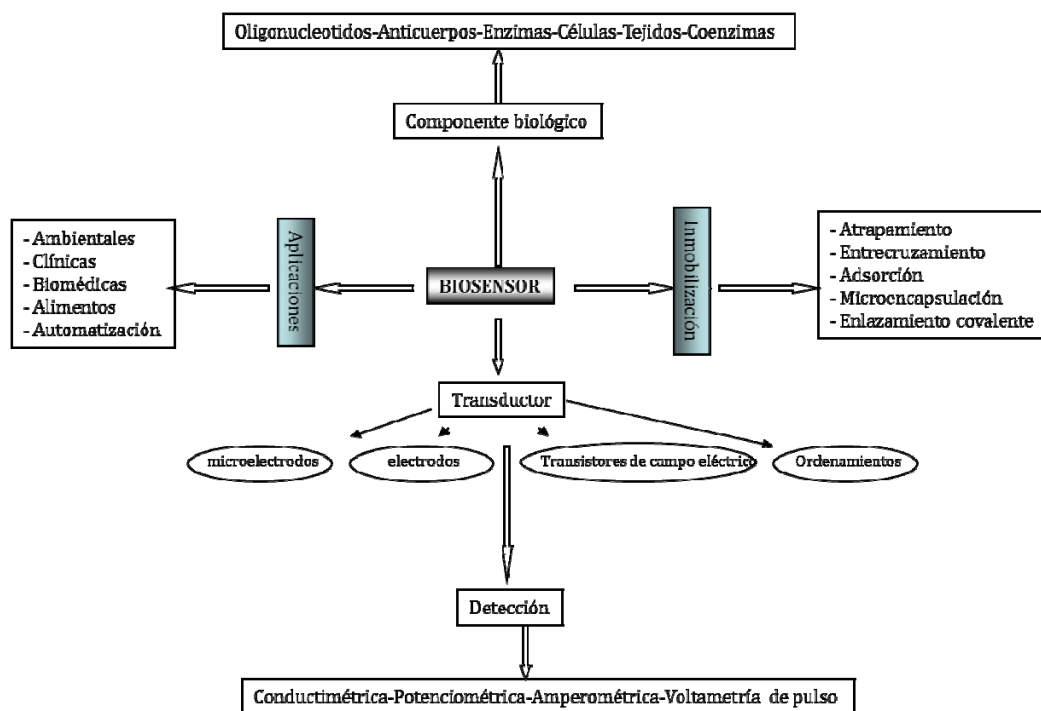
Nanoestructura	Aplicación	Referencia
Nanotubos de proteínas	Biosensores	Hell y col., 2010
Nanotubos de péptidos	Inmovilización de enzimas	Hell y col., 2010
Nanotubos de péptidos	Detección de virus	(Yemini y col., 2005)

- **Biosensores**

Un biosensor es un dispositivo electrónico que transforma información química en una señal analítica útil. Los biosensores contienen dos componentes básicos conectados en serie: un sistema de reconocimiento biológico y un transductor físico-químico.

El sistema de reconocimiento biológico transforma la información del dominio bioquímico, generalmente la concentración de un analito, en una señal de salida química o física con una sensibilidad definida. El principal objetivo del sistema de reconocimiento es suministrar al biosensor un alto grado de selectividad al analito que está siendo medido.

La mayoría de biosensores son más o menos selectivos (no específicos) para un analito en particular, pero algunos de ellos por su diseño y construcción son de clase específica, ya que utilizan algunas clases de enzimas, por ejemplo biosensores para compuestos fenólicos; mientras que otros utilizan extractos celulares, por ejemplo aquellos utilizados para medir la demanda bioquímica de oxígeno. En el esquema 1 se puede ver un diagrama generalizado sobre los componentes de un biosensor.



Esquema 1. Componentes principales de un biosensor

- **Biosensores basados en NTP**

Los NTP son nanoestructuras bio-inspiradas que gracias a sus propiedades fisicoquímicas han sido objeto de estudio debido a sus múltiples aplicaciones (Hell y col., 2010; Yemini y col., 2005). Una de las aplicaciones más comunes es en la construcción de biosensores debido a sus propiedades electroquímicas. Los NTP han servido para la detección de

diferentes analitos como glucosa, peróxido de hidrógeno y compuestos de interés ambiental. Se han utilizado diferentes tipos de electrodos para la inmovilización de los NTP, entre los más utilizados están los electrodos de carbono, de oro y de grafito.

Recientemente el grupo de Gazit y col inmovilizó NTP sobre electrodos de grafito para la detección de peróxido de hidrógeno. Se observó un mejor desempeño del electrodo modificado con los NTP comparado con el electrodo de grafito sin modificar. En otro trabajo el mismo grupo modificó electrodos de oro con un conjugado NTP-glucosa oxidasa para la detección de peróxido de hidrogeno. Nuevamente los valores de la corriente detección fueron altos en comparación con el electrodo sin modificar. En la tabla 7 se aprecian otros experimentos realizados utilizando NTP sobre diferentes tipos de electrodos para la detección de diferentes tipos de analitos.

Tabla 7. Biosensores basados en NTP

Péptido	Electrodo	Analito	Referencia
Difenilalanina	Grafito	Fenol	(Matos y col., 2011)
Difenilalanina	Carbono vidrioso	Dopamina	(Viguiet y col., 2011)
Octapéptido de N-S-G-A-I-T-I-G	Oro	Cobre	(Viguiet y col., 2011)

- **Detección de células cancerígenas utilizando biosensores**

Uno de los problemas claves en el tratamiento del cáncer es la detección temprana de la enfermedad. Los métodos de detección temprana del cáncer son de suma importancia y son un área activa de la investigación actual. Actualmente los métodos de detección más importantes son: inmunohistoquímicos, inmunofluorescencia, citometría de flujo, etc.

Uno de los indicadores más utilizados en la detección del cáncer es mediante la identificación de un tipo de línea celular conocida como células HeLa. Las células HeLa son un tipo particular de células inmortales usadas en investigación. Son denominadas inmortales precisamente porque pueden dividirse un número ilimitado de veces en el laboratorio si las condiciones fundamentales para la supervivencia de las células se cumplen.

En la tabla 8 se presentan los métodos más utilizados para la detección de células HeLa.

Tabla 8. Sistemas de detección de células HeLa

Sistema	Referencia
Sensor de microbalanza de cristal de cuarzo	(Banerjee y col., 2003)
Radioinmunoensayos	(Banerjee y col., 2003)
Ensayos citológicos	(Li y col., 2008)
Imágenes de fluorescencia	(Vora y col., 2002)

Aunque la efectividad en la detección de estos métodos no ha sido debatida ni puesta en tela de juicio, la mayoría de ellos presentan inconvenientes relacionados con tiempos largos de análisis inclusive algunos tienen asociados riesgos de contaminación radiactiva (Banerjee y col., 2009).

Una alternativa para evitar las desventajas de los métodos presentados en la tabla 8 es mediante el uso de metodologías electroquímicas a través de la construcción de biosensores (ver sección 1.3.4). Sin embargo algunos biosensores presentan problemas de sensibilidad y selectividad a la hora de detectar un blanco específico. Una alternativa para estos inconvenientes sería diseñar y construir biosensores basados en la interacción específica de los receptores de folato sobre-expresados por las células HeLa con el AF inmovilizado sobre la superficie de un electrodo. Recientemente se han incorporado diferentes tipos de nanopartículas para mejorar las propiedades electroquímicas de los biosensores (Brindle y col., 2008). Es por eso que en este trabajo de doctorado se utilizaron NTP funcionalizados con AF para crear un nuevo sistema de detección electroquímica para la detección específica de células cancerígenas del tipo HeLa.

1.4. Ácido fólico

1.4.1. Generalidades

El ácido fólico es también conocido como vitamina D y es una molécula de bajo peso molecular (PM: 441 g/mol) que está compuesta por un anillo pteridínico, ácido p-aminobenzoico y ácido glutámico (Yang y col., 2002).

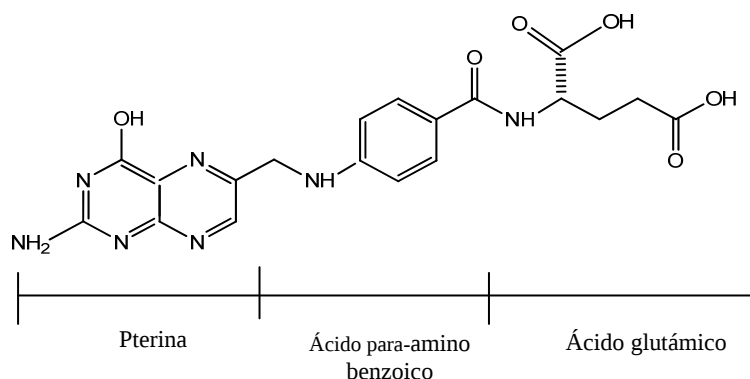


Figura 14. Estructura química del AF

El AF es utilizado por las células eucariotas para el metabolismo de compuestos de un carbono y en la síntesis de purina y pirimidinas para la formación del ADN (Xia y col., 2010). La toma del AF por parte de las células es llevada a cabo por un transportador de folatos reducidos o por un transportador de folato con un protón acoplado. En células cancerígenas otro mecanismo de ingreso es el responsable para la toma del AF, este mecanismo está regulado por proteínas ligadoras conocidas como receptores de folato (RF). Existen tres tipos de RF: α , β y γ , los cuales son proteínas ligadoras presentes en la membrana celular y se encuentran presentes en células cancerígenas y en el parásito de la *Leishmania* (Heijden y cols., 2009; Kamen y col., 1986; Turk y col., 2002). El RF α es sobre-expresado por aproximadamente el 40% de las células cancerígenas, particularmente en células cancerígenas de ovario, útero y cerebro se encuentran en aproximadamente un 90%. Por otro lado el RF β se encuentra sobre-expresado en células de leucemia y en macrófagos activados de artritis reumatoide y otros tipos de enfermedades inflamatorias (Shen y col., 1995). El RF γ no ha sido detectado en tejidos humanos pero se han encontrado en células tipo T reguladoras (Schneider y col., 2005).

El AF y alguno de sus conjugados poseen una afinidad alta por los RF con una constante de disociación (K_d) entre 1-10 nM (Li y col., 2011). Esta importante característica ha llamado la atención de la comunidad científica debido a que el AF puede ser utilizado como un blanco estratégico para la detección y el tratamiento del cáncer y posiblemente en otras enfermedades infecciosas como la leishmaniasis. En la tabla 9 se encuentran algunas estrategias utilizadas para la detección y tratamiento de diferentes tipos de cáncer por parte de conjugados de AF.

Tabla 9. Conjugados de AF en la detección y tratamiento en células cancerígenas

Conjugado	Aplicación	Referencia
AF-quitosano-nanopartículas	Cáncer colorectal	(Sahu y col., 2011)
AF-quitosano-doxoribocina-nanopartículas	Cáncer retinoblastoma	(Lai y col., 2009)
AF-nanopartículas de TiO_2	Células HeLa	(Henne y col., 2006)
AF-albumina de suero bovino-nanopartículas de oro	Detección de RF	(Abdolahad y col., 2012)
AF-NTC	Detección de células cancerígenas	(Lai y col., 2009)

Debido a las características y propiedades presentadas por el AF en esta tesis se propone su anclaje a NTC y nanotubos biológicos conformados por péptidos como la difenilalanina (FF). El objetivo de la funcionalización de los NTC con AF es la de lograr un calentamiento localizado y permitir una actividad anti-Leishmania *in vitro* en células infectadas con el parásito. Para la detección de células cancerígenas que sobre-expresen RF se propone utilizar NTP funcionalizados con AF como elemento de reconocimiento biológico.

1.5. Tratamientos contra la leishmaniasis

Los tratamientos actuales contra la leishmaniasis (ver anexo) presentan algunas dificultades que no se han podido resolver completamente, lo cual ha permitido desarrollar métodos terapéuticos alternos. En este sentido el presente trabajo de investigación se plantea estudiar los efectos generados por la interacción de los NTC funcionalizados con AF y radiaciones inocuas como el infrarrojo cercano y permitan un calentamiento localizado para lograr una destrucción selectiva de las células infectadas, lo cual es actualmente un reto terapéutico en el tratamiento contra la leishmaniasis.

En la siguiente tabla, se describe la dosis usada y el modo de acción del medicamento usado en los tratamientos tradicionales contra la leishmaniasis cutánea.

Tabla 10. Tratamientos actuales usados contra la leishmaniasis cutánea

Tratamiento sistémico			
Fármaco	Modo de acción	Dosis	Referencia
Antimoniales Pentavalentes	Inhibición de la glicolisis y la β -oxidación de ácidos grasos del parásito	20 mg/kg/día	(Croft y col., 2006)
Anfotericina B	Se enlaza a los esteroides de la membrana del parásito y cambia la permeabilidad selectiva a K^+ y Mg^{2+} .	Diluir dosis calculada en 500 cc de DAD 5%	(Shofri y col., 2012)
Miltefosina	Inhibe la biosíntesis de fosfolípidos y esteroides	2.5 mg/kg/día	(Shyam y col., 2012)
Tratamiento tópicos			
Anfotericina liposomal	Fusión fagolisosomal	0.8 mg/kg/día	(Nilfrousihzhadeh y col., 2006)
Imiquimodina	Modifica la actividad inmune y aumenta la liberación del Interferon- α (IFN- α)	20 mg/kg/día	Gómez y col., 2012)
Paramomicina	Inhibición de la biosíntesis de proteínas	14/mg/kg/día	(Nilfrousihzhadeh y col., 2006)

Generalmente el tratamiento terapéutico requiere varias dosis y en algunos casos se ha encontrado resistencia del parásito. Actualmente la nanotecnología ha atraído la atención de la comunidad científica debido a su rápido crecimiento y a sus aplicaciones en todos los campos de la ciencia. Otra razón es la esperanza de poder utilizar y aplicar nanopartículas en el tratamiento de varias enfermedades. A continuación se describen algunos de los recientes estudios de nanopartículas y nanocompuestos para la creación de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis.

1.5.1. Nanotecnología aplicada al tratamiento de la leishmaniasis

En el tratamiento contra la leishmaniasis se han utilizados nanocompuestos como los liposomas, nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, nanopartículas de plata etc, en los cuales es posible el encapsulamiento o el acople de fármacos como la AmB, o incluso la utilización directa de las nanopartículas para mejorar la actividad anti-Leishmania (Ashutosh y col., 2012). Se han usado nanopartículas de poliacil-cianoacrilato cargadas con primaquina en macrófagos infectados con *L. donovani*, el efecto de la droga encapsulada en la nanopartícula mostró ser 21 veces más efectivo en la erradicación del parásito que la primaquina libre (Doroud y col., 2011).

La pentamidina ha sido encapsulada en nanopartículas de polimetacrilato en ratones infectados con *L. infantum*, se encontró que la dosis efectiva 50 (DE₅₀) fue seis veces menor para el conjugado nanopartícula-pentamidina que para la pentamidina en su forma libre (Baptista y col., 2011). Por otro lado Doroud y cols desarrollaron un sistema transportador de pADNs de *L. major*, basado en un sistema de nanopartículas catiónicas lipídicas, para inducir una respuesta inmune protectora y empezar las bases de una posible vacuna (Doroud y col., 2011).

Una alternativa novedosa consistió en el encapsulamiento de AmB en nanoemulsiones basadas en estearilaminas. El nanoconjugado fue sometido a estudios de permeación en piel y se encontró una mayor eficiencia de penetración del conjugado comparado con la AmB libre (Santos y col., 2012).

La AmB no ha sido el único fármaco anti-Leishmania acoplado a nanopartículas. La paramomicina fue encapsulada en nanopartículas lipídicas sólidas y se estudio además de su actividad anti-Leishmania la eficiencia de encapsulamiento y otros parámetros de producción. Este estudio demostró mejores porcentajes en la liberación del fármaco (Van de Ven y col., 2012).

Una nueva metodología está aprovechando las propiedades anti-bactericidas de las nanopartículas de plata. En un estudio se irradiaron nanopartículas de plata con luz UV con una potencia de 36 W en un cultivo de células infectadas con *L. tropica*. Se obtuvieron

muertes del 90% de los amastigotes utilizando concentraciones de nanopartículas de plata de 200 µg/mL (Allahverdiyev y col., 2011).

El único estudio documentado hasta ahora que menciona el uso de NTC contra la *Leishmania* fue el realizado por Ashutosh y cols (Ashutosh y cols., 2012). La AmB fue acoplada a la pared de los NTC e incubados en amastigotes y promastigotes de *L. donovani*. El resultado obtenido fue un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito utilizando la AmB-NTC comparado con la AmB libre.

En la tabla 11 se resumen los trabajos que utilizaron nanopartículas en el tratamiento *in vitro* de la leishmaniasis.

Tabla 11. Tratamientos para leishmaniasis basados en nanoestructuras

Nanopartícula	Aplicación	Referencia
Nanopartículas poliméricas (ácido láctico-co-gliciláctico)-Anfotericina B	Tratamiento leishmaniasis visceral	(Verma y col., 2011)
Nanopartículas lipídicas-Paramomicina	Actividad anti-Leishmania	(Van de Ven y col., 2012).
Nanoemulsiones-Anfotericina B	Estudios de permeación en piel para tratamiento de leishmaniasis cutánea	(Santos y col., 2012)
Nanopartículas de poliéster-Anfotericina B	Tratamiento leishmaniasis visceral	(Santos y col., 2009)
Nanopartículas de plata	Tratamiento <i>L. tropica</i>	(Allahverdiyev y col., 2011)

En este trabajo se desarrolló y evaluó un sistema de NTC funcionalizados con AF para destruir selectivamente los amastigotes intracelulares de *L. panamensis*, *in vitro* empleando como células modelo las THP-1, en presencia de esta radiación.

El desarrollo de esta investigación es el resultado de la colaboración de los profesores Patricia Escobar (CINTROP), Edgar A. Páez y Fernando Martínez O. (CICAT), quienes han venido estudiando la interacción de compuestos con la radiación electromagnética y su efecto en células infectadas, como método alternativo en la lucha contra la leishmaniasis (Hernández y col., 2010; Mateus y col., 2007; Valdivieso y col., 2010; Novoa y col., 2012).

En esta investigación se realizó la funcionalización de los nanotubos NTC [38] y NTP con el ácido fólico (AF) (Castillo y col., 2013). Estos materiales se caracterizaron para evidenciar la funcionalización. Los NTC funcionalizados se evaluaron en la fototerapia térmica en células infectadas con el parásito de la *Leishmania*, específicamente amastigotes intracelulares de *L. panamensis in vitro* empleando como células modelo las THP-1. Adicionalmente, este es el primer trabajo en el cual se estudia este tipo de procedimiento⁺⁺.

Mientras que los NTP funcionalizados se utilizaron como plataformas biológicas en la construcción de un biosensor para la detección de células cancerígenas del tipo HeLa. Además, este es el primer trabajo que utiliza NTP funcionalizados con AF para la detección electroquímica de células HeLa.

⁺⁺ Junto con el Trabajo de Maestría en Ciencias básicas: “Actividad de nanotubos de carbono acoplados a ácido fólico contra *Leishmania panamensis* después de irradiación con luz infrarroja cercana” Desarrollado por Leydi Viviana Novoa en 2012.

1.6. Bibliografía

- Abdolahad M., Taghinejad M., Taghinejad H., Janmaleki M., Mohajerzadeh S. Lab on a Chip, 2012; 12: 1183-1190.
- Adler-Abramovich L., Badihi-Mossberg M., Gazit E., Rishpon J. Small, 2010; 6: 825-831.
- Akasaka T., Watari F. Acta Biomaterialia, 2009; 5: 607-612.
- Allahverdiyev A., Abamor E., Bagirova M., Ustundag C., Kaya C., Kaya F., Rafailovich M. International Journal of Nanomedicine, 2011; 6: 2705-2714.
- Ashutosh G., Sundar S., Duncan R., Nakashi R., Goya L. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012; 56: 518-525.
- Arsawang U., Saengsawan O., Rungrotmongkol T., Sornmee P., Wittayanarakul K., Remsungnen T., Hannongbua S. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2011; 29: 591-596.
- Artl M., Haase D., Oswald S., Bachmatiuk A., Klingeler R., Schulze R., Ritschel M., Leonhardt A., Fuessel S., Buchner B., Kraemer K., Wirth P. Nanotechnology, 2010; 21: 335101.
- Azamian B., Davis J., Coleman K., Bagshaw C., Malcom L., Green H. Journal of American Chemical Society, 2002; 124: 12664-12665.
- Balasubramanian K., Burghard M. Small, 2005; 2: 180-192.
- Banerjee S., Kahn M., Wong S. Chemistry: A European Journal, 2003; 9: 1898-1908.
- Baptista M., Wainwright M. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2011; 44: 1-10.
- Bellucci S., Gaggiotti G., Marchetti M., Micciulla F., Mucciato R., Regi M. Journal of Physics, 2007; 61: 99-104.
- Bhirde A., Patel V., Gavard J., Zhang G., Sousa A., Masedunskas A., Leapman R., Weigert R., Gutkind S., Rusling J. ACS Nano, 2009; 3: 307-316.

- Bianco A., Kostarelos K., Partidos D., Prato M. *Chemical Communications*, 2005; 5: 571-577.
- Bianco A., Kostarelos K., Prato M. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2005; 9: 674-679.
- Brindle K. *Nature Reviews Cancer*, 2008; 8: 94-107.
- Burlaka A., Lukin S., Prylutska S., Remeniak O., Prylutsky Y., Shuba M., Maksimenko S., Ritter U., Scharff P. *Experimental Oncology*, 2010; 32: 48-50.
- Carey F., Sundberg R. *Advanced Organic Chemistry*, 2007, Springer; pág 2-4. USA.
- Carlson L., Krauss T. *Accounts of Chemical Research*, 2008; 41: 235-243.
- Carson I., Hibbert K., Akindoju F., Johnson C., Stewart M., Kelly-Brown C., Beharie G., Fisher T., Stoddart D., Oki A., Neelgund G., Regisford G., Traisawatwong P., Zhou J., Luo Z. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2012; 96: 380-386.
- Cassell A., Raymakers R., Kong J., Dai H. *Journal of Physical Chemistry B*, 1999; 103: 6484-6492.
- Castillo J., Tanzi S., Dimaki M., Svendsen W. *Electrophoresis*, 2008; 29: 5026-5032.
- Castillo J., Torres M., Molina D., Castillo-León J., Svendsen W., Escobar P., Martínez F. *Carbon*, 2012; 50: 2691-2697.
- Castillo J., Svendsen W., Rozlosnik N., Escobar P., Martinez F., Castillo-León J. *Analyst*, 2013; 138: 1026-1031.
- Clausen C., Jensen J., Castillo J., Dimaki M., Svendsen W. *NanoLetters*, 2008; 8: 4066-4069.
- Constantine P., Firme I., Prabhakar R., Bandaru R. *Nanomedicine*, 2010; 6: 245-256.
- Croft S., Sundar S. Fairlamb A. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006; 111-126.
- Cui D., Tian F., Ozkan C., Wang M., Gao H. *Toxicological Letters*, 2005; 155: 73-85.

- Chakravarty P., Marches R., Zimmerman N., Swafford A., Bajaj P., Inga H., Musselman H., Pantano P., Draper R., Vitetta E. *Proceedings of National Academy of Sciences*; 2008; 105: 8697-8702.
- Chen H., Ma X., Li Z., Shi Q., Zheng W. Liu Y., Wang P. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2012; 5: 334-338.
- Cherny I., Gazit E. *Angewandte Chemie*, 2008; 47: 4062-4069.
- Chiang I., Brinson B., Smalley R., Margrave J., Hauge R. *Journal of Physical Chemistry B*, 2001; 105: 1157-1161.
- Chidawanyika W., Nyokong T. *Carbon*, 2010; 48: 2831-2838.
- Dhar S., Liu Z., Thomale J., Dai H., Lippard S. *Journal of American Chemical Society*, 2008; 130: 11467-11476.
- Dillon E., Crouse C., Barron A. *NanoLetters*, 2008; 2:156-164.
- Donaldson K., Aitken R., Tran L., Stone V., Duffin R., Forrest G. *Toxicology Science*, 2006; 92: 5-22.
- Doroud D., Zahedifard F. *Journal of Control Release*, 2011; 153: 154-162.
- Fisher J., Sarkar S., Buchanan C. *Cancer Research*, 2010; 70: 9855-9864.
- Gao X., Djalali R., Haboosheh A., Samsom J., Nuraje N., Matsui H. *Advanced Materials*, 2005; 17: 1753-1757.
- Gazit E. *Chemical Society Reviews*, 2007; 36: 1263-1269.
- Gómez L., Panniello M., Zerpa O., Reyes O. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2102; 66: AB107.
- Gorbitz C. *Chemical Communications*, 2006, 3: 2332-2334.
- Guldi D., Rahman G., Jux N., Balbinot D., Hartnagel U., Tagamatarchis N. *Journal of American Chemical Society*, 2005; 127: 9830-9838.

Haddad R., Holzinger M., Maaref A., Cosnier S. *Electrochimica Acta*, 2010; 55: 7800-7803.

Haggenmueller R., Rahatekar S., Fagan J., Chun J., Becker M., Naik R., Krauss T., Carlson L., Kadla J., Trulove P., Fox D., DeLong C., Fang Z., Kelley S., Gilman J. *Langmuir*, 2008; 24: 5070-5078.

Hamon M., Chen J., Chen Y., Itkis M., Rao A., Eklund P., Haddon R. *Advanced Materials*, 1999; 11: 834-839.

Hedderman T., Keogh S., Chambers G., Byrne H. *Journal of Physical Chemistry B*; 2006: 110: 3895-3901.

Heijden J., Oerlemans R., Dijkmans B., Qi H., Laken C., Lems W., Jackman A., Krann M., Tak P., Ratnam M., Jansen G. *Arthritis & Rheumatism*, 2009; 60: 12-21.

Hell A., Fretz m., Crommelin D., Hennink W., Mastrobattista E. *Journal of Controlled Release*, 2010; 141: 347-353.

Henne W., Doorneweerd D., Lee J., Low P., Savran C. *Analytical Chemistry*, 2006; 78: 4880-4884.

Hernández I., Escobar P. Tesis de Maestría en Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, UIS, 2010.

Hirsch A., Vostrowsky O. *Topics Current Chemistry*, 2005; 245: 193-237.

Hsieh Y., Chou Y., Lin C., Hsieh T., Shu C. *Aerosol and Air Quality Research*, 2010; 10: 212-218.

Hu H., Zhao B., Hamon M., Kamaras K., Itkis M., Haddon R. *Journal of American Chemical Society*, 2003; 125: 14893-14900.

Iijima S. *Nature*, 1991; 354: 56-58.

Ishibashi A., Nakashima N. *Chemistry*, 2006; 12: 7595-7602.

- Jacobsen N., Pojana G., White P., Moller P., Cohn C., Korsholm K. *Environmental Molecular Mutagenics*, 2008; 49: 476-487.
- Journet C., Maser W., Bernier P., Loiseau A., Chapelle M., Lefrant S., Deniard P., Lee R., Fischer J. *Nature*, 1997; 388: 756-762.
- Kam N., Kam S., O'Connell M., Wisdom J., Dai H. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 2007; 102: 11600-11605.
- Kamen B., Capdevilla A. *Proceedings of National Academy of Sciences*, 1986; 83: 5983-5987.
- Kataura H., Kumazawa Y., Maniwa Y., Umezumi I., Suzuki S., Ohtsuka Y., Achiba Y. *Synthetic Metals*, 1999; 103: 2555-2558.
- Kim G., Ramaraj B., Yoon K. *Applied Surface Science*, 2011; 258: 1027-1032.
- Klingeler R., Hampel S., Buchner B. *International Journal of Hyperthermia*, 2008; 24: 496-505.
- Klumpp C., Kostarelos K., Prato M., Bianco M. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006; 1758: 404-412.
- Kraemer K., Artl M., Silke H., Haase D., Fuessel S., Schulze R., Leonhardt A., Wirth M. *The Journal of Urology*, 2011; 63: 1020-1030.
- Kulamarva A., Raja P., Bhathena H., Chen H., Talapatra S., Ajayan P., Nalamasu O., Prakash S. *Nanotechnology*, 2009; 20: 025612.
- Kunza H., Haase D., Kramer K., Rauschenbach M., Ritschel M., Leonhardt A., Thomas J., Oswald S., Hoffman V., Buchener B. *Nanomedicine*, 2008; 3: 175-182.
- Lacerda L., Raffa S., Prato M., Bianco A., Kostarelos K. *Nanotoday*, 2007; 2: 38-43.
- Lacerda L., Bianco A., Prato M., Kostarelos K. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006; 58: 1460-1470.

- Lai T., Lee W. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2009; 204: 148-153.
- Lam C., James J., McCluskey R., Hunter R. *Toxicological Letters*, 2007; 168: 121-127.
- Levi-Polyachenko N., Merkel E., Jones B., Carroll D., Stewart J. *Molecular Pharmaceutics*, 2009; 6: 1092-1099.
- Li H., Li D., Liu Y., Qin N., Ren T., Xu S., Liu Q., Mayerand D., Wang E. *Chemical Communications*, 2012; 48: 2594-2596.
- Li P., Wang Y., Zeng F., Chen L., Peng Z., Kong L. *Carbohydrate Research*, 2011; 346: 801-806.
- Li W., Wen J., Tu Y., Ren Z. *Applied Physics A*, 2002; 74: 397-401.
- Liu M., Yang Y., Zhu T., Liu Z. *Carbon*, 2005; 43: 1470-1483.
- Liu Y., Wei K., Ma C., Yang S., Chen J. *Colloids Surfaces B and Biointerfaces*, 2012; 89: 1-9.
- Liu Z., Chen K., Davis C., Sherlock S., Cao Q., Chen X., Dai H. *Cancer Research*, 2008; 68: 6652-6660.
- López T., Ortiz E., Alvarez M., Navarrete J., Odriozola J., Martínez F., Páez E., Escobar P., Espinoza K., Rivero I. *Nanomedicine*, 2010; 6: 777-785.
- Lu F., Gu L., Meziani J., Wang X., Luo P., Veca L., Cao L., Sun Y. *Advanced Materials*, 2009; 21: 139-152.
- Luo X., Matranga C., Tan S., Alba N., Cui X. *Biomaterials*, 2011; 32: 6316-6323.
- Madani S., Tan A., Dwek M., Seifalian A. *International Journal of Nanomedicine*, 2012; 7: 905-914.
- Manthe R., Foy S., Krishnamurthy N., Sharma B., Labhasetwar V. *Molecular Pharmaceutics*, 2010; 7: 1880-1898.

Martin-Palma R., Lakhtakia A. Nanotechnology, a crash course. 2010, SPIE; pág 1-3. USA.

Martinez M., Callejas M., Benito A., Cochet M., Seeger T., Schreibert J., Gordon C., Marhic C., Chauvet O., Fierro J., Maser W. Carbon, 2003; 41: 2247-2252.

Mateus J., Escobar P. Tesis de Maestría en Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, UIS, 2007.

Matos I., Alves W. Applied Materials & Interfaces, 2011; 3: 4437-4443.

Maurin G., Stepanek I., Bernier P., Colomer J., Nagy J., Henn F. Carbon, 2001; 39: 1273-1278.

Mocan T., Iancu C. International Journal of Nanomedicine, 2011; 6: 1945-1954.

Moon H., Lee S., Choi H. ACS Nano, 2009; 3: 3707-3713.

Naderi N., Madani S., Mosahebi A., Seifalian A. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, 2012; 12.

Nilfrousihazadeh M., Jaffray M., Reiszadeh R., Ansari N. International Journal of Dermatology, 2006; 45: 989-991.

Novoa V., Escobar P. Tesis de Maestría en Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, UIS, 2012.

Nuraje N., Banerjee I., MacCuspie R., Yu L., Matsui H. Journal of American Chemical Society, 2004; 126: 8088-8089.

Park B., Ko K., Yoon D., Kim D. Enzyme and Microbial Technology, 2012; 51: 81-85.

Pramanik M., Song K., Swierczewska M., Green D., Sitharaman B., Wang L. Physics in Medicine and Biology, 2009; 54: 3291.

Pruthi J., Mehra N., Jain N. Journal of Drug Targeting, 2012; 20: 593-604.

Pumera M., Smid B., Veltruska K. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2009; 9: 2671-2676.

- Qiu X., Tang L., Dong C., Ren J. *Chinese Chemical Letters*, 2010; 21: 1227-1230.
- Reches M., Gazit E. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007; 7: 2239-2245.
- Rica R., Mendoza E., Lechuga L., Matsui H. *Angewandte Chemie*, 2008; 120: 9898-9901.
- Ryu J., Lim S., Park C. *Advanced Materials*, 2009; 21: 1-5.
- Robinson J., Welsher K., Tabakman S., Sherlock S., Wang h., Luong R., Dai H. *NanoResearch*, 2010; 3: 779-793.
- Sahu S., Maiti S., Maiti T., Ghosh S., Pramanik P. *Macromolecular Bioscience*, 2011; 11: 285-2895.
- Samori C., Ali-Boucetta H., Sainz R., Guo C., Toma F., Fabbro C., da Ros T., Prato M., Kostarelos K., Bianco A. *Chemical Communications*, 2010; 46: 1494-1496.
- Santos L., Colhone M., Daghanstanli A., Stabeli R., Silva-Jardim I., Ciancaglini P. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2009; 340: 112-118.
- Santos C., Barbosa R., Arantes V., Caldeira L., Oliveira M., Sócrates E., Miranda L. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2012; 8: 322-329.
- Sayes C., Liang F., Hudson J., Mendez J., Guo W., Beach J. *Toxicological Letters*, 2006; 161: 135-142.
- Scanlon S., Aggeli A. *Nanotoday*, 2008; 3: 22-30.
- Schneider R., Schmitt F., Frochot C., Fort Y., Lourette N., Guillemin F., Muller J., Barberi-Heyob M. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005; 13: 2799-2808.
- Sgobba V., Guldi D. *Chemical Society Reviews*, 2008; 38: 165-184.
- Shokri A., Sharifi I., Khamesipour A., Nakhaee N., Harandi M., Nosratabadi J., Parizi M., Barati M. *Parasitology Research*, 2012; 110: 1113-1117.
- Shen F., Ross J., Miller D., Ratnam M. *Biochemistry*, 1995: 5660-5665.

Shyam S., Anup S., Madhukar R., Vijay P., Avinash S., Bart O., Marleen B., Dujardin J., Chakravarty J. *Clinical Infectious Diseases*, 2012; 55: 543-550.

Singh P., Campidelli S., Giordani S., Bonifazi D., Bianco A., Prato M. *Chemical Society Reviews*, 2009, 2214-2230.

Swierczewska M., Choi K., Mertz E., Huang X., Zhang F., Zhu L., Yoon H., Park J., Bhirde A., Chen X. *NanoLetters*, 2012; 12: 3613-3620.

Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M. *Chemical Reviews*, 2006; 106: 1105-1136.
Takeuchi N. *Nanociencia y nanotecnología*. 2009, Dewey; pág 13-17. México.

Tamamis P., Adler-Abramovich L., Reches M., Marshall K., Sikorski P., Serpell L., Gazit E., Archontis G. *Biophysical Journal*, 2009; 96: 5020-5029.

Tchoul M., Warrent F., Lolli G., Resasco D., Arepalli S. *Chemistry of Materials*; 2009: 5765-5772.

Thuy N., Tam P., Le A., Tam L., Thu V., Hieu N., Chien N. *Current Applied Physics*, 2012; 12: 1553-1560.

Torti S., Byrne F., Whelan O., Levi N., Ucer B., Schmid M., Torti F., Akman S., Ajayan P., Nalamasu U., Carroll D. *International Journal of Nanomedicine*, 2007; 2: 707-714.

Turk M., Breur G., Widmer W., Paulos C., Xu L., Grote L., Low P. *Arthritis & Rheumatism*, 2002; 46: 1947-1955.

Valdivieso W., Escobar P. *Tesis de Maestría en Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, UIS*, 2010.

Van de Ven H., Vermeersch M., Vandenbroucke R., Mattheeussen A., Apers S., Weyenberg W., De Smeth S., Cos P., Maes L., Ludwing A. *Journal of Drug Targeting*, 2012; 20: 142-154.

Verma R., Pandya S., Misra A. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2011; 7: 118-120.

- Viguié B., Zor K., Kasotakis E., Mitraki A., Clausen C., Svendsen W., Castillo-León J. *Applied Materials & Interfaces*, 2011; 3: 1594-1600.
- Vora A., Riga A., Dollimore D., Alexander K. *Thermochimica Acta*, 2002; 392: 209-220.
- Wang L., Xu R., Chen Y., Jiang R. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011; 69: 120-126.
- Wang L., Zhang M., Zhang N., Shi J., Zhang H., Li M., Lu C., Zhang Z. *International Journal of Nanomedicine*, 2011; 6: 2641-2652.
- Wang X., Deng X., Wang H., Liu Y., Wang T, Gu Y. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2007; 41: 85-90.
- Wu W., Wieckowski S., Pastorin G., Benincasa M., Klumpp C., Briand J., Gennaro S., Prato M., Bianco A. *Angewandte Chemie*, 2005; 117: 6516-6520.
- Xia W., Low P. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2010; 53: 6811-6824.
- Yan X., Zhu p., Li J. *Chemical Society Reviews*, 2009; 39: 1861-2336.
- Yang L., Yang B., Zeng D., Wang D., Wang Y., Zhang L. *Carbohydrate Polymers*, 2012; 85: 845-853.
- Yang S., Lin F., Tsai K., Wei M., Tsai H., Wong J., Shieh M. *Bioconjugate Chemistry*, 2010; 21: 679-689.
- Yemini W., Reches M., Gazit E., Rishpon J. *Analytical Chemistry*, 2005; 77: 5155-5159.
- Ziegler K., Gu Z., Peng H., Flor E., Hauge R., Smalley R. *Journal of American Chemical Society*, 2005; 127: 1541-1547.
- Zhao B., Hu H., Perea D., Haddon R. *Journal of American Chemical Society*, 2005; 127: 8197-81203.
- Zhao Q., Feng X., Mei S., Zhaoxia J. *Nanotechnology*, 2009; 20: 105101.
- Zhao Y., Stoddart J. *Accounts of Chemical Research*, 2009; 42: 1161-1171.

Zhang L., Zeng L., Barron A., Montiero-Riviere N. International Journal of Toxicology, 2007; 26: 103-107.

Zheng L., Song J. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009; 135: 650-665.

CAPÍTULO II

Preparación, Caracterización y Funcionalización de Nanotubos de Carbono y Nanotubos de Péptido con Ácido Fólico

2.1. Introducción

Desde la primera publicación que anunciaba el descubrimiento de los NTC (Ijima y col., 1991), la comunidad científica ha intensificado la búsqueda y aplicación de nuevas nanoestructuras en todos los campos de la ciencia y la medicina. Recientemente en 2006 Gazit y col dieron a conocer un nuevo tipo de nanoestructura construido a partir de moléculas biológicas, y que se conoce NTP, los cuales son sintetizados a partir de la difenilalanina. Al igual que los NTC, los NTP han sido utilizados en diversos campos de la medicina y la biología (Gorbitz y col., 2006). Para ser aplicados en estos campos de la ciencia, sobre todo en medios celulares, los NTC y los NTP necesariamente deben ser modificados estructuralmente por medio de la unión con diferentes tipos de biomoléculas, en un proceso conocido como funcionalización.

Motivados por lo anterior en este capítulo se hará una descripción de la preparación, funcionalización y caracterización de NTC y NTP con AF. Además se describirán los métodos espectroscópicos, de microscopia electrónica y de fuerza atómica utilizados en la caracterización de los nanotubos que permitirán evidenciar la unión nanotubo-AF.

Los NTC fueron funcionalizados por medio de dos estrategias: covalente y no covalente. En la estrategia covalente la unión NTC-AF se llevó a cabo mediante el uso de un linker como la carbodiimida. En la estrategia no covalente la unión del AF al nanotubo se llevó a cabo simplemente mediante la sonicación de los dos compuestos sin el uso de ningún otro compuesto. Por primera vez se utilizó la técnica bidimensional 2D DOSY-RMN para evidenciar la funcionalización de los NTC con el AF. Las técnicas espectroscópicas: UV-Vis, fluorescencia y principalmente la espectroscopia Raman evidenciaron la unión nanotubo-AF.

Finalmente la microscopia electrónica de barrido y la microscopia de fuerza atómica comprobaron la unión del AF a los NTC, en esta unión se comprueba que las moléculas del AF están envolviendo la estructura del NTC mediante interacciones débiles no covalentes.

2.2. Parte experimental

2.2.1. Reactivos

La tabla 12 muestra los reactivos utilizados los cuales fueron adquiridos comercialmente y algunos donados por la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU)

Tabla 12. Lista de reactivos empleados

Compuesto	Casa comercial	Pureza %
NTC	Sigma-Aldrich	90 (longitud 2-5 μm , diámetro 0.2-2 nm)
NTC HIPCO*	Unydim	longitud 2-5 μm , diámetro 0.2-2 nm
Quitosano	Sigma-Aldrich	Peso molecular 5000 Mn, <75% deacetilado
Ácido fólico	Sigma-Aldrich	>97
Hidróxido de sodio	Merck	98
<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida	Fluka	>99
Ácido clorhídrico	Merck	99.9
Difenilalanina	Bachem (Germany)	99
1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol	Fluka	99
<i>N</i> -Hidroxisuccinimida	Sigma-Aldrich	98
<i>N</i> -Hidroxisuccinimida Atto 532	Sigma-Aldrich	>80

*HIPCO: High Pressure Carbon Monoxide

2.2.2. Funcionalización de NTC con AF

2.2.2.1. Funcionalización covalente de NTC con AF

Para la solubilización de NTC se colocaron cinco miligramos de NTC en un frasco de vidrio y se sonicaron en un Ultrasonic processor de Cole Parmer Instruments, modelo cpx 130 PB durante 1 hora en una solución acuosa de quitosano 30% p/v. La solución se preparó pesando 15 mg de quitosano (PM 5000 y 75% deacetilado) y se diluyó hasta 50 mL con agua destilada y agregando unas gotas de ácido acético (pH 3.0) hasta disolver completamente con ayuda de ultrasonido. Posteriormente la solución fue centrifugada a 2800 rpm por 20 minutos; el sobrenadante fue recogido y cuidadosamente separado del sólido remanente (fig. 15). Finalmente la solución de NTC fue almacenada a 4°C para la posterior funcionalización con AF.

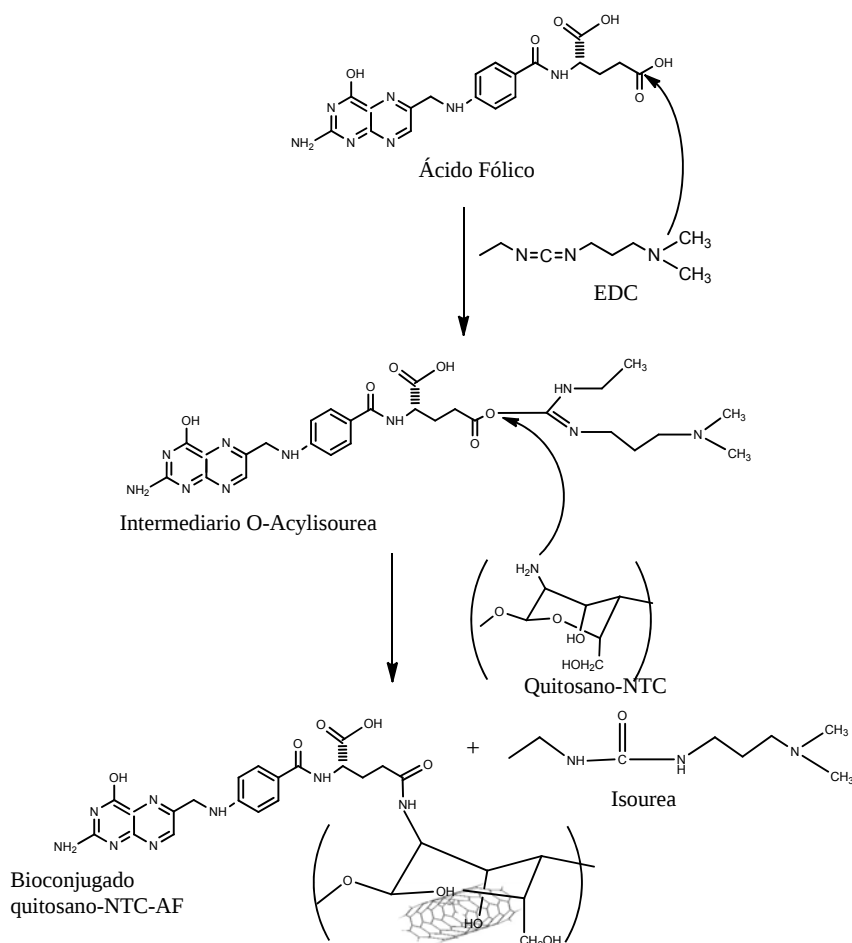


Figura 15. Funcionalización covalente de NTC-AF

Para la preparación de NTC funcionalizado covalentemente, la conjugación de AF sobre los NTC-quitosano se logró utilizando una metodología similar a la utilizada por Kam y cols [4]. Primero 5 mL de una solución acuosa NTC-quitosano fue incubada con *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (3.5mM), la mezcla fue agitada magnéticamente a temperatura ambiente (25°C) durante 12 horas y protegida de la luz cubriendo el recipiente con papel aluminio. Posteriormente se preparó una solución acuosa ligeramente básica de AF (2.5mM) y se adicionó (5 mL) a la solución de NTC-quitosano activada con *N*-(3-Dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (500 μ L). La mezcla se dejó en agitación durante la noche y luego fue dializada tres veces con una solución buffer fosfato pH 7.0 usando una membrana de diálisis (tamaño de poro 10000) para remover el exceso de AF y EDC.

2.2.2.2. Funcionalización no covalente de NTC con AF

En un recipiente de vidrio de 50 mL se colocaron cinco miligramos de NTC y se adicionó a una solución ligeramente básica (pH 9) de AF (5 mL). La solución de AF se preparó pesando 6.5 mg de AF y adicionando 10 μ L de NaOH 1 M para solubilizar el AF y se llevó a 25 mL de volumen con agua destilada.

La mezcla NTC-AF fue agitada durante 5 minutos y posteriormente fue sonicada durante 20 minutos. La solución NTC-AF durante la sonicación fue introducida en una baño termostatado (15°C) para evitar el sobrecalentamiento generado por el sonicador y evitar afectar la estructura electrónica de los NTC. Luego de la sonicación la solución fue centrifugada a 2800 rpm durante 20 min, el sobrenadante fue separado del sólido. Finalmente la solución fue dializada tres veces con agua destilada para eliminar el exceso de AF que no reaccionó. El esquema de la síntesis puede observarse en la siguiente figura.

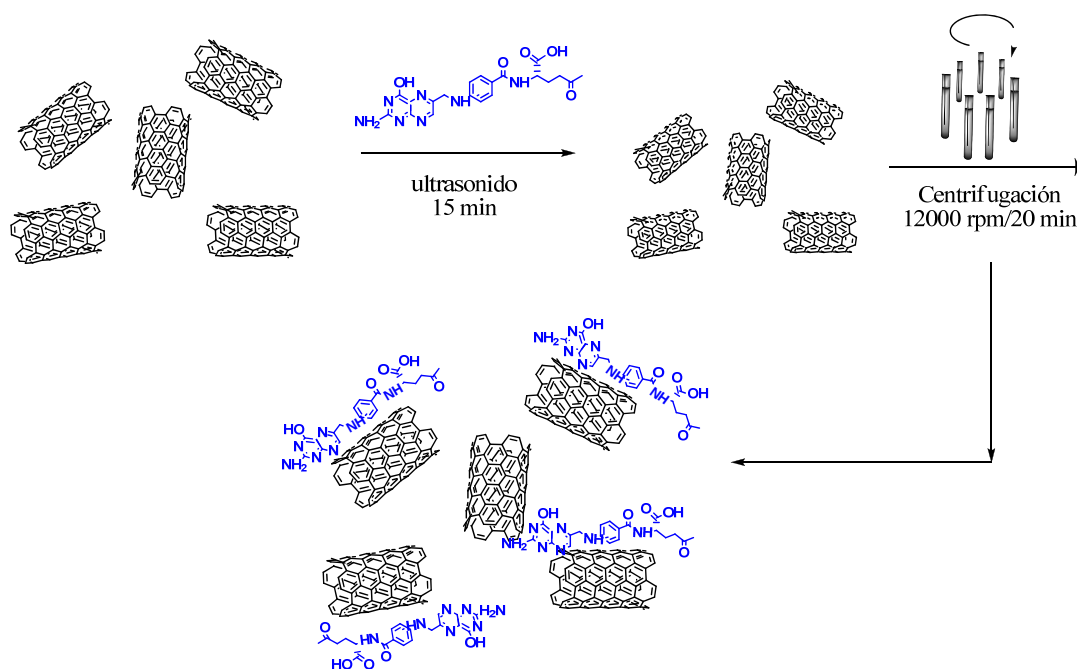


Figura 16. Funcionalización no covalente de NTC-AF

2.2.3. Caracterización espectroscópica de NTC-AF

Los espectros UV-Vis se tomaron en un espectrofotómetro Agilent-HP 8453 (Waldbronn, USA) utilizando celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud. Los espectros fueron graficados y analizados utilizando el software de gráficas y tratamiento de datos OriginLab versión 8.0. Para la espectroscopia de fluorescencia se utilizó un espectrofotómetro de luminescencia Perkin Elmer LS-55 (Waltham, USA), utilizando celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud. Los espectros Raman fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro HR-800 (Horiba-JobinYvon, Kyoto, Japón) en el caso de los NTC-quitosano y un espectrofotómetro MicroRaman DRX (ThermoScientific, USA) para el análisis de los NTC-AF. La caracterización RMN y DOSY 2D se obtuvo mediante un espectrómetro Bruker Avance III (USA), 400 MHz.

2.2.4. Determinación del potencial zeta de las dispersiones NTC-AF

Para la determinación del potencial zeta se preparó una solución (0.1 mg/mL) de NTC-AF a la cual se le determinó su máximo valor de absorbancia a la longitud de onda de absorción de los NTC (265 nm). Luego se introdujo en una cubeta plástica y se determinó su potencial

zeta utilizando un Zetasizer Nano *Particle Analyzer Series* (Malvern, model ZEN3500, Worcestershire, United Kingdom). Las soluciones fueron diluidas utilizando agua destilada como solvente.

2.2.5. Caracterización microscópica de NTC-AF

Los NTC-AF fueron analizados por medio de microscopia electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio electrónico de barrido Quanta FEG SEM con detector de fluorescencia de rayos X (EDX) (Oregon, USA) y por medio de microscopia de fuerza atómica (AFM) utilizando un microscopio de fuerza atómica XE-150 Premier cross-functional AFM with motorized simple stage (Park Systems, Santa Clara, USA). Estos análisis se realizaron en la Universidad Técnica de Dinamarca.

2.2.6. Síntesis de NTP funcionalizados con AF

2.2.6.1. Síntesis de NTP

Los NTP se prepararon siguiendo la metodología utilizada por Gazit y col. Se pesaron 100 mg de FF y se disolvieron con 1 mL de 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) para una concentración final de 100 mg/mL. Luego una alícuota de 20 μ L de FF se disolvió con 980 μ L de agua milliQ y finalmente la solución fue agitada. La concentración final fue de 2 mg/mL.

2.2.6.2. Funcionalización de NTP con AF

Los NTP fueron funcionalizados covalentemente con AF utilizando mediante carbodiimida y N-hidrosuccinimida. Se preparó una solución de AF 6.5 mM y se agregaron 200 μ L a una solución 50 mM de carbodiimida (150 μ L) y 15 mM de N-Hidroxisuccinimida (NHS) (50 μ L), esta solución se dejó en reacción durante 1 h. Luego 266 μ L de AF-carbodiimida-NHS se agregaron a 1 mL de solución de NTP. La solución se agitó durante 15 s, se dejó en reacción durante 2 h. Posteriormente la solución fue lavada 3 veces con agua milliQ y centrifugada (12000 rpm durante 10 min) para retirar el exceso de AF y carbodiimida sin reaccionar. El esquema de la reacción se observa en la figura 17.

2.2.6.3. Funcionalización de NTP con AF y NHS-Atto 532

Los NTP fueron marcados con un fluoróforo de NHS-Atto. El Atto 532 es un fluoróforo con un alto rendimiento cuántico, alta estabilidad térmica y soluble en agua. Posee una longitud de onda máxima de 532 nm y una longitud de onda de emisión de 553 nm.

Se preparó una solución diluida de NHS-Atto 5 mM, 50 μ L de esta solución se agregó a una solución de AF-carbodiimida (500 μ L), la solución final se agitó durante 30 s y se dejó en reacción durante 1 h. Posteriormente la solución compuesta de AF, carbodiimida y NHS-Atto se agregó a los nanotubos agitando durante 2 horas. Se realizaron varios lavados y centrifugaciones con agua milliQ para retirar los excesos de AF, carbodiimida y NHS-Atto.

La solución final fue refrigerada (4°C) y protegida de la luz para ser vista en el microscopio de fluorescencia.

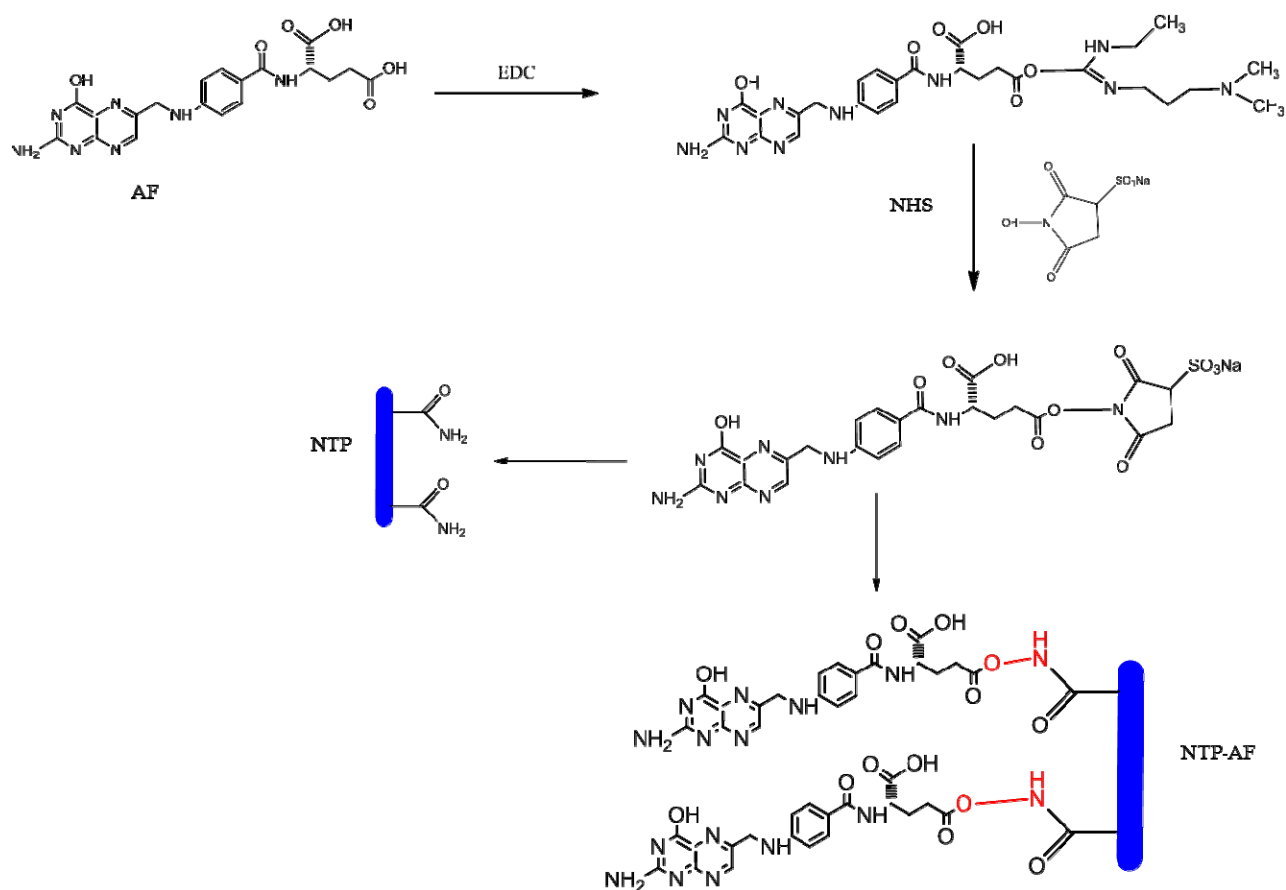


Figura 17. Síntesis de NTP funcionalizados con AF

2.2.7. Caracterización espectroscópica de NTP y NTP-AF

Los espectros UV-vis se tomaron en un espectrofotómetro Agilent-HP 8453 utilizando celdas de cuarzo de 1.0 cm de longitud. Los espectros fueron graficados y analizados utilizando el software Origin 8.0. Los espectros Raman fueron tomados en un espectrofotómetro microscopio Raman DRX (ThermoScientific).

2.2.8. Caracterización microscópica NTP y NTP-AF

Los NTP funcionalizados y sin funcionalizar fueron analizados por microscopia de fluorescencia utilizando un microscopio de fluorescencia Cell Observer Zeiss (Germany). La estructura de los NTP y NTP-AF fue analizada mediante AFM por medio de un microscopio XE-150 Advanced SPM y las imágenes fueron analizadas utilizando el software XEI 1.8.0

Data & Processing Analysis. Adicionalmente los nanotubos fueron analizados por microscopia SEM utilizando un microscopio SEM Quanta FEG. Estos análisis se realizaron en la Universidad Técnica de Dinamarca.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Estudio de la dispersión de los NTC en soluciones acuosas de quitosano

En la figura 18 se observan el sistema NTC-quitosano (pH 4-5) totalmente homogéneo, lo cual demuestra la solubilización de los NTC. Similares resultados se obtuvieron en otros trabajos realizados con quitosano (Shieh y col. 2010).

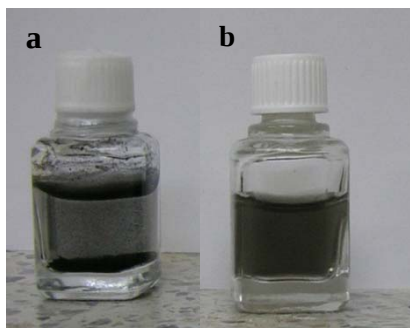


Figura 18. Nanotubos de carbono antes (a) y después de la solubilización en quitosano (b)

El análisis por espectroscopia UV/Vis mostró una banda de máxima absorbancia a 265 nm (figura 19) característica de las transiciones electrónicas de los electrones π presentes en la estructura del grafeno. Esta banda característica ha sido observada en otros trabajos con NTC (Jeong y col., 2007; Attal y col., 2006). El espectro UV-vis no muestra ninguna señal relacionada con el quitosano.

Un indicio del grado de solubilización de los NTC es la resolución observada en los espectros de absorción UV-vis. En la figura 2.5 se aprecian varios picos resueltos en el intervalo de longitudes de onda 500-800 nm, precisamente en esta región se encuentra una de las transiciones pertenecientes a las singularidades de van Hove (750 nm) E_{11} (Ahmad y col., 2009).

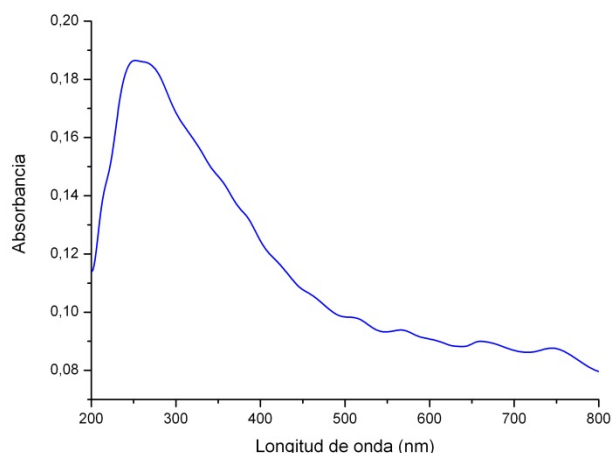


Figura 19. Espectro UV-vis de NTC-quitosano

2.3.2. Análisis de la fluorescencia del quitosano por NTC

El efecto de apagamiento o de desactivación de la fluorescencia hace referencia a cualquier proceso que disminuye la intensidad en la fluorescencia emitida por una sustancia (Lu y col., 2009). Dentro de los procesos conocidos que causan el apagamiento se encuentran: transferencia de energía, formación de complejos y por colisiones moleculares. Los NTC han sido reportados como agentes desactivadores de la fluorescencia de varios fluoróforos y otras moléculas que emiten fluorescencia. Este efecto fue observado en este trabajo.

En la figura 20 se aprecia el espectro de emisión del quitosano a una longitud de onda de 418 nm, esta emisión desaparece o es apagada casi en su totalidad en presencia de NTC o cuando el quitosano se encuentra unido a él, evidenciando de esta manera la interacción molecular entre el polisacárido del quitosano y el NTC que produce el efecto de apagamiento del quitosano por parte de los NTC.

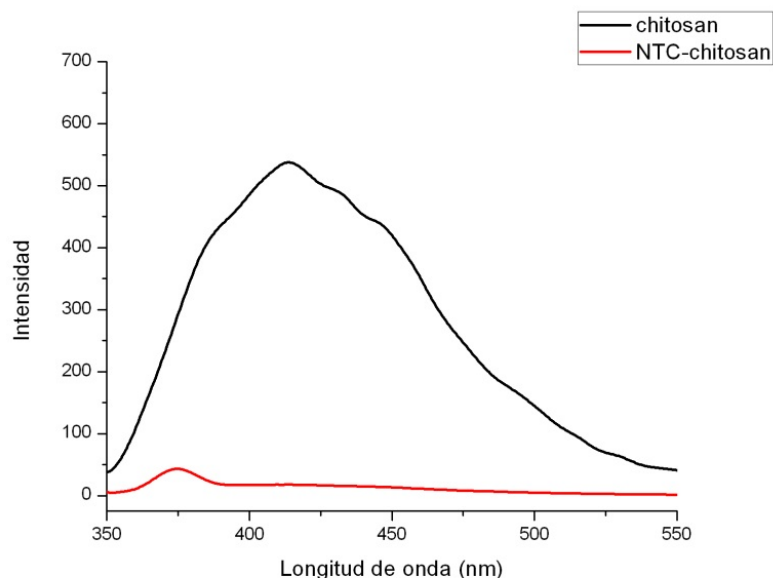


Figura 20. Espectro de emisión del quitosano y del quitosano conjugado a NTC

2.3.3. Análisis Raman de dispersiones de NTC en quitosano

La espectroscopia Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de compuestos orgánicos e inorgánicos. Está basada en el fenómeno inelástico de la dispersión de la luz que permite el estudio de vibraciones y rotaciones moleculares. Es una de las técnicas más utilizadas para el análisis y la caracterización de nanotubos de carbono debido a que proporciona información detallada sobre la estructura electrónica, geométrica y vibracional de diferentes tipos de NTC presentes en una muestra.

En la espectroscopia Raman las muestras de NTC-quitosano se excitaron utilizando un láser de 532 nm. La espectroscopia Raman permitió explorar características estructurales y vibracionales del sistema NTC-quitosano. En la figura 21 se aprecian los espectros Raman de los NTC antes y después de la funcionalización con el quitosano. Se pueden apreciar algunas vibraciones características de los NTC en concordancia con los resultados obtenidos en otros trabajos (Graupner y col., 2007) y que se mantienen después de la funcionalización.

En los NTC la banda G representa las vibraciones de la hibridación sp^2 del doble enlace C=C. Claramente se pueden apreciar las bandas G y G' las cuales corresponden a la vibración fundamental (primer orden) de elongación tangencial y un sobretono de segundo orden ubicados a 1500 y 1650 cm^{-1} respectivamente. En la zona entre 1250 y 1400 cm^{-1} se ubica la banda D en ambos espectros. Esta banda es conocida como la banda de desorden inducido e indica la presencia de defectos en el NTC, que en el caso de los espectros es extremadamente débil.

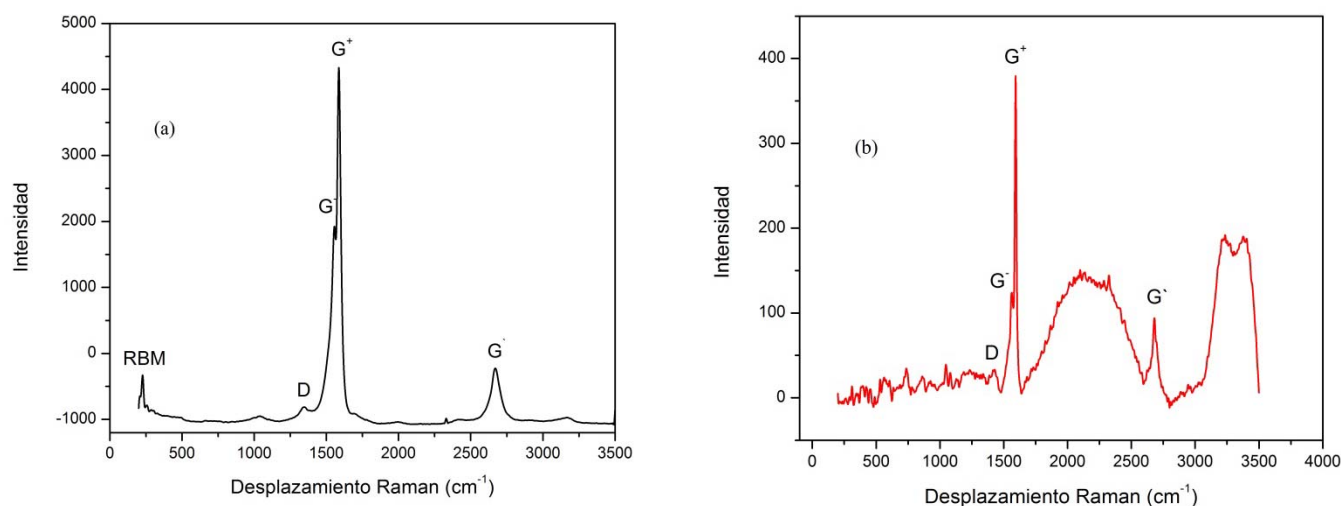


Figura 21. Espectro Raman de (a) nanotubos de carbono y (b) nanotubos de carbono-quitosano

Mediante el cálculo de la relación de intensidades entre las bandas D y G es posible extraer información sobre el número de defectos sobre las paredes del NTC, indicando así si los NTC fueron funcionalizados o no. La relación de la banda D y G para el NTC sin funcionalizar fue 0.0637 y la relación para el NTC-quitosano fue de 0.096 evidenciando así la presencia del quitosano sobre las paredes del nanotubo.

2.3.4. Análisis de NTC-quitosano por AFM

La microscopia de fuerza atómica (AFM) es una técnica útil capaz de registrar continuamente la topografía de nanoestructuras mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda está acoplada a una cantiléver (palanca microscópica) muy flexible de sólo 200 μm . La AFM ha sido útil para la caracterización de nanoestructuras debido a su alto poder de resolución y a la capacidad para detectar cambios en la topografía de la superficie

(ver figura 22) (Jalili y col., 2004). Por esta razón la AFM fue utilizada para evaluar las dispersiones de NTC-quitosano, además el tamaño y diámetro de algunos NTC pueden ser identificados como nanotubos individuales.

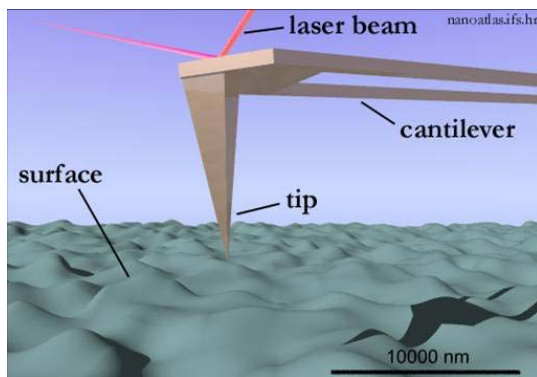


Figura 22. Esquema del funcionamiento de la AFM.

Para el análisis de la dispersión de los NTC por AFM, 10 μL de la dispersión NTC-quitosano fueron depositados sobre un portamuestras de silicio. La solución fue evaporada a temperatura ambiente durante 3 horas. Las muestras fueron analizadas utilizando una sonda tipo no-contacto de silicio recubierto con una película de aluminio, con una constante de fuerza de 42 N/m y una frecuencia de 330 kHz.

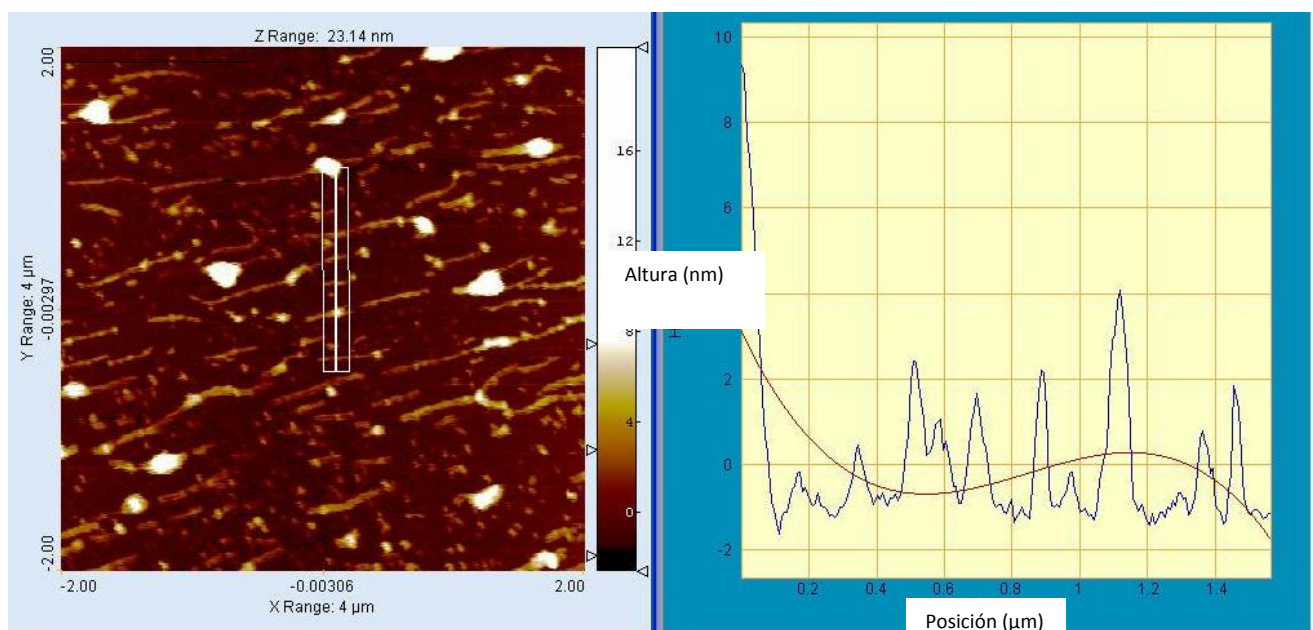


Figura 23. Imágenes AFM de la dispersión de NTC-quitosano

En la figura 23 se aprecian NTC de diferentes tamaños y diámetros, los cuales como se observa en la figura están totalmente separados y cubiertos con moléculas de quitosano. Los residuos de quitosano probablemente podrían ser aquellos aglomerados (blancos) que se observan con mayor intensidad y de forma casi esférica sobre la superficie de algunos de los nanotubos.

La línea de perfil que incluye aproximadamente 4 nanotubos individuales indica el diámetro de cada uno de ellos. Los NTC con diámetros mayores de 2 nm son nanotubos recubiertos por el quitosano, debido a que el quitosano recubre los nanotubos y produce un aumento en la superficie su superficie.

La separación de los NTC en nanoestructuras individuales cubiertas por quitosano hace que los nanotubos puedan ser dispersados en soluciones acuosas de pH ácido, y los convierte en candidatos potenciales para diferentes aplicaciones biomédicas.

De esta manera la caracterización espectroscópica Raman y por AFM de la dispersión NTC-quitosano evidencia la unión de los NTC con el quitosano, probablemente por una interacción

de tipo no covalente, como se ha explicado en algunos estudios encontrados en la literatura (Zheng y col., 2011; Long y col., 2008).

2.3.5. Análisis UV-Vis de los NTC funcionalizados con el AF

Los NTC-AF fueron preparados por dos metodologías, la primera permite una unión covalente mediante el uso de carbodiimida (EDC) y *N*-Hidroxisuccinimida (NHS) y la segunda una funcionalización no covalente sin el uso de linkers ni tratamientos oxidativos fuertes.

No se observaron diferencias en los espectros UV-vis, de fluorescencia y Raman de los NTC-AF preparados por los dos procedimientos.

El espectro de la figura 24 muestra tres bandas de absorción UV, las cuales corresponden a la banda de absorción de la estructura tubular de los NTC (265 nm) (Attal y col., 2006), y dos bandas adicionales correspondientes a la estructura del AF, 282 y 364 nm respectivamente. El espectro fue tomado luego de lavar y centrifugar el conjugado con agua destilada, para eliminar el exceso de AF que no reaccionó.

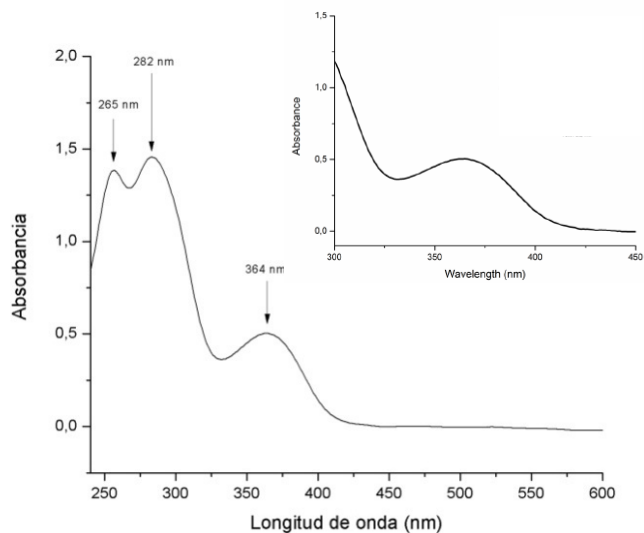


Figura 24. Espectro UV-vis NTC-AF (recuadro espectro UV-vis AF)

2.3.6. Estudio por fluorescencia de los NTC-AF

La literatura indica un apagamiento de fluorescencia causado por los NTC (Lu y col., 2009) y ha sido considerado como un efectivo “quencher” en la actividad fluorescente de varios fluoróforos.

El AF libre y conjugado con los NTC fue excitado a una longitud de onda de 364 nm y presentó una emisión alrededor de 475 nm. El espectro de la figura 25, efectivamente muestra una disminución en la emisión de fluorescencia del AF en presencia de los NTC. La literatura ha explicado el efecto de apagamiento de varias moléculas en presencia de los NTC y este efecto se atribuye a la transferencia electrónica. El efecto de apagamiento del AF por los NTC puede ser un indicio de la interacción de estos dos compuestos para formar el respectivo conjugado, sin embargo este efecto no fue estudiado con detalle en este trabajo.

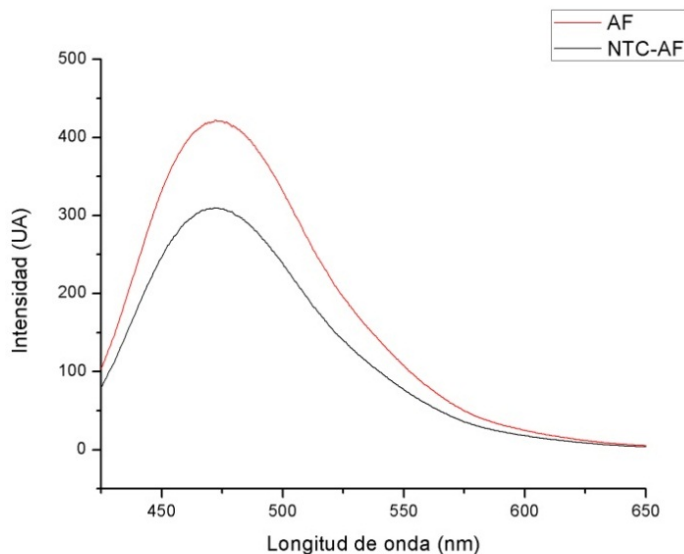


Figura 25. Espectros de emisión de AF libre y conjugado a los NTC (λ_{exc} = 364 nm).

2.3.7. Estudio Raman de los NTC-AF

El espectro Raman del sistema NTC permitió demostrar la dependencia del espectro de los NTC con la energía del láser de excitación, como consecuencia del proceso Raman resonante. Para el análisis de los NTC-AF se utilizó un equipo MicroRaman equipado con dos láseres con longitudes de onda de 532 nm (verde) y 785 nm (rojo) respectivamente. Las

muestras (10 μL de dispersión NTC-AF) fueron depositadas sobre portamuestras de silicio y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Por medio del microscopio del equipo Raman se escogió un área densamente poblada por los NTC y se excitó con el láser 532 nm y posteriormente con el láser de 785 nm. En la figura 26 se hace una comparación de los espectros Raman de los NTC sin funcionalizar a 532 nm y 785 nm respectivamente.

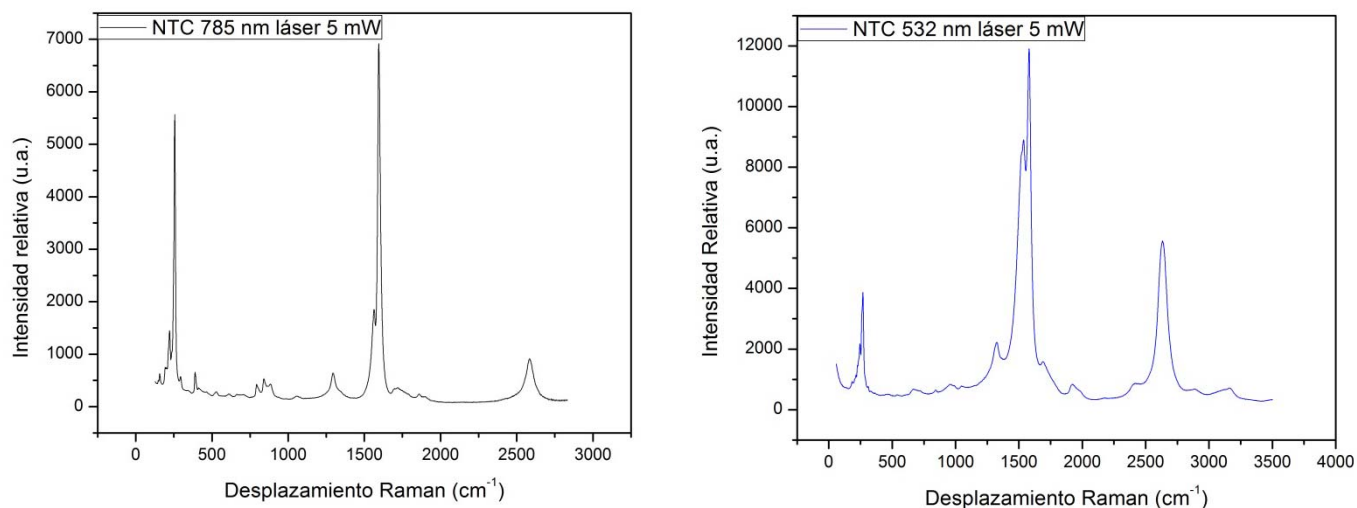


Figura 26. Espectros Raman de NTC sin funcionalizar utilizando dos láseres a (a) 785 nm y (b) 532 nm respectivamente

Como se aprecia claramente en la zona comprendida entre 750 y 1000 cm^{-1} se observan una serie de picos que no se observan en el espectro Raman utilizando el láser de 532 nm. Además se aprecia una mejor resolución de las bandas a 1300 cm^{-1} y la banda a 1589 cm^{-1} obtenidas con el láser de 785 nm, por el contrario el láser de 532 nm no permite diferenciar claramente estas dos bandas. Esto probablemente sea debido a cambios en la vibración molecular debido a la utilización de un láser más energético. Con base en estos resultados los siguientes experimentos Raman se llevaron a cabo utilizando el láser a 785 nm.

Los espectros Raman de la figura 26 concuerdan plenamente con los indicados en la literatura (Graupner y col., 2007), identificándose que las bandas más importantes de los NTC se encuentran presentes. Por ejemplo en la zona comprendida entre 200 cm^{-1} y 300 cm^{-1} se observan los modos conocidos como RBM (Radial Modes Breathing). Los modos de

respiración radial son característicos de los NTC de pared simple y están relacionados de manera inversa con el diámetro del nanotubo, y posteriormente se demostrará que son útiles en la evaluación de la funcionalización de los NTC. La banda intensa a 1589 cm^{-1} es conocida como la banda G correspondiente a las vibraciones tangenciales de los nanotubos. Las otras dos bandas características son las bandas D (desorden inducido) y G^- ubicadas a 1300 cm^{-1} y 2600 cm^{-1} respectivamente. Estas bandas aportan información sobre la estructura electrónica y fonónica de los NTC (Dresselhaus y col., 2002; Jinno y col., 2006). En la figura 27 se observa el espectro Raman identificando vibraciones asociadas a cada una de las bandas de los NTC.

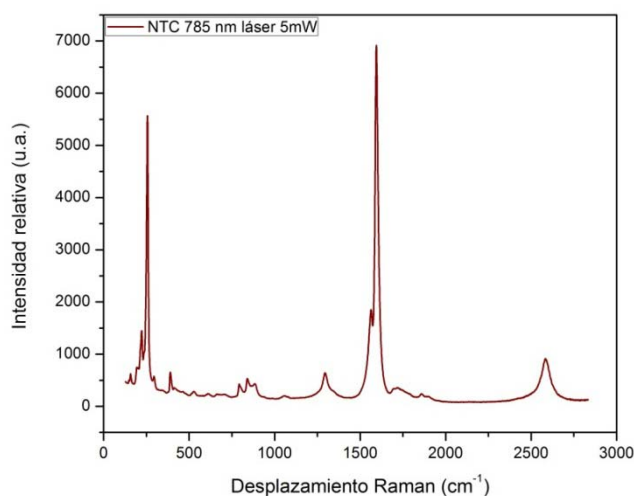


Figura 27. Modos vibracionales característicos de NTC.

Los modos RBM sirven como referencia para caracterizar los NTC funcionalizados con diferentes tipos de moléculas. Recientemente Horn y cols utilizaron los modos RBM para evaluar el estado de dispersión y agregación de una muestra de NTC (Horn y col., 2012). Para evaluar el grado de funcionalización de los NTC con alcanos lineales se utilizó como referencia las intensidades de las bandas Raman correspondientes a los RBM. En este trabajo los NTC funcionalizados fueron evaluados tomando como base el valor de la intensidad del modo a 270 cm^{-1} . La comparación de los espectros Raman de una muestra de NTC y NTC-AF se indica en la figura 28 y se observó una disminución en la intensidad de los NTC-AF, asociada a la presencia del AF alrededor del nanotubo que en cierto modo afecta los modos RBM y está “asfixiando” al NTC evitando su “respiración” y su vibración radial en

la superficie de los nanotubos. Este fenómeno ha sido observado en otros trabajos y ha permitido evaluar la funcionalización de NTC (Kim y col., 2005).

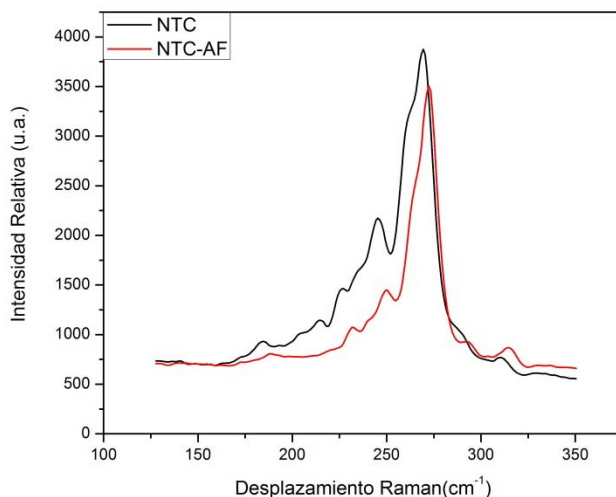


Figura 28. Comparación de los RBM de NTC y NTC-AF.

Además de los modos RBM las bandas G y D también han sido utilizadas para la caracterización de NTC funcionalizados mediante el cálculo de la relación de sus intensidades. Cuando el valor de la relación de intensidades se aproxima a 1 significa que un gran número de defectos superficiales están en la superficie del nanotubo. Por ejemplo los NTC de pared múltiple tienen valores de relación de intensidades cercanos a la unidad debido a la gran cantidad de capas concéntricas de nanotubos de carbono. Esta información fue utilizada para calcular la relación de intensidades de las bandas D y G de NTC funcionalizados y sin funcionalizar.

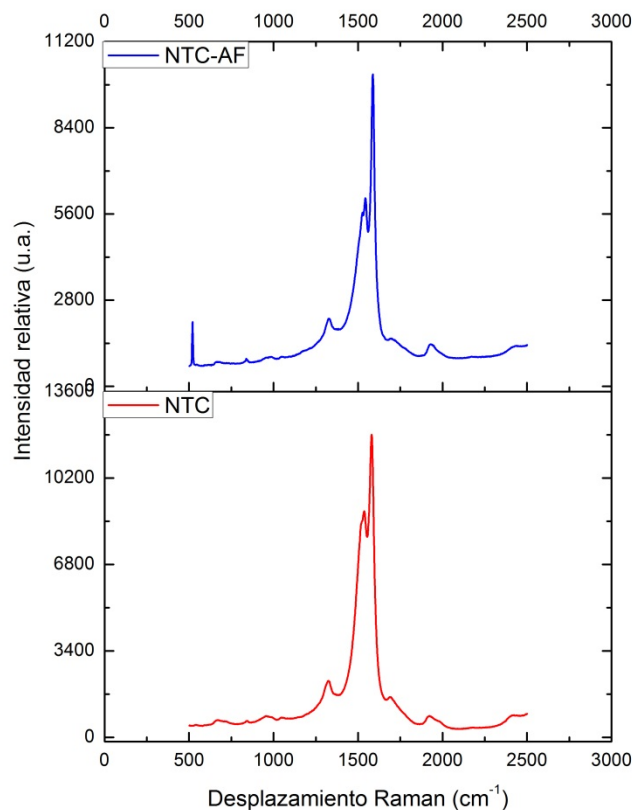


Figura 29. Espectros Raman de NTC y NTC-AF.

En la figura 29 se comparan los espectros Raman de los NTC y NTC-AF y se observó un cambio en la intensidad de las bandas y se realizó el cálculo de la relación de intensidades. En la tabla se aprecian los valores de las relaciones.

Tabla 13. Calculo de la relación de intensidades de las bandas G y D para NTC y NTC-AF

Muestra	Intensidad banda D	Intensidad banda G	I_D/I_G
NTC	2219	11900	0.18
NTC-AF	2220	10121	0.21

Aunque la diferencia en las relaciones de las intensidades para NTC y NTC-AF no es muy notoria, esta leve diferencia significativa indica la presencia de defectos en la superficie de

los NTC, los cuales son debidos probablemente a la presencia del AF, que a pesar de ser una interacción débil tipo no covalente permite establecer la unión del AF con el NTC.

2.3.8. El estudio de coeficiente de difusión por RMN de NTC y los NTC-AF permitió la caracterización de la unión del AF a los NTC

La espectroscopia bidimensional DOSY (Diffusional Ordered Spectroscopy) es una técnica de separación no invasiva para el análisis de mezclas multicomponentes (Kuang y col., 2012; Cohem y col., 2005; Viel y col., 2003). La técnica está basada en la aplicación de un gradiente de campo pulsado a lo largo del tubo de RMN y va discriminando los componentes de la mezcla de acuerdo a su coeficiente de difusión (CD). El CD es una propiedad física que depende del tamaño y de la forma de las moléculas, además de factores como la temperatura y la viscosidad, y se obtiene por medio de la siguiente ecuación denominada Debye-Einstein (Cohem y col., 2005).

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta\gamma_s} \quad (1)$$

Dónde:

D es el coeficiente de difusión, k es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, η la viscosidad de la solución y γ_s es el radio hidrodinámico de la molécula. La información obtenida en un espectro 2D-DOSY es representada en una gráfica bidimensional de desplazamiento químico (ppm) y coeficiente de difusión (cm^2/s), como se aprecia en la figura 30.

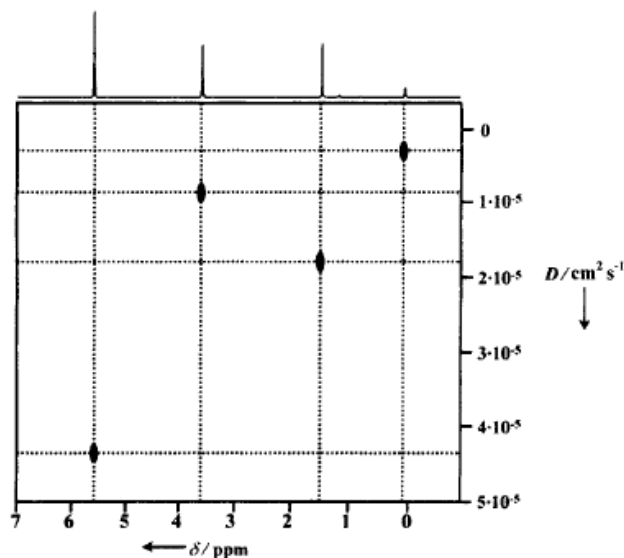


Figura 30. Espectro 2D DOSY (Kim y col., 2005).

Esta es una técnica realmente nueva para la caracterización de NTC conjugados con biomoléculas. Uno de los primeros trabajos que utilizó la técnica de RMN 2D DOSY fue realizado por el grupo de Prato y col en 2010, en este estudio se utilizó para monitorear la funcionalización, purificación y composición de NTC funcionalizados con polietilenglicol (PEG).

En esta tesis se presenta a continuación el uso del 2D DOSY RMN para la caracterización del conjugado NTC-AF, estos resultados fueron publicados en la prestigiosa revista Carbon (Castillo y col., 2012).

Para medir el espectro 2D-DOSY RMN para el conjugado NTC-AF, las muestras fueron preparadas disolviendo 400 μL de la muestra en 100 μL de agua deuterada (D_2O). Para los experimentos bidimensionales DOSY se utilizó un gradiente pulsado por medio de una secuencia programada *ledbpgp2s*, por cada gradiente se utilizaron 32 barridos y un tiempo de difusión 0.05 s. Todos los experimentos fueron realizados a 298 K. Se utilizó el software Topspin 2.1 para el procesamiento de los espectros.

Los espectros RMN correspondientes a la carbodiimida, AF libre, quitosano y al AF conjugado al NTC se encuentran en la figura 31. Como se aprecia en la figura 31d es evidente la presencia de las señales correspondientes del quitosano y el AF.

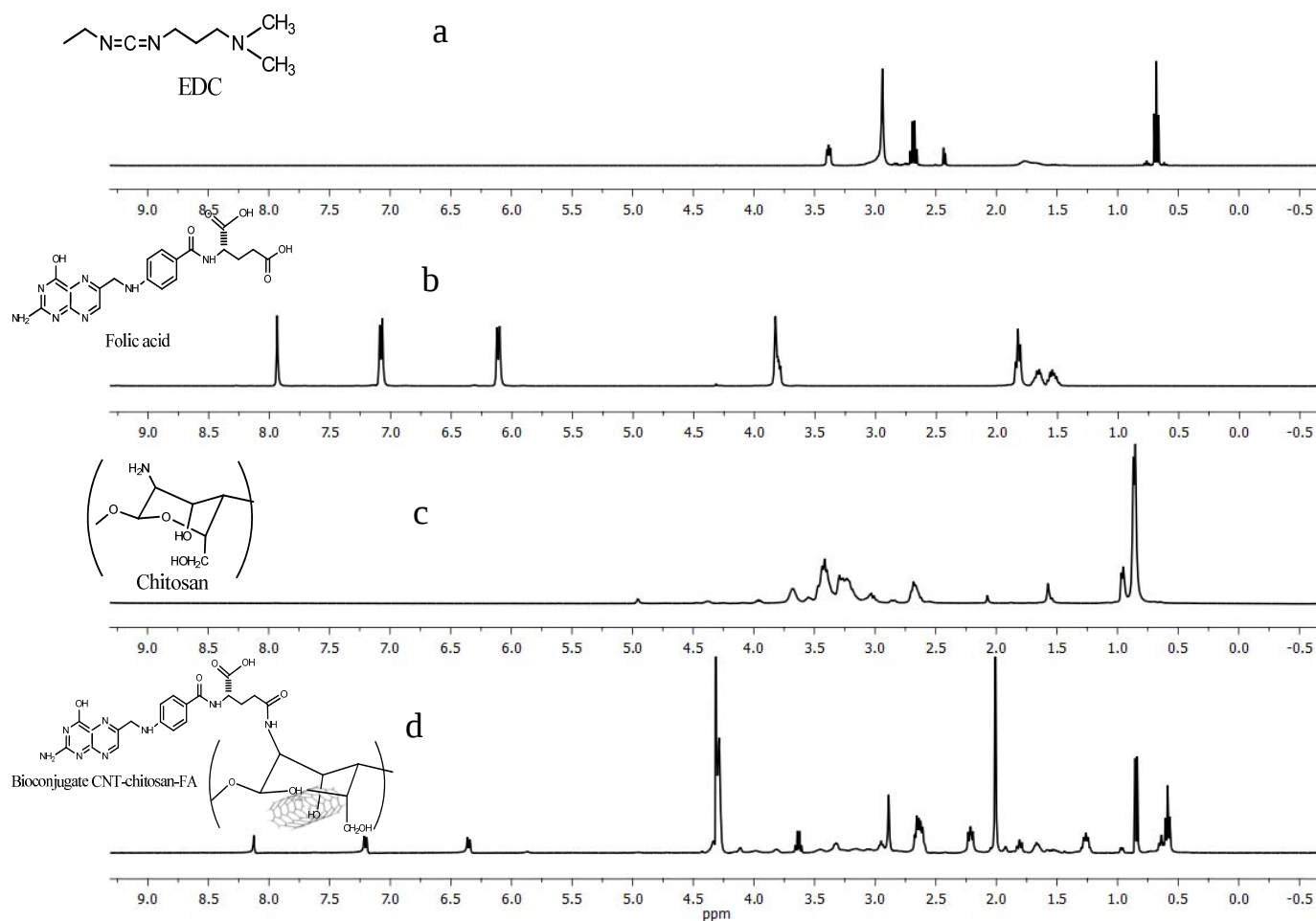


Figura 31. Espectros de RMN: a) carbodiimida (EDC), b) AF, c) quitosano and d) NTC-AF

El espectro 31d presenta una señal intensa a 1.90 ppm la cual es atribuida a los protones de los grupos metilos que se encuentran en la isourea, la cual es un producto secundario de la reacción entre el quitosano y el AF. Las señales protónicas a 6.37 (d, $J=8.7$ Hz, 2H), 7.21 (d, $J=1.7$ Hz, 2H) corresponden a desplazamientos químicos de los protones de la región del ácido p-amino benzoico del AF y la señal a 8.61 (s, 1H) pertenece al protón de la parte pteridina del folato. Se observa también un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos del AF conjugado comparado con las señales del AF libre las cuales se encuentran en 6.12 (d, $J=8.3$ Hz, 2H), 7.06 (d, $J=8.3$ Hz, 2H) y 7.93 (s, 1H). Este desplazamiento probablemente ocurra debido al efecto protector de los electrones π de los NTC los cuales inducen una corriente y un campo magnético en la dirección opuesta al campo aplicado, generando el efecto protector y desplazando las señales del AF hacia campo alto.

La ecuación de Stejskal-Tanner muestra la relación entre el decaimiento en la amplitud de la señal RMN con el coeficiente de difusión.

$$S = S_0 e(D\gamma^2\delta^2g^2\Delta)$$

Dónde: S: amplitud de la señal, S_0 : amplitud de la señal en ausencia de difusión, D: coeficiente de difusión, γ : radio giromagnético, δ : duración del gradiente del pulso, g: fuerza del gradiente y Δ : tiempo de difusión. Adicionalmente esta ecuación relaciona la dependencia de la amplitud de la señal con los parámetros utilizados para la aplicación del gradiente de campo pulsado (γ , g y Δ). La atenuación en las señales de los desplazamientos químicos del AF libre y conjugado fue utilizada para el cálculo del coeficiente de difusión.

La representación de los experimentos 2D DOSY se pueden apreciar en la figura 32. En la gráfica se observa una representación bidimensional, donde el eje x representa los desplazamientos químicos y el eje y representa el log natural de los coeficientes de difusión. Las posiciones en donde coinciden los dos ejes representan los coeficientes de difusión para cada una de las especies presentes en el conjugado NTC-AF.

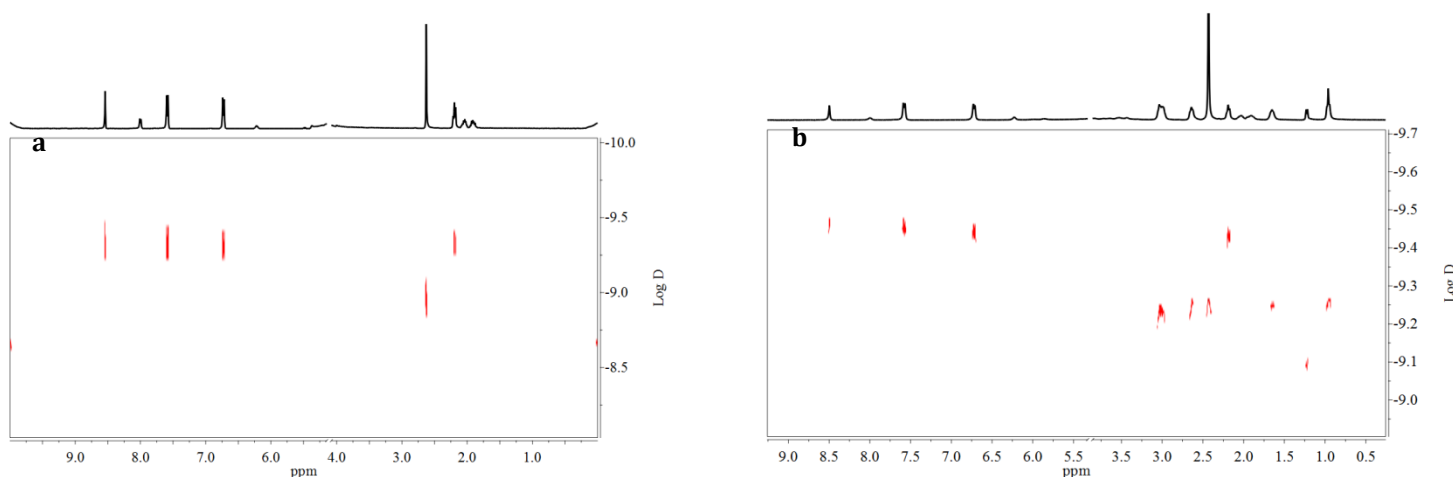


Figura 32. Espectros 2D DOSY de a) AF y b) NTC-AF

La figura 32a muestra el mapa bidimensional de los coeficientes de difusión (CD) del AF libre en donde todas las señales de los protones presentan el mismo CD, con un valor de $5.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, este valor se calculó sacando por medio del anti log D. Por otro lado en la figura 32b las señales correspondientes al AF conjugado presentan un valor de $3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, la presencia de otro compuesto es corroborado por las señales de protones con un mismo CD

de $5.9 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, la cual corresponde probablemente a la isourea la cual es un producto secundario de la reacción.

Los valores de CD mostrados arriba demuestran que el AF se difunde más rápidamente debido a su menor tamaño, que el AF conjugado al NTC el cual por ser un compuesto de mayor tamaño se difunde a una menor velocidad, eso evidencia la formación del compuesto NTC-AF. El DOSY puede ser utilizado como una herramienta muy útil para la obtener información acerca de moléculas funcionalizadas sobre la superficie de diferentes tipos de nanoestructuras (Hu y col., 2005).

2.3.9. Los NTC-AF fueron estables a pHs fisiológicos

El potencial zeta (PZ) es una propiedad física que está relacionada con la estabilidad de dispersiones coloidales y da un indicio del grado de repulsión entre las partículas cargadas en la dispersión (Castillo y col., 2012). Existe un rango para el cual las partículas pueden ser estables o inestables, aquellas partículas con valores de entre +30 mV y -30 mV son consideradas inestables con alta probabilidad de precipitación. Por otro lado partículas con PZ más positivos que +30 mV y más negativas que -30 mV son consideradas como estables. En este trabajo se obtuvo un valor de PZ de -32.4 mV a pH 7.0 (ver figura 33), lo que indica que el conjugado NTC-AF forma dispersiones estables a pH fisiológico, convirtiéndolo en candidato ideal para aplicaciones biológicas.

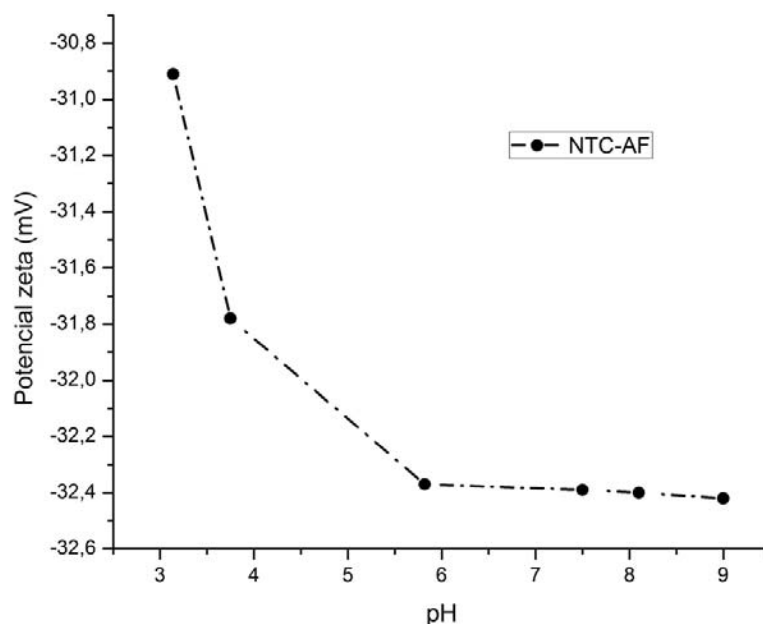


Figura 33. Potencial zeta de dispersiones de NTC-AF a diferentes valores de pH

2.3.10. La microscopia SEM evidencio la unión NTC-AF

Una solución de NTC-AF (10 μ L) fue colocada sobre un sustrato de silicio (silicon wafer) y se dejó evaporar hasta sequedad para ser analizada por SEM. El mismo procedimiento se realizó para una muestra de NTC sin funcionalizar.

A continuación se observan las fotografías SEM de los NTC sin funcionalizar junto con el análisis elemental realizado por el detector EDX.

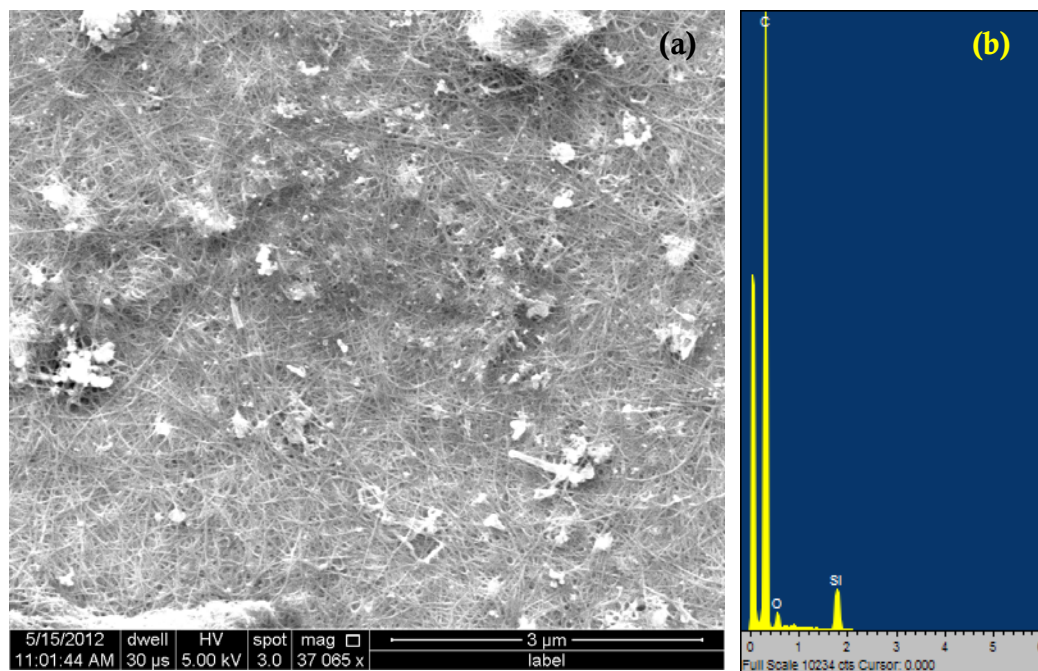


Figura 34. (a) Imagen SEM de NTC sin funcionalizar y (b) Espectro EDX

Según se aprecia en la figura 34, los NTC sin AF presentan demasiadas impurezas, como por ejemplo formas alotrópicas de carbono y residuos de catalizadores, las cuales se observan como grandes agregados, el espectro EDX muestra una banda intensa que indica la alta concentración de carbono. Además se aprecian como los NTC forman madejas enredadas y demasiado largas evitando visualizarlos de manera individual. Esta es una de las razones por las cuales los NTC son insolubles en la mayoría de solventes, las interacciones hidrofóbicas entre los tubos genera agregados como los observados en la figura 34. Debido a esto es necesaria la funcionalización, ya sea covalente o no covalente, para romper estas interacciones y poder así solubilizar estas nanoestructuras.

A continuación se muestran las imágenes SEM de los NTC funcionalizados con AF y su análisis por EDX, figura 35.

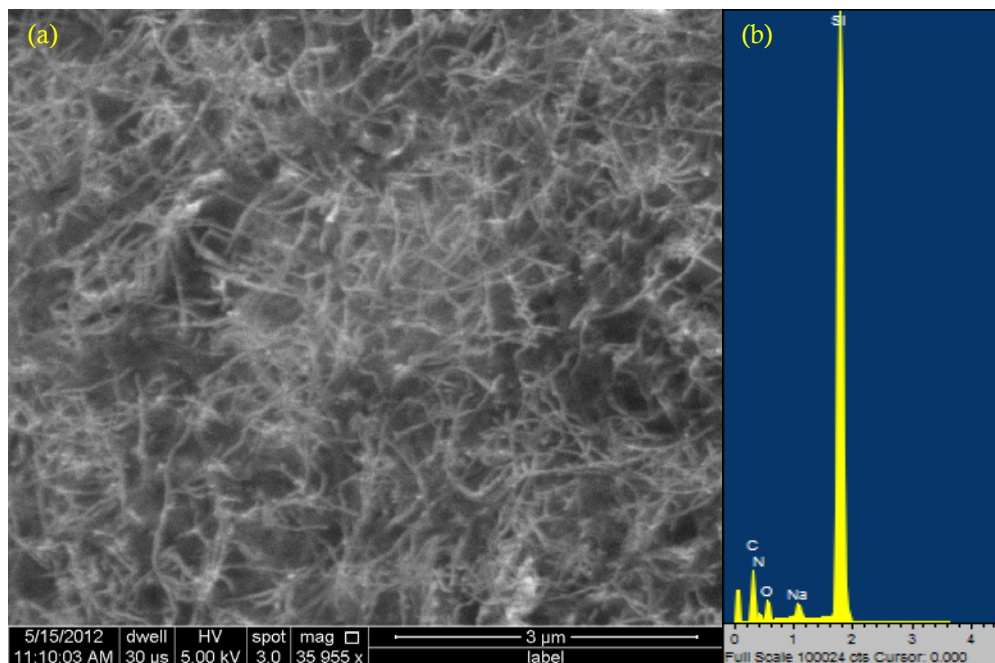


Figura 35. (a) Imagen SEM de NTC-AF y (b) Espectro EDX

En esta imagen los NTC presentan un número menor de impurezas y una menor densidad. El análisis del espectro EDX muestra un espectro con una banda del carbono menos intensa, lo que indica que probablemente un cambio del ambiente de la especie que está aportando carbono. Además se observa la presencia de bandas en la zona entre 0.3-1.3 eV asociadas a los elementos nitrógeno y sodio respectivamente. Estos dos últimos elementos pertenecen a la estructura del AF (el ácido fólico fue disuelto en NaOH), lo cual podría sugerir que la funcionalización de los nanotubos de carbono con el AF ocurrió. De esta manera el procedimiento usado para la funcionalización no covalente mediante la sonicación de NTC con AF es una nueva estrategia para la purificación y funcionalización de los nanotubos.

En un experimento adicional los NTC fueron dispersos utilizando una concentración más baja de AF (0.5 mM) y fueron ultrasonificados aproximadamente 1 hora. Este procedimiento permitió obtener NTC-AF cortos y mejor dispersos.

En la figura 36 se puede apreciar más claramente los NTC-AF vistos como nanoestructuras individuales y con una menor presencia de “madejas” de nanotubos.

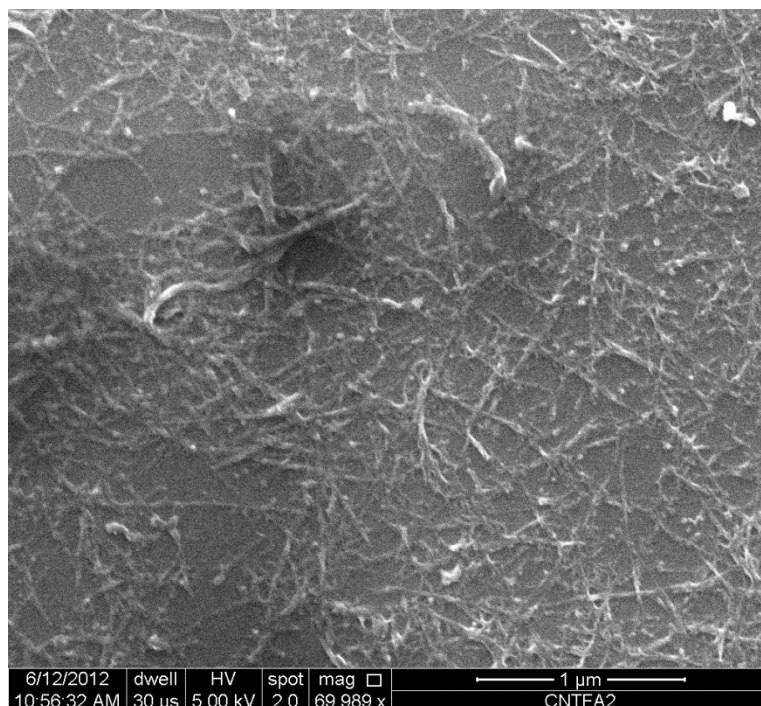


Figura 36. (a) Imagen SEM de NTC-AF presentes como nanotubos individuales

2.3.11. Las imágenes de AFM mostraron al AF cubriendo las paredes de los NTC

Para la microscopia AFM se utilizaron puntas de silicio recubiertas con aluminio y se empleó el modo de no-contacto para el análisis de topografía del conjugado NTC-AF. Se utilizaron portamuestras de silicio sobre los cuales se depositaron 5 μ L de NTC-AF y se dejó secar a temperatura ambiente.

A continuación se observa la figura 37 las imágenes AFM de los NTC-AF. El área escaneada fue de 3 μ m x 3 μ m.

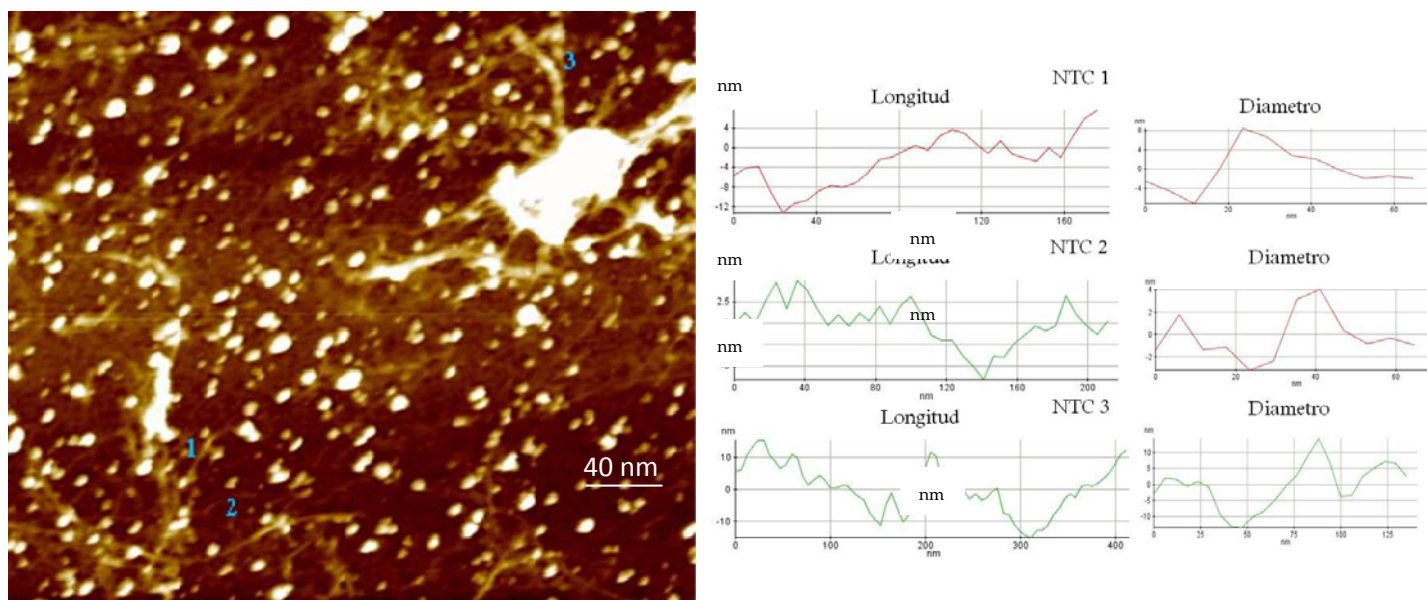


Figura 37. Imagen AFM de NTC-AF y líneas de perfil topológico para varios NTC-AF (área escaneada 3 μm x 3 μm)

Para apreciar los NTC funcionalizados con AF se observa en la imagen AFM unas especies de puntos amarillos grandes los cuales probablemente son aglomerados de AF que no se enlazan a los nanotubos. En la figura 37 se indican algunos nanotubos enumerados del 1 al 3, los cuales corresponden a NTC de diferente tamaño y diámetro. El tubo 1 posee una longitud de 170 nm y un diámetro de aproximadamente 8 nm. Originalmente los NTC fueron adquiridos comercialmente con un diámetro entre 1 y 2 nm, lo cual indicaría que el aumento en el diámetro es debido a un recubrimiento con moléculas de AF. De otro lado el tubo 2 con una longitud de 130 nm y un diámetro de 4 nm posee un recubrimiento con un menor número de moléculas de AF. El nanotubo número 3 posee una longitud 300 nm y un diámetro de 12 nm, como se aprecia en la figura 37, sobre la superficie del NTC se observan varias zonas amarillas y brillantes que son debidas al AF “envolviendo” al NTC lo cual indicaría la funcionalización no covalente de los NTC con el AF.

En la figura 38 se aprecia una imagen AFM 3D del NTC-AF número 3, en ella se observa más claramente el NTC recubierto por el AF.

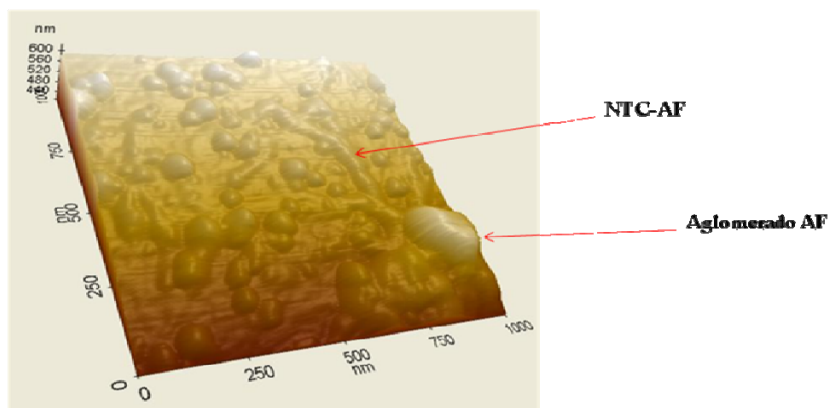


Figura 38. Imagen AFM en 3D de NTC-AF

Para disminuir la presencia de aglomerados de AF se realizó un experimento adicional pero esta vez utilizando concentraciones más bajas de AF (1 mM) para lograr una mejor dispersión de los NTC y menos interferencia por parte del AF no enlazado. Las imágenes se muestran a continuación en la figura 39.

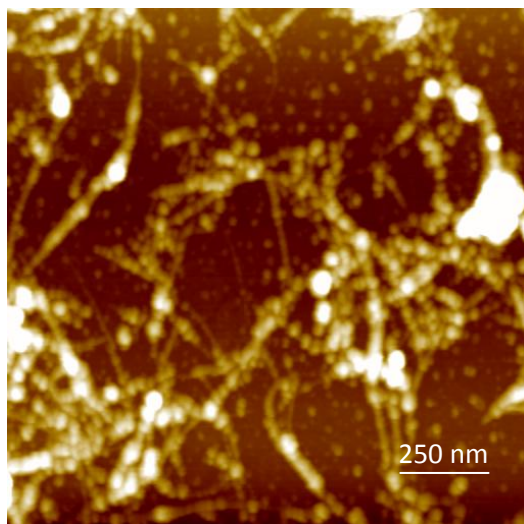


Figura 39. Imagen AFM de NTC-AF.

Aunque se observan aun residuos de AF libre, esta cantidad es menor si se compara con los aglomerados de AF de la figura 37. Se escogió un NTC-AF de una longitud aproximada de 1 μm el cual presenta zonas con diferentes diámetros debido a cantidades variables de AF recubriendo la superficie. Los diámetros variables observados en este NTC se presentan en la figura 40 y además se observa la línea de perfil topológica para la zona analizada. La zona

1 del NTC presenta un diámetro de 2 nm probablemente en esta zona del nanotubo no fue recubierta por el AF. La zona 2 del NTC presenta un diámetro de 8 nm, el aumento en el diámetro es debido al recubrimiento por una cantidad indeterminada de AF. La cantidad de AF que recubre al nanotubo aumenta drásticamente hasta alcanzar un diámetro de aproximadamente 30 nm, esto se aprecia en la zona 3. Finalmente la zona 4 del nanotubo presenta un diámetro de 8 nm. El análisis topológico de este nanotubo muestra que el recubrimiento de los nanotubos por el AF no es totalmente homogéneo, algunas zonas fueron recubiertas con mayores cantidades de AF mientras otras zonas con menores diámetros indican que la cantidad de AF enlazado al NTC fue menor.

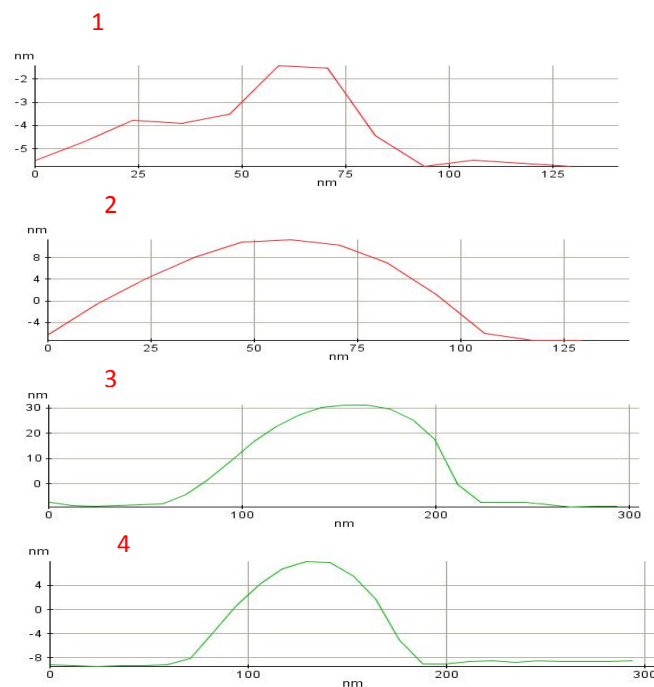
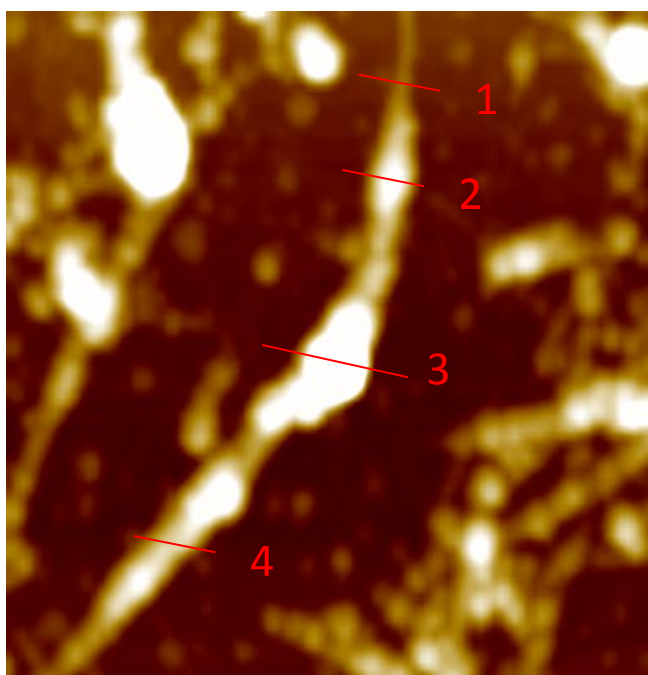


Figura 40. Imagen ampliada AFM de NTC-AF y líneas de perfil topológico para un NTC recubierto por diferentes cantidades de AF (escala 3 μm x 3 μm)

El mismo NTC-AF de la figura anterior es representado en la siguiente imagen 3D.

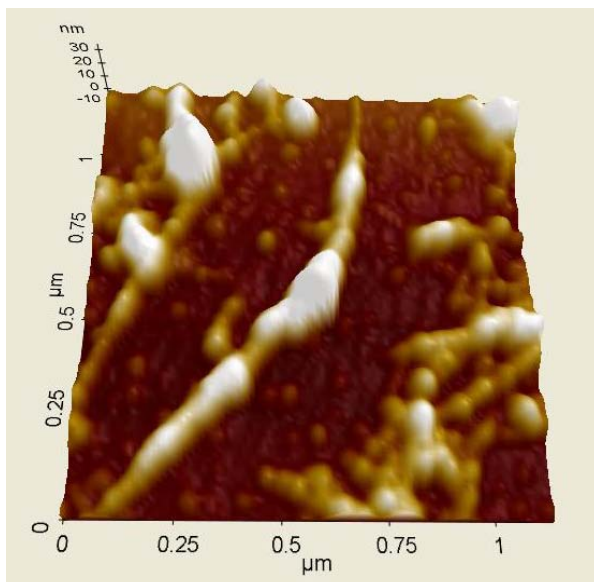


Figura 41. Imagen AFM 3D del NTC-AF

2.3.12. Funcionalización de NTP con AF

2.3.12.1. La espectroscopia UV-Vis mostró la formación NTP-AF

El conjugado NTP-AF fue preparado en presencia de EDC/NHS. La EDC perteneciente a la familia de las carbodiimidas, es uno de los compuestos más utilizados para la conjugación entre grupos -COOH y -NH_2 que conlleva a la formación de enlaces amido (Castillo y col., 2012). La hidrólisis del intermediario EDC-AF es una de las principales reacciones secundarias que puede romper el enlace EDC-AF. Por esta razón se utilizó el NHS (*N*-hidroxisuccinimida), el cual aumenta la estabilidad del éster intermediario formado por la EDC y el AF. La formación del intermediario conocido como *O*-acilisourea permite el ataque nucleofílico por parte de los grupos amino presentes en la superficie de los nanotubos. Para comprobar la funcionalización de los nanotubos con el AF se realizó un análisis por medio de espectroscopia UV-vis.

En la figura 42 se aprecia el espectro UV-vis de los NTP antes y después de la funcionalización con AF.

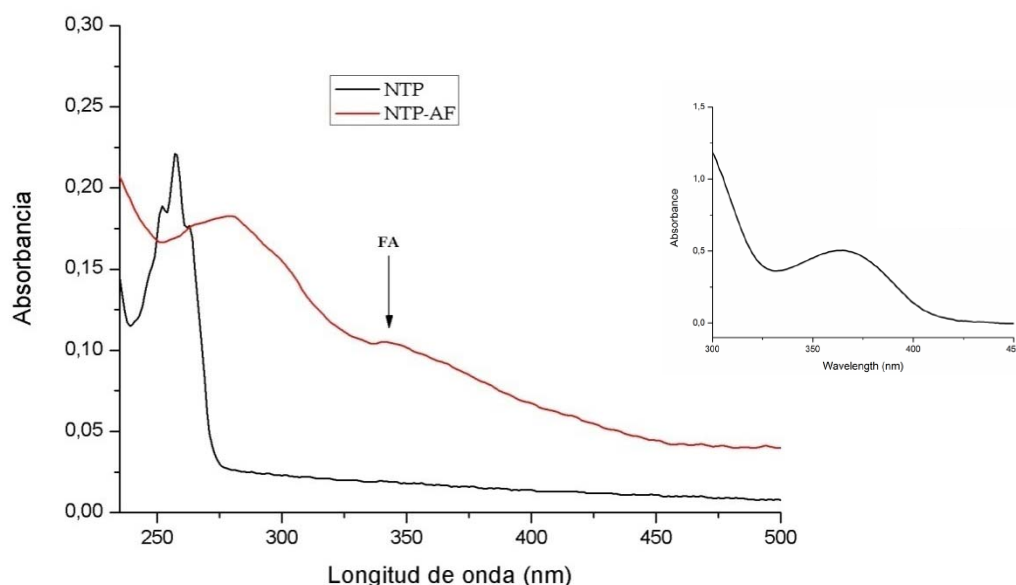


Figura 42. Espectro UV-vis de NTP funcionalizados con AF y del AF sin funcionalizar

En el espectro de los NTP sin funcionalizar se observan tres picos de absorción a 251, 257 and 262 nm correspondiente a transiciones electrónicas π - π de los anillos aromáticos de la estructura de la difenilalanina. Luego de la funcionalización con AF se observa una banda adicional a 341 nm que corresponde a una banda característica del AF. Además se observa un corrimiento del máximo de absorción de los NTP (251 nm a 280 nm) debido probablemente a la interacción del nanotubo con el AF.

2.3.12.2. La espectroscopia Raman evidenció la funcionalización de los NTP con el AF

Las técnicas microscópicas han sido las más utilizadas en la caracterización de los NTP, debido a que brindan información sobre la estructura, estabilidad térmica, flexibilidad y otras propiedades físicas. Sin embargo es necesaria la obtención de información acerca de la estructura química y molecular de los NTP debido a la presencia de grupos funcionales sobre su superficie que incrementan el rango de aplicaciones principalmente en el campo de la biomedicina. La espectroscopia Raman ha sido utilizada con éxito en el estudio de NTC, nanoalambres y nanotubos inorgánicos (Kumar y col., 2012).

Los NTP y NTP funcionalizados con AF fueron estudiados mediante la espectroscopia Raman por medio de dos láseres de excitación a 785 nm y 532 nm. Los espectros Raman medidos con el láser 532 nm mostraron una mayor resolución y mayores valores en la

intensidad de los picos para el NTP. En el caso de NTP-AF no fue posible obtener un espectro Raman representativo a 532 nm debido a la interferencia presentada por la fluorescencia del AF.

Los espectros Raman de NTP a 785 nm y 532 nm son comparados en la figura 43. La asignación de bandas para los dos espectros observados a 785 y 532 nm respectivamente, se encuentra en la tabla 14.

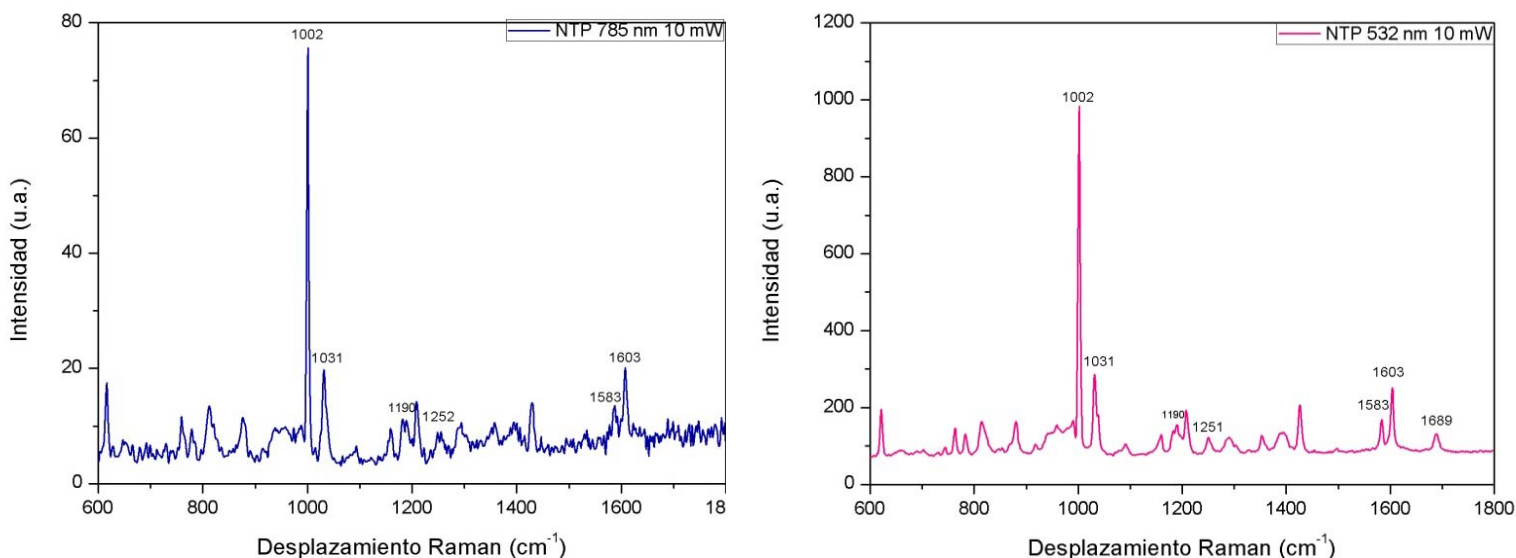


Figura 43. Comparación de espectros Raman de NTP a 785 nm y 532 nm de excitación (10 mW)

Tabla 14. Asignación de las vibraciones Raman más importantes de NTP utilizando dos láseres de excitación: 785 nm y 532 nm

Modo vibracional	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹) 785 nm	Desplazamiento Raman (cm ⁻¹) 532 nm
Modos de respiración del anillo bencénico	1002-1031-1190-1583	1001-1031-1190-1583
Estiramiento C=C del anillo bencénico	1603	1603
Estiramiento C-N	1252	1252
Vibración de la amida I debido al estiramiento C=O	-	1689

Como se observa en la tabla y en la figura anterior el uso de láser con diferentes longitudes de onda no afecta la posición de las principales bandas Raman de los NTP ni mejoró la resolución, las principales diferencias están asociadas a una mayor intensidad y mejor resolución al usar el láser de 532 nm. Además el láser 785 nm no detectó la presencia de la vibración de la banda C=O proveniente de la amida I.

En la siguiente figura se aprecia la comparación de los espectros Raman para los NTP, AF y NTP-AF respectivamente utilizando el láser de 785 nm.

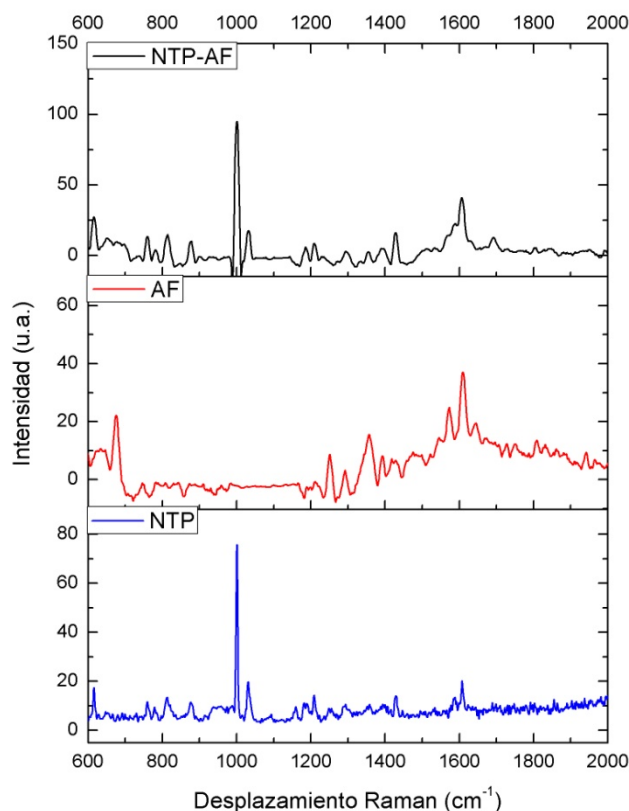


Figura 44. Comparación de espectros Raman de NTP-AF, AF y NTP usando las λ de excitación de 785 nm y una potencia de 10 mW.

El modo de respiración radial de los NTP ubicados a 1030 cm^{-1} muestra una ligera disminución en su intensidad cuando es funcionalizado con AF, una probable interacción de tipo apilamiento entre el anillo del AF y los anillos bencénicos de la difenilalanina de los NTP ocurre.

Para NTP-AF se observa la presencia de una banda a 1691 cm^{-1} proveniente de la vibración de la amida I, esta es probablemente una vibración debida a la formación de un nuevo enlace entre los grupos carboxílicos del AF los cuales se acoplan a los grupos NH_2 libres de los NTP. El AF incrementaría el efecto Raman de esta banda la cual no fue observada en el espectro utilizando el láser 785 nm. Esta banda posiblemente sea un indicio de la formación del enlace amida responsable del acoplamiento covalente entre el AF y los NTP. Sin embargo debido a la poca claridad del efecto Raman presentado por los espectros con este láser es necesario utilizar metodologías derivadas de la espectroscopia Raman para caracterizar los NTP funcionalizados con AF.

2.3.12.2.1. Ampliación del efecto Raman de NTP-AF

Una forma más conveniente de caracterizar la funcionalización de los NTP con el AF es mediante la técnica ERSRA en donde sus siglas en ingles significan Espectroscopia Resonante Superficial Raman Amplificada (Farbord y col., 2012). Como su nombre lo indica es una técnica derivada de la espectroscopia Raman que es útil para muestras que presentan una alta fluorescencia y una baja sensibilidad mediante la espectroscopia Raman normal. Esta técnica emplea superficies recubiertas con nanoestructuras metálicas como el oro o la plata para atenuar muestras con gran emisión de fluorescencia. La amplificación en la señal Raman se cree que es debido a dos mecanismos fundamentales: i) el modelo electromagnético (EM), y (ii) el modelo químico o de transferencia de carga (TC). El modelo EM surge cuando la frecuencia de excitación interactúa con los electrones metálicos formando plasmones sobre la superficie rugosa debido al metal enlazado a ella. La energía de los plasmones produce un efecto Raman en el analito, esta energía es luego devuelta a los plasmones y la radiación dispersa es detectada por el espectrómetro Raman (Kumar y col., 2012). En el modelo TC, la molécula debe estar enlazada a la superficie metálica creando un complejo de transferencia de carga. La frecuencia de excitación interactúa con el metal formando un par hueco-electrón y la energía es transferida al analito mediante el enlace formado por el metal y el analito. Ambos mecanismos contribuyen al efecto ERSRA aunque la contribución de cada uno depende del sistema a estudiar.

Debido a la presencia de una alta emisión fluorescente por parte del AF y a la poca información obtenida con el láser de 785 nm, en este trabajo se caracterizó el conjugado

NTP-AF utilizando la técnica ERSRA. Para este propósito se utilizó una superficie de silicio recubierta con nanopartículas de oro. En la siguiente figura se observan las imágenes SEM de la superficie metálica las cuales fueron suministradas por el Dr. Tomas Rindzevicius del departamento de Micro y Nanotecnología de la DTU de quien además colaboró en la toma de los espectros ERSRA.

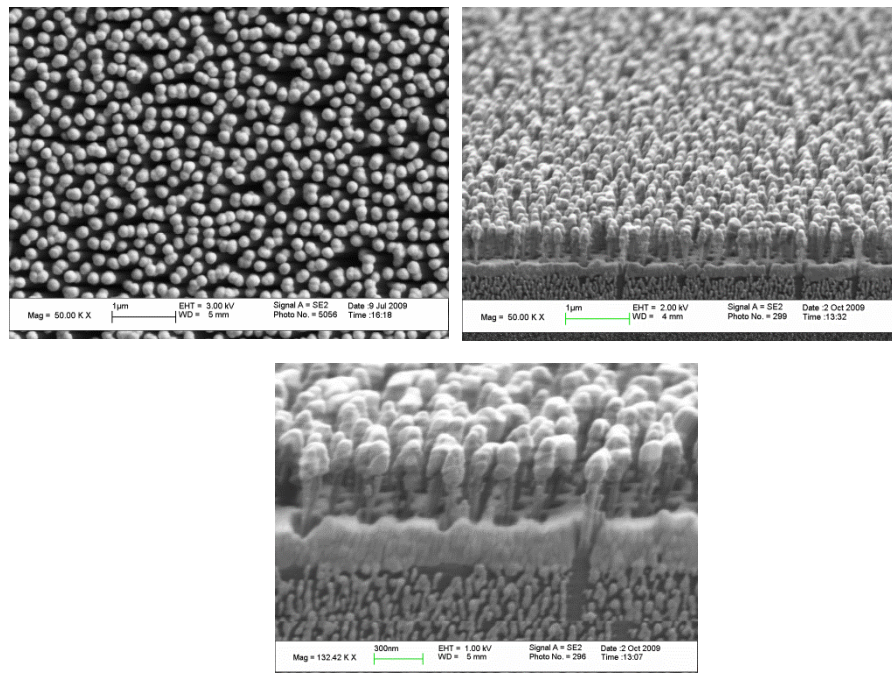


Figura 45. Imágenes SEM de superficies modificadas con nanopartículas de oro utilizadas en los experimentos ERSRA.

Las imágenes SEM muestran una vista superior y frontal de la superficie de silicio modificada con nanopartículas de oro. Se aprecian especies de bosque de “pilares” conglomerados los cuales ayudan a intensificar el efecto Raman del AF y los NTP modificados. Se agregó 1 μ L de solución de AF y en otro sustrato se agregó 1 μ L de NTP-AF, las superficies se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente fueron lavadas con agua milliQ y secadas con nitrógeno. Los espectros Raman fueron tomados utilizando el láser de 785 nm.

En la figura 46 se realiza una comparación de los espectros Raman del AF sobre superficie de silicio sin modificar y sobre la superficie modificada con nanopartículas de oro usando el láser de 785 nm. El espectro Raman ERSRA del AF fue tomado a la potencia más baja del láser (0.1 mW), debido a que a potencias mayores la estructura del AF se puede ver afectada. Como se aprecia en el espectro Raman normal del AF (azul), las bandas no son

representativas y de baja intensidad, debido probablemente a la interferencia presentada por la fluorescencia del AF. Sin embargo la mayoría de bandas del espectro superior concuerdan con las del espectro ERSRA.

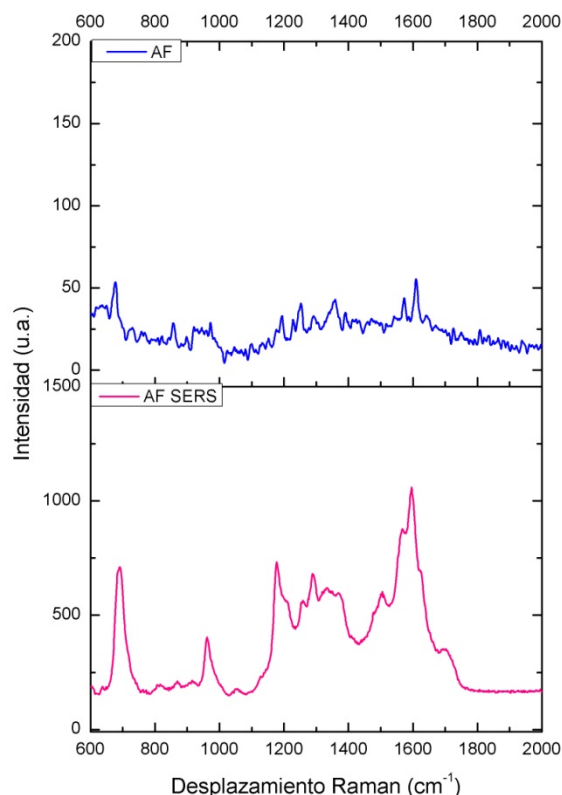


Figura 46. Comparación de espectros Raman del AF (normal, línea azul) y del AF SERS (línea rosa) a una λ de 785 nm de excitación.

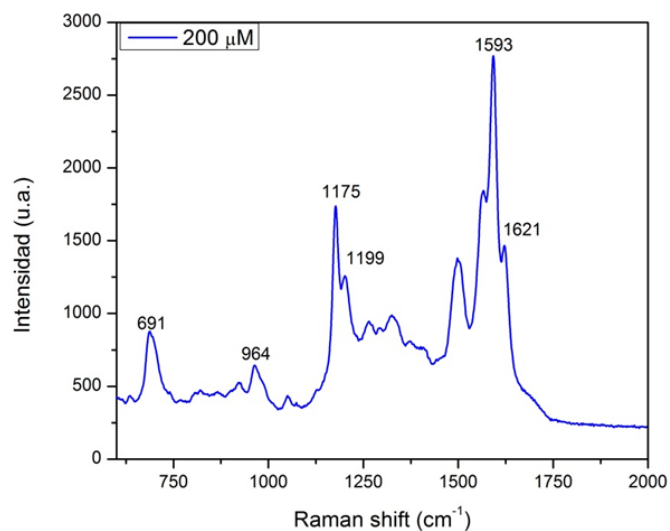
El análisis del espectro del AF ERSRA muestra una mejor resolución de los picos y además algunos picos incrementaron su intensidad casi 100 veces. El AF de alguna manera está interactuando con las nanopartículas de oro de la superficie ya que para que se presente la intensificación del efecto Raman la distancia mínima a la que deben estar las moléculas del analito con las nanopartículas de oro es de 5 nm (Farbord y col., 2012).

En la tabla 15 se encuentran los principales modos vibracionales presentados por el AF.

Tabla 15. Modos vibracionales del AF.

Modo vibracional	Desplazamiento Raman (cm^{-1})
Estiramiento N-H del grupo amino de la pterina	691
Modos de respiración radial del anillo bencénico	964, 1621
Vibraciones asimétricas del enlace C-H de los grupos CH_2 de la parte glutámica del AF	1175
Tijereteo del enlace C-H del anillo bencénico	1199
Estiramiento C-N del anillo pteridínico	1593

En la figura 47 se aprecia el espectro ERSRA Raman del AF a una concentración de $200 \mu\text{M}$, junto con cada uno de los números de onda respectivos.

**Figura 47.** Modos vibracionales del AF utilizando la técnica ERSRA.

El efecto en el incremento del efecto Raman también sirvió para caracterizar los NTP funcionalizados con el AF. El procedimiento de deposición de la solución sobre la superficie metálica fue el mismo que el realizado con el AF. A continuación se aprecia la comparación de los espectros ERSRA del AF sólo y el AF conjugado a los NTP.

El espectro Raman ERSRA de los NTP-FA presenta los picos característicos más importantes de los NTP, a 1318 cm^{-1} y 1352 cm^{-1} se aprecian los modos de respiración debido a los anillos aromáticos de la difenilalanina, los cuales fueron observados en el espectro Raman de los NTP sin funcionalizar en la figura 48 (1002 cm^{-1} y 1031 cm^{-1}). En el espectro SERS NTP-AF se observa además la presencia de los dos picos representativos del AF a 1178 cm^{-1} y 1593 cm^{-1} . En espectro del AF sin conjugar estos dos picos se aprecian a 1175 cm^{-1} y 1945 cm^{-1} respectivamente. El desplazamiento presentado por estos picos en los NTP-AF probablemente es un indicio de la funcionalización covalente del AF con los nanotubos que modifican la vibración respectiva.

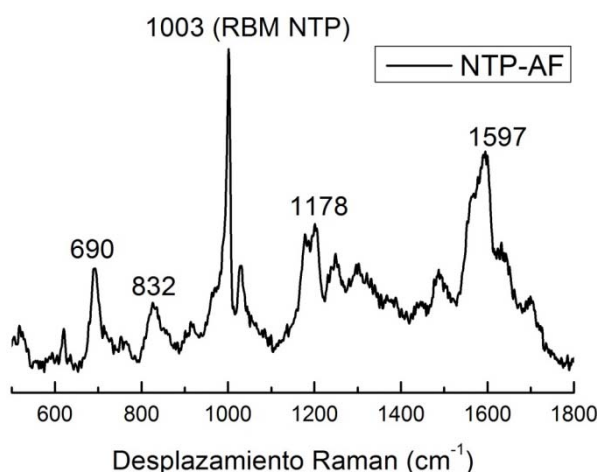


Figura 48. Espectro Raman ERSRA del del NTP-AF a 785 nm de excitación.

De esta manera se demuestra la funcionalización covalente de los NTP con el AF mediante la espectroscopia Raman amplificada. Estos son los primeros resultados de la literatura que muestran la caracterización de NTP-AF por medio de espectroscopia Raman normal y amplificada.

2.3.12.3. Los NTP funcionalizados con AF presentaron fluorescencia

La presencia de grupos amino sobre la estructura de los NTP ha sido una ventaja muy bien aprovechada para la funcionalización con diferentes tipos de moléculas. El grupo de Park (Park y col., 2009) funcionalizó NTP con fotosensibilizadores (ácido salicílico, benzofenona y 1-10-fenantrolina) los cuales exhibieron excelentes propiedades fluorescentes al unirse al NTP. En otro trabajo los NTP fueron funcionalizados con puntos cuánticos lo cual permitió la

construcción de microarreglos de NTP fluorescentes para ser utilizados como sensores (Clausen y col., 2008). En este trabajo la funcionalización de NTP con AF fue posible por la presencia de grupos amino disponibles en la superficie de los NTP.

Los NTP funcionalizados con AF fueron analizados por microscopia óptica y de fluorescencia. En la figura 49 se observan las fotografías tomadas con el microscopio óptico de los NTP antes y después de la funcionalización.

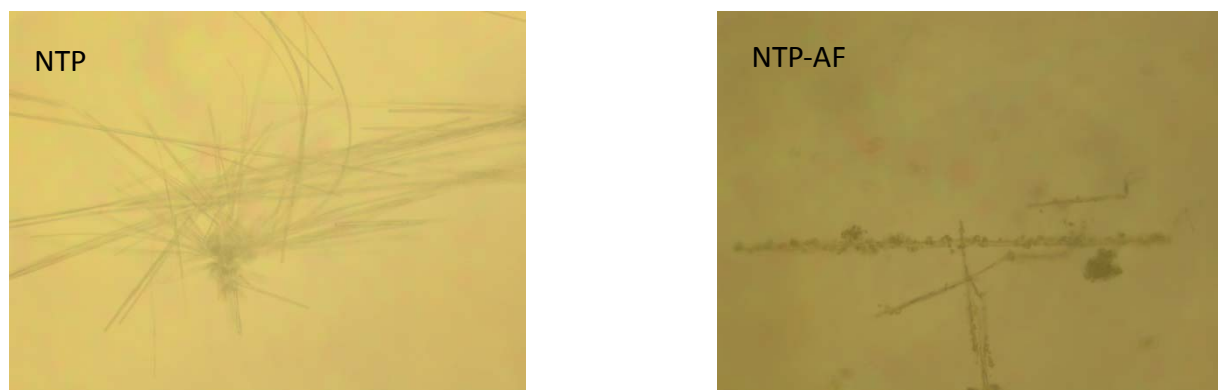


Figura 49. Imágenes de microscopia óptica de NTP antes y después de funcionalizar con AF

La figura de la izquierda (a) muestra a los NTP como estructuras rígidas y sin ningún defecto en la superficie. Por otro lado en la figura b se observan los nanotubos con pequeños aglomerados sobre la superficie que probablemente podrían ser moléculas de AF.

Para apreciar con más claridad la presencia del AF sobre los nanotubos se tomaron varias imágenes con el microscopio de fluorescencia utilizando un filtro DAPI (Nikon 425-500 nm). En la figura 50 se observan los NTP funcionalizados con AF utilizando el filtro DAPI, se nota la presencia de fluorescencia debido a la emisión presentada por el AF. Por otro lado la imagen (d) muestra a los NTP sin AF, no se observó fluorescencia para esta muestra de NTP.

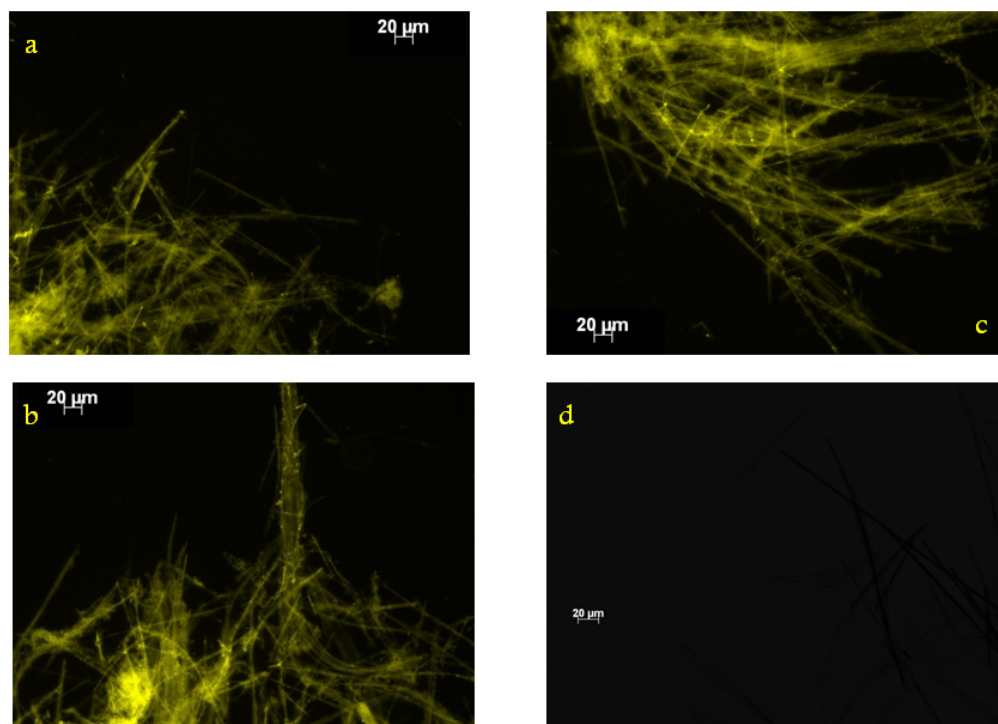


Figura 50. Imágenes de microscopia de fluorescencia de (a-c) NTP-AF, (d) NTP sin AF

Se realizó un experimento adicional para comprobar la funcionalización de los NTP con AF mediante microscopia de fluorescencia. Los NTP fueron funcionalizados con AF modificado con NHS-atto. Esta molécula es una *N*-hidroxisuccinimida la cual está marcada con un fluoróforo conocido como atto-532 que emite a una longitud de onda de 553 nm.

En la figura 51 se observan los NTP-AF detectados con varios filtros, la imagen c muestra los NTP funcionalizados con NHS-Atto emitiendo a 553 nm, se aprecia la fluorescencia del fluoróforo atto-532 el cual se encuentra enlazado al AF el cual a su vez se encuentra sobre la superficie de los NTP.

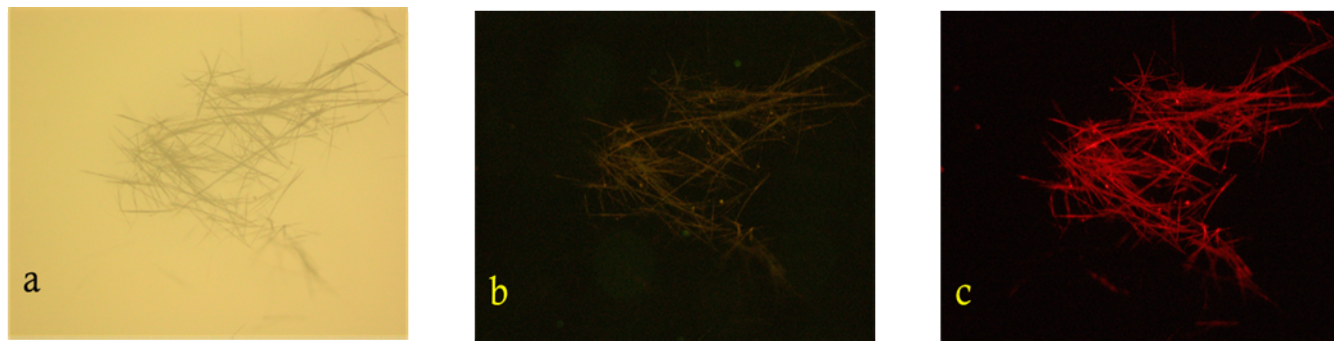


Figura 51. Imágenes de microscopia de fluorescencia de (a) NTP-AF óptica, (b) NTP-AF filtro DAPI y (c) NTP-AF filtro Texas Red (TR).

2.3.12.4. La microscopia SEM comprobó la unión de NTP-AF

La funcionalización de los NTP con el AF fue seguida mediante microscopia SEM, se utilizaron sustratos de silicio en donde 5 μ L de las muestras fueron depositadas y secadas a temperatura ambiente durante 3 horas. Se utilizó alto vacío y una energía electrónica de 5 kV. La figura muestra las imágenes SEM de los NTP y de los NTP-AF.

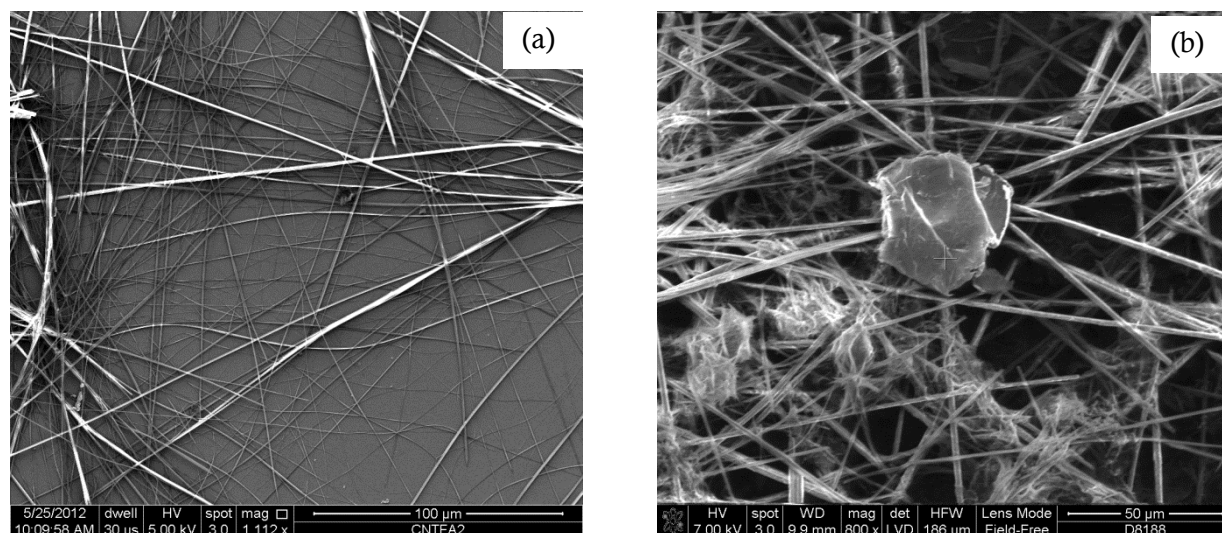


Figura 52. Imágenes de microscopia SEM de (a) NTP, (b) NTP funcionalizados con AF

La figura de la izquierda muestra los NTP como estructuras largas y rígidas y entrecruzándose entre sí, por otro lado los NTP funcionalizados con AF (derecha) se observan como estructuras de mayor diámetro debido a la presencia del AF sobre su superficie. Algunas de las estructuras de AF se aprecian como aglomerados sobre la

superficie de los NTP mientras que las otras, las cuales no se aprecian debido a la resolución del microscopio, están cubriendo a los nanotubos.

Por medio del software de imágenes Image J se midió el diámetro de uno de los NTP sin funcionalizar y uno de los NTP funcionalizados con AF, el diámetro del NTP de la imagen a tiene un valor de 220 nm, mientras que el NTP-AF de la imagen presenta un diámetro de 3000 nm. El aumento en el diámetro es debido a la presencia del AF sobre las paredes de los nanotubos.

Estas son las primeras imágenes SEM que se obtienen del conjugado NTP-AF, pues la literatura aún no reporta trabajos sobre la funcionalización de nanotubos de péptidos con AF, así pues este es el primer trabajo que realiza la funcionalización de NTP con AF.

2.3.12.5. La presencia de defectos superficiales sobre los NTP-AF fue evidenciada por AFM

Una solución de NTP fue depositada sobre una superficie de silicio (silicon wafer) y se dejó evaporar el solvente durante 1 hora y luego fue analizada por AFM. La estructura de los NTP fue consistente con imágenes microscópicas obtenidas en otros trabajos [30]. El diámetro del nanotubo analizado estuvo entre 30 y 800 nm, rango reportado por Abramovich (Abramovich y col., 2005) y el NTP de nuestro trabajo presentó un diámetro aproximado de 180 nm. En la figura 2.39 se aprecia el NTP sin funcionalizar, el área de escaneo fue de $2.5 \mu\text{m} \times \mu\text{m}$.

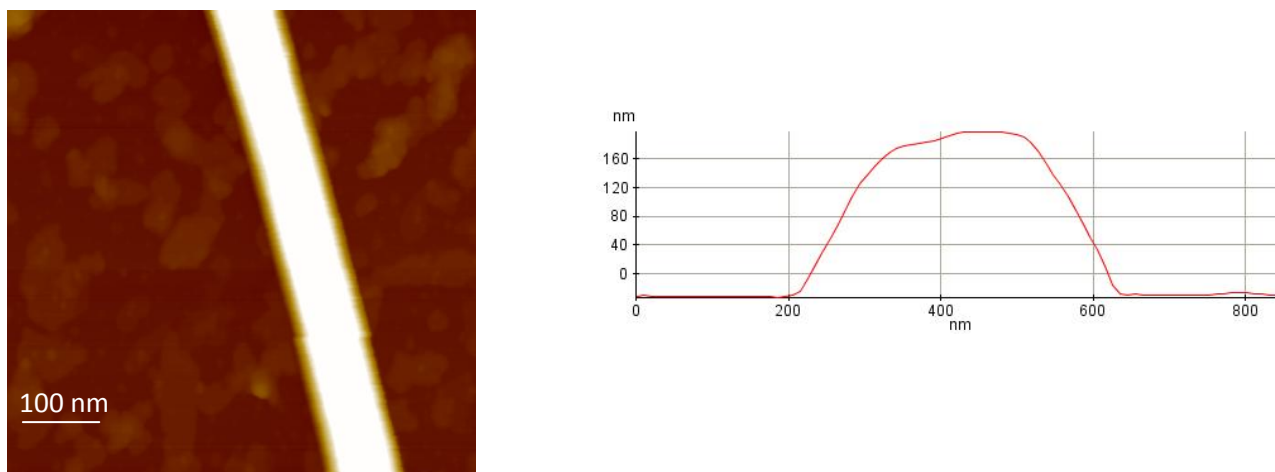


Figura 53. Imagen AFM de un NTP y la correspondiente línea de perfil topológico (área de escaneo $2.5 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$)

La imagen AFM del NTP sin funcionalizar muestra una estructura rígida aparentemente lisa y sin ningún defecto sobre la superficie. Un análisis de la línea de perfil topológico muestra al nanotubo con un diámetro aproximado de 160 nm.

Cuando el NTP fue funcionalizado covalentemente con el AF se observó un aumento en el diámetro del nanotubo, AF con un diámetro de 300 nm, probablemente debido al enlazamiento del AF a través de la unión química mediante la carbodiimida, ver la fig. 54.

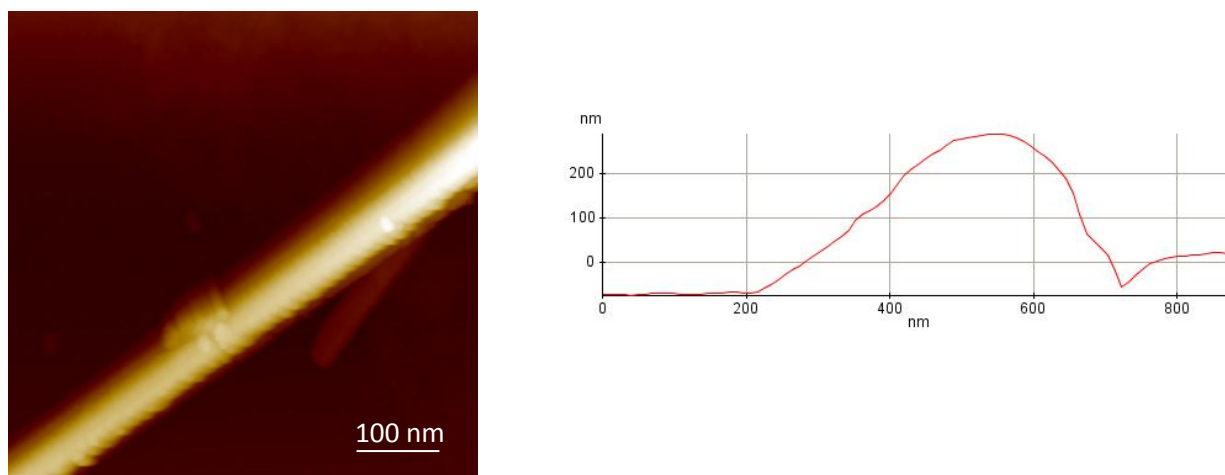


Figura 54. Imagen AFM de un NTP-AF y la correspondiente línea de perfil topológico (escala 2.5 μm x 2.5 μm)

Además de un aumento en el diámetro de aproximadamente 150 nm se observan ciertos defectos sobre las paredes del nanotubo debido a moléculas de AF que recubren la superficie del tubo. Estas imágenes refuerzan los resultados obtenidos por espectroscopia Raman, microscopia de fluorescencia y SEM en donde se evidencio la funcionalización de los NTP con el AF. Una imagen más clara de las estructuras de NTP con y sin el AF se aprecia en las figuras 3D mostradas a continuación.

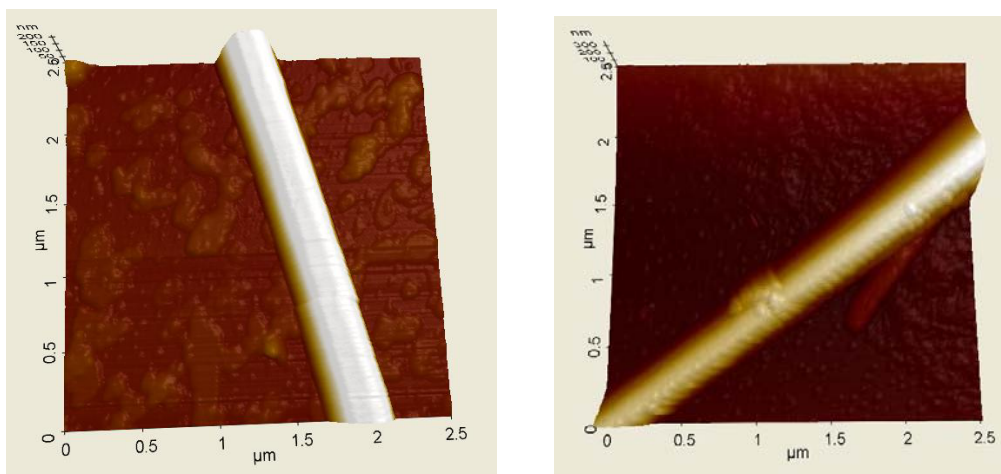


Figura 55. Comparación de la estructura 3D de un NTP y un NTP funcionalizado con AF (escala 2.5 μm x 2.5 μm).

2.4. Conclusiones

Los espectros UV-Vis, Raman y fluorescencia evidenciaron la unión no covalente del quitosano con los NTC. La espectroscopia UV-Vis mostró la presencia de la banda a 265 nm típica de los nanotubos en solución y el efecto de apagamiento de la fluorescencia del quitosano por los nanotubos corroboró la funcionalización. Los valores de la relación de intensidades Raman de las bandas D y G indicaron la presencia de defectos sobre la superficie de los NTC, estos valores sirvieron como evidencia adicional para comprobar la unión del quitosano a las paredes de los NTC.

El conjugado NTC-quitosano fue utilizado como soporte para la unión covalente del AF, esto se logró por medio de una reacción de acoplamiento utilizando el linker EDC/NHS. La funcionalización covalente del AF con NTC-quitosano fue caracterizada mediante la técnica 2D NMR DOSY. Los coeficientes de difusión del AF libre ($5.0 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) y el AF conjugado a los nanotubos ($3.5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$) mostraron al AF difundiendo más rápido que su contraparte conjugada, el cual al ser un compuesto de mayor volumen y masa se difunde más lentamente evidenciando así la unión del AF al conjugado NTC-quitosano.

Los NTC fueron dispersados y funcionalizados no covalentemente con AF. La espectroscopia Raman fue utilizada como herramienta clave para comprobar la unión no covalente del AF a los nanotubos. Los modos vibracionales de “respiración” radial de los NTC antes y después de funcionalizar evidenciaron la unión del AF a los NTC. La intensidad de estos modos disminuyó luego de la funcionalización con el AF debido a que la “respiración” radial se vio impedida por la presencia de esta molécula. Igualmente los valores de la relación I_D/I_G mostraron un valor de 0.18 y 0.21 para los NTC y los NTC-AF respectivamente. El aumento en el valor de I_D/I_G indicó la presencia de defectos superficiales sobre los nanotubos demostrando así probablemente la funcionalización no covalente de los NTC con el AF.

Para un valor de pH 7.0 se obtuvo una dispersión estable con un valor de potencial zeta de -32.4 mV con una baja probabilidad de precipitación. El conjugado NTC-AF formó dispersiones estables a pH fisiológicos lo que lo convierte en candidato ideal para las aplicaciones biológicas.

Los NTC-AF fueron caracterizados microscópicamente mediante las técnicas SEM y AFM. La caracterización por SEM mostró la presencia de madejas de nanotubos difíciles de identificar individualmente. La funcionalización con AF logró mejorar la dispersión y se obtuvieron nanotubos de menores tamaños y separados como tubos individuales. Además el análisis SEM-EDX mostró la presencia de NTC funcionalizados con el AF.

La presencia del AF envolviendo los NTC fue demostrada mediante AFM. El análisis topológico y estructural exhibió un aumento en el diámetro de los nanotubos luego de la unión con el AF comparado con el diámetro original de los NTC sin funcionalizar. Imágenes tridimensionales ayudaron a corroborar la unión no covalente del AF sobre la superficie de los NTC.

En este trabajo se evidenció la funcionalización covalente de NTP con AF. La funcionalización covalente del AF con los NTP se siguió por espectroscopia Raman y se identificaron los modos vibracionales de “respiración” radial a 1002, 1031 y 1583 cm^{-1} correspondientes a los NTP. Se utilizó la espectroscopia Raman amplificada (SERS) como estrategia para lograr una mejor identificación de los modos vibracionales del AF y los NTP en el conjugado. Los espectros SERS mostraron una mejor resolución de las bandas y se identificaron los modos del AF (691, 964, 1175 y 1593 cm^{-1}) los cuales se identificaron también en el conjugado NTP-AF.

La microscopia fluorescente permitió identificar los NTP funcionalizados con el AF. Experimentos de control de NTP sin funcionalizar no exhibieron ninguna fluorescencia. Por otro lado la presencia del AF sobre los NTP produjo nanoestructuras con emisión de luz fluorescente.

La funcionalización de los NTP con el AF fue evidenciada mediante microscopia SEM y AFM. Las imágenes tridimensionales mostraron a los NTP con defectos sobre la superficie probablemente por la presencia del AF unido covalentemente a su estructura. El diámetro de los NTP aumentó luego de la unión con el AF.

Finalmente la preparación y caracterización de NTC-AF y NTP-AF convierte a estos conjugados en potenciales nanocompuestos para aplicaciones biológicas que incluyan la actividad *in vitro* en células infectadas con enfermedades infecciosas o en células

cancerígenas. Igualmente podrían ser aplicados en la detección de enfermedades infecciosas o en cáncer en donde se encuentren células malignas que sobreexpresen receptores de folato.

2.5. Bibliografía

- Ahmad A., Kurkina T., Kern K., Balasubramanian K. *ChemPhysChem*, 2009; 10: 2251-2255.
- Attal S., Thiruvengadathan R., Regev O. *Analytical Chemistry*, 2006; 78: 8098-8104.
- Castillo J., Torres M., Molina D., Castillo-León J., Svendsen W., Escobar P., Martínez F. *Carbon*, 2012; 50: 2691-2697.
- Clausen C., Jensen J., Castillo J., Dimaki M., Svendsen W. *NanoLetters*, 2008; 8: 4066-4069.
- Cohem Y., Avram L., Frish L. *Angewandte Chemie*, 2005; 44: 520-544.
- Dresselhauss M., Dresselhaus G., Jorio A., Filho A., Pimenta A., Saito R. *Accounts of Chemical Research*, 2002; 35: 1070-1078.
- Farbod A., Parvinzadeh M., Ali S., Amir K. *Superlattices and Microstructures*, 2012; 52: 50-62.
- Gazit E. *Chemical Society Reviews*, 2007; 36: 1263-1269.
- Gorbitz C. *Chemical Communications*, 2006, 3: 2332-2334.
- Graupner R. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2007; 38: 673-683.
- Horn D., Tracy K., Easley C., Davis V. *Journal of Physical Chemistry C*. 2012; 116: 10341-10348.
- Hu H., Yu A., Kim E., Zhao B., Itkis M., Bekyarova E., Haddon R. *Journal of Physical chemistry B*. 2005; 109: 11520-11524.
- Ijima S. *Nature*, 1991; 354: 56-58.
- Jalili N., Laxminarayana K. *Mechatronics*, 2004; 18: 907-945.
- Jinno M., Ando Y., Bandow S., Fan J., Yudasaka M., Ijima S. *Chemical Physics Letters*, 2006; 418: 109-114.
- Jeong S., Kim K., Jeong J., An K., Lee S., Lee Y. *Synthetic Metals*, 2007; 157: 570-574.

- Kam N., Kam S., O'Connell M., Wisdom J., Dai H. PNAS, 2007; 102: 11600-11605.
- Kim U., Furtado C., Liu X., Chen G., Eklund P. Journal of the American Chemical Society, 2005; 127: 15437-15445.
- Kuang Y., Wu B., Hu D., Zhang X., Chen J. Journal of Solid State Electrochemistry, 2012; 16: 759-766.
- Kumar G. Journal of Nanophotonics, 2012; 6: 1-20.
- Long D., Wu G., Zhu G. International Journal of Molecular Sciences, 2008; 9: 120-130.
- Lu Y., Wang Y., Gao S., Wang G., Yan C., Chen D. Journal of Luminescence, 2009; 129: 1048-1054.
- Marega R., Aroulmoji V., Bergamin M., Feruglio L., Dinon F., Bianco A., Murano E., Prato M. ACSNano. 2010, 4; 2051-2058.
- Pastor A., Martínez-Viviente E. Coordination Chemistry Reviews, 2008; 225: 2314-2345.
- Ryu J., Lim S., Park C. Advanced Materials, 2009; 21: 1-5.
- Shieh T., Wu H., Twu Y., Chung Y. Colloid & Polymer Science, 2010; 288: 377-385.
- Viel S., Capitani D., Mannina L., Segre A. Biomacromolecules, 2003; 4: 1843-1847.
- Viel S., Mannina L., Segre A. Tetrahedron Letters, 2002; 43: 2515-2519.
- Yemini W., Reches M., Gazit E., Rishpon J. Analytical Chemistry, 2005; 77: 5155-5159.
- Zheng X., Zhou F. Journal of X-Ray Science and Technology, 2011; 19: 275-284.

CAPÍTULO III

Fotoactivación y Actividad in vitro de Nanotubos de Carbono-Ácido Fólico

3.1. Introducción

Las opciones actuales para medicamentos de la LC son limitadas y presentan desventajas como: efectos tóxicos secundarios, altos costos en los tratamientos y la resistencia presentada por el parásito (Kumasr y col., 2012). En consecuencia el desarrollo de nuevos tratamientos alternativos a los actuales medicamentos es prioritario y se ha convertido en un desafío para lograr un tratamiento eficaz. Los avances logrados en el campo de la nanotecnología han permitido el diseño y la preparación de nuevos tipos de nanocompuestos como: liposomas, nanoemulsiones y nanopartículas poliméricas (Nilfroushzadeh y cols., 2006). Los investigadores han centrado su atención en estos nanocompuestos debido a que poseen características fisicoquímicas (tamaño nano, biocompatibles, estabilidad, etc) que permiten ser aplicados en campos de la biomedicina como: entrega de fármacos, sistemas de detección, etc.

Entre los tratamientos localizados (realizados directamente en las lesiones), la terapia térmica (calor o frio) constituye una opción interesante en LC (Shyam y col., 2012). El tratamiento térmico en leishmaniasis comprende un rango de metodologías que van desde el tratamiento con nitrógeno líquido (crioterapia) hasta la generación de calor por medio de diferentes tipos de radiaciones (Sanchez y col., 2012; Jowkar y col., 2012). La generación de calor provocada por radiaciones como la RF o el IR, provocan un calentamiento localizado que penetra la piel y expone a altas temperaturas a los amastigotes que se encuentran en el tejido afectado (Sharquie y col., 1998). Sin embargo la termoterapia en leishmaniasis tiene algunos inconvenientes ya que en algunos casos es dolorosa e incomoda para los pacientes debido a la necesidad de anestesiarse el tejido infectado, además precisa de la inserción de electrodos en las lesiones para que ocurra el flujo de calor (Jowkar y col., 2012). Otros tratamientos alternativos estudiados incluyen la utilización de cremas (paramomicina tópica), glucantime intralesional y la terapia fotodinámica (Ashutosh y cols., 2012) entre otras, ver tabla 16.

Tabla 16. Tratamientos fisicoquímicos evaluados como terapia contra leishmaniasis

Tratamiento	Modo de acción	Referencia
Crioterapia	Congelamiento celular	(Meymandi y col., 2011)
Laser CO ₂	Inhibición de la multiplicación celular del parásito a temperaturas > 39°C	(Croft y col., 2006)
Terapia	Los fotosensibilizadores pueden	(Ashutosh y col., 2012)

Fotodinámica	catalizar diferentes reacciones dependientes de luz generando especies reactivas de oxígeno, las cuales producen reacciones fotooxidativas con la membrana del parásito. En experimentos <i>in vivo</i> la eliminación del parásito no ocurre de manera directa sino por mecanismos indirectos como la disminución en el número de monocitos en el área tratada.	
--------------	--	--

Los NTC son estructuras compuestas por átomos de carbono que han sido exitosamente utilizadas como vehículos transportadores de fármacos, en el diagnóstico de enfermedades y como nanosensores (Croft y col., 2006). Recientemente mediante su funcionalización con AF y por medio de la excitación con luz del IR cercano los NTC fueron utilizados como agentes generadores de calor en la destrucción selectiva de células cancerígenas tipo HeLa (Burlaka y col., 2010). El ingreso de los NTC-AF fue facilitado gracias a la sobreexpresión de RF por las células de carcinoma vertical, posteriormente el continuo calentamiento (7 min) con IR cercano provocó la muerte selectiva de las células cancerígenas sin afectar las células sanas.

Hasta el año 2012 se conoció el primer trabajo experimental de la utilización de NTC como transportadores de fármacos en experimentos de actividad anti-Leishmania. Ashutosh y cols funcionalizó el fármaco AmB sobre la pared de NTC (ver figura 56). El conjugado NTC-AmB fue caracterizado por FTIR y microscopia TEM para verificar la unión nanotubo-AmB. Se evaluó su actividad anti- Leishmania en macrófagos infectados con *L. donovani*. La comparación de la actividad anti-Leishmania de la AmB libre y conjugada a los NTC, mostró una mayor eficacia del conjugado NTC-AmB y no se presentaron efectos citotóxicos en los experimentos *in vivo* realizados en hámsteres.

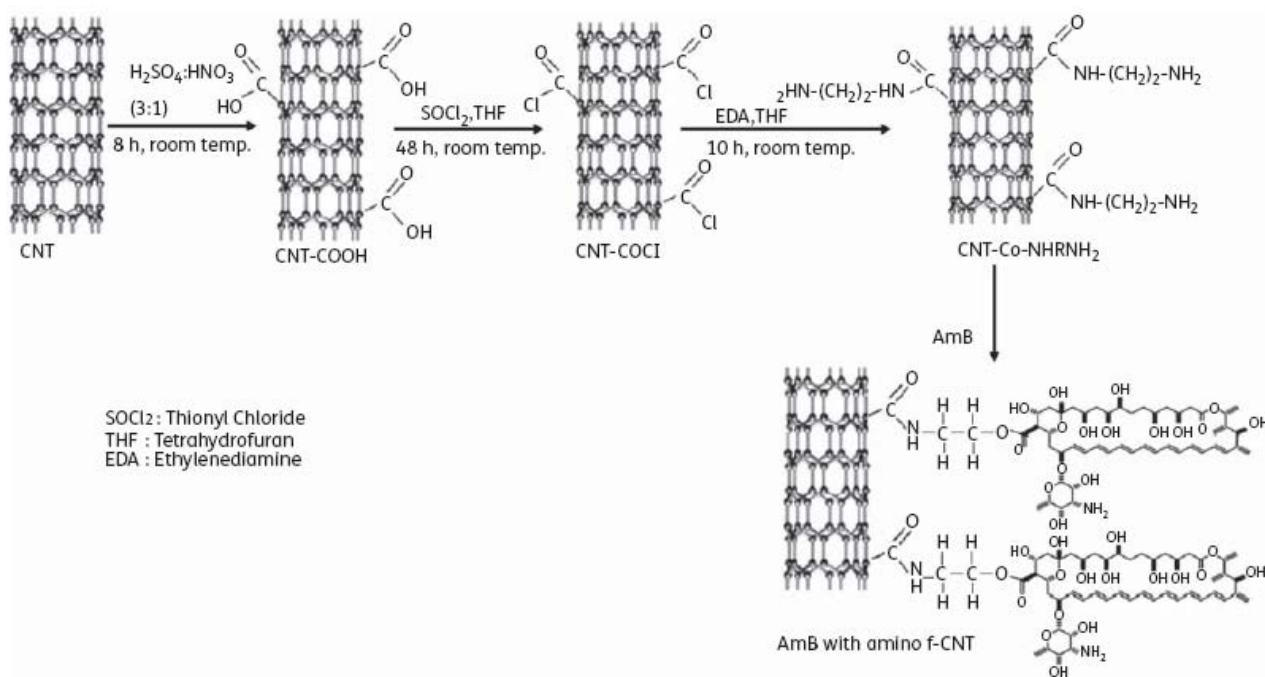


Figura 56. Esquema de la síntesis de NTC-AmB (Ashutosh y col., 2012).

Los NTC al ser modificados con AF podrían mejorar la selectividad facilitando su internalización para el transporte de fármacos o como agente generadores de calor. Una vez sean ingresados en las células infectadas con la *Leishmania*, estos podrían en principio ser irradiados con luz visible o del IR cercano de 808 nm generando un efecto térmico letal para las células enfermas. De esta manera se podría mejorar la selectividad de los nanocompuestos en la destrucción de células con leishmaniasis, comparada con los tratamientos sistémicos y térmicos actuales.

Hasta ahora han sido pocos los estudios realizados que utilicen el AF unido a NTC para facilitar su ingreso celular y que interaccionen con radiaciones no invasivas como el IR cercano para generar efectos tóxicos y así permitir la destrucción selectiva de células infectadas con *Leishmania spp.* Esto motivó realizar este trabajo investigativo para preparar y evaluar un sistema de NTC funcionalizados con AF para destruir selectivamente los amastigotes intracelulares de *L. panamensis*, *in vitro* empleando como células modelo las THP-1, en presencia de la radiación.

Al comienzo del capítulo se describen los equipos utilizados para la fotoactivación de los nanotubos y los ensayos biológicos para evaluar los NTC-AF. Luego se presentan los

resultados de la fotoactivación de los NTC-AF utilizado el láser IR cercano de $\lambda = 808$ nm. Finalmente se presentan los resultados de la toxicidad, internalización y del efecto fototóxico de los nanotubos en células THP-1 infectadas con la *Leishmania*.

3.2. Parte experimental

Las metodologías utilizadas están orientadas a determinar la actividad tóxica de los NTC-AF contra células y parásitos antes y después de la irradiación con una fuente láser de luz del IR cercano (808 nm). Los ensayos en parásitos y células se realizaron en el laboratorio de Quimioterapia en colaboración de las profesionales Leidy Viviana Novoa y Betty Stefany Lozada bajo la dirección de la Profesora Patricia Escobar, pertenecientes al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) ubicado en la sede UIS-Guatiguará.

3.2.1. Parásitos y células

Se utilizaron promastigotes de *L. panamensis* MHOM/PA/71/LS94 (LS94) los cuales fueron cultivados en medio Scheneider suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi) pH 7,2 a 28°C en oscuridad. Los amastigotes intracelulares de *L. panamensis* se obtuvieron infectando las células THP-1 diferenciadas con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento utilizando un ratio de infección célula: parásito de 1:5 durante 48 horas a 32°C, 5% de CO₂ y 95% de mezcla de aire. Las láminas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa y el porcentaje de infección fue determinado por conteo de 300 células en microscopio de luz transmitida.

Se utilizó la línea celular humana de leucemia monocítica aguda (THP-1, ATCC TIB 202) la cual fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi, 0,1% de penicilina-estreptomicina a 37°C, 5% CO₂ y 95% de mezcla de aire. La diferenciación de los monocitos THP-1 a su fenotipo adherente se realizó utilizando 80 ng/mL de forbolmiristato acetato (PMA por sus siglas en inglés) por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂, 95% mezcla aire.

3.2.2. Compuestos

Se utilizaron NTC funcionalizados con AF preparados según numeral 2.1.2.2. Para cada experimento se preparaban soluciones nuevas del compuesto y almacenadas a 4°C durante máximo 4 días. Se prepararon soluciones stock de 0.5 mg/mL de NTC-AF en agua tipo milliQ bajo condiciones de esterilidad. Como compuesto de referencia se utilizó la miltefosina (Sigma-Aldrich).

3.2.3. Sistema de irradiación

Para los experimentos de irradiación se utilizó un sistema láser compuesto por un diodo de 808 nm, un controlador de temperatura del diodo y un controlador de potencia, el cual fue adquirido a ThorLabs (Newton, USA). En la figura 57 se observa una fotografía del sistema láser 808 nm con cada una de sus partes.

3.2.4. Calentamiento de los NTC-AF en sistemas acuosos sin células

Para determinar el calentamiento de los NTC funcionalizados con AF en un sistema sin células se prepararon 3 soluciones de NTC-AF en agua milliQ de concentraciones 0.125, 0.25 y 0.5 mg/mL y se irradiaron durante 10 minutos usando tres valores diferentes de potencia del diodo láser (200, 400 y 600 mW). Se registró el cambio de temperatura y se construyeron curvas de calentamiento para cada concentración y potencia y se determinó la velocidad de calentamiento en °C/s. Estos cálculos y las curvas se realizaron utilizando el software Origin 8.0.

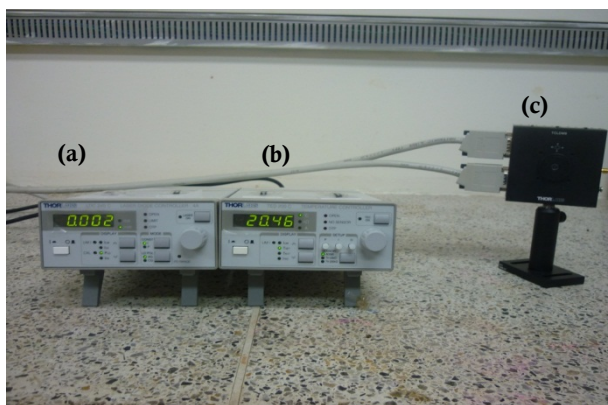


Figura 57. Sistema diodo láser para experimentos de fotoactivación de NTC. (a) Controlador de potencia, (b) controlador de temperatura y (c) diodo 808 nm.

3.2.5. Ensayos de internalización

Se realizaron dos tipos de ensayo para evaluar la internalización de los NTC-AF. En el primer ensayo se incubaron células THP-1 no infectadas con NTC-AF con una concentración de 0.125 mg/mL. Los NTC-AF se incubaron durante 24 y 48 h, posteriormente las células fueron fijadas con formalina 2% y coloreadas con Hoechst 1 µg/mL durante 5 minutos en oscuridad. Finalmente las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400).

En el segundo ensayo células THP-1 infectadas con *L. panamensis* y no infectadas (8×10^5 células/mL) fueron cultivadas en placas de 24 pozos con laminillas circulares y tratadas con diferentes concentraciones de NTC-AF (0.125-0.03 mg/mL) de 2 a 72 horas a 37°C, 5% CO₂, 95% de mezcla aire. Terminado el respectivo periodo de incubación las laminillas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de células con internalización positiva de los compuestos fue determinado microscópicamente por conteo directo de 300 células. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células con NTC internalizados. Cada concentración fue evaluada en dos experimentos independientes y se realizó el registro fotográfico en cada uno de los tiempos y concentraciones usadas.

3.2.6. Ensayos de toxicidad

Los ensayos de actividad tóxica estuvieron orientados a determinar el efecto de diferentes concentraciones de NTC-AF en las células y parásitos sin irradiación y después de la irradiación con el láser IR cercano de 808 nm y una potencia de 800 mW. Se analizaron las células THP-1 y los amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. En todos los experimentos se realizó un control de células tratadas sin irradiar.

3.2.6.1. Ensayos de toxicidad en células de mamífero sin irradiar

Las células THP-1 transformadas fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2 por triplicado con NTC-AF por 24 horas. Células controles fueron mantenidas sin tratamiento. La toxicidad celular fue determinada por el método colorimétrico de MTT.

El método MTT se realizó adicionando 20 µL de MTT (5 mg/mL) a cada pozo e incubando por 4 horas. Luego 100 µL de DMSO/pozo fueron agregados para diluir los cristales de formazan. Las absorbancias fueron determinadas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 580 nm utilizando el lector de microplacas Anthos 2020. El porcentaje de toxicidad se calculó a través de la fórmula: toxicidad (%) = $100 \times (\text{Absorbancia/IF grupo control} - \text{Absorbancia/IF grupo tratado}) / \text{Absorbancia grupo control}$. (IF: intensidad de fluorescencia).

Con estos datos se calculó la concentración inhibitoria 50 y 90 (CI₅₀ y CI₉₀), por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MS xlf_{it} (ID Business Solution, Guildford, UK).

3.2.6.2. Ensayos de toxicidad en células de mamífero irradiadas

Las células THP-1 transformadas a su fenotipo adherente fueron tratadas con una concentración de 0.125 mg/mL de NTC-AF e incubados por 24 horas a 37°C, 5% CO₂, 95% mezcla-aire. Células controles fueron mantenidas sin tratamiento. Posteriormente el medio fue remplazado por medio RPMI 1649 10% de SBFi y las células fueron irradiadas con el láser IR cercano por 5 y 10 minutos a una potencia de 800 mW. En una placa diferente, las células tratadas con NTC-AF y las células controles fueron mantenidas sin irradiación. La toxicidad se evaluó 24 h (o 48 h en algunos experimentos) pos-irradiación por conteo en hemocitómetro utilizando como colorante vital la eosina amarilla. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de muerte celular. Cada experimento fue repetido tres veces.

3.2.6.3. Ensayos de toxicidad en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*

Células THP-1 fueron transformadas con acetato de forbomiristato en cámaras de vidrio con sistema deslizante (labteck de NUNC) fueron infectadas con promastigotes de *L. panamensis* (fase estacionaria de crecimiento) utilizando una relación de infección de 1:5 célula: parásito por 48 horas a 32°C, 5% CO₂ 95% mezcla-aire. Después fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2 de NTC-AF (0.25 a 0.016 mg/mL) por 24 horas. Posteriormente se irradiaron con IR cercano (808 nm) por 10 minutos. Células infectadas controles tratadas y no tratadas con NTC-AF fueron mantenidas sin irradiación. De igual forma células infectadas no tratadas fueron irradiadas en las mismas condiciones. Luego, las células fueron fijadas con metanol por 10 minutos y coloreadas utilizando la tinción de Giemsa.

El porcentaje de infección fue determinado microscópicamente por conteo directo contando el número de células infectadas en 300 células. Se consideró célula infectada aquella que contenía al menos un amastigote intracelular, cada concentración fue evaluada por duplicado en cada uno de los dos experimentos independientes. El efecto del compuesto con relación a los tiempos de exposición al IR cercano fue expresada como la concentración citotóxica para el 90% de las células (CC₉₀) por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MSXIfit™, ID Bussines solutions, Guildford UK, para cada uno de los tiempos probados.

3.3. Resultados y Discusión

3.3.1. Los NTC-AF presentaron un efecto térmico en presencia de un haz de luz láser de 808 nm

En la figura 58 se observa el sistema de diodo láser de 808 nm utilizado para la fotoactivación de las soluciones de NTC-AF.



Figura 58. Dispositivo de calentamiento de dispersiones NTC-AF por medio de un diodo laser de 808 nm.

En la figura 59 se aprecian las curvas de calentamiento observadas con los diferentes valores de potencia del diodo láser y con tres concentraciones diferentes de NTC-AF. Se utilizó un tiempo de irradiación de 10 minutos. La temperatura fue medida utilizando un termómetro electrónico de sonda metálica, y se tuvo la precaución de que el haz no interfiriera con el termómetro y así no tener lecturas falsas de la temperatura.

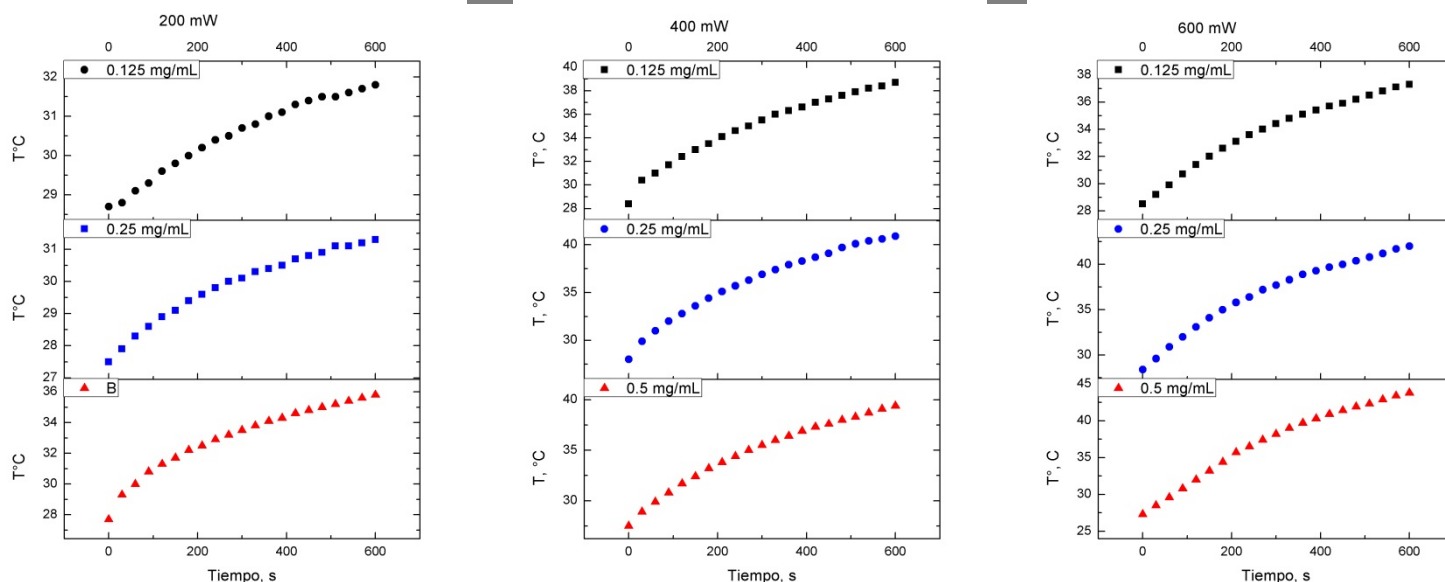


Figura 59. Curvas de calentamiento de NTC-AF utilizando un diodo laser de 808 nm a tres potencias diferentes (200, 400 y 600 mW)

Como se observa en la figura 59 luego de una exposición continua de los NTC-AF con el láser IR cercano se observa un incremento en la temperatura de las soluciones. La máxima velocidad de calentamiento se aprecia en los primeros 5 minutos, después no se observa un aumento significativo de la temperatura. Para comprobar que la solución no registró aumentos posteriores de temperatura a tiempos por encima de los 10 minutos se realizó un experimento similar a los anteriores en donde una solución de NTC-AF 0.25 mg/mL fue calentada durante 15 minutos con una potencia de 600 mW. Como se aprecia en la figura 60 la solución comienza a disminuir la temperatura a tiempos mayores de 10 minutos y a los 15 minutos de irradiación la solución alcanza una temperatura final de 40°C. Probablemente esta disminución en los valores de temperatura puede estar asociada a un intercambio de calor de dispersión NTC-AF con el medio.

El máximo valor en la temperatura se alcanzó a la máxima potencia ensayada (0.6 W) con un valor de 43.8°C durante 10 minutos de irradiación. En un trabajo similar con NTC Hussain (Hussain y col., 2011), los nanotubos alcanzaron una temperatura máxima de 44°C luego de 4 minutos de irradiación de los nanotubos pero utilizando un láser con una potencia de 4.5 W. En otro trabajo se alcanzó una temperatura máxima de 60°C utilizando una lámpara IR cercano (780-1400 nm) para irradiar NTC de pared múltiple (Burlaka y col., 2011). Estas diferencias en las temperaturas alcanzadas pueden ser debidas a factores como la concentración y la estructura de los NTC utilizados. Esto fue demostrado en el trabajo de

Hussain y cols, allí se observaron diferencias en los valores de temperatura para el calentamiento de NTC, NTC funcionalizados con grupos -COOH y nanopartículas de negro de carbón. En otro estudio (Madani y col., 2012) NTC de pared múltiple dispersos en el surfactante Pluronic 127 resultaron más eficientes en la producción de calor luego de la irradiación con IR cercano que NTC de pared sencilla sin surfactante. Se cree que este fenómeno está asociado al comportamiento de “antena dipolar” de los NTC de pared múltiple cuya alta eficiencia de calentamiento está asociada a su amplio espectro de absorción comparado con el espectro de los NTC de pared sencilla.

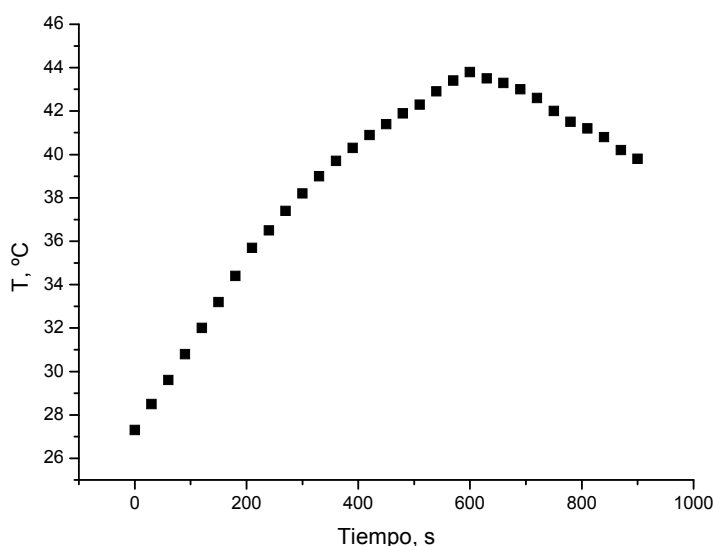


Figura 60. Curva de calentamiento de una solución de NTC-AF 0.5 mg/mL utilizando un diodo laser de 808 nm (600 mW). Tiempo de irradiación 15 minutos.

La mayor velocidad de calentamiento ($0.037\text{ }^{\circ}\text{C/s}$) se obtuvo para la dispersión de NTC-AF con la mayor concentración y a la mayor potencia de laser ensayada (600 mW).

El incremento en la concentración de NTC-AF produce las mayores temperaturas de calentamiento. Este aumento eficiente en la temperatura es debido a las transiciones originadas por la alta absorción de los NTC en la región del IR cercano, los cuales exhiben las denominadas singularidades de van Hove (Fisher y col., 2010). Estas consisten en discontinuidades en la densidad de estados en un sólido y son características para los NTC. La absorción de luz por NTC produce un calentamiento localizado de la solución que se

genera por vibraciones electrónicas estimuladas las cuales producen una disipación de calor y esto se ve reflejado en un aumento de temperatura del medio (Burlaka y col., 2010).

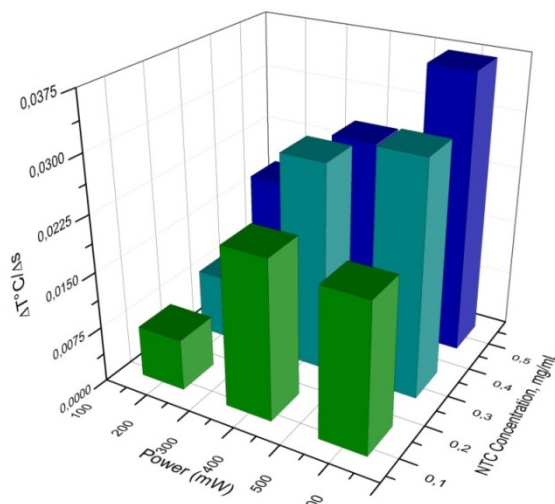


Figura 61. Curva 3D de calentamiento de tres soluciones acuosas de NTC-FA (0.125, 0.3125, 0.5 mg/mL) a diferentes potencias del diodo láser 808 nm (200, 400 y 600 mW)

En la figura 62 se aprecia el experimento control realizado para comprobar que el calentamiento de la solución efectivamente fue debido a la presencia de los NTC solubilizados en AF. Este experimento consistió en la irradiación de agua sin la presencia de los NTC. Se utilizó una potencia máxima de 600 mW.

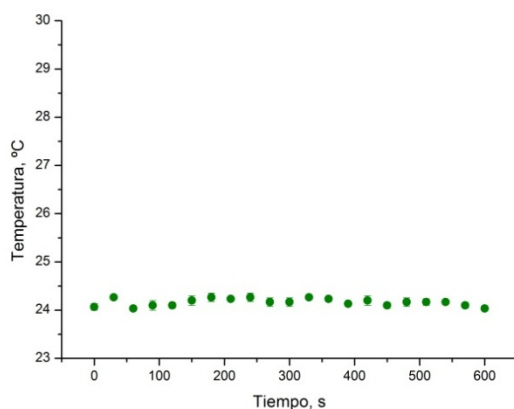


Figura 62. Calentamiento de agua sin la presencia de NTC-AF a una potencia de 600 mW.

Se puede apreciar en la figura 62 que no se observa incremento alguno de la temperatura del agua cuando se irradia con el láser IR cercano. Un resultado similar fue observado por Hussain, quien irradió una celda de cuarzo conteniendo agua. Los valores de la temperatura registrada estuvieron en el rango entre 20-24°C. Esta solución fue utilizada como experimento control para comprobar que el calentamiento registrado fue debido exclusivamente a las soluciones conteniendo nanotubos de carbono y nanopartículas de negro de carbón. Los resultados presentados en esta investigación y en otros estudios (Fisher y col., 2010; Hussain y col., 2012; Madani y col., 2012; Schrand y col., 2011) comprueban la transparencia del agua en la zona IR cercano del espectro electromagnético, lo cual ha sido aprovechado como una condición fundamental para la realización de experimentos biológicos con este tipo de radiaciones (Madani y col., 2012).

3.3.2. Actividad *in vitro* de NTC-AF

El efecto de calentamiento provocado por el láser de 808 nm sobre el sistema NTC-AF será utilizado para el estudio de la actividad *in vitro* en células infectadas con *L. panamensis*.

3.3.2.1. Los NTC-AF no fueron tóxicos en células de mamíferos

Los resultados presentados en la tabla 17 muestran que el tratamiento con NTC-AF en células THP-1 (no infectadas) presentó una baja toxicidad en las concentraciones utilizadas.

Tabla 17. Actividad del conjugado NTC-AF sobre células THP-1 por el método MTT (24 horas después de irradiación)

NTC-AF (mg/mL)	Toxicidad en células THP-1.	
	Porcentajes de toxicidad $\pm$ DS	
	Irradiado	No irradiado
0.031	8.80 $\pm$ 0.41	14.48 $\pm$ 0.52
0.063	22.12 $\pm$ 0.41	14.22 $\pm$ 0.21
0.080	21.74 $\pm$ 2.84	18.086 $\pm$ 0.47
0.150	22.81 $\pm$ 2.69	24.708 $\pm$ 3.45
0.250	21.09 $\pm$ 1.44	11.136 $\pm$ 7.56
0.500	39.69 $\pm$ 0.75	35.75 $\pm$ 1.73

En un experimento adicional, concentraciones de 0.2 mg/mL de NTC-AF fueron tóxicas para 24.39 ± 0.09 % de las células THP-1 (no infectadas), 48 horas pos-irradiación. Las células controles no irradiadas mostraron 3.60 ± 11.10 % de toxicidad.

Según los resultados encontrados no se puede mostrar que hubo diferencias entre los % de citotoxicidad de las células irradiadas con respecto a las células no irradiadas.

La literatura menciona múltiples estudios que hablan sobre la citotoxicidad de NTC en líneas celulares como: HeLa, linfocitos B, MCF-7, MSTO-211H y HEK (Iancu y col., 2011). Una de las razones de esta citotoxicidad probablemente es el tamaño y el área superficial específica, a mayor área superficial específica (ASE) mayor efecto tóxico. El ASE se define como la relación entre el área superficial y la masa del nanotubo (Firme y col., 2010). Los NTC de pared simple tienen áreas superficiales mayores que los de pared múltiple, pero debido a la presencia de fuerzas de van der Waals entre las paredes laterales de los NTC, estos tienden a aglomerarse, lo que reduce en gran medida su área superficial específica. La aglomeración de NTC de pared múltiple es mínima, lo que los convierte en nanoestructuras con mayor citotoxicidad. En un estudio con macrófagos J774 incubados con NTC de pared simple durante 72 horas usando concentraciones de 0.06 y 0.6 mg/mL los nanotubos no presentaron toxicidad, mientras que a una concentración de 6 mg/mL se registró una viabilidad celular del 40% (Montes y col., 2012).

En los experimentos de citotoxicidad en este trabajo se utilizaron NTC-AF de pared simple utilizando concentraciones similares o menores a los mencionados en el párrafo anterior (0.03-0.5 mg/mL), en estas condiciones los nanotubos no fueron tóxicos (ver tabla 17), además estos formaron aglomerados en las células (fig. 63) disminuyendo así su ASE. Estos factores sumados a la funcionalización con una biomolécula como es el AF convierten al NTC-AF en un conjugado útil y seguro para aplicaciones biomédicas que involucren interacciones con células.

3.3.2.2. Los NTC-AF fueron internalizados por células THP-1

3.3.2.2.1. Resultados con inmunofluorescencia

En la figura 63 a se observan células THP-1 sin NTC-AF, utilizadas como control. Las figuras 63 b y 63 c corresponden a células THP-1 incubadas con NTC-AF con una concentración de 0.125 mg/mL durante 24 h y 48 h respectivamente. Se observa una leve diferencia luego de 24 y 48 horas de incubación indicada en las figuras 63b y 63c. En la figura 63b se puede observar una mayor cantidad de NTC-AF los cuales no alcanzan a llegar el núcleo. Esta cantidad de NTC-AF aumenta luego de 48 horas de incubación. Las aglomeraciones presentadas de NTC-AF en la figura 63c se ubicaron en el citoplasma y con el aumento del tiempo de incubación los NTC ocupan más del 50% de la célula.

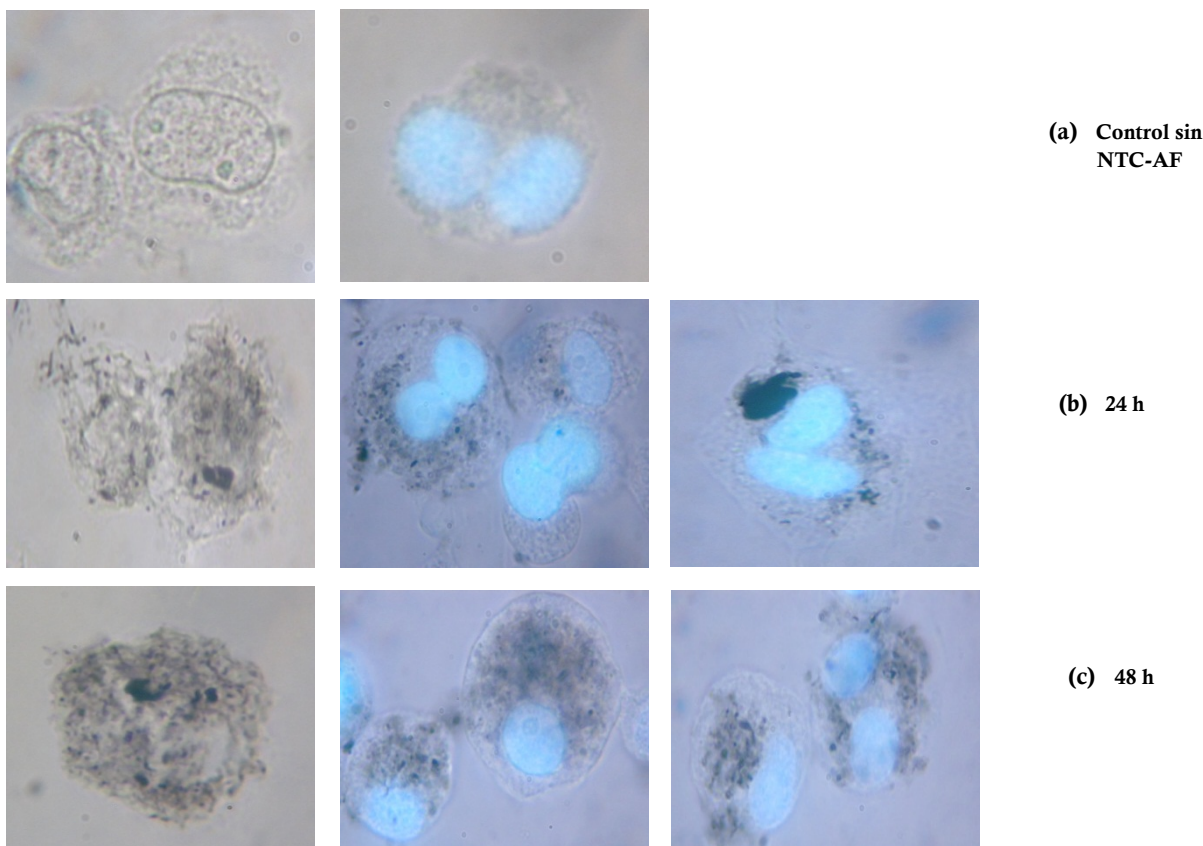


Figura 63. Internalización de NTC-AF en células THP-1 (microscopia fluorescente)

Los NTC pueden internalizarse en células de mamíferos mediante mecanismos de difusión pasiva (Lacerda y col., 2007). El grupo de Kostarelos (Kostarelos y col., 2007) estudió la

internalización de NTC-Amb en líneas celulares como: fibroblastos, HeLa, CHO y HEK293 y concluyeron que el mecanismo de internalización es independiente del tipo de línea celular utilizado. Dumortier (Dmortier y col., 2006) incubaron NTC funcionalizados con sales de diazonio con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ durante 24 h luego de este tiempo los NTC se internalizaron en macrófagos y linfocitos T.

3.3.2.2. Resultados con microscopia óptica

En esta investigación los NTC-AF con una concentración de 0.031 mg/mL tuvieron un porcentaje de internalización del 35% luego de 24 h de incubación en células THP-1. Mientras que para una concentración de 0.125 mg/mL de NTC-AF se alcanzó un porcentaje de internalización de aproximadamente el 60% luego de 24 h de incubación. Estos resultados se observan en la figura 64.

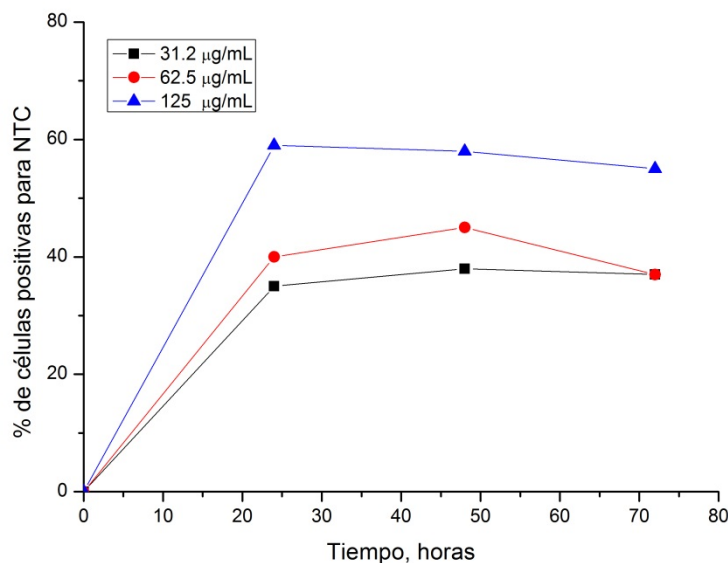


Figura 64. Porcentajes de internalización de NTC-AF en células THP-1.

El estudio de la internalización de los NTC-AF fue seguido además mediante microscopia óptica. Se aprecia la formación de aglomerados de NTC-AF los cuales están ubicados en posibles organelas del tipo vacuolas. El tamaño de estas organelas depende de la concentración de NTC-AF, a mayor cantidad de nanotubos funcionalizados con AF los aglomerados son de mayor tamaño y a su vez ocupan más espacio en el citoplasma. Sin

embargo a la misma concentración y a mayores periodos de incubación los aglomerados fueron de menor tamaño. Lo anterior puede apreciarse en la figura 6

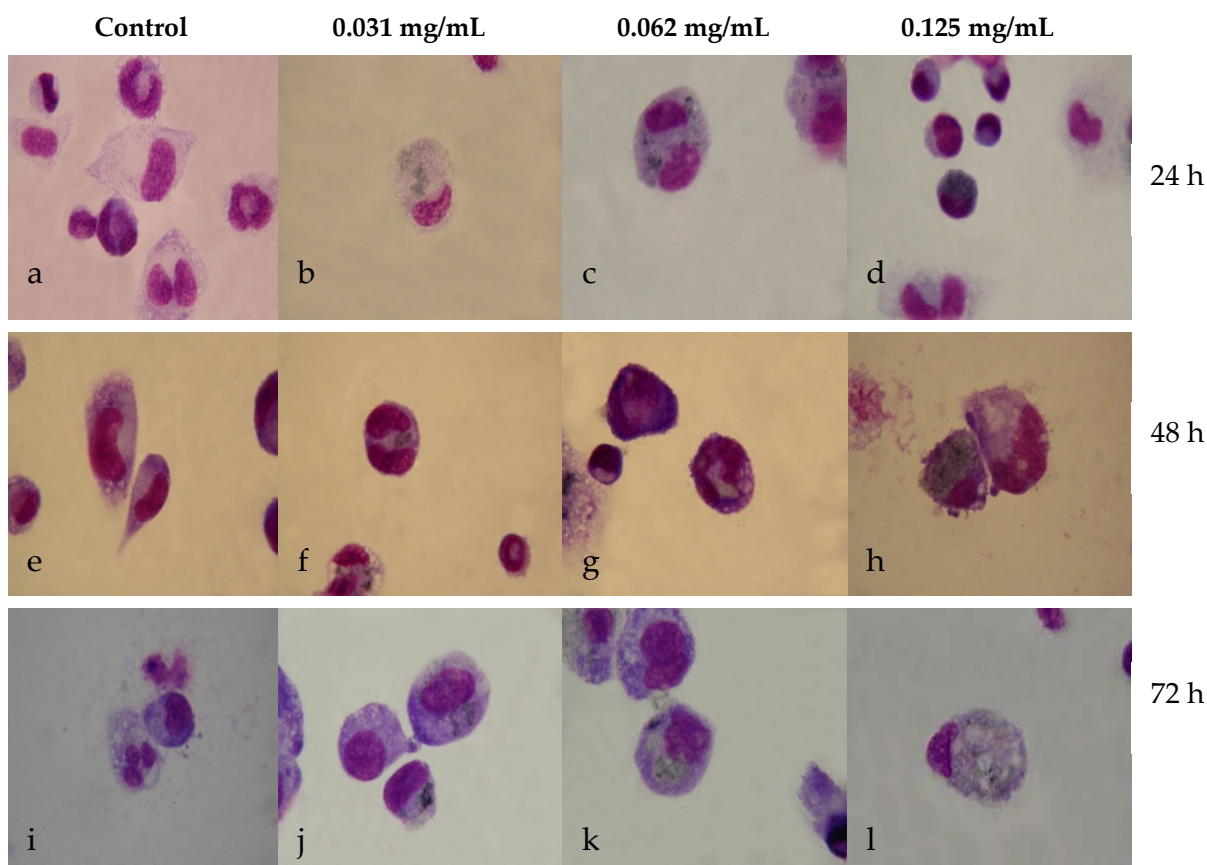


Figura 65. Internalización de NTC-AF en células THP-1 (microscopía óptica). (a-d) incubación 24h, (e-h) 48h, (i-l) 72h.

En este trabajo los NTC-AF se internalizaron en células THP-1 y en células THP-1 infectadas por *Leishmania* como se aprecia en la figura 66.

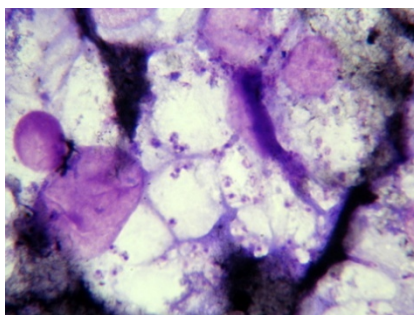


Figura 66. Internalización de NTC-AF en células THP-1 infectadas por *Leishmania* (microscopía óptica)

El mecanismo de ingreso de los NTC-AF a las células THP-1 infectadas probablemente ocurre por un mecanismo mediado por las proteínas fijadoras de folato, debido a que los nanotubos están funcionalizados con AF. Los NTC son insolubles en agua y otros solventes por lo que no fue posible realizar experimentos control de internalización utilizando NTC sin funcionalizar. Sin embargo en el trabajo de tesis de maestría (Novoa y col., 2012) de la profesional Viviana Novoa y en un estudio de Castillo (Castillo y col., 2011) se encontró que NTC-quitosano con una concentración de 125 $\mu\text{g/mL}$ y 24 h de incubación lograron una internalización de aproximadamente 65% en células THP-1. A pesar del leve aumento en el % de internalización del NTC-quitosano comparado con el NTC-AF, el conjugado NTC-AF logró un mayor tiempo de internalización en células THP-1. Luego de 72 h de incubación el % de internalización de los NTC-AF permaneció casi constante (60% aproximadamente). Por otra parte el porcentaje de internalización de los NTC-quitosano luego de 70 h de incubación disminuyó del 80 al 30%.

La *Leishmania* es un parásito incapaz de sintetizar folatos indispensable para la síntesis de bases precursoras de ADN (Fadili y col., 2003; Cunningham y col., 2001), y otros precursores importantes en rutas biosintéticas de otros tipos de biomoléculas (Vickers y col., 2006). A pesar de esta limitante la *Leishmania* ha desarrollado un sistema de proteínas para el transporte y metabolitos de folatos. Sin embargo, no se conocen hasta el momento estudios sobre la modulación y estimulación por parte del parásito en la expresión de proteínas fijadoras de folato (PFF) en las células infectadas con la *Leishmania*.

El sistema transportador de proteínas está conformado por dos tipos de proteínas: transportadores de folato (FT1) y transportadores de biopterinas (BT1). La FT1 es una proteína transmembranal constituida por un conjunto de 14 proteínas con los extremos N-terminal y C-terminal dentro de la célula (Fadili y col., 2003). Por otro lado la BT1 contiene 12 dominios localizados en la membrana plasmática y es el principal transportador de pterinas no conjugadas (Rciahrd y col., 2002), aunque estudios han demostrado una pequeña capacidad para transportar folatos (Kunding y col., 1999; Ouameur y col., 2008).

La información anterior es concordante con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde los NTC-AF fueron internalizados por las células infectadas por el parásito de la *Leishmania*.

3.3.2.3. Actividad fototóxica de NTC-AF en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*

A continuación se observa el montaje experimental para la irradiación de los NTC-AF en células infectadas y no infectadas con el parásito de la *Leishmania panamensis*.

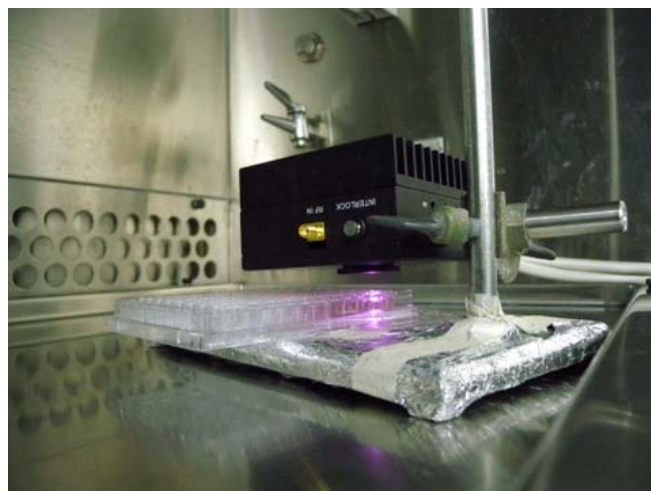


Figura 67. Montaje utilizado para irradiación de células con NTC-AF.

En la tabla 18 se observan los resultados de los porcentajes de inhibición de las células infectadas y no infectadas con la *Leishmania*.

Tabla 18. Actividad fototóxica del conjugado NTC-AF sobre células infectadas con amastigotes intracelulares de *L. panamensis* irradiados durante 10 minutos.

NTC-AF (mg/mL)	Amastigotes intracelulares de <i>Leishmania panamensis</i> .					
	Porcentajes de inhibición $\pm$ DS					
	Experimento 1		Experimento 2		Experimento 3	
	Irradiado	No irradiado	Irradiado	No irradiado	Irradiado	No irradiado
0.5	NC	NC	NC	NC	22.22 $\pm$ 5.56	0
0.25	2.55 $\pm$ 2.23	0	2.17	12.32 $\pm$ 4.14	11.11 $\pm$ 1.85	16.75 $\pm$ 1.97
0.12	2.55 $\pm$ 1.59	6.09 $\pm$ 0.9	0	8.96 $\pm$ 1.38	0	0
0.06	0	0	0	4.2 $\pm$ 3.31	0	0

NC: no calculado

En un experimento adicional, concentraciones de 0.2 mg/mL indujeron 38.66 ± 2.55 % de inhibición de las células infectadas 48 horas pos-irradiación. Las células controles no irradiadas mostraron un 10.29 ± 7.89 % de inhibición.

El tratamiento con NTC-AF en células THP-1 infectadas presentó una baja inhibición en las células infectadas con *L. panamensis* en las concentraciones utilizadas. Según los resultados encontrados no se puede mostrar que hubo diferencias entre los porcentajes de disminución de las células infectadas irradiadas con respecto a las células infectadas no irradiadas.

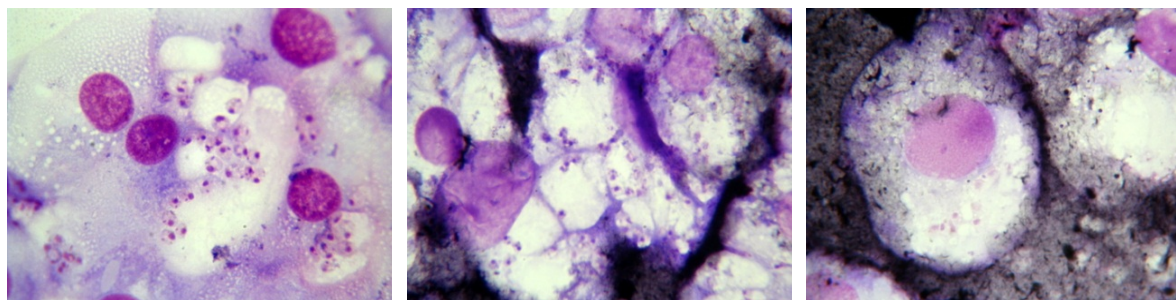
Diferentes estudios (Kam y col., 2005; Chakravarty y col., 2008) han mostrado la efectividad de los NTC bajo la acción del IR cercano en la destrucción selectiva de células cancerígenas. Uno de los pioneros en este tipo de aplicaciones fue Kam quien logró de manera selectiva la destrucción de casi el 100% de células cancerígenas tipo HeLa y utilizando una fibra laser de 1064 nm a una potencia de 3.5 W/cm^2 mediante pulsos de 10 s cada uno. Fisher estudió la respuesta fototérmica de NTC de pared múltiple irradiados durante 5 y 10 minutos con una densidad de potencia de 15.3 W/cm^2 e incubados en células de cáncer de próstata PC3. Se obtuvieron porcentajes de muerte células de casi el 90%. En otro estudio Chakravarty y col destruyó de manera selectiva células cancerígenas del tipo Daudi irradiando NTC de carbono con un sistema laser 811 nm durante 7 minutos y a una densidad de potencia de 5 W/cm^2 . El mecanismo de muerte celular por calentamiento con IR cercano ocurre debido a necrosis coagulativa y la desnaturalización de proteínas de la célula (Madani y col., 2012). Una forma de evaluar la muerte celular por cambios en la temperatura es mediante el análisis de las proteínas de choque térmico (HSP). Las HSP son proteínas que producen los organismos unicelulares y sirven como marcadores endógenos de estrés térmico cuando la temperatura excede los 43°C . Algunos investigadores (Burke y col., 2009) han concluido que la expresión de HSP aumenta en zonas de células cancerígenas cercanas al haz de luz láser que las está irradiando, y ésta expresión de HSP disminuye gradualmente en zonas lejas al haz de luz láser. Cuando estas células cancerígenas son irradiadas en presencia de NTC, el calor generado por los nanotubos es suficiente para aumentar la temperatura superficial de las células, disminuir la sobreexpresión de HSP y producir necrosis coagulativa.

Según los resultados de la tabla 18 la inhibición del crecimiento de amastigotes por parte de los NTC-AF irradiados con IR cercano no fue la esperada. Probablemente la máxima

temperatura alcanzada de 44°C por los NTC-AF no fue la suficiente para lograr la desnaturalización completa de las proteínas de un número significativo de los parásitos haciendo difícil que se produjera la destrucción del parásito. A pesar de que se utilizaron algunas condiciones similares a los experimentos en estudios con cáncer (longitud de onda, y tiempos de irradiación (5-10 minutos)) los experimentos de irradiación de células THP-1 infectadas con *L. panamensis* no produjeron porcentajes de inhibición significativos. Sin embargo hasta ahora en la literatura no hemos encontrado ningún estudio específico del uso del sistema NTC-AF para la destrucción selectiva de la *Leishmania* en presencia de radiación del IR cercano, como se ha mencionado los NTC se han utilizado como transportadores de fármacos (como la AmB) para combatir con otra estrategia la leishmaniasis.

En este estudio inicial realizado sobre el uso de NTC-AF en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* irradiados con láser del IR cercano de 808 nm no se pudo observar una diferencia clara entre los porcentajes de inhibición de las células infectadas irradiadas con respecto a las no irradiadas. Probablemente la razón de los bajos % de inhibición pudo ser debido a que los NTC-AF son activados generando un aumento localizado de la temperatura que resulta letal para cierta cantidad de parásitos presentes en las células infectadas con *Leishmania* pero insuficientes para matar toda la población presente.

La figura 68 muestra los NTC-AF internalizados en las células infectadas con los amastigotes, aunque la diferencia en las imágenes de las células antes y después de irradiar no es muy notoria, en la tabla 18 este resultado se observó más claramente, mediante el cálculo de los % de inhibición.



a) Control

b) 24 h de incubación, tiempo de irradiación 10 min

c) 24 h de incubación, tiempo de irradiación 10 min (detalle)

Figura 68. Irradiación láser de NTC-AF en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. (Aumento de 1000x).

A pesar de que no se alcanzaron porcentajes de inhibición “altos” los resultados obtenidos por el compuesto NTC-AF son promisorios y probablemente con la utilización de un sistema laser de mayor potencia y mayor estabilidad que alcance temperaturas superiores a las 45°C durante tiempos superiores a los dos minutos podría ser suficiente para alcanzar mayores porcentajes de inhibición de parásitos de la *L. panamensis*.

3.4. Conclusiones

La estimulación de NTC-AF con radiación electromagnética del IR cercano (808 nm) produjo un efecto térmico en los nanotubos. Éste efecto se vio reflejado en aumento de la temperatura de las dispersiones NTC-AF, lográndose un mayor efecto para una concentración de 0.5 mg/mL. A medida que se aumentó la potencia del láser de 200 a 600 mW la temperatura de la solución exhibió un incremento considerable, obteniéndose una máxima temperatura de 44°C. Se alcanzó una velocidad de calentamiento de 0.036 °C/s para una concentración de 0.5 mg/mL y una potencia del láser de 600 mW. Experimentos de control mostraron la transparencia e inocuidad de la luz IR cercano frente a una solución acuosa. No se obtuvieron cambios significativos de la temperatura del agua durante 10 minutos de irradiación utilizando la máxima potencia (600 mW) del láser de 808 nm. Las excelentes propiedades ópticas de los NTC en la zona del IR cercano los han convertido como excelentes candidatos para aplicaciones biomédicas en el campo de la terapia fototérmica para la destrucción selectiva de células cancerígenas. Lo cual estimuló su uso en las células infectadas con la *Leishmania*.

Las dispersiones NTC-AF no exhibieron toxicidad alguna en células de mamíferos THP-1, además no se alcanzó la CC₅₀ (concentración citotóxica 50) ni la CC₉₀ incluso a concentraciones mayores de 335 µg/mL.

Los experimentos de internalización mostraron el ingreso de los NTC-AF en células THP-1 y se observó una dependencia del tiempo de internalización con la concentración de nanotubos internalizados. Los NTC se ubicaron en el citoplasma y con el aumento en el tiempo de internalización ocuparon más del 50% de la célula. Además por medio de microscopia óptica se observó la formación de aglomerados de los NTC-AF los cuales se ubicaron en especies de vacuolas. El mecanismo de ingreso de los NTC funcionalizados con AF es probablemente mediado la expresión de receptores de folato como se encontró en la tesis de maestría (Novoa y cols., 2012) realizada en colaboración con este proyecto.

Los NTC-AF sintetizados en este trabajo cumplieron las características fisicoquímicas y biológicas para ser utilizados como agentes en la terapia fototérmica para la destrucción selectiva de células cancerígenas y células infectadas con *Leishmania*. Estas características

fueron: tamaño nanométrico, alta estabilidad química (ver cap. 2), sistemas generadores de un efecto fototérmico y baja citotoxicidad.

A pesar de exhibir las características mencionadas anteriormente el efecto fototóxico en los amastigotes intracelulares no fue el esperado. Sin embargo se observó la internalización de los NTC-AF en las células THP-1 infectadas con *Leishmania*. La poca eficiencia en los porcentajes de inhibición de los amastigotes intracelulares observada fue debida probablemente a que el efecto térmico generado no fue suficiente para matar toda la población de células infectadas.

La población de NTC-AF ingresada por las células infectadas con el parásito no fue el suficiente para que el láser generara el calentamiento de los nanotubos. Además existió dificultad para alinear el láser en los pozos conteniendo las células dentro de las zonas donde estaban presentes los NTC-AF, probablemente se estaban irradiando posiciones donde había ausencia de NTC.

3.5. Bibliografía

- Ashutosh G., Sundar S., Duncan R., Nakashi R., Goya L. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012; 56: 518-525.
- Burke A., Ding X., Singh R. *Proceedings of the National American of Sciences*, 2009; 106: 12897-12902.
- Burlaka A., Lukin S., Prylutska S., Remeniak O., Prylutsky Y., Shuba M., Maksimenko S., Ritter U., Scharff P. *Experimental Oncology*, 2010; 32: 48-50.
- Castillo J., Novoa V., Martínez F., Escobar P. *Revista Salud UIS*, 2011; 43: 21-26.
- Croft S., Sundar S., Fairlamb A. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006; 111-126.
- Cunningham M., Beverley S. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 2001; 113: 199-213.
- Chakravarty P., Marches R., Zimmerman N., Swafford E., Bajaj P., Musselman I., Pantano P., Draper R., Vitetta E. *Proceedings of the National American of Sciences*, 2008; 105: 8697-8702.
- Dumortier H., Lacotte S., Pastorin G., Marega R., Bonifazi D., Briandi D., Briand J., Prato M., Muller S., Bianco A. *NanoLetters*, 2006; 7: 1522-1528.
- Fadili A., Richard D., Kundig C., Oullette M. *Biochemical Pharmacology*, 2003; 66: 999-1008.
- Firme C., Bandaru R. *Nanomedicine*, 2010; 6: 245-256.
- Fisher J., Sarkar S., Buchanan C. *Cancer Research*, 2010; 70: 9855-9864.
- Hussain S., Dosser L., Payne S., Stacy B., Schrandt A. *Applied Materials & Interfaces*, 2011; 3: 3971-3980.
- Iancu C., Mocan L., bele C., Orza A., Tabaran F., Catoi C., Stiufiuc R., Stir A., Matea C., Iancu D., Agoston-Coldea L., Zaharie F., Mocan T. *International Journal of Nanomedicine*, 2011; 6: 129-141.
- Jowkar F., Dehghani F., Jamshidzadeh A. *Journal of Dermatological Treatment*, 2012; 23: 131-135.

Kam N., Kam S., O'Connell M., Wisdom J., Dai H. *Proceedings of the National American of Sciences*, 2007; 102: 11600-11605.

Kumar P., Kalpna A., Prasad Y., Madhukar R., Nath S., Shyam S. *The Journal of Infectiuos Diseases*, 2012; 205: 333-336.

Kunding C., Haimeur A. *EMBO Journal*, 1999; 18: 2342-2351.

Kostarelos K., Lacerda L., Pastorin G., Wu W., Wieckowski S., Luangsivilay J., Godefroy S., Pantarotto D., Briand J., Muller S., Prato M., Bianco A. *Nature Nanotechnology*, 2007; 2: 108-113.

Lacerda L., Raffa S., Prato M., Bianco A., Kostarelos K. *Nanotoday*, 2007; 2: 38-43.

Madani S., Tan A., Dwek M., Seifalian A. *International Journal of Nanomedicine*, 2012; 7: 905-914.

Meymandi S., Zandi S., Aghaie H., Heshmatkhan A. *Journal of the Academy European of Dermatology and Venereology*, 2011; 25: 587-591.

Montes-Fonseca S., Orrantia-Borunda E., Duarte-Moller A., Luna-Velasco A., Román-Aguirre M., Horta C., Sánchez-Ramírez B. *Journal of Nanomaterials*, 2012; 1-7.

Novoa V. *Tesis de Maestría en Ciencias Básicas*, UIS, 2012.

Nilfrousihzadeh M., Jaffray M., Reiszadeh R., Ansari N. *International Journal of Dermatology*, 2006; 45: 989-991.

Ouameur A., Girard I. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2008; 162: 155-164.

Richard D., Kunding C., Oullette M. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002; 277: 29460-29467.

Sanchez-Moreno M., Contreras-Gómez F., Navarro P., Marín C., Ramírez-Macías I., Olmo F., Sanz A., Campayo L., Cano C., Yunta M. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012; 67: 387-397.

Schrand A., Stacy B., Payne S., Dosser L., Hussain S. ACS Applied Materials & Interfaces, 2011; 3: 3971-3980.

Sharquie K., al-Hamamy H., Yassin E. Journal of Dermatology, 1998, 25: 234-237.

Shyam S., Anup S., Madhukar R., Vijay P., Avinash S., Bart O., Marleen B., Dujardin J., Chakravarty J. Clinical Infectious Diseases, 2012; 55: 543-550.

Vickers T., Orsomando G., Díaz R., Scott D., Kang S., Hanson A., Beverley S. The Journal of Biological Chemistry, 2006; 281: 38150-38158.

CAPÍTULO IV

Biosensor Nanotubo de Péptido-Ácido Fólico para Detección de Células Cancerígenas

4.1. Introducción

En los últimos años se ha incrementado el interés por RF como blanco estratégico para la detección y diagnóstico del cáncer (Henne y col., 2006). Los RF son proteínas ligadoras de folatos que poseen una gran afinidad por el AF con una constante de asociación de aproximadamente 0.1 nM y tienen un peso de 38 kDa. Se encuentran sobre-expresadas en la superficie de la membrana celular de células cancerígenas y de parásitos de la leishmaniasis (Leamon y col., 2004).

Actualmente existen una diversidad de métodos para la detección de receptores de folato como indicador de la presencia de algún tipo de cáncer, entre estos métodos se tienen: ensayos citológicos, ensayos de fluorescencia, y radio-inmunoensayos (Li y col., 2012). A pesar de que la efectividad de estos métodos no ha sido cuestionada, la mayoría de ellos son costosos, requieren largos tiempos de análisis y además existe un riesgo de radioactividad sobre todo en los radio-inmunoensayos (Li y col., 2012). Debido a esto la comunidad científica tiene cierto interés en el desarrollo de nuevas metodologías alternativas que eviten los inconvenientes arriba mencionados.

Los métodos electroquímicos, principalmente aquellos basados en biosensores, han recibido un apreciable interés debido a la simplicidad y rápidos tiempos de análisis (Castillo y col., 2004). Recientemente los biosensores que utilizan como elemento de transducción electroquímica el grafeno han venido en aumento debido a las propiedades presentadas por este compuesto (Brownson y col., 2010). El grafeno tiene la posibilidad de adsorber sobre su superficie diferentes tipos de biomoléculas (ADN, proteínas, enzimas, anticuerpos, nanopartículas) y así mejorar sus propiedades electroquímicas.

Los NTP son entidades biológicas con la capacidad y propiedad de auto-organizarse rápidamente en condiciones “suaves” de laboratorio sin la necesidad de equipos especializados y altas temperaturas (Cherny y col., 2008). Los NTP han recibido gran aceptación por parte de la comunidad científica para el diseño racional de dispositivos funcionales para aplicaciones en el campo de la bionanotecnología (Reches y col., 2007).

En este capítulo se describirá la fabricación de un biosensor de grafeno modificado con el conjugado NTP-AF para la detección de células HeLa. El NTP-AF fue depositado sobre un

electrodo de grafeno con el objetivo de incrementar la transferencia electrónica. La adición y enlazamiento de los RF y las células HeLa a la superficie del electrodo de grafeno modificado mostró una disminución en la corriente farádica, hecho que fue confirmado por experimentos de VC. El biosensor mostró ser selectivo hacia los receptores del AF. Se espera que el electrodo NTP-AF sobre el cual se fundamenta este biosensor pueda ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades en las cuales exista una sobre-expresión de RF, como en el caso del cáncer o enfermedades tropicales como la leishmaniasis.

4.2. Parte experimental

4.2.1. Preparación de electrodos modificados con NTP-AF

Los electrodos serigrafiados (SPEs) fueron adquiridos comercialmente (DropSens), estos electrodos son no reutilizables, tienen dimensiones 3.4 x 1.0 x 0.05 cm y se incorporan en una misma pieza el electrodo de trabajo, el auxiliar y el de referencia, en la figura 4.1 se aprecia una fotografía de estos electrodos. El electrodo de referencia y los contactos eléctricos están hechos de plata.

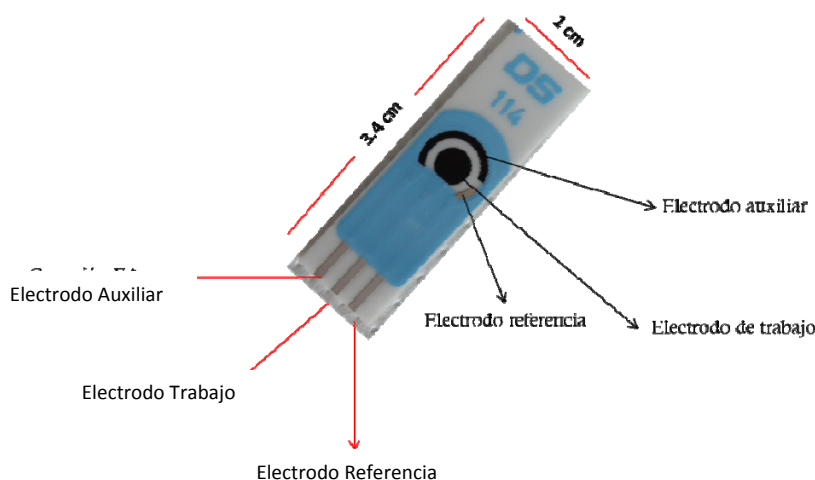


Figura 69. Características del electrodo serigrafiado.

4.2.2. Modificación de electrodos de carbono y grafeno

Se modificaron tres electrodos (carbono, grafeno y oro) con los NTP y con el conjugado NTP-AF. Primero se midieron 10 μ L de la solución NTP y se depositó sobre la superficie del electrodo y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente la superficie del electrodo se lavó cuidadosamente con una solución de buffer fosfato 10 mM pH 7.4. Para el conjugado NTP-AF se realizó el mismo procedimiento pero esta vez depositando sobre la superficie del electrodo 10 μ L. Finalmente los electrodos fueron almacenados en la nevera a 4°C para su posterior caracterización electroquímica.

4.2.3. Modificación de electrodos de oro

Para la modificación de los electrodos de oro se realizó el mismo procedimiento con algunas variaciones. Primero los electrodos de oro fueron modificados con una solución de 2-Iminotiol para lograr una mejor adsorción del NTP y del conjugado NTP-AF. Para esto se depositó sobre la superficie del electrodo 5 μL de una solución de iminitiol (25 μM) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Posteriormente se depositó 10 μL del NTP (0.2 mg/mL) o 10 μL del conjugado NTP-AF (0.1 mg/mL) y se dejaron incubando durante 2 horas, finalmente el electrodo fue cuidadosamente lavado con el buffer salino de fosfato y se almacenaron a 4°C.

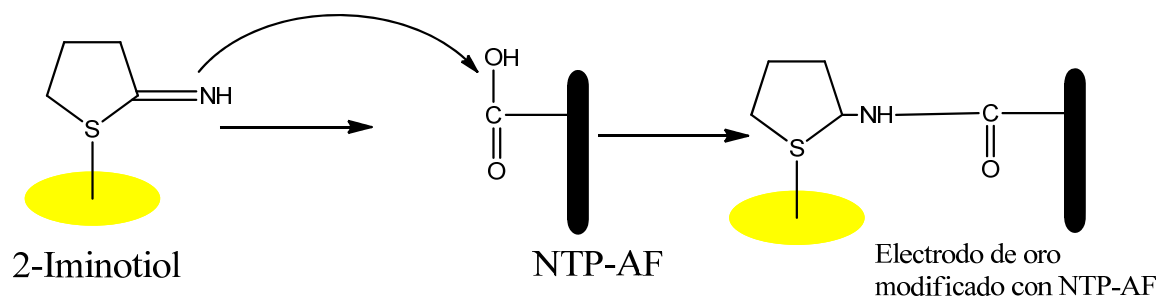


Figura 70. Modificación de electrodos de oro con NTP-AF.

4.2.4. Caracterización microscópica de los electrodos modificados con NTP-AF

Los electrodos se observaron por el microscopio de fluorescencia, en un Cell Observer Zeiss, y el microscopio electrónico de barrido mediante un SEM Quanta FEG. El análisis se realizó identificando la fluorescencia de los NTP-AF sobre la superficie de los diferentes electrodos. Además la microscopia SEM permitió identificar la estructura de la superficie de los electrodos modificados y sin modificar.

4.2.5. Caracterización electroquímica de los electrodos no modificados

Para la caracterización electroquímica de los electrodos se midieron los VCs utilizando como especie redox una solución de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 10 mM conteniendo KCl a una concentración de 100 mM. Los electrodos fueron sumergidos en la solución anterior y se tomaron VC a una velocidad de barrido de 100 mV/s. El montaje utilizado para las mediciones electroquímicas

se aprecia en la figura 71. Las mediciones se llevaron a cabo en un potenciostato Autolab PGSTAT101 (Metrohm Autolab, USA).

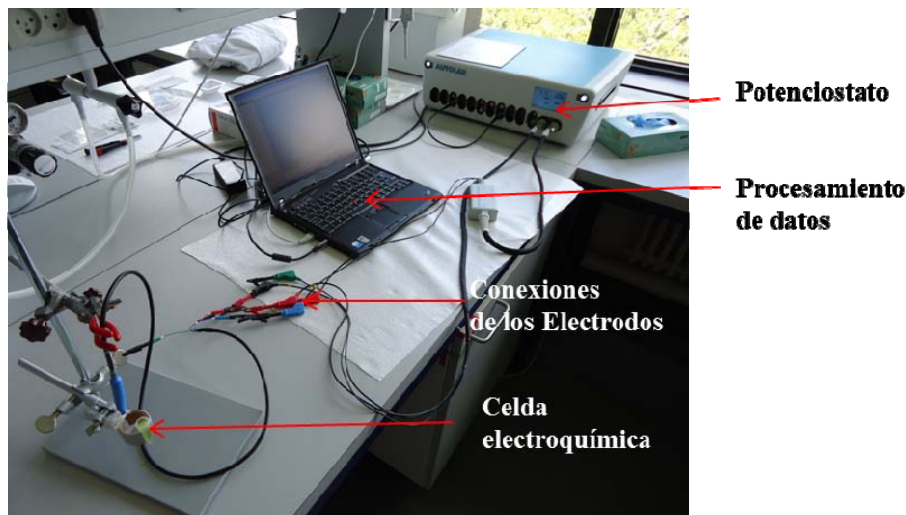


Figura 71. Montaje utilizado para las mediciones electroquímicas.

4.2.6. Caracterización electroquímica de los electrodos modificados con NTP y NTP-AF

Los electrodos de carbono, grafeno y oro modificados con NTP y NTP-AF fueron sumergidos en la celda electroquímica conteniendo la solución de ferrocianuro de potasio-cloruro de potasio y fueron medidos sus respectivos VCs a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Cada uno de los ciclos se realizó entre 600 y -600 mV.

4.2.7. Detección de receptores de folato

Se prepararon diferentes soluciones de RF, partiendo de una solución stock de 2.63 μM se prepararon por dilución 5 soluciones en un rango comprendido entre 4-40 nM. Las soluciones fueron agregadas sucesivamente a la celda electroquímica conteniendo una solución 10 mM de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, se agitó la solución y se tomaron los respectivos VCs. Se construyó una curva de calibración de intensidad de corriente vs concentración de RF. Como experimento control se tomó una una solución de RF incubada con una solución de AF 100 veces más concentrada que la primera solución. La mezcla fue dejada en reacción durante 2 horas, tiempo que asegura un total bloqueo de los RF por parte del AF. Posteriormente esta

solución se agregó a la celda electroquímica y se registró el respectivo VC utilizando una velocidad de barrido de 100 mV/s.

4.2.8. Detección de células HeLa

La línea celular HeLa fue donada generosamente por el laboratorio CellLab de la Universidad Técnica de Dinamarca. Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1648 incubada con suero bovino fetal (SBF). Las células fueron removidas del fondo del *frasco de Roux* utilizando tripsina y buffer PBS. Posteriormente las células HeLa fueron colocadas en medio RPMI y colocadas en tubos cónicos para ser centrifugadas (1500 rpm x 5 min). Las células en solución fueron almacenadas en una cabina con 5% CO₂ a 37°C. Posteriormente se determinó la concentración mediante conteo en cámara Neubauer y se prepararon diluciones entre 500 y 3000 células HeLa/mL. Las soluciones de células HeLa de diferente concentración fueron agregadas a la celda electroquímica y agitadas durante 30 segundos, finalmente se registraron los VCs a 100 mV/s.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. El conjugado NTP-AF fue adsorbido sobre la superficie de los electrodos

Luego de la inmovilización del conjugado sobre la superficie de los electrodos se realizó la caracterización microscópica por fluorescencia y por SEM. En la figura 72 se aprecian las imágenes de la superficie de los electrodos modificados y sin modificar con NTP y NTP-AF.

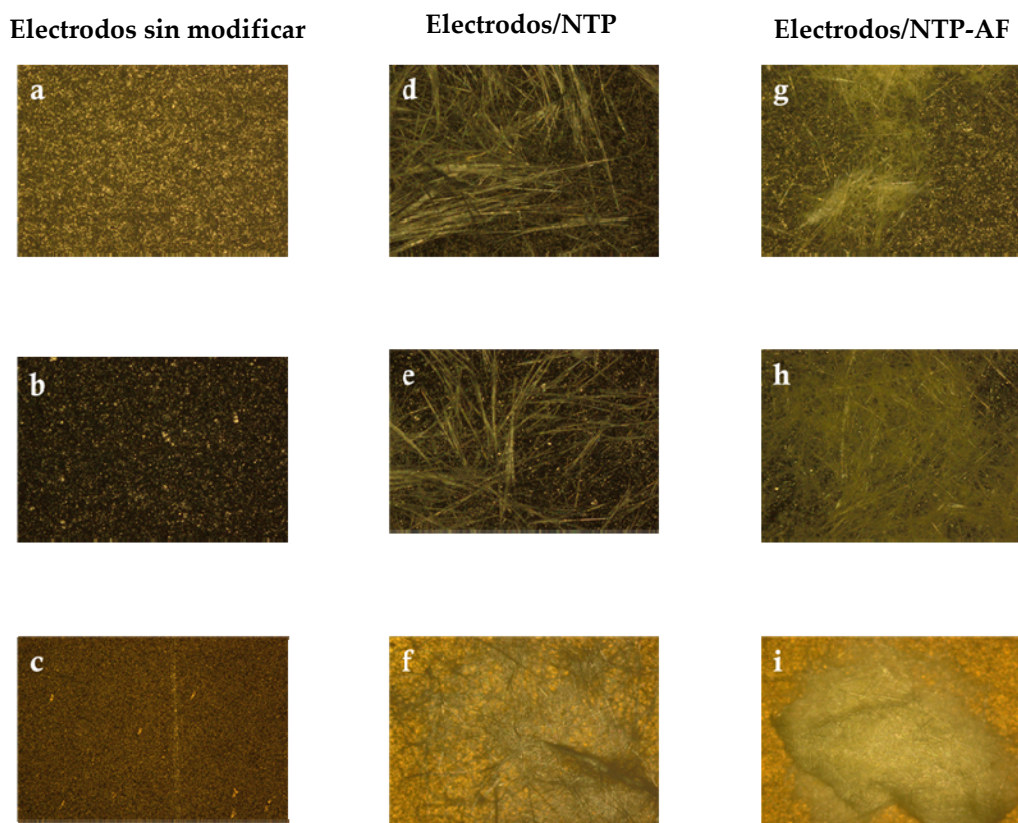


Figura 72. Imágenes de microscopia óptica de (a-c) electrodos de carbono, grafeno y oro sin modificar, (d-f) electrodos carbono, grafeno y oro modificados con NTP, NTP-AF y (g-i) electrodos modificados con NTP-AF.

Se observa una clara diferencia en las superficies de los electrodos sin modificar. La superficie de los electrodos muestra la presencia de los nanotubos formando especies de entrecruzados con los electrodos. Como se verá más adelante esto tendrá cierta influencia sobre la respuesta electroquímica de los electrodos modificados. A diferencia de los electrodos modificados con NTP los electrodos NTP-AF muestran una mayor área cubierta

por el conjugado, es decir están cubriendo un mayor porcentaje de la superficie de grafeno y se nota la ausencia de espacios entre los nanotubos.

Adicionalmente se tomaron imágenes de microscopia fluorescente de la superficie de los electrodos modificados únicamente con el conjugado NTP-AF, como evidencia para mostrar la modificación de los electrodos.

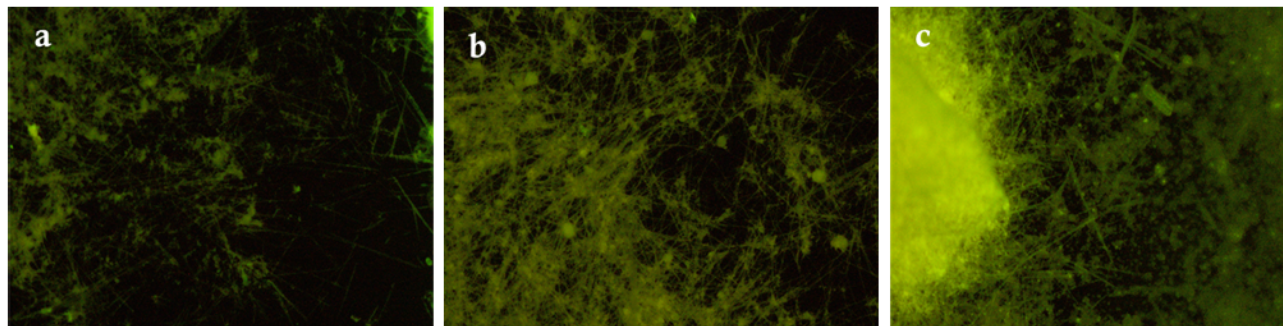
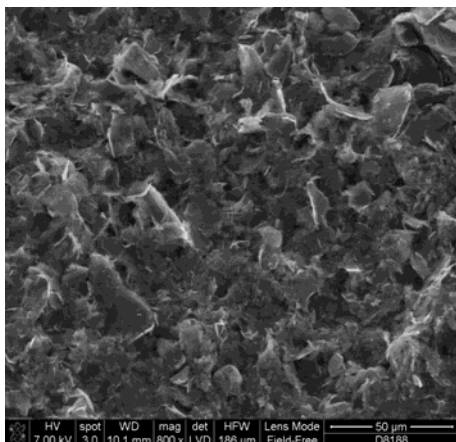


Figura 73. Imágenes de microscopia fluorescentes de (a) electrodos de carbono/NTP-AF (b) electrodos de grafeno/NTP-AF y (c) electrodos de oro NTP-AF.

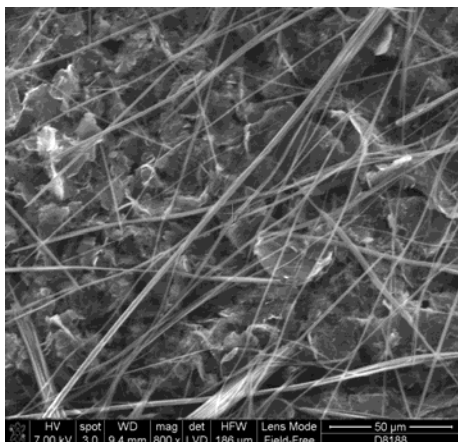
La fluorescencia presentada por el conjugado es debido a las propiedades fluorescentes del AF cuya longitud de onda de emisión esta en el rango de 450-480 nm.

Para evidenciar con más detalle aun la modificación de los electrodos, se realizó una caracterización adicional utilizando microscopia SEM. En la figura 74 mostrada a continuación se nota la diferencia entre los electrodos de grafeno modificados y sin modificar.

Electrodo de grafeno sin modificar



Electrodo de grafeno/NTP



Electrodo de grafeno/NTP-AF

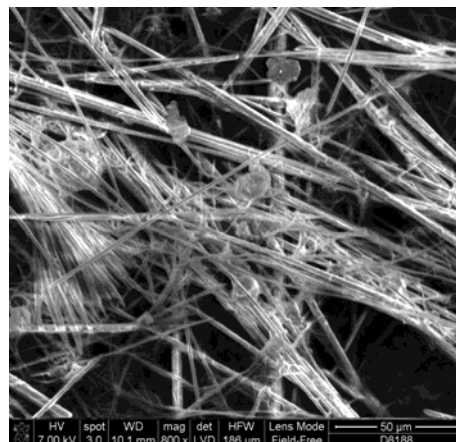


Figura 74. Imágenes de microscopia SEM de electrodos de grafeno, electrodos de grafeno/NTP y electrodos de grafeno-NTP/AF respectivamente.

Nuevamente se aprecia claramente que la mayor área superficial es cubierta por los NTP-AF comparado con los electrodos NTP y de grafeno.

4.3.2. Los NTP-AF exhibieron excelentes propiedades electroquímicas

La VC es una de las técnicas analíticas más ampliamente utilizadas para es el estudio de reacciones electroquímicas y suministra una información rápida sobre los potenciales redox de la especie bajo estudio (Harnish y col., 2012).

Esta técnica se basa en aplicar un barrido de potencial al electrodo de trabajo tanto en el sentido directo como en el sentido inverso, proceso conocido como barrido triangular de potencial. Este programa de potencial se inicia en un valor E_1 y finaliza en un valor E_2 .

En este tipo de perturbación, la pendiente de la variación de potencial se conoce como “velocidad de barrido”. Existen 3 valores importantes de potencial, el potencial inicial E_0 , el potencial de corte anódico E_a y el potencial de corte catódico E_c . El barrido puede ser iniciado en cualquier sentido (anódico o catódico). Para un sistema reversible, la respuesta corriente-potencial que se obtiene es similar a la de la figura 75. Considerando que el barrido se inicia en el sentido anódico, se aprecia que cuando se alcanza el valor adecuado de potencial para que la reacción de oxidación ocurra, la corriente aumenta notablemente hasta un valor máximo. Dado que la especie que reacciona es consumida totalmente en la superficie del electrodo, la corriente de oxidación cae a medida que se aumenta el potencial. Una vez alcanzado el valor de potencial de corte anódico, el barrido de potencial es invertido y se

obtiene un aumento de corriente catódica correspondiente a la reacción de reducción. El VC finaliza en un valor de potencial, coincidente con el valor de potencial inicial. Dos valores importantes para el análisis del proceso redox son las corrientes máximas obtenidas, denominadas corriente de pico anódico (i_{pa}) y corriente de pico catódico (i_{pc}), respectivamente.

En la figura 75 se aprecia un VC típico para diferentes velocidades de barrido. De esta manera en este trabajo se utilizó la VC como una herramienta para evaluar el comportamiento de los electrodos modificados con el conjugado NTP-AF ya que éste es utilizado en la construcción de electrodos para la detección de células cancerígenas que expresen receptores de folato.

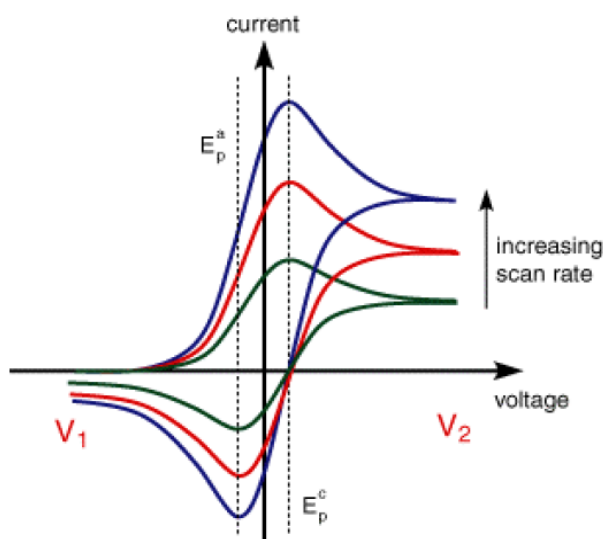


Figura 75. Ejemplo de un voltamograma cíclico (Brad y col., 2007).

La superficie de los electrodos de oro, carbono y grafeno fue cubierta mediante la adsorción física de los NTP y del conjugado NTP-AF. Los NTP y el conjugado se dejan en contacto con los electrodos durante tres horas a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavados cuidadosamente con agua milliQ para remover cualquier exceso de nanotubo o conjugado no adsorbido sobre los electrodos.

En la figura 76 se observan los electrodos preparados de grafeno, carbono y oro modificados con NTP y NTP-AF.

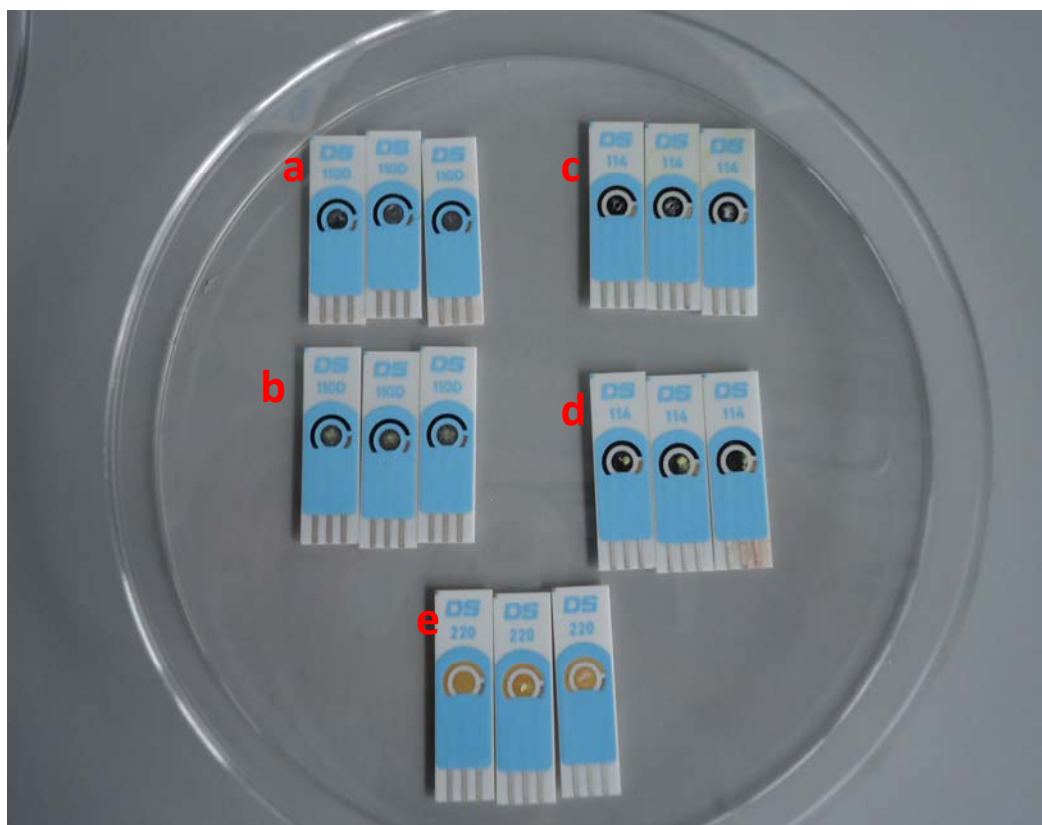


Figura 76. Electrodo modificado con NTP y NTP-AF: (a, b) grafeno, (c,d) carbono y (e) oro.

Finalmente fueron caracterizados mediante VC utilizando $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM como compuesto redox. En la figura 77 se observan los VCs medidos de los tres electrodos (oro, carbono y grafeno) sin modificar.

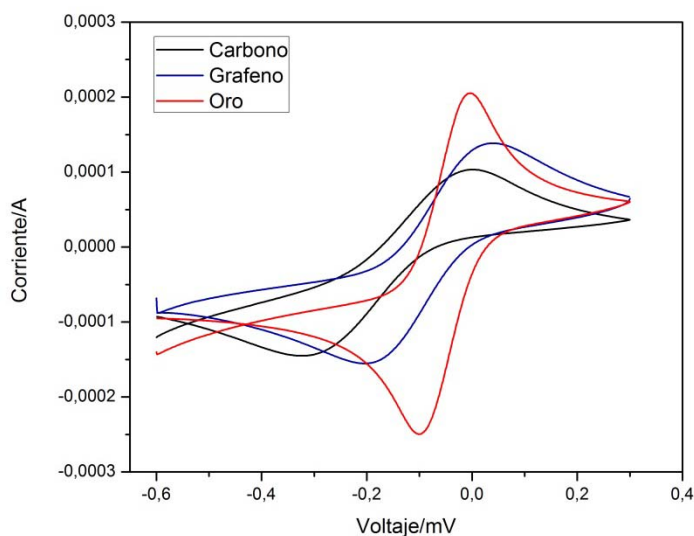


Figura 77. VCs de electrodos de carbono, grafeno y oro sin modificar. La solución electroquímica está compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM y se midió a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Según la gráfica los valores de la corriente catódica generada durante el barrido de voltaje fue 103, 141 y 205 μA para los electrodos de carbono, grafeno y oro respectivamente. El electrodo de oro generó la respuesta más alta en el valor de la corriente durante el proceso redox del ferrocianuro de potasio, por el contrario el electrodo de carbono obtuvo el valor más bajo en la corriente. La notoria respuesta electroquímica de los electrodos de oro radica en sus altas propiedades conductoras y alta velocidad en la transferencia electrónica (Ferapontova y col., 2005).

Para mirar el efecto de los NTP sobre la reducción/oxidación del $K_3[Fe(CN)_6]$ se midieron VCs de cada uno de los electrodos modificados con los NTP.

Según la literatura los NTP exhiben buenas propiedades electroquímicas convirtiéndolos en excelentes candidatos para la construcción de biosensores (Shklovsky y col., 2010). El éxito de los NTP en aplicaciones electroquímicas radica principalmente en un aumento del área superficial de los electrodos modificados por estos.

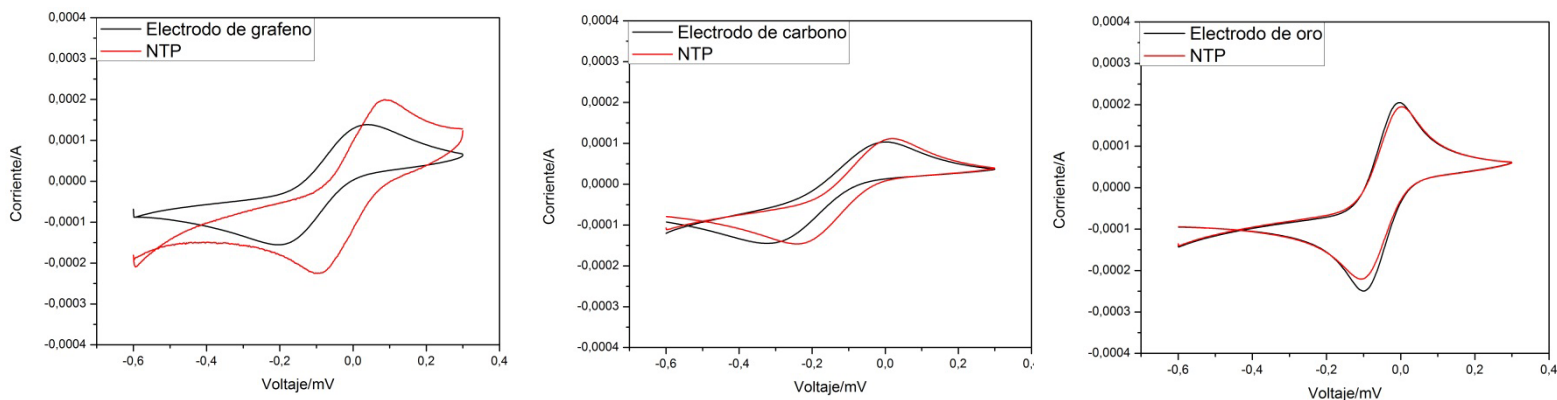


Figura 78. VCs de electrodos de oro, carbono y grafeno sin modificar y modificados con NTP. La solución electroquímica está compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM y se midió a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

El electrodo de carbono modificado con NTP exhibió un leve aumento en el valor de la corriente mientras que el electrodo de grafeno-NTP exhibió un aumento de 32 μA . Por otro lado el electrodo de oro mostró un comportamiento opuesto debido a que el valor de la corriente disminuyó aproximadamente 12 μA . este efecto obedece probablemente a que el electrodo de oro modificado con NTP no presenta un comportamiento conductor suficiente para causar un aumento en los valores de la intensidad de corriente.

Para continuar con la modificación de los electrodos con el conjugado NTP-AF se midieron los respectivos VCs.

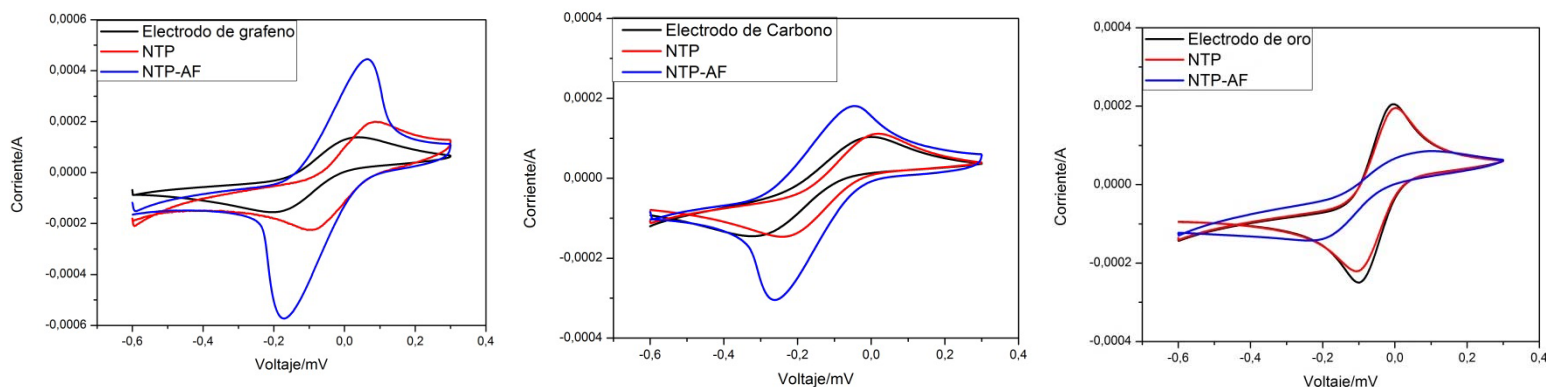


Figura 79. Comparación de CVs de electrodos sin modificar y modificados con NTP y NTP-AF. Solución electroquímica compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los electrodos de grafeno y de carbono modificados con NTP-AF mostraron un aumento significativo en el valor de la corriente, siendo este aumento más pronunciado en el electrodo de grafeno. El valor de la corriente del electrodo de grafeno NTP-AF tuvo un aumento de 300 μA comparado con el valor del electrodo de grafeno sin modificar mientras que el electrodo de carbono aumento en casi 80 μA comparado con el electrodo no modificado. Por otra parte el electrodo de oro disminuyo el valor de la corriente cuando fue modificado con el conjugado NTP-AF. En un trabajo realizado por Wang (Wang y col., 2102) se observó el mismo efecto de disminución de los valores de la intensidad de corriente. Sobre un electrodo de oro fueron inmovilizadas varias capas con polímeros conductores y no conductores, a pesar de la inmovilización de estos polímeros los valores de corriente siguieron disminuyendo. Las capas de polímeros actuaron como aislantes disminuyendo de esta manera los valores en la intensidad de la corriente. En la tabla 19 se observan los valores de las corrientes para cada uno de los electrodos modificados y sin modificar.

Tabla 19. Valores de las corrientes para los electrodos de oro, carbono y grafeno sin modificar y modificados con NTP y NTP-AF.

ELECTRODO		CORRIENTE (μA)
Oro	No modificado	204
	NTP	194
	NTP-AF	75
Carbono	No modificado	102

Grafeno	NTP	113
	NTP-AF	180
	No modificado	138
	NTP	198
	NTP-AF	444

El análisis de la tabla anterior muestra que si se comparan los electrodos sin modificar, el electrodo de oro fue el que generó la señal más alta en la corriente, mientras el electrodo de carbono obtuvo la señal más baja en la corriente de respuesta. La comparación de los electrodos modificados con NTP muestra al grafeno con el valor más alto en la corriente mientras que el electrodo de oro-NTP exhibió valores de corriente menores comparado con el electrodo sin modificar. El grafeno ha sido utilizado recientemente en el desarrollo de nuevos dispositivos electrónicos debido a sus interesantes propiedades electrónicas y electroquímicas (Yemini y col., 2005; Pumera y col., 2010; Liu y col., 2010; Shao y col., 2010; Browson y col., 2010). Finalmente al comparar los electrodos modificados con el conjugado NTP-AF nuevamente el electrodo de grafeno exhibió la señal más alta.

Probablemente exista un efecto sinérgico entre los NTP, el AF y la gran área superficial del electrodo de grafeno, el AF ha sido reportado como una especie electroactiva, esta característica sumada al incremento del área de los NTP son los responsables de las excelentes propiedades electroquímicas mostradas por este material.

Para comprobar la estabilidad de los electrodos en el tiempo, se midieron VCs de los mismos electrodos utilizados 24 horas después de la primera medición. Como se aprecia en la figura 80 la respuesta electroquímica de los electrodos de grafeno modificados exhibe un aumento en el valor de la corriente luego de 24 horas de haber sido preparado. En el caso del electrodo modificado con NTP hubo un aumento de 19 μA , es decir de 305 a 324 μA . Mientras en el caso del electrodo NTP-AF el incremento en la corriente fue de 51 μA . El aumento posiblemente está asociado a la estabilización de la fisisorción de los NTP y los NTP-AF sobre el grafeno a medida que transcurre el tiempo. Adicionalmente, tiempos de inmovilización de 3 horas mostraron buenas respuestas electroquímicas.

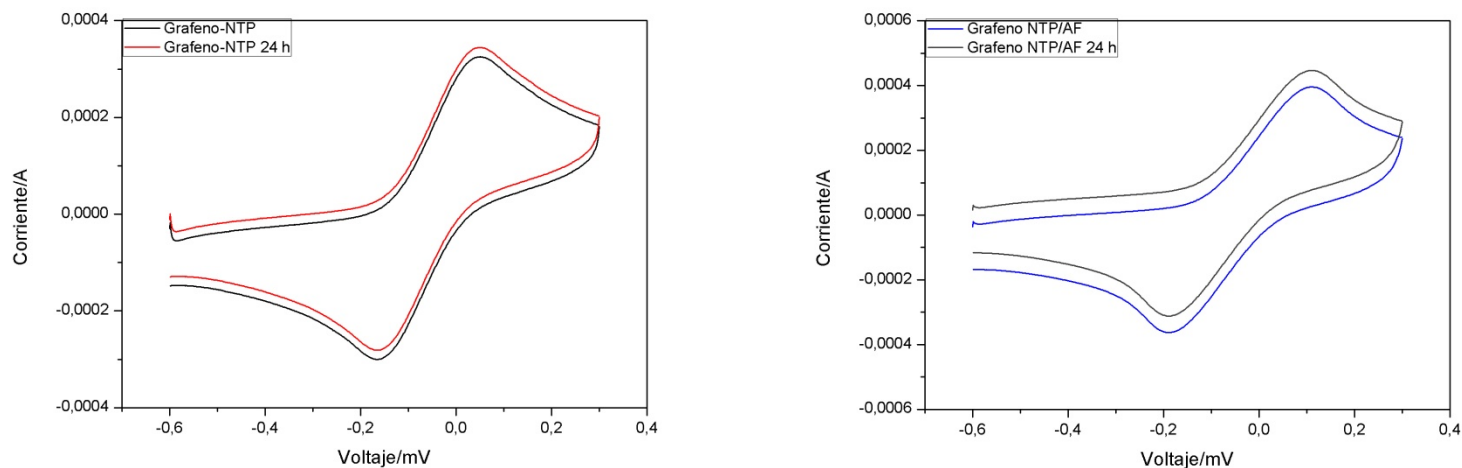


Figura 80. VCs de electrodos modificados con NTP y NTP-AF luego de 24 horas de preparación. La Solución electroquímica esta compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM, se midieron a una velocidad de barrido de 100 mV/s.

Los resultados anteriores convierten a los electrodos de grafeno modificados con NTP-AF en potenciales candidatos para aplicaciones electroquímicas para la construcción de biosensores en la detección de células cancerígenas. Debido a los resultados observados por el electrodo de grafeno modificado con el conjugado NTP-AF, este será utilizado para la detección de receptores de folato y en la detección de células cancerígenas que sobreexpresen este tipo de receptores.

4.3.3. El biosensor fue sensible a diferentes concentraciones de receptores de folato

De acuerdo con los resultados observados en la sección anterior, en este estudio se emplearon electrodos de grafeno modificados con NTP-AF para la detección de RF. A continuación se aprecian los VCs obtenidos luego de la adición de varias cantidades a partir de una solución stock de RF 2.63 μ M.

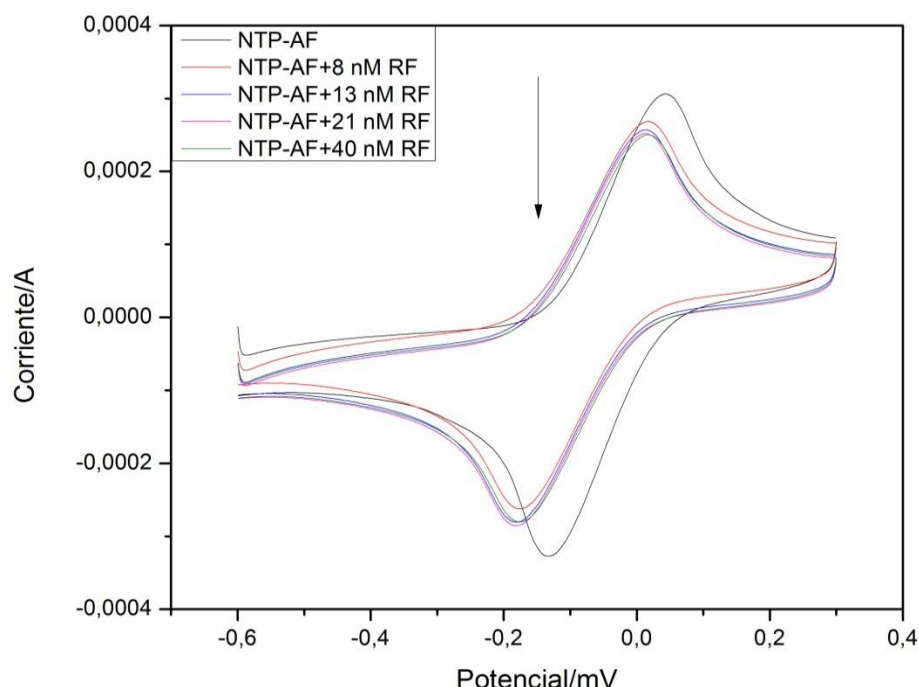
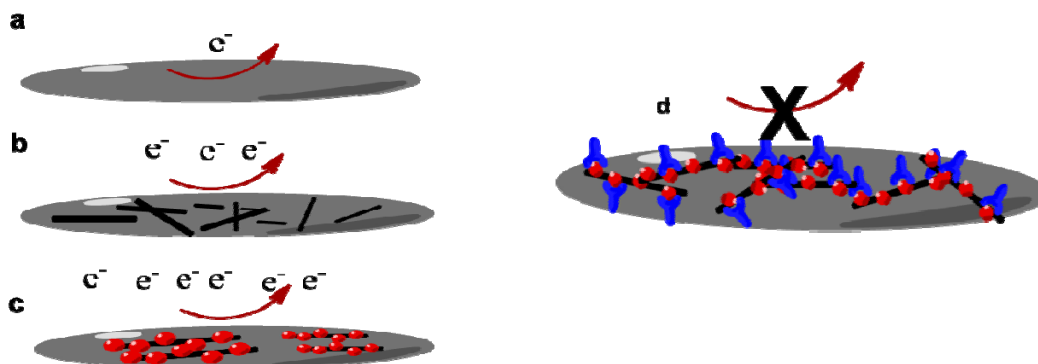


Figura 81. VCs de electrodos de grafeno NTP-AF a diferentes concentraciones de soluciones de RF. Solución electroquímica compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM. (Velocidad de barrido de 100 mV/s).

En los VCs se observa claramente una disminución del valor de la corriente a medida que aumenta la concentración de los RF. Cuando se alcanza una concentración de 40 nM el valor de la corriente disminuye pero no tan notoriamente como cuando se agregó la primera concentración de 8 nM. Este efecto puede ser explicado debido a la interacción de los receptores con el AF enlazados a los NTP, la conocida interacción RF-AF caracterizada por una $K_d = 1-10$ nM, hace que la comunicación electrónica entre el electrodo y el conjugado NTP-AF se disminuya, de alguna manera los receptores de folato están bloqueando la transferencia electrónica entre la superficie del electrodo de grafeno y los NTP funcionalizados con el AF. En el siguiente esquema se explica más claramente el efecto presentado por los RF cuando interactúan con el AF inmovilizado sobre la superficie del electrodo de grafeno.



Esquema 2. Modelo de transferencia electrónica en la detección de RF.

En el esquema 2 se muestra como el electrodo de grafito exhibe una transferencia de electrones hacia la solución de ferrocianuro de potasio, la cual como se observó en la figura es más alta comparada con los electrodos de carbono y de oro. Posteriormente como se aprecia en la figura 2b la transferencia electrónica aumenta debido a la presencia de los NTP. La funcionalización de AF sobre la superficie de los NTP incrementa aún más la transferencia de electrones, debido quizás al aumento del área superficial del grafito con el conjugado NTP-AF. Con estas características el electrodo es posible utilizarlo para la detección de RF, esto es precisamente lo que se ilustra en el esquema 2d. La adición de RF provoca el bloqueo de la señal electroquímica debido a la alta afinidad presentada por la interacción RF-AF. Debido a esta interacción la comunicación electroquímica se bloquea a medida que el número de receptores cubren la superficie del electrodo provocando así la disminución en los valores de la corriente.

Con base en los resultados anteriores se procedió a construir una curva de calibración de intensidad de corriente contra concentración de RF.

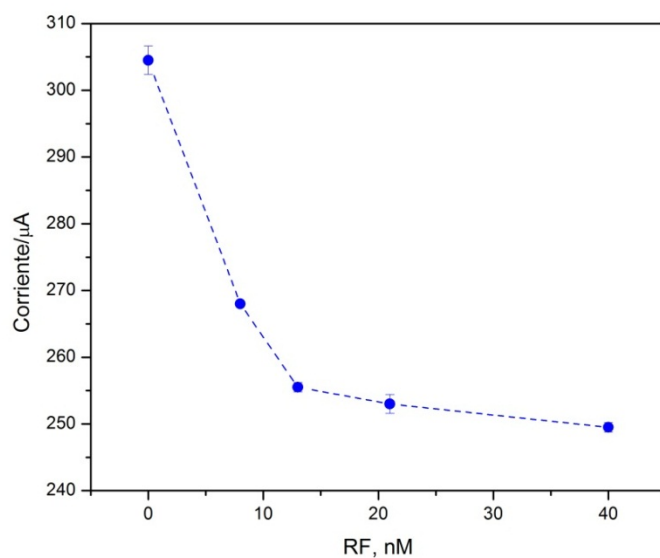


Figura 82. Gráfica de corriente contra concentración de RF

Como se aprecia en la figura existe una dependencia entre la concentración de RF y los valores de la corriente, se observa una dependencia exponencial. Para efectos prácticos la gráfica puede convertirse a su forma lineal transformando los valores de la corriente y la concentración en su respectivo valor inverso.

Esto se aprecia más claramente en la gráfica de $1/\text{corriente}$ vs $1/[\text{RF}]$.

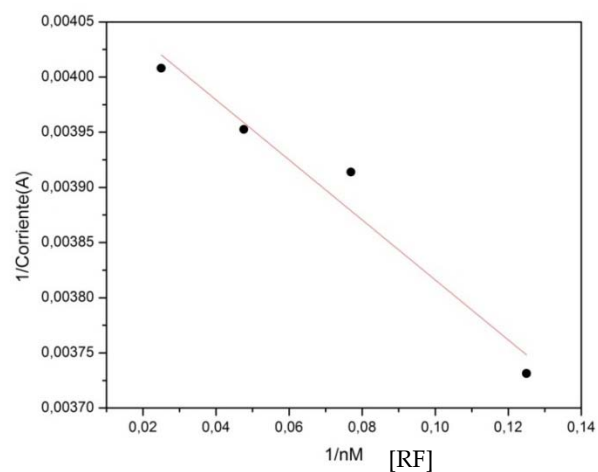


Figura 83. Curva de calibración corriente vs RF

Se aprecia una tendencia lineal, la cual puede ser aprovechada para medir la concentración de cualquier solución que presente determinada cantidad de receptores de folato. La ecuación para ésta gráfica fue:

$$\text{Corriente} = 0.0040 - 0.0027[\text{RF}] \quad r^2 = 0.989 \quad (1)$$

4.3.3.1. El biosensor NTP-AF fue selectivo hacia receptores de folato

Para demostrar la selectividad del biosensor se incubó una solución de 4 nM de RF con una solución de AF 100 veces mayor (400 nM) durante 3 horas con el fin de asegurar un bloqueo total de los receptores y así descartar que la disminución en la respuesta electroquímica sea debida a otras especies presentes en la solución. De esta manera se midieron VCs del electrodo de grafeno NTP-AF en ausencia de RF, en presencia de RF 40 nM y en presencia de la solución de RF bloqueados por el exceso de AF. Los resultados se muestran a continuación.

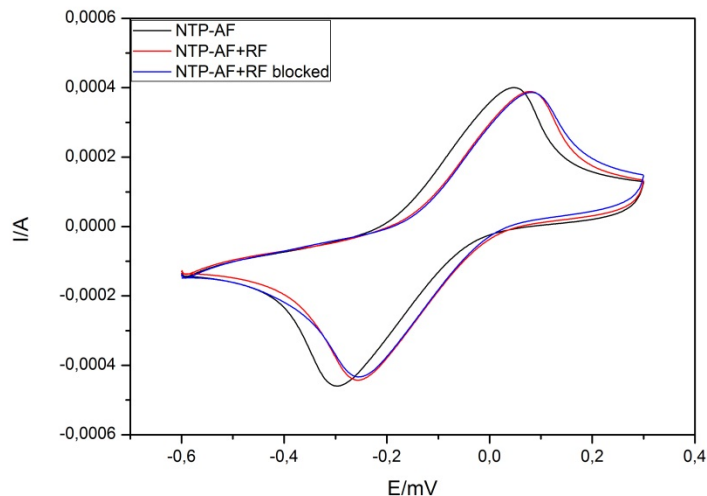


Figura 84. Selectividad del biosensor NTP-AF

Como se aprecia en la figura 84 luego de la adición de la solución de RF 4 nM se observa la disminución en el valor de la corriente que se observó en anteriores experimentos, posteriormente luego de la adición de RF incubados con una solución de AF, se observa que la respuesta electroquímica no se ve afectada, es decir el valor de la corriente permanece

constante. El AF previamente incubado con la solución de los RF bloquea totalmente el efecto de los receptores sobre la respuesta electroquímica del biosensor, de esta manera se comprueba que el electrodo modificado con NTP-AF es selectivo hacia los receptores de folato.

La detección de RF a diferentes concentraciones utilizando electrodos de grafeno modificados con nanoestructuras de péptidos funcionalizadas con biomoléculas como el AF puede ser utilizada para la detección de células cancerígenas o posiblemente células infectadas con el parásito de la *Leishmania* que sobreexpresen RF. A continuación se describen los resultados del comportamiento del electrodo de grafeno modificado en la detección de células de cáncer humano cervical, más conocidas como células HeLa.

4.3.4. Estudio en el comportamiento en la intensidad de corriente del biosensor NTP-AF en presencia de células cancerígenas HeLa

El AF es una vitamina soluble en agua y perteneciente al grupo de los complejos B. En los mamíferos esta vitamina no puede ser sintetizada por lo que es necesario su consumo a través de la dieta alimenticia. La gran afinidad presentada por el AF y los RF ha convertido a esta biomolécula en un blanco clave para la síntesis de fármacos para el tratamiento del cáncer y como ligando estratégico para la entrega controlada y selectiva de agentes terapéuticos en tumores o en sitios donde se presente algún tipo de inflamación (Henne y col., 2006; Li y col., 2011).

Los RF son sobre expresados por células cancerígenas de ovario, pulmón, seno, cerebro y de colon (Sahu y col., 2011; Turk y col., 2002; ayala y col., 2012). Es por esta razón que se escogió la línea celular HeLa como modelo para la construcción del biosensor utilizando electrodos de grafeno modificados con el conjugado NTP-AF. En la figura 85 se aprecia una imagen de la línea celular HeLa utilizada en este estudio.

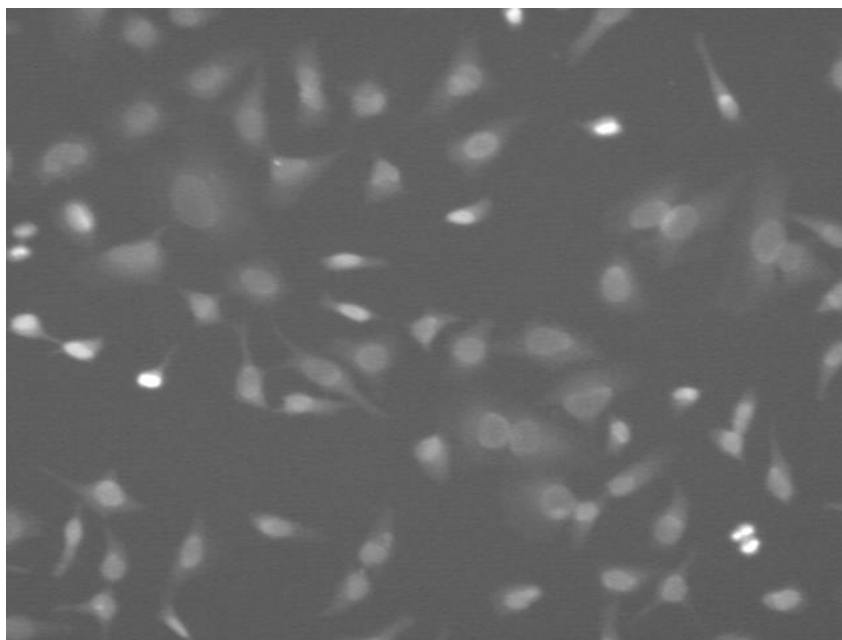


Figura 85. Imagen de microscopia óptica de células HeLa, realizadas en el microscopio óptico.

Las células HeLa fueron cultivadas en medio RPMI y se utilizaron diferentes soluciones con concentraciones en un rango entre 500-10000 células HeLa/mL. El electrodo de grafeno NTP-AF fue sumergido en la solución 10 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ + 100 mM KCl y se midió el respectivo VC. Posteriormente se adicionaron diferentes alícuotas de dispersión de células HeLa a partir de una solución de concentración conocida (250000 células HeLa/mL). Después de cada adición la solución fue agitada y luego de un tiempo de 3 minutos se procedió a medir el VC. En la figura 86 se observan los VCs a diferentes concentraciones de células HeLa.

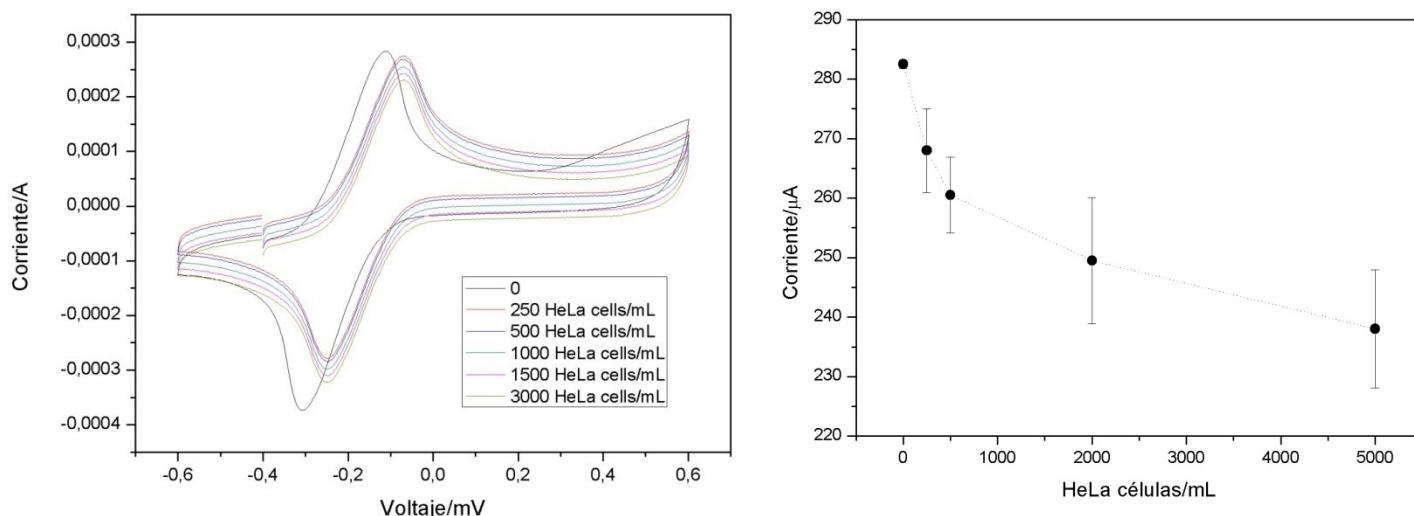


Figura 86. (a) VCs de electrodos de grafeno NTP-AF a diferentes concentraciones de soluciones de células HeLa, (b) curva de calibración corriente contra concentración de células HeLa. Solución electroquímica compuesta de $K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM. (Velocidad de barrido de 100 mV/s).

Con la dependencia de la corriente a diferentes concentraciones de células HeLa se procedió a construir la respectiva curva de calibración corriente vs concentración de células HeLa, esto se observa en la figura 86b. Se utilizaron dos electrodos en las mismas condiciones, en la figura se observa claramente la dependencia de la corriente con la concentración de las células.

Para comprobar que realmente el efecto del bloqueo en la comunicación electrónica entre la solución electroquímica y el electrodo es debido a la detección de las células cancerígenas por parte del AF, se realizó un experimento a diferentes tiempos de inmersión fijando una concentración de células HeLa de 2500 células HeLa/mL. Para esto se utilizó un electrodo nuevo para cada experimento realizado a 10 min, 1 h, 5 h y 13 h. Los VCs se aprecian en la figura 87.

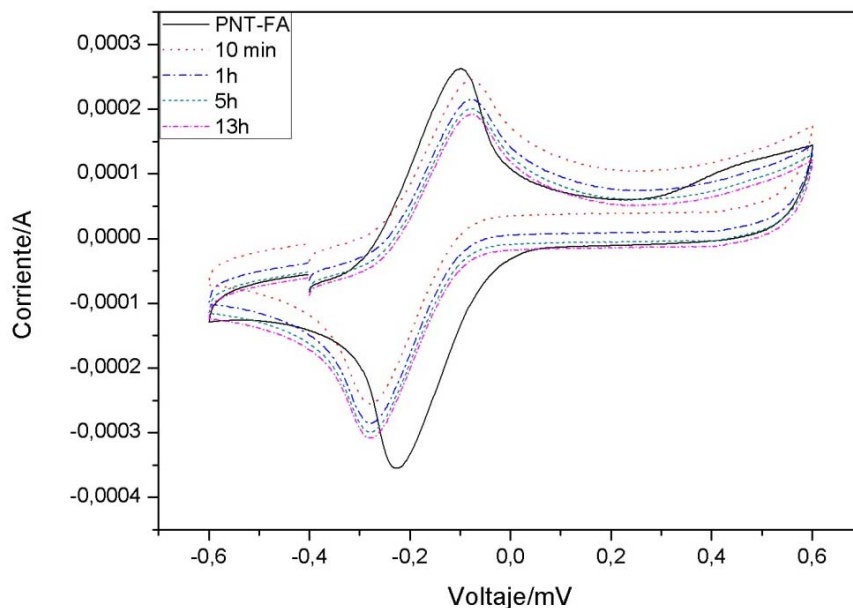


Figura 87. VCs de electrodos de grafeno NTP-AF para diferentes tiempos de inmersión y a una concentración fija de 2500 células HeLa/mL.

A medida que aumentaba el tiempo de inmersión del electrodo de grafeno NTP-AF en la solución de células HeLa la intensidad de corriente disminuía gradualmente, este efecto se aprecia más claramente en la figura 88.

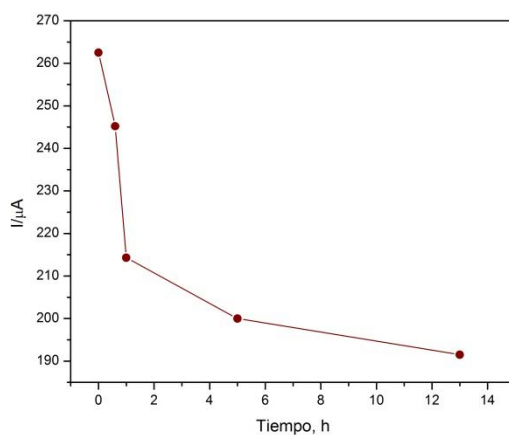


Figura 88. Disminución de la intensidad de corriente variando el tiempo de inmersión de los electrodos de grafeno NTP-AF en una solución de células HeLa 2500 células/mL.

Un efecto similar fue observado por Liu (Liu y col., 2007) quien utilizó un método electroquímico usando electrodos de oro modificado con un conjugado nanopartículas de

oro-AF para la detección de células de cáncer de ovario CHO-1. La disminución exponencial presentada por la corriente a medida que aumentaba el tiempo fue utilizada para escoger el tiempo óptimo de inmersión para la detección de células CHO. En la figura 88 puede observarse que luego de 1 hora de inmersión la intensidad de corriente disminuye aproximadamente 300 μA . Sin embargo el tiempo óptimo escogido para la detección de las células HeLa usando el electrodo de grafeno NTP-AF fue de 10 minutos o tiempos por debajo, debido probablemente a que tiempos superiores a los 30 minutos podrían desorber el conjugado NTP-AF de la superficie del electrodo.

4.4. Conclusiones

Por medio de microscopia de fluorescencia y de microscopia SEM se caracterizaron los electrodos de carbono, grafeno y oro modificados con NTP y con el conjugado NTP-AF.

La VC permitió caracterizar electroquímicamente los electrodos de oro, grafeno y carbono y se concluye que el electrodo de grafeno modificado con NTP y NTP-AF exhibió la mejor respuesta electroquímica. Los valores en la corriente de los picos anódicos soportan lo mencionado anteriormente.

La estabilidad de los electrodos modificados con NTP y NTP-AF luego de 24 horas de preparados exhibieron valores de corriente más altos que los mostrados con los electrodos luego de 1 hora de ser preparados, probablemente a una mejor adsorción del conjugado NTP-AF sobre la superficie de los electrodos.

La transferencia electrónica entre la solución electroactiva ($K_3[Fe(CN)_6]$ 10 mM + KCl 100 mM) y los electrodos fue mejorada debido a la presencia del conjugado NTP-AF sobre la superficie del electrodo de grafeno. La disminución en los valores de la corriente del electrodo modificado en presencia de diferentes soluciones de RF (4-40 nm) fue utilizada para preparar un biosensor para la detección de células cancerígenas del tipo HeLa. El límite de detección alcanzado fue de 250 células HeLa/mL de solución.

El biosensor es selectivo hacia RF y células conteniendo este tipo de receptores, esto se demostró mediante experimentos control de soluciones de RF incubadas previamente con exceso de AF (200 mM).

El electrodo de grafeno modificado con NTP-AF se convierte en una herramienta electroquímica para potenciales aplicaciones en la detección de diferentes tipos de células cancerígenas que sobre-expresan RF y más importante aún podría ser utilizada en el diagnóstico de enfermedades infecciosas como la leishmaniasis.

4.5. Bibliografía

Ayala M., Fernández M., Montenegro M., Sanchez L., Chazarra S., Piñero A., Cabezas J., Rodríguez J. *Experimental Cell Research*, 2012; 318: 1146-1159.

Bard A., Faulkner L. *Electrochemical Methods: Fundamental and Applications*.

Brownson D., Banks C. *Analyst*, 2010; 135: 2768-2778.

Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu A., Ryabov A., Csoregi E. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2004; 102: 179-194.

Cherny I., Gazit E. *Angewandte Chemie*, 2008; 47: 4062-4069.

Feranpontova E., Castillo J., Hushpulian D., Tishkov V., Chubar T., Gazaryan I., Gorton L. *Electrochemistry Communications*, 2005; 7: 1291-1297.

Harnish F., Freguia S. *Chemistry, an Asian Journal*, 2012; 7: 466.

Henne W., Doorneweerd D., Lee J., Low P., Savran C. *Analytical Chemistry*, 2006; 78: 4880-4884.

Leamon C., Reddy J. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004; 56: 1127-1141.

Li H., Li D., Liu Y., Qin N., Ren J., Xu L., Liu Q., Mayer D., Wang K. *Chemical Communications*, 2012; 48: 2594-2596.

Li P., Wang Y., Zeng F., Chen L., Peng Z., Kong L. *Carbohydrate Research*, 2011; 346: 801-806.

Liu C., Yu Z., Neff D., Zhamu A., Neff D., Zhamu A., Jang B. *NanoLetters*, 2010; 10: 4863-4868.

Liu L., Zhu X., Zhang D., Huang J., Li G. *Electrochemistry Communications*, 2007; 9: 2547-2550.

Pumera M., Ambrosi A., Bonanni A., Khim L., Poh H. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010; 29: 954-965.

Reches M., Gazit E. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2007; 7: 2239-2245.

Sahu S., Maiti S., Maiti T., Ghosh S., Pramanik P. *Macromolecular Bioscience*, 2011; 11: 285-2895.

Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I., Lin Y. *Electroanalysis*, 2010; 22: 1027-1036.

Shklovsky J., Beker P., Amdursky M., Gazit E., Rosenman G. Materials Science and Engineering B, 2010; 169: 62-66.

Turk M., Breur G., Widmer W., Paulos C., Xu L., Grote L., Low P. Arthritis & Rheumatism, 2002; 46: 1947-1955.

Wang H., Wang T., Ye Y., Zhang Y., Yang P., Cai H., Cai J. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012; 40: 184-190.

Yemini M., Reches M., Gazit E., Rishpon J. Analytical Chemistry, 2005; 77: 5155-5159.

Recomendaciones generales

1. Se recomienda utilizar potencias de láser por encima de los 1000 mW, prolongar los tiempos de irradiación y modificar la longitud de onda incidente, parámetros que afectan la interacción NTC radiación que afectan el aumento de temperatura localizado. Además se propone realizar experimentos utilizando tiempos mayores de 10 minutos pero aislando la dispersión NTC-AF en una chaqueta térmica para evitar pérdidas por intercambio de calor con el medio.
2. Se recomienda ensayar el electrodo de grafeno modificado con NTP/AF en células infectadas con el parásito de la *Leishmania* y evaluar sus propiedades para así ampliar el uso práctico del biosensor.
3. A pesar de que se realizaron experimentos control con RF bloqueados con AF en el electrodo de grafeno modificado NTP/AF, se recomienda realizar experimentos de control adicionales en células de mamíferos que no sobreexpresen RF para tener una evaluación completa de la selectividad del biosensor.

Anexos

ANEXO A

MODELO COMPUTACIONAL DE LA INTERACCIÓN NANOTUBO DE CARBONO- ÁCIDO FÓLICO

RESUMEN

Se estudió la interacción entre el ácido fólico (AF) y nanotubos de carbono (NTC) de pared simple utilizando tres métodos computacionales: ONIOM, DFT b31yp y una función base 6-31g (d). Los cálculos computacionales de la interacción entre el AF y el NTC mostraron la formación de interacciones débiles del tipo puente de hidrógeno entre los hidrógenos de la parte glutámica del AF y la nube de electrones π del NTC.

METODOLOGÍA

Métodos computacionales

Las estructuras del AF y NTC fueron optimizadas utilizando el método híbrido oniom, implementado en el paquete de gaussian 03. La capa interna se trabajó con el método de la teoría de los funcionales de la densidad (DFT) empleando un funcional de intercambio y correlación b3lyp y una función base 6-31g (d) y la capa externa con un método de la mecánica molecular UFF.

Una vez optimizadas las estructuras del NTC y el AF se llevó a cabo la simulación computacional de la interacción NTC-AF. Para esto se utilizó un NTC de pared simple de tipo armchair (5,5) conteniendo 110 átomos de carbono y 10 átomos de hidrógeno terminales en cada extremo del nanotubo y la estructura optimizada del AF.

La longitud de enlace C-C en el nanotubo fue de 1.42 Å la cual corresponde a una hibridación tipo sp^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las estructuras optimizadas del NTC (5,5) y el AF se pueden observar en la figura A1. Los datos obtenidos de las distancias internucleares y la estructura del AF se pueden observar en la tabla A1 y concuerdan con las reportadas por Bonechi y cols.

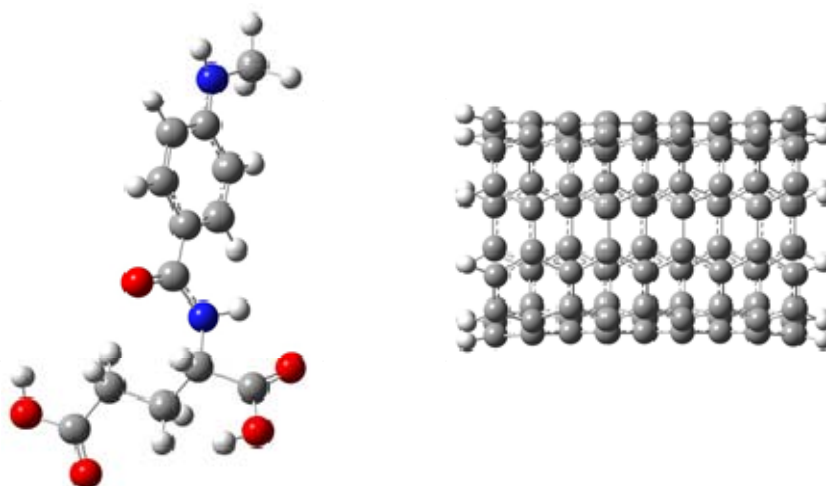


Figura A1. Estructuras energéticas más estables del ácido fólico y del nanotubo de carbono

1. Ácido fólico

La estructura optimizada del AF se aprecia en la figura A1, en esta se puede observar como la parte GLU y la parte PABA se encuentran en un mismo plano molecular. La porción glutámica γ tiene un ángulo diedro con un valor de $175,8^\circ$ (C13-C10-C7-C6) y el ángulo diedro de unión entre el GLU y el PABA tiene un valor de $187,7^\circ$ (C6-N17-C19-C20). Mientras, la porción glutámica α se encuentra fuera del plano con un ángulo diedro de $282,4^\circ$ (C4-C6-N17-C19). La identificación de los carbonos e hidrógenos del AF puede apreciarse en la figura A2.

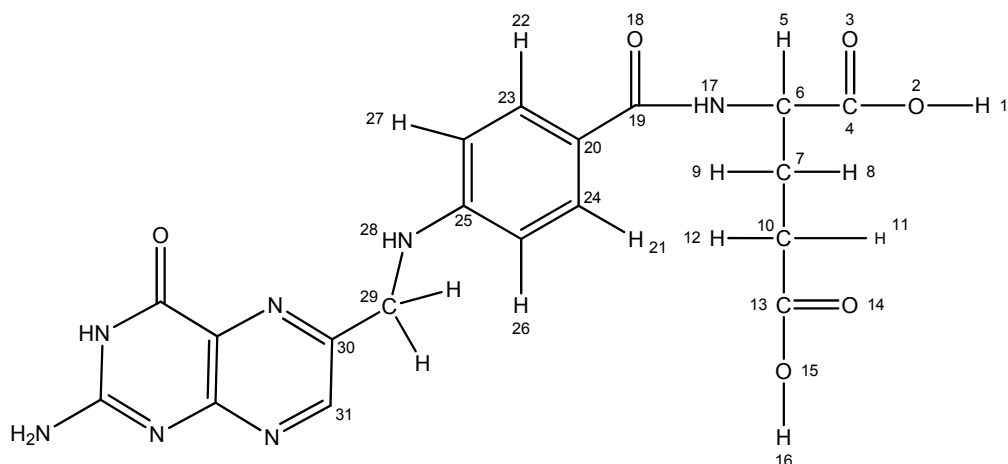


Figura A2. Estructura química del AF.

Por otro lado el anillo de la pteridina (PT) es perpendicular al PABA con un ángulo de torsión de $301,6^\circ$ (C31-C30-C29-N28), además el ángulo de torsión de la unión entre el PT y el PABA es planar ($175,3^\circ$ (C30-C29-N28-C25)). Aunque estos valores no han sido reportados por la literatura, Bonechi y cols midió las distancias interatómicas (C_i-H_j) del AF y estas concuerdan con los valores presentados (Tabla A1).

Tabla A1. Comparación de las distancias internucleares C_i-H_j del AF con las distancias internucleares de la literatura

Distancias Internucleares C _i -H _j	Experimental ^a (Å)	Literatura ^a (Å)
C13-H11/ C13-H12	1.98 ± 0.16	2.13
C4-H5	2.16 ± 0.18	2.15
C19-H17	2.07 ± 0.17	2.08
C25-H26/ C25-H27	1.93 ± 0.13	2.18 (2.17)
C24-H21/C23-H22	1.12 ± 0.10	1.08
C20-H21/ C20-H22	2.02 ± 0.12	2.18 (2.18)

^aBonecci

2. Nanotubo de carbono-Ácido fólico

Para la simulación de la interacción entre el NTC-AF (figura A2), se consideró únicamente la parte GLU y PABA del AF, con el fin de reducir la complejidad del sistema NTC-AF y a su vez disminuir el tiempo de cálculo, esta aproximación se tuvo en cuenta ya que el anillo de la PT del AF está involucrado en la interacción con los receptores celulares, por tal razón la interacción con el NTC solo puede llevarse a cabo con el GLU.

Los parámetros geométricos tales como las distancias y los ángulos de enlace del NTC no se ven afectados luego de la interacción con el AF, esto se ve reflejado en la longitud de los enlaces C-C antes y después de la interacción con el AF cuyo valor en la distancia es de 1.43 Å en ambos casos, lo cual probablemente se debe a las interacciones débiles entre el AF y el NTC.

Por otro lado la estructura del AF antes y después de la interacción con el NTC muestra cambios notables en las distancias y los ángulos de enlace de la parte GLU cuyos valores se aprecian en la tabla A2.

Tabla A2. Comparación de los ángulos diedros del AF libre y AF conjugado con NTC

Ángulo	AF libre (°)	AF-NTC (°)
C13-C10-C7-C6	175,8	183,0
C6-N17-C19-C20	187,7	169,3
C4-C6-N17-C19	282,4	225,2
C4-C6-C7-C10	66,4	177,7
C7-C6-N17-C19	157,7	102,8
N17-C6-C4-O2 (se rompe el puente de hidrogeno)	62,6	167,2
C7-C10-C13-O15	180,1	130,1
C10-C13-O15-H16	180,4	355,2
H5-C6-C7-C10	38,6	343,2

De acuerdo con la tabla A2 se observan notables variaciones en el ángulo diedro del AF libre y conjugado, tal es el caso del ángulo formado por los átomos N17-C6-C4-O2, en el AF libre se aprecia la formación de un puente de hidrógeno entre el O2 y el O14 (1,73 Å), esta interacción se rompe cuando el AF está en presencia del NTC (5,45 Å), cuyo protón se

orienta en una dirección para favorecer la interacción con la estructura del NTC. La otra variación significativa se aprecia en los valores del ángulo formado por H5-C6-C7-C10.

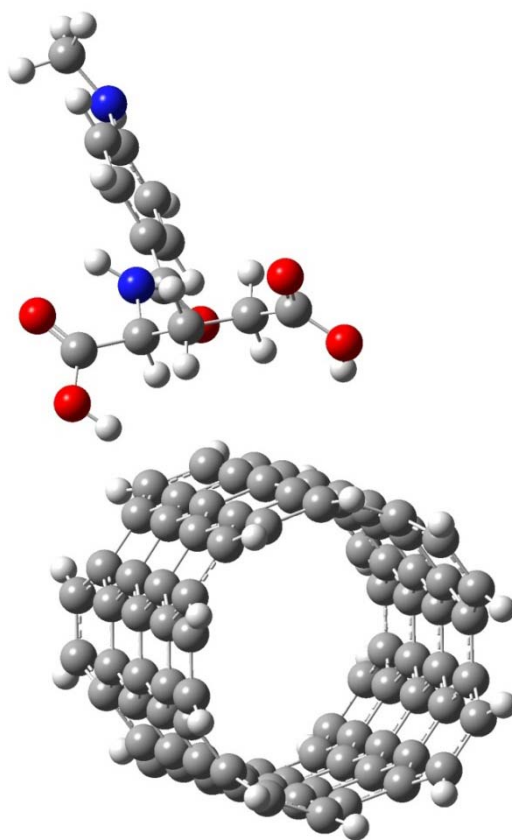


Figura A2. Modelamiento computacional de la interacción entre el AF y el NTC

ANEXO B

PUBLICACIONES

1. Artículos

- a. **John J. Castillo**, Leidy Novoa, Fernando Martínez O., Patricia Escobar. Nanotubos de carbono-quitosano en células HOS y THP-1. *Revista Salud UIS*, 2011, 43: 21-26.

Artículos Originales

Nanotubo de carbono-chitosan en células HOS y THP-1

Nanotubos de carbono en células

Carbon nanotubes-chitosan in HOS and THP-1 cells

John Jairo Castillo León¹, Leidy Viviana Novoa², Fernando Martínez Ortega¹, Patricia Escobar Rivero²

RESUMEN

Introducción: Los nanotubos de carbono (NTC) son estructuras nanométricas utilizadas en el tratamiento de enfermedades, principalmente en la entrega de fármacos para terapias en cáncer. **Objetivo:** Estudiar la internalización de NTC acoplado a quitosano (NTC-Q) en células de osteosarcoma humano (HOS) y monocitos humanos de leucemia aguda (THP-1). **Materiales y métodos:** Los NTC solubilizados con quitosano 30% fueron caracterizados espectroscópicamente por UV-Vis, fluorescencia y Raman. Las células HOS y THP-1 fueron tratadas con NTC-Q y se evaluó la internalización por tinción de Giemsa en microscopio de luz y la citotoxicidad utilizando la prueba fluorométrica de Azul de Alamar. **Resultados:** Los espectros Raman y de fluorescencia mostraron la funcionalización de los NTC con quitosano. Los NTC fueron internalizados por las líneas celulares después de 24 h mostrando una ubicación citoplasmática sin presentar citotoxicidad en ninguna de las células evaluadas. **Discusión:** Las características presentadas por los NTC-Q les brinda la posibilidad de ser utilizados como transportadores de fármacos. *Salud UIS* 2011; 43(1): 21-26

Palabras clave: Nanotubos de carbono, quitosano, internalización celular

ABSTRACT

Introduction: Carbon nanotubes (CNT) are nanometer-sized structures used in medicine in the treatment of diseases, mainly in drug delivery in therapies against cancer. **Objective:** To Study the internalization of carbon nanotubes modified with chitosan (CNT-CH) in human osteosarcoma cells (HOS) and human monocytes of acute leukemia (THP1). **Materials and methods:** The CNTs solubilized in chitosan 30% were characterized spectroscopically by UV-Vis, fluorescence and Raman. HOS cells and THP-1 were treated with CNT-CH, the internalization was evaluated by Giemsa staining with light microscopy, and cytotoxicity was determined using Alamar Blue assay. **Results:** Raman and fluorescence spectra showed the functionalization of the CNT with chitosan. After 24 h the NTC were internalized in the cell lines showing a cytoplasmic location and were not cytotoxic in any of both cell lines types. **Discussion:** The properties of CNT-CH on cells allowing it to be potentially used as drug carrier. *Salud UIS* 2011; 43(1): 21-26

Keywords: Carbon nanotubes, chitosan, cell internalization cells, macrophages

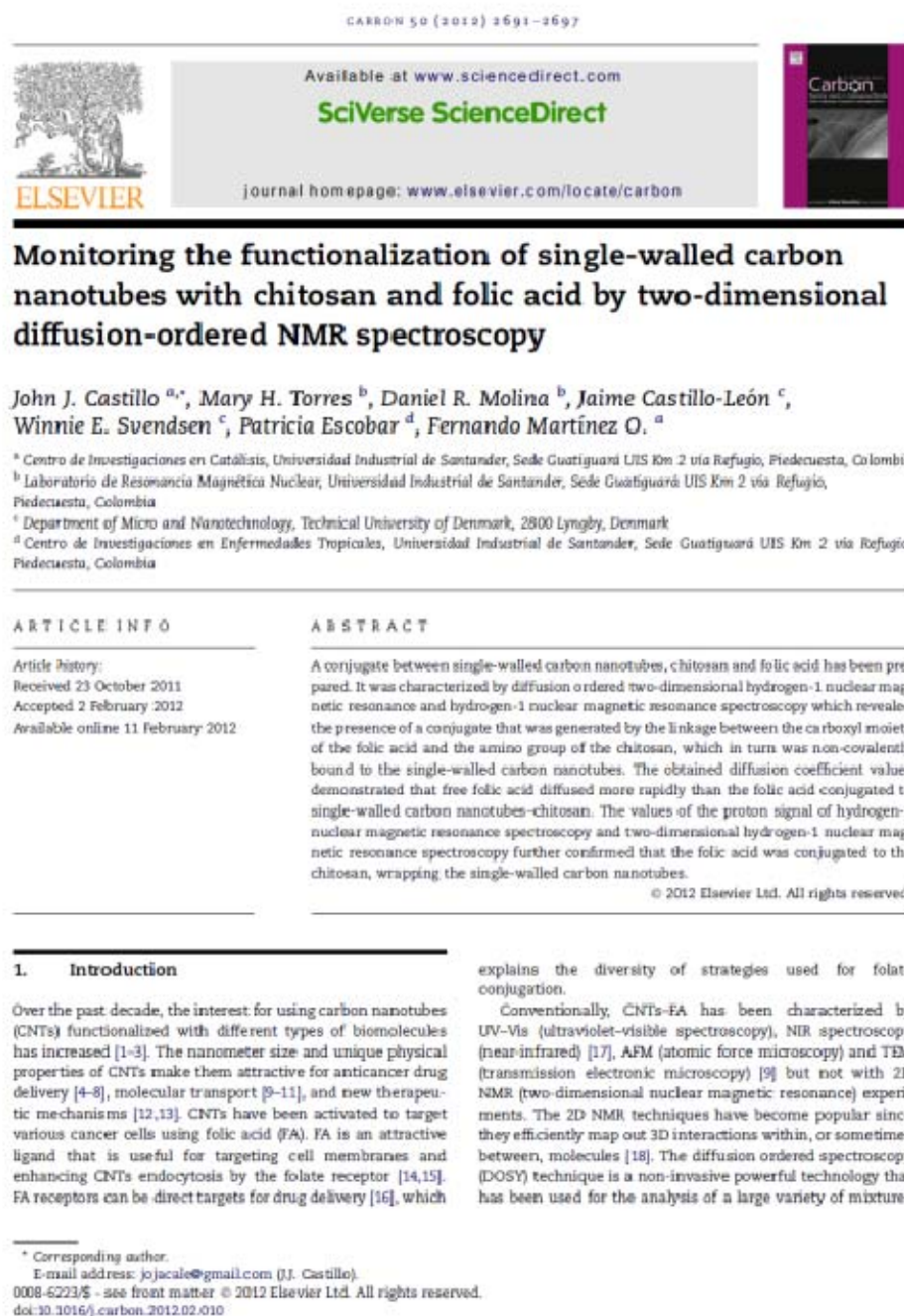
1. Centro de Investigación en Catálisis, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

2. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Departamento de Ciencias Básicas, Escuela de Medicina, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Correspondencia: John Jairo Castillo León, Centro de Investigación en Catálisis, Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Santander, Teléfono: 6550805; Email: johnleon76@hotmail.com

Recibido: 1 de mayo de 2010 - **Aceptado:** 30 de junio de 2010

- b. **John J. Castillo**, Mary H. Torres, Daniel R. Molina, Jaime Castillo-León, Winnie E. Svendsen, Patricia Escobar, Fernando Martínez O. Monitoring the functionalization of single-walled carbon nanotubes with chitosano and folic acid by two-dimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Carbon*, 2012, 50: 2691-2697.



- c. **John J. Castillo**, Winnie E. Svendsen, Noemi Rozlosnik, Patricia Escobar, Fernando Martínez O., Jaime Castillo-León. Detection of cancer cells using a peptide nanotube/folic acid modified graphene electrode. *Analyst*, 2013, 138: 1026–1031.

Analyst

RSC Publishing

PAPER

Detection of cancer cells using a peptide nanotube–folic acid modified graphene electrode†

Cite this: *Analyst*, 2013, 138, 1026John J. Castillo,^{ab} Winnie E. Svendsen,^b Noemi Rozlosnik,^b Patricia Escobar,^c Fernando Martínez^a and Jaime Castillo-León^{a,b}

This article describes the preparation of a graphene electrode modified with a new conjugate of peptide nanotubes and folic acid for the selective detection of human cervical cancer cells over-expressing folate receptors. The functionalization of peptide nanotubes with folic acid was confirmed by fluorescence microscopy and atomic force microscopy. The peptide nanotube–folic acid modified graphene electrode was characterized by scanning electron microscopy and cyclic voltammetry. The modification of the graphene electrode with peptide nanotube–folic acid led to an increase in the current signal. The human cervical cancer cells were bound to the modified electrode through the folic acid–folate receptor interaction. Cyclic voltammograms in the presence of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a redox species demonstrated that the binding of the folate receptor from human cervical cancer cells to the peptide nanotube–folic acid modified electrode lowered the electron transfer resulting in a decrease in the measured current. A detection limit of 250 human cervical cancer cells per mL was obtained. Control experiments confirmed that the peptide nanotube–folic acid electrode specifically recognized folate receptors. The modified electrode described here opens up new possibilities for future applications in early stage diagnoses of diseases where cells over-express folate receptors, such as in cancer or leishmaniasis disease.

Received 14th August 2012
Accepted 26th October 2012

DOI: 10.1039/c2an36121c

www.rsc.org/analyst

1 Introduction

In recent years, folate receptors (FRs) have been used as a strategic target in the detection and diagnosis of cancer.^{1–3} FRs are folate binding proteins with a high affinity for folic acid (FA) ($K_d = 0.1\text{--}10\text{ nM}$) and a molecular weight of 38 kDa. They are over-expressed on the surface of cancer cells or cells infected with parasites responsible for tropical diseases such as leishmaniasis.^{4–6} Different methods have been developed for FR detection, including cytological testing, fluorescent imaging and radio-labeled assays.^{7–11} Although the effectiveness of these methods has yet to be challenged, most of them are costly and time-consuming in the experimental process and, what is more, these approaches may be coupled with a radioactive risk as in the case of radio-labeled assays. It is therefore of utmost importance to develop new methods and techniques for FR detection.

Electrochemical methods have attracted considerable attention for the development of biosensors intended for the detection of disease markers due to their simplicity, rapidity and convenience.¹² FA is an attractive ligand that is useful for

targeting cell membranes.^{13,14} The high affinity between FA and FRs suggests the use of FA as a bio-recognition element for the construction of electrochemical sensors.¹⁵ This interaction will result in the blockage of the electron transfer by the insulating cell membrane and the concomitant decrease of the current.¹⁶ Cyclic voltammetry and impedance spectroscopy were used to characterize the interaction between the FR present on the cells and the FA functionalized transducer. Different materials such as gold nanoparticles, polydopamine-coated carbon nanotubes, polyaniline nanofiber/gold nanoparticles and boron-doped diamond electrodes were used as transducers and functionalized with folic acid for the electrochemical detection of folate receptors on cells.^{13,16–18} Since its experimental discovery in 2004, graphene has attracted much attention as a new nanomaterial with interesting electronic and electrochemical properties for use in the development of biosensing devices.^{19–21} More and more attention has been given to the decoration of graphene with functional molecules or other nanomaterials to enable its use in fields such as biosensing, energy storage, and biofuel cells, among others.^{22,23} Enzymes, antibodies, metal nanoparticles, DNA and quantum dots are some of the materials used for the functionalization of graphene.²⁴

Self-assembled peptide nanostructures are biological entities that are able to self-organize under mild conditions rapidly and without employing specialized equipment or high temperatures.²⁵ Self-assembled peptides have been highlighted as promising biomaterials for the rational design of functional devices for

^aCentro de Investigaciones en Catálisis, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiquari UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

^bDepartment of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby 2800, Denmark. E-mail: jaic@nanotech.dtu.dk

^cCentro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiquari UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2an36121c

- d. **John J. Castillo**, Tomas Rindzevicius, Leidy V. Novoa, Winnie E. Svendsen, Noemi Rozlosnik, Anja Boisen, Patricia Escobar, Fernando Martínez O., Jaime Castillo-León. Non-covalent conjugate of single-walled carbon nanotubes and folic acid for interactions with cells over-expressing folate receptors. *Journal of Materials Chemistry B*, 2013. (Aceptado, DOI 10.1039/C2AN36121C).

Journal of Materials Chemistry B

RSC Publishing

PAPER

Non-covalent conjugates of single-walled carbon nanotubes and folic acid for interaction with cells over-expressing folate receptors†

Cite this: *J. Mater. Chem. B*, 2013, **1**, 1475

John J. Castillo,^a Tomas Rindzevicius,^b Leidy V. Novoa,^c Winnie E. Svendsen,^b Noemi Rozlosnik,^b Anja Boisen,^b Patricia Escobar,^c Fernando Martínez^a and Jaime Castillo-León^{a,b}

We here present a method to form a noncovalent conjugate of single-walled carbon nanotubes and folic acid aimed to interact with cells over-expressing folate receptors. The bonding was obtained without covalent chemical functionalization using a simple, rapid "one pot" synthesis method. The zeta potential for the single-walled carbon nanotube-folic acid solution was -32.4 mV at pH 7.0 and the result indicates that the folic acid coating inhibited aggregation of the carbon nanotubes. Properties of the single-walled carbon nanotube-folic acid conjugate were analyzed using ultraviolet-visible, fluorescence and Raman spectroscopies. While the folic acid fluorescence signature was significantly quenched by the presence of single-walled carbon nanotubes, the Raman spectra of the conjugate displayed a decreased distribution of sp^2 sites. Both results were attributed to the noncovalent functionalization of the single-walled carbon nanotubes with folic acid. A more detailed investigation of the single-walled carbon nanotube-folic acid conjugates utilizing scanning electron microscopy, atomic force microscopy and energy-dispersive X-ray spectroscopy confirmed the presence of the well-defined folic acid coating on the individual single-walled carbon nanotubes. The single-walled carbon nanotube-folic acid conjugates were incubated with THP-1 cells and the internalization was evaluated by Giemsa staining with light microscopy, and cytotoxicity was evaluated using the MTT reduction assay. The cytotoxicity studies presented a low toxicity of the conjugates in the THP-1 cells. The low toxicity and the cellular uptake of single-walled carbon nanotube-folic acid by cancer cells suggest their potential use in carbon nanotube-based drug delivery systems and in the diagnosis of cancer or tropical diseases such as leishmaniasis.

Received 19th November 2012
Accepted 4th January 2013

DOI: 10.1039/c2tb00434h
www.rsc.org/MaterialsB

Introduction

Since their first discovery in 1991, carbon nanotubes (CNTs) have attracted significant attention from researchers all around the world.¹ In the development of new materials with interesting biomedical properties that facilitate drug delivery in cancer therapies,² one of the major difficulties is to functionalize CNTs with different types of biomolecules.^{3–5} In order to functionalize CNTs and simultaneously prevent inter-CNT aggregation, two methodologies have so far been suggested: (i) covalent and (ii) noncovalent functionalization of the CNT sidewalls. In the first strategy, several research groups have utilized the *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethylamino)

propyl)carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) chemistry to covalently bind biomolecules to single-walled carbon nanotubes (SWCNTs).^{6–9} Disadvantages of the latter approach include considerable processing times and costs. Furthermore, in covalent approaches, CNTs are mixed with strong inorganic acids at high temperatures to create carboxylic groups on the surface.⁸

Although this strategy has been recognized as an effective path for the solubilization and stable dispersion of CNTs, aggressive chemical modifications might introduce structural defects that produce changes in carbon hybridization from sp^2 to sp^3 leading to a possible partial loss of conjugation affecting the mechanical and electronic properties of CNTs.⁹ The modification-induced structural changes in the electronic and mechanic properties of CNTs can be minimized by using a noncovalent functionalization methodology. Sidewalls of CNTs have previously been functionalized using noncovalently bound polymers,¹⁰ proteins,¹ DNA,¹¹ π - π stacking¹² or hydrophobic interactions.¹³ The noncovalent dispersion procedures usually involve ultrasonication, centrifugation and filtration process steps.¹⁴

^aCentro de Investigaciones en Cerámicas, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatapurá UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

^bDepartment of Micro- and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby 2800, Denmark. E-mail: jalc@nanotech.dtu.dk; Tel: +45 4325 6837

^cCentro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatapurá UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

† Electronic supplementary information (ESI) available: Interaction of SWCNT-FA with a folate receptor negative cell line. See DOI: 10.1039/c2tb00434h

- e. **John J. Castillo**, **Ciro E. Roza**, **Jaime Castillo-León**, **Tomas Rindzevicius**, **Winnie E. Svendsen**, **Noemi Rozlosnik**, **Anja Boisen**, **Patricia Escobar**, **Fernando Martínez O.** *Chemical Physical Letters*, **2013** (Aceptado, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cplett.2013.02.014>)

ACCEPTED MANUSCRIPT

Computational and experimental studies of the interaction between single-walled carbon nanotubes and folic acid

John J. Castillo^{1,2}, Ciró E. Roza³, Jaime Castillo-León^{4}, Tomas Rindzevicius⁴, Winnie E. Svendsen⁴, Noemi Rozlosnik⁴, Anja Boisen⁴, Fernando Martinez O.¹*

¹Centro de Investigaciones en Catálisis, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

²Grupo de Investigación en Ciencias Químicas y Tecnologías Sostenibles, Facultad de Ciencias Físicas, Exactas y Naturales, Universidad de Santander, Campus Lagos del Cacique, Bucaramanga, Colombia

³Grupo de Investigaciones Ambientales para el Desarrollo Sostenible, Facultad de Química Ambiental, Universidad Santo Tomás, Floridablanca, Colombia

⁴Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, 2800 Lyngby, Denmark

*Corresponding author: Jaime Castillo-León, E-mail: jaic@nanotech.dtu.dk (J. Castillo-León); Phone: +45 4525 6837

2. Presentaciones Escritas (poster)

- a. Jaime Castillo-León, **John J. Castillo**, Patricia Escobar, Fernando Martínez O., Edgar Páez M., Winnie E. Svendsen. Phototoxic effect of functionalized biological nanotubes on cells infected with leishmaniasis. *1st Nano Today Conference*, Singapur, **2009**.

P8: NANOSYSTEMS FOR BIOLOGICAL AND MEDICAL APPLICATIONS

Phototoxic Effect of Functionalized Biological Nanotubes on Cells Infected with Leishmaniasis

Jaime Castillo¹, John Castillo², Patricia Escobar², Fernando Martinez², Edgar Paez² and Winnie Edith Svendsen¹

¹DTU Nanotech, Technical University of Denmark, Denmark

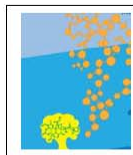
²Industrial University of Santander, Colombia

Leishmaniasis is a tropical endemic disease affecting around 88 countries, 72 of these countries are classed as developing countries including 13 of the least developed countries. An estimated of 12 millions humans are infected with an annual mortality of 60000, according to the World Health Organization (WHO). Presently non vaccine against this disease is available. The traditional treatments for leishmaniasis involve toxic drugs that are not completely efficient and generate life-threatening adverse side effects such as cardiac arrhythmia, acute pancreatitis, gastrointestinal toxicity, hypokalemia among others. Therefore, new efficient, low-cost and nontoxic alternative treatments are urgently required.

This project offers an alternative method to selectively destroy the leishmania species. More precisely we want to develop the transporting capabilities of different biological nanotubes combined with functionalization chemistry in order to penetrate the cells and deliver oxygen reactive species. The oxygen reactive species will be activate through radio frequency radiation (RF) or near-infrared light (NIR) causing a localized phototoxic effect that will destroy the leishmania parasite. We envision the use of biological nanotubes that are non-toxic and at the same time have the capacity to transport, selectively penetrate infected cells and deliver compounds that will destroy the parasite causing leishmaniasis.

Results showing a method to manipulate in a controlled way the fabricated biological nanotubes, the controlled fabrication of the bio nanotubes, the functionalization of the nanotubes with fluorescent dyes and magnetic nanoparticles and the photodynamic activity of some chemical compounds on the Leishmania parasite will be presented and discussed. This method will open new exciting possibilities for the use of biological nanotubes for drug delivery and the treatment of tropical diseases such as leishmaniasis or Chaga's disease.

- b. **John J. Castillo**, Juan Pablo López N, Edgar Giovanni Villabona Leal, Fernando Martínez O. Evaluación del potencial z de soluciones acuosas de nanotubos de carbono-quitosano. *XXIX Congreso Latinoamericano de Química*, Cartagena, Colombia, 2010.



XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA
XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA -
VI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFIA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL Z DE SOLUCIONES ACUOSAS DE NANOTUBOS DE CARBONO-CHITOSAN

John Castillo, Juan Pablo López, Edgar Giovanni Villabona, Fernando Martínez O.
Centro de Investigación en Catálisis
Universidad Industrial de Santander.

Palabras clave: Nanotubos de carbono, quitosano, potencial z.

Introducción. La afinidad de los nanotubos de carbono (NTC) (hidrofóbicos o hidrofílicos) modificados o no, es de crucial importancia en aplicaciones biológicas (1). Debido a la estructura grafeno (hidrofóbica) de los NTC, ellos son insolubles en agua. Un requisito importante para aplicaciones biológicas es su solubilidad en agua, por ejemplo para utilizar los NTC como transportadores de fármacos (1). La dispersión de NTC en agua puede ser mejorada mediante un tratamiento oxidativo o usando biomoléculas o surfactantes (2). En este trabajo se midió el potencial zeta para evaluar la dispersión de NTC-chitosan variando el pH y así analizar la estabilidad de las dispersiones, que permiten decidir su aplicación en medios biológicos ya que se requiere un control sobre el valor de pH.

Metodología. Los nanotubos de carbono de pared simple fueron solubilizados en una solución acuosa de quitosano con una concentración de 12 ppm mediante ultrasonido. La estabilidad del sistema se analizó variando el pH entre 3 y 10, midiendo el potencial z de la solución. Las mediciones de potencial z se llevaron a cabo en una celda tipo GT-2 y un Zeta-Meter System 3.0. Las dispersiones se agitaron 10 minutos antes de cada medición.

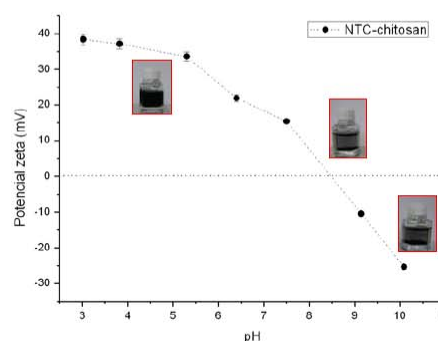
Resultados y discusión. En la figura 1, se aprecia la variación del potencial z en función del pH de la solución. Sobre la superficie de los NTC se formó una doble capa eléctrica debido a la carga positiva del quitosano (catiónico), capa que previene la formación de agregados y estabiliza la dispersión (2). La densidad de carga sobre la superficie de los NTC exhibió una dependencia del pH, ver figura 1.

El punto isoeléctrico (PI) de la dispersión NTC-chitosan se encontró a un pH de 8.5. A partir de este valor de pH los NTC precipitaron como se observa en la dispersión de la solución a pH 8.5 (figura 1). La baja solubilidad de los NTC en el PI es debido a la baja carga superficial sobre los NTC, pues el quitosano de naturaleza catiónica interacciona con los grupos OH⁻ del medio provocando la precipitación de los NTC. Cuando el pH varió entre 3 y 7, se observaron los valores más altos del potencial z,

Aquí pueden ir los patrocinadores, pero en las memorias

reflejándose en soluciones más estables dado que no precipitaron. La repulsión de cargas entre el quitosano y los protones del medio evita la precipitación de los NTC.

Fig. 1. Potencial z de dispersiones NTC-chitosan en función del pH



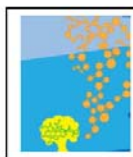
Conclusiones. Se observó que las dispersiones de NTC-chitosan de mayor estabilidad se encontraron para los valores de pH comprendidos entre 3 y 7.5. Este rango de valores permite deducir las condiciones de la solución del NTC-chitosan para trabajar con los pH fisiológicos, permitiendo utilizar las dispersiones de NTC en medios biológicos.

Bibliografía.

1. Prato, M; Kostarelos, K; Bianco, A; (2007). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 41(1): 60-68.
2. Wang, Q; Han, Y; Wang, Y; Qin, Y; Guo, Z. Effect of the surfactant structure on the stability of carbon nanotubes in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B.* 112: 7227-7233.

Agradecimiento. Los autores agradecen a Colciencias por la financiación del proyecto 110245921468 y por la beca de doctorado de JC.

- c. **John J. Castillo**, Fernando Martínez O. Caracterización espectroscópica de nanotubos de carbono funcionalizados no covalentemente con quitosano. XXIX Congreso Latinoamericano de Química, Cartagena, Colombia, 2010.



XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA
XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA -
VI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFIA

**CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE NANOTUBOS DE CARBONO
FUNCIONALIZADOS NO COVALENTEMENTE CON CHITOSAN**

John Castillo^a, Patricia Escobar^b, Fernando Martínez O.^a

^aCentro de Investigación en Catálisis, ^bCentro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales,
Universidad Industrial de Santander.

Palabras clave: Nanotubos de carbono, quitosano, espectroscopia.

Introducción. Los nanotubos de carbono (NTC) son estructuras de tamaño nanométrico de forma cilíndrica que han sido utilizadas en campos como la medicina, biología y electrónica (1). Dada su naturaleza hidrofóbica los NTC son insolubles en la mayoría de solventes. Un requisito importante para aplicaciones biológicas es su solubilidad en agua (2). La caracterización de los NTC funcionalizados incluye técnicas microscópicas y espectroscópicas. El objetivo de este trabajo fue funcionalizar NTC no covalentemente con quitosano para mejorar su solubilidad en medio acuoso y caracterizar espectroscópicamente los NTC funcionalizados.

Metodología. Los nanotubos de carbono de pared simple fueron solubilizados en una solución acuosa de quitosano mediante ultrasonido. El sistema obtenido fue caracterizado UV-Vis, I.R. cercano, espectroscopia Raman y fluorescencia.

Resultados y discusión. Los nanotubos de carbono se solubilizaron en quitosano figura 1(b). El NTC funcionalizado exhibió una banda a 265 nm (UV) y en el infrarrojo cercano (NIR) presentó bandas comprendidas entre 700-1000 nm y 1100-1300 nm típicas de las transiciones entre la banda de valencia y la banda de conducción en el NTC, denominadas singularidades de van Hove (tabla 1).

Fig. 1. NTC-chitosan (a) antes de sonicación (b) después de sonicación y centrifugación

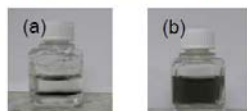


Tabla 1. Tabla 1. Bandas UV-vis e infrarrojo cercano de NTC-chitosan

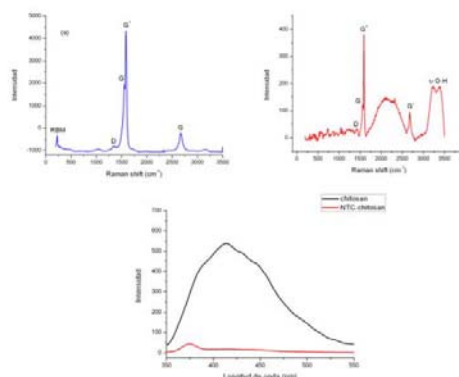
	Banda (nm)	Transición
UV-vis	265	Aromáticos (grafito)

Aquí pueden ir los patrocinadores, pero en las memorias

NIR	1220 920 800	S ₁₁ S ₂₂ S ₃₃
-----	--------------------	---

Mediante la espectroscopia Raman y de fluorescencia se evidenció la funcionalización no covalente de los nanotubos de carbono (figura 2).

Fig. 2. Espectros Raman de NTC y NTC-chitosan y de fluorescencia de quitosano y NTC-chitosan

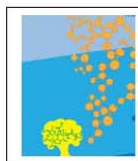


Conclusiones. Los NTC fueron solubles en quitosano lo que los hace aptos para aplicaciones biológicas. La caracterización espectroscópica permitió identificar las bandas características de los NTC y comprobó la funcionalización no covalente de los NTC con el quitosano

Bibliografía.

1. Prato, M; Kostarelos, K; Bianco, A; (2007). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 41(1): 60-68.
2. Yu, J; Grossiord, N; Koning, C; Loos, J; (2007). Controlling the dispersion of multi-walled carbon nanotubes in aqueous surfactant solution. *Carbon*. 45: 618-623.

- d. **John J. Castillo**, Jaime Castillo-León, Patricia Escobar, Edgar Páez M., Fernando Martínez O., Winnie E. Svendsen. Nanoesferas de péptidos como potenciales vehículos para la entrega de fármacos. *XXIX Congreso Latinoamericano de Química*, Cartagena, Colombia, 2010.



XXIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUIMICA
XVI CONGRESO COLOMBIANO DE QUIMICA -
VI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFIA

NANOESEFERAS DE PÉPTIDOS COMO POTENCIALES VEHÍCULOS PARA ENTREGA DE FÁRMACOS

John Castillo^a, Jaime Castillo^c, Patricia Escobar^b, Edgar Páez^a, Fernando Martínez O.^a, Winnie Svendsen^c,
^aCentro de Investigación en Catálisis, ^bCentro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales,
Universidad Industrial de Santander, ^cDepartment of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark

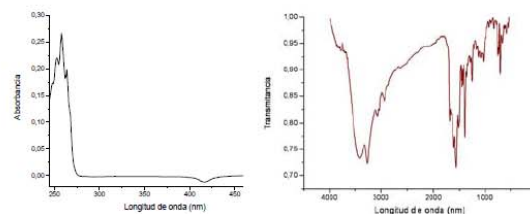
Palabras clave: Nanoesferas de péptidos, nanomedicina, fármacos.

Introducción. Para que un fármaco ejerza su efecto terapéutico es importante que éste acceda selectivamente a su blanco apropiado. Se han desarrollado nanosistemas que sirven como vectores tales como nanoliposomas, micelas, dendrímeros y nanotubos de carbono. Uno de los problemas de algunos nanosistemas sintéticos es su toxicidad y su poca biocompatibilidad. Recientemente nanosistemas biológicos conocidos como nanoesferas de péptidos (NEP) fueron sintetizados (2). Las NEP están constituidas por el dipéptido difenilglicina y se autoensamblan espontáneamente por medio de interacciones de van Der Waals y puentes de hidrógeno (2). El objetivo de este trabajo fue preparar y caracterizar espectroscópicamente (UV-Vis e IR) y microscópicamente (SEM) las NEP para determinar las condiciones fisicoquímicas necesarias e implementarlas como potenciales vectores en la entrega de fármacos.

Metodología. Se preparó una solución stock conteniendo difenilglicina disuelta en hexafluoropropanol a una concentración final de 10 mg/mL, luego esta solución fue llevada a una concentración de 5 mg/mL con agua destilada. Se tomaron espectros UV-Vis e infrarrojo (IR) y se determinó el tamaño de las NEP por análisis de imágenes tomadas por microscopia de barrido electrónico (SEM).

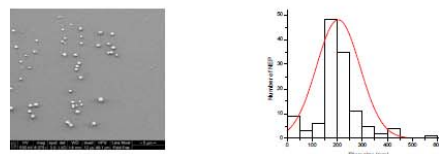
Resultados y discusión. En la figura 1 se aprecian los espectros UV-vis e IR. Las NEP presentan un pico de máxima absorción alrededor de 256 nm, el cual es debido a la transición electrónica $\pi-\pi^*$ del grupo fenilo de la difenilglicina, además según el espectro de IR se aprecia una banda entre 1500 y 1600 cm^{-1} , correspondiente al grupo amido del enlace peptídico de los aminoácidos. El hidrógeno libre del grupo amido es el que se puede aprovechar para la funcionalización de diferentes tipos de moléculas para utilizar las NEP como transportadores de fármacos.

Fig. 1. Espectros (a) UV-vis y (b) IR de NEP



En la figura 2 se observa una fotografía SEM de una muestra de NEP. Esta muestra fue analizada por medio del software Image J, y luego de un análisis estadístico se determinó el tamaño promedio del diámetro de las NEP. El tamaño promedio correspondiente a la población de NEP analizada fue de 200 nm aproximadamente. Este tamaño los hace aptos para ingresar a la célula y llevar consigo el fármaco que se desea anclar.

Fig. 2. Microscopia SEM de NEP y su histograma del análisis de diámetro



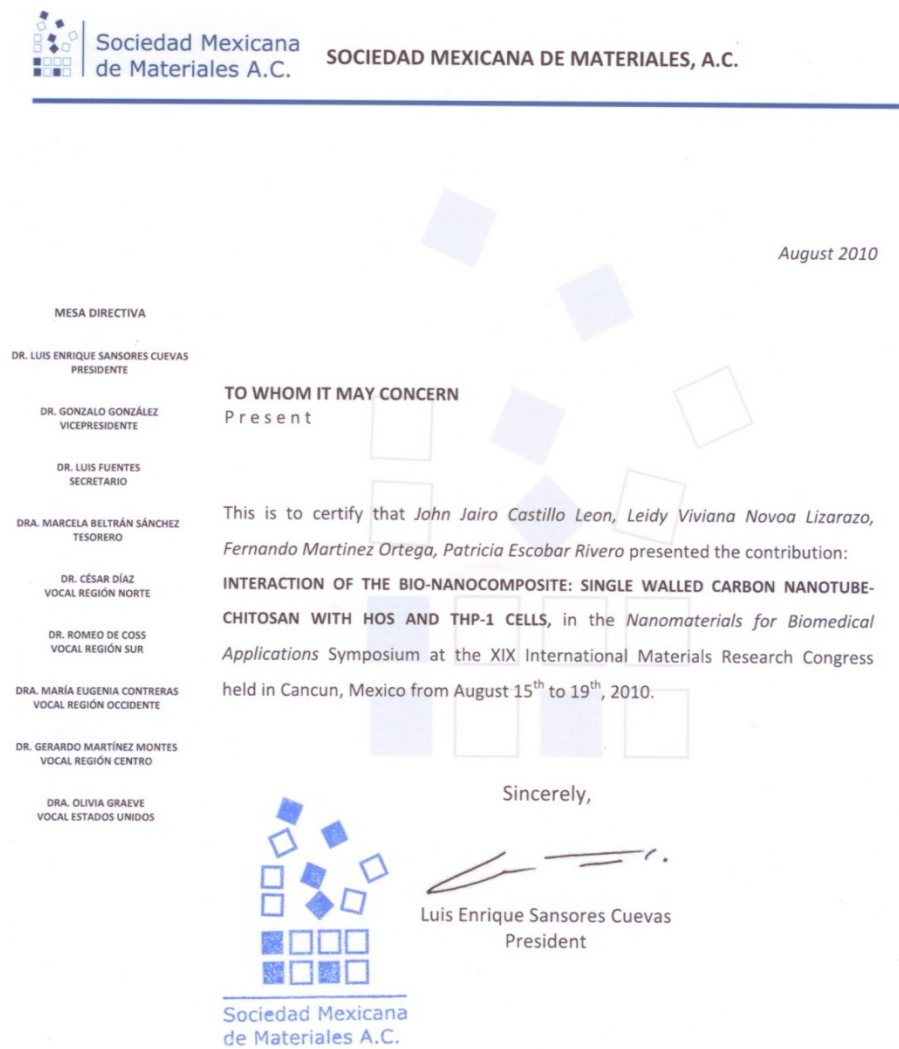
Conclusiones. La presencia de grupos funcionales (amida) y el tamaño nanométrico de las NEP las convierte en potenciales vehículos para el transporte localizado y selectivo de fármacos.

Bibliografía.

1. Prato, M; Kostarelos, K; Bianco, A; (2007). Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc. Chem. Res.* 41(1): 60-68.
2. Reches, M; Gahid, E; (2006). Molecular self-assembly of peptide nanostructures. *Current Nanoscience.* 2: 105-111.

Aquí pueden ir los patrocinadores, pero en las memorias

- e. **John J. Castillo**, Leidy V. Novoa, Fernando Martínez O., Patricia Escobar. Interaction of the bio-nanocomposite: single-walled carbon nanotubes-quitosano with HOS and THP-1 cells. *XIX International Materials Research Congress: Nanomaterials for Biomedical Applications Symposium*, Cancun, Mexico, **2010**.



- a. **John J. Castillo**, Mary H. Torres, Daniel R. Molina, Jaime Castillo-León, Winnie E. Svendsen, Patricia Escobar, Fernando Martínez O. Monitoring the functionalization of single-walled carbon nanotubes with chitosan and folic acid by two-dimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy. *Carbonhagen, 3rd Symposium on Graphene and Carbon Nanotubes*, Copenhagen, Denmark, **2012**.

CARBONHAGEN 2012

POSTERS

Monitoring the functionalization of single-walled carbon nanotubes with chitosan and folic acid by two-dimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy

John Castillo

John J. Castillo^{1*}, Mary H. Torres², Daniel R. Molina², Jaime Castillo-León³, Winnie E. Svendsen³, Patricia Escobar⁴, Fernando Martínez O.¹

¹Centro de Investigaciones en Catálisis, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

²Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

³Department of Micro and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark

⁴Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Sede Guatiguará UIS Km 2 vía Refugio, Piedecuesta, Colombia

Single walled carbon nanotubes (SWCNT) bioconjugates are being considered as one of the most promising nanomaterials in the biomedicine field. The availability of a fast and reliable analytical technique to evaluate the type of interaction in the functionalization of CNT is necessary. In this work a conjugate between single-walled carbon nanotubes, chitosan and folic acid has been prepared. It was characterized by diffusion ordered two-dimensional hydrogen-1 nuclear magnetic resonance and hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy which revealed the presence of a conjugate that was generated by the linkage between the carboxyl moiety of the folic acid and the amino group of the chitosan, which in turn was non-covalently bound to the single-walled carbon nanotubes. The obtained diffusion coefficient values demonstrated that free folic acid diffused more rapidly than the folic acid conjugated to single-walled carbon nanotubes-chitosan. The values of the proton signal of hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy and two-dimensional hydrogen-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy further confirmed that the folic acid was conjugated to the chitosan, wrapping the single-walled carbon nanotubes.

Keywords: single-walled carbon nanotube - folic acid; 2D-DOSY spectroscopy; diffusion coefficient.