



FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED
SIMPLE Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO TÉRMICO.

ELIZABETH AYALA BLANCO.
YEISON GABRIEL PEÑA BECERRA.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

BUCARAMANGA

ESCUELA DE QUÍMICA

2013

FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED
SIMPLE Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO TÉRMICO.

ELIZABETH AYALA BLANCO
YEISON GABRIEL PEÑA BECERRA

Proyecto de Grado en Modalidad de Trabajo de Investigación como Requisito para
Optar al Título de Químicos.

Director

FERNANDO MARTÍNEZ ORTEGA

Químico, Docteur en Chimie. Profesor Titular Laureado, Escuela de Química.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2013

DEDICATORIA

A Dios que hace posible lo imposible y siempre
ha estado presente en cada momento de nuestras
vidas brindándonos fortaleza y sabiduría.

Y a nuestros padres

“Esther Becerra y Gabriel Peña

Luz Gloria Blanco y Gerardo Ayala”

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser el pilar fundamental en mi vida, por todo su esfuerzo, dedicación, apoyo y sacrificio por hacer posible cada uno de mis logros y metas. A mi hermana Laura que con su apoyo incondicional, amor y ejemplo me dio fortaleza para sortear cualquier dificultad. A mi novio Camilo Bernal por todo su amor, su comprensión y apoyo para hacer realidad este sueño.

Gracias a mi familia, especialmente mi abuelita Hilda, mi hermana Patricia, mi papa, mi tia Esperanza, mis padrinos Luz Marina, Antonio, Dolly por haberme acompañado y apoyado durante mi carrera. A mis amigos Juliana, Angela y Vivianne por estar presentes en cada momento de mi vida y compartir a mi lado mis fracasos y triunfos. A mis amigos y compañeros de vida Universitaria Mario, Marcela A, Carolina Z, Brigit, Jonathan, Alejandra, Diego, Camilo S, Katherin y Mauricio M por compartir conmigo cada experiencia y especialmente a Carlos Torres por su apoyo, compañía, trabajo en equipo y a Diana Rios por su amistad incondicional, su paciencia y aporte en este proyecto. A Miriam por todo su apoyo, colaboración, dedicación, amistad y amabilidad.

A Yeison Gabriel Peña mi amigo y compañero de trabajo, con el cual he compartido grandes aventuras, alegrías y tristezas, quien ha trabajado conmigo durante varios años y con su esfuerzo y dedicación ha hecho posible este trabajo.

Elizabeth Ayala Blanco

De manera especial agradezco a mis padres, por confiar en mí, dedicar tiempo, esfuerzo y todo su apoyo incondicional en mi realización como profesional y persona. Por su paciencia y amor, también a mi hermano Carlos Alfredo Peña.

Gracias a mi familia que me recibió con los brazos abiertos cuando inicié la etapa de ser profesional, entre ellos mi abuelita Alix, mi tío Ludwing, mi tía Ruth, mi tía Aminta, Mario, mi tío Alfredo, mi abuelo Gabriel, mis primos Cesar, Angie, Carlos, y en especial a mi primo y hermano Andrés quien ha estado presente en los momentos buenos y malos y me ha sido de gran apoyo.

A mis amigos y compañeros con los que compartí cada etapa en la vida universitaria, entre ellos: Jhonatan, Oscar, Brigit, Diana, Edicson, Yuli, Omar, Viviana y Jasson.

A mi compañera y amiga Elizabeth Ayala con quien he trabajado arduamente durante varios años y quien me ha ayudado para alcanzar esta meta que tanto anhelábamos.

Yeison Gabriel Peña

Además agradecemos de manera especial a nuestro director de proyecto el profesor Fernando Martínez por ser nuestra guía durante la realización de este trabajo, por aceptarnos en su grupo de investigación (CICAT) por su apoyo, dedicación y esfuerzo. Al profesor Rodrigo Torres por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, y su gran disposición para poder lograr la finalización de este trabajo. Al profesor Arnold Romero por su amistad, su ayuda y su colaboración. Gracias al Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander por prestarnos los equipos utilizados en el proyecto. Gracias a Monica y Alejandro por paciencia, amabilidad y ayuda. Al profesor Jonny Duque y al Centro de Investigación Enfermedades Tropicales-CINTROP por facilitarnos sus instalaciones para desarrollar parte del proyecto, Oveimar por su ayudarnos en la síntesis, al Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología por el préstamo de equipos y reactivos y a sus integrantes por habernos acogido en su laboratorio.

RESUMEN

TÍTULO: FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SIMPLE CON ÁCIDO FÓLICO Y EVALUACIÓN DE SU EFECTO TERMICO*.

Autores: Elizabeth Ayala Blanco** et Yeison Gabriel Peña Becerra**.

Palabras claves: funcionalización, Nanotubos de carbono, ácido fólico, efecto térmico local, radiación I.R.

En el presente trabajo se estudió la funcionalización covalente de nanotubos de carbón de pared simple con el ácido fólico (AF). Se midió el aumento de la temperatura de soluciones de NTC-AF al ser irradiadas con bombillas comerciales incandescentes, que emiten en gran parte radiación infrarroja. El procedimiento de funcionalización se inspiró en un método de síntesis usado para la aminación de la lipasa B de la Candida antártica, utilizando el EDAC como agente de activación de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de los NTC-COOH. La caracterización de los precursores, intermediarios y producto final se realizó mediante técnicas espectroscópicas tales como IR-ATR, UV-VIS y Fluorescencia así como la dispersión de luz dinámica.

Se observó un efecto térmico de los nanotubos de carbono funcionalizados con AF (covalente y no covalentemente) al irradiarse las soluciones de NTC-AF. Los dos tipos de nanotubos funcionalizados presentaron un aumento de temperatura cuando se irradió con una bombilla de 60 vatios durante una hora. Sin embargo en los NTC-AF funcionalizados covalentemente se observó un mayor aumento de temperatura. La importancia del efecto térmico radica en aplicación de estos biomateriales como tratamiento alternativo en enfermedades como la Leishmaniasis, cuyas células infectadas con el parásito de la Leishmania se pueden eliminar mediante este efecto térmico localizado.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Fernando Martínez O.

ABSTRACT

TITLE: COVALENT FUNCTIONALIZATION OF SINGLE-WALLED CARBON NANOTUBES WITH FOLIC ACID AND EVALUATION OF ITS THERMIC EFFECT.

Authors: Elizabeth Ayala Blanco** and Yeison Gabriel Peña Becerra**.

KEYWORDS: functionalization, Carbon Nanotubes, folic acid, local thermal effect. Irradiation I.R.

In this work, covalent functionalization of carbon nanotubes single walled (SWCNT) with folic acid (FA) was studied. The temperature increase was measured in solutions of SWCNT-AF under irradiation with commercial incandescent bulbs, which emit infrared radiation largely. The functionalization process was inspired by a synthesis method used for the amination of the lipase B from *Candida antarctica*, using EDAC as an activating agent of the carboxyl groups present on the surface of the SWCNT-COOH. The precursors' characterization, intermediates and final product was performed by spectroscopic techniques such as IR-ATR, UV-VIS, fluorescence and dynamic light scattering.

Thermal effect was observed of the functionalized carbon nanotubes with AF (covalently and non-covalently) when the solutions got irradiated with SWCNT-AF. The two types of functionalized nanotubes present an increase in temperature when it got irradiated with a 60 watt light bulb for an hour. However, covalently functionalized SWCNT-AF showed a greater increase in temperature. The importance of thermal effect applies in application of these biomaterials as an alternative treatment in diseases such as leishmaniasis, which infected cells with the *Leishmania* parasite can be killed by the localized heating effect.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Fernando Martínez O.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	26
1. JUSTIFICACIÓN	28
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GENERAL	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. FUNDAMENTO TEÓRICO	30
3.1 NANOTECNOLOGÍA	30
3.2 NANOTUBOS DE CARBONO	32
3.2.1 Estructura de Nanotubos de Carbono	33
3.2.2 Síntesis de Nanotubos de Carbono	35
3.2.2.1 Método de Depósito Químico en fase Vapor	35
3.2.2.2 Método de Descarga de Arco Eléctrico	36

3.2.2.3 Método de Ablación Laser	36
3.2.3 Métodos de funcionalización de Nanotubos de Carbono de Pared Simple	38
3.2.3.1 Funcionalización no Covalente	38
3.2.3.2 Funcionalización Endoédrica	40
3.2.3.3 Funcionalización Covalente	40
3.2.4 Aplicaciones de Nanotubos de Carbono	41
3.2.4.1 Electrónica	41
3.2.4.2 Química	43
3.2.4.2.1 Adsorción y Absorción	43
3.2.4.2.2 Sensores Químicos	43
3.2.4.2.3 Catálisis	44
3.3 ÁCIDO FÓLICO	44
3.3.1 Estructura del Ácido Fólico	44
3.3.2 Receptores de Folato	46

3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	48
3.5 DISTRIBUCIÓN ESPECTRAL DE LÁMPARAS INCANDESCENTES	49
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	50
4.1 DISPERSIÓN DE NANOTUBOS DE PARED SIMPLE	50
4.2 FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NTC-COOH CON ÁCIDO FÓLICO	50
4.2.1 Funcionalización covalente NTC-COOH con Etilendiamina	50
4.2.2 Funcionalización covalente NTC-EDA con Ácido Fólico	50
4.3 CARACTERIZACIÓN DE NTC-AF	51
4.3.1 Caracterización por Espectroscopía (IR/ATR)	51
4.3.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)	52
4.3.3 Caracterización por Espectroscopía (UV-VIS)	52
4.3.4 Caracterización por Espectroscopía de Fluorescencia	52
4.4 FUNCIONALIZACIÓN NO COVALENTE DE NTC-AF	53

4.4.1 Solución de 100ppm	53
4.4.2 Solución de 1000ppm	53
4.5 APLICACIÓN PRELIMINAR DE LA FUNCIONALIZACIÓN NO COVALENTE DE NTCPS-AF EN BIOACTIVIDAD LARVICIDA EN ESTADO 3 Y 4.	53
RESULTADOS Y DISCUSIONES	54
5.1 ESTUDIO DE LA FUNCIONALIZACIÓN DE NTC-AF	55
5.1.1 Análisis Caracterización NTC-AF por Espectroscopía (IR/ATR)	56
5.1.2 Estudio de la distribución del tamaño de partícula	62
5.1.3 Análisis Caracterización NTC-AF por Espectroscopía (UV-VIS)	64
5.1.4 Análisis Caracterización NTC-AF por Espectroscopía de Fluorescencia	66
5.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO TÉRMICO DE NTC-AF	68
5.2.1 Análisis del efecto térmico de la funcionalización covalente y no covalente de NTC-AF	69
5.3 APLICACIÓN PRELIMINAR DE LA FUNCIONALIZACIÓN NO COVALENTE DE NTC-AF EN BIOACTIVIDAD LARVICIDA EN	

ESTADO 3 Y 4.	73
6. CONCLUSIONES	75
7. RECOMENDACIONES	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	83

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Bandas características de IR del NTC.	57
Tabla 2. Resultados obtenidos en la caracterización del tamaño de partícula por DLS.	61
Tabla 3. Bandas de Absorción de ultravioleta visible del NTC-COOH.	65
Tabla 4. Medición de la Temperatura del agua, en un sistema Cerrado e iluminado con bombilla incandescente de 60 watts localizado a una altura de 15 cm sobre el nivel del agua.	69
Tabla 5. Medición de la Temperatura del agua, en un sistema Cerrado de una solución acuosa de 1000ppm con NTC-AF no covalente e iluminado con bombilla incandescente de 60 watts localizado a una altura de 15 cm sobre el nivel del agua.	69
Tabla 6. Medición de la Temperatura del agua, en un sistema cerrado de una solución acuosa de 100 ppm con NTC-AF no covalente e iluminado con bombilla incandescente de 60 watts localizado a una altura de 15 cm sobre el nivel del agua.	69
Tabla 7. Medición de la Temperatura del agua, en un sistema cerrado de una solución acuosa de 1000 ppm con NTC-AF covalente e iluminado con bombilla incandescente de 60 watts localizado a una altura de 15 cm sobre el nivel del agua.	70

Tabla 8. Medición de la Temperatura del agua, en un sistema Cerrado de una solución acuosa de 100 ppm con NTC-AF covalente e iluminado con bombilla incandescente de 60 watts localizado a una altura de 15 cm sobre el nivel del agua.	70
Tabla 9. Control de la actividad larvicida a un tiempo de 24 horas.	73
Tabla 10. Control de temperatura a una altura de 20 cm con una bombilla incandescente a 40 watts a 24 horas del experimento.	73
Tabla 11. Control de la actividad larvicida a un tiempo de 48 horas.	73
Tabla 12. Control de temperatura a una altura de 20 cm con una bombilla incandescente a 40 watts a 48 horas del experimento.	74

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Imagen de los Polímeros que se autoensamblan para formar una cuerda a nanoescala.	31
Figura 2. Imagen de un Nanobiosensor de grafeno para detección de bacterias en un esmalte dental.	31
Figura 3. Esquema de las formas alotrópicas del Carbono: (a)Cadenas de carbono, (b) Hidrocarburos aromáticos policíclicos,(c) Grafito, (d) Carbono amorfo, (e) C ₆₀ , (f) C ₇₀ , (g) Nanotubos de carbono y (h) Nanodiamante.	32
Figura 4. Clasificación de los Nanotubos de Carbono según el número de capas.	33
Figura 5. Representación Gráfica de Tipos de Nanotubos de Pared Simple NTC, según el plegamiento de una lámina de grafeno.	34
Figura 6. Esquema de las estrategias de funcionalización de los NTC. a) Funcionalización covalente en las paredes, b) funcionalización covalente a través de defectos, c) funcionalización exoédrica, no covalente por surfactantes, d) funcionalización exoédrica, no covalente con polímeros, e) funcionalización endoédrica (por ejemplo C ₆₀).	39

Figura 7. Aplicaciones de los Nanotubos de Carbono según sus propiedades.	41
Figura 8. Tabla periódica de los nanotubos que permite determinar las propiedades electrónicas de los NTC.	42
Figura 9. Estructura del Ácido Fólico.	46
Figura 10. Esquema del proceso de potocitosis (receptores de folato).	48
Figura 11. Distribución espectral de lámparas incandescentes.	49
Figura 12. Montaje experimental de la funcionalización covalente de NTC-EDA y NTC-AF.	52
Figura 13. Imagen de las dispersiones de NTC-COOH en: a)Agua, b)DMF y c)Acetonitrilo.	51
Figura 14. Esquema de la: Funcionalización covalente (a) Intermediario NTC-EDA y (b) Producto final NTC-AF.	57
Figura 15. Espectros IR del NTC.	58
Figura 16 Espectros IR del NTC-COOH.	58
Figura 17 Espectros IR del NTC-EDA.	59
Figura 18 Espectros IR del NTC-AF.	60

- Figura 19.** Espectros IR de la reproducibilidad experimental del intermediario NTC-EDA y producto Final NTC-AF. 61
- Figura 20.** a) distribución de tamaño NTC-COOH b) distribución de tamaño NTC-EDA, c) Distribución de tamaño NTC-AF. 63
- Figura 21.** Espectros UV-VIS a) precursores EDA (disuelto en agua) y AF (disuelto en acetonitrilo b) Intermediarios y productos de Nanotubos de Carbono dispersos en acetonitrilo. 65
- Figura 22.** Espectros de fluorescencia de la etilendiamina y el NTC-EDA dispersos en agua. 66
- Figura 23.** Espectros de fluorescencia del Ácido Fólico y el NTC-AF dispersos en acetonitrilo. 67
- Figura 24.** Montaje experimental para medir el aumento de la temperatura en un sistema cerrado con lámpara incandescente de 60 watts. 68
- Figura 25.** Medición del Efecto térmico producido por los NTC-AF funcionalizados covalente y no covalente al ser iluminados con una bombilla comercial de incandescencia. 71
- Figura 27.** Larvas Aedes Aegypti durante el proceso de alimentación (27a) Larva sin alimentar, (27b) durante las primeras 2 horas de alimentación, (27c) transcurrido 24 horas de alimentación y (27d) a las 48 horas de alimentación. 75

LISTA DE ANEXOS

	Pág
ANEXO A. Espectro de Infrarrojo de la Etilendiamina	83
ANEXO B Espectro de infrarrojo del Ácido Fólico	84

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AF. Ácido Fólico

AL Ablación Láser

ATR (*Attenuated Total Reflection*) Reflectancia Total Atenuada

C₆₀ (*Fullerene*) Fullerenos

CVD Depósito Químico en Fase Vapor

DA Descarga de Arco Eléctrico

DCC N,N'-Diciclohexilcarbodiimida

DLS (*Dispersive light scattering*) Dispersión de Luz Dinámica

EDA (*Ethylenediamine*) Etilendiamina

FBP (*Folate Binding Proteins*), Folato unido a proteínas

IR Infrarrojo

IRC Infrarrojo Cercano

IR/ATR Espectroscopía infrarroja acoplada con Reflectancia Total Atenuada

5-MTHF 5-Metiltetrahidrofolato

M Muertas

NTC Nanotubo de Carbono

NTCPS Nanotubo de Carbono de Pared Simple

NTPM Nanotubo de carbono de Pared Múltiple

NTC-AF Nanotubos de carbono funcionalizados con Ácido Fólico

NTC-COOH Nanotubos de carbono funcionalizados con ácidos carboxílicos

NTC-EDA Nanotubos de carbono funcionalizados con etilendiamina

R1, R2, R3 Replicas 1, 2 y 3

RF Receptor de Folato

THF Tetrahidrofurano

UV-VIS Espectroscopía Ultravioleta Visible

V Vivas

GLOSARIO

Apoptosis. Es una forma de muerte celular que está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente.

Potocitosis. Tipo de endocitosis en la cual se forman las caveolas, este tipo de transporte ocurre en la absorción del folato. La endocitosis es un mecanismo celular para el ingreso de sustancias externas.

Pirólisis. Proceso de descomposición térmica en el que una molécula se rompe por acción del calor en ausencia de oxígeno.

Efecto batocrómico. Este efecto se produce cuando la longitud de onda de la absorción de una sustancia se desplaza hacia longitudes de onda más largas o de menor energía, por efecto del solvente o sustituyentes.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología ha generado un gran avance a nivel científico, permitiendo la investigación interdisciplinaria en campos como la química, la medicina, la biología y la electrónica entre otras. Esto a generado un gran intereres ante la comunidad científica,considerándolo uno de los mas innovadores y ambiciosos proyectos de la ciencia moderna. Permittiendo el estudio a nivel atómico de la acción de los fármacos, procesos de creación de fuentes de energía inagotables y ataque a plagas.[1]

Los nanotubos de carbono (NTC), usados en el presente trabajo, presentan estructuras tubulares con propiedades mecánicas y electrónicas muy particulares. Además son sistemas livianos y porosos con alta resistencia mecánica que permiten así el reforzamiento estructural de los materiales. Su síntesis se basa en un proceso de pirólisis en el cual los compuestos usados como precursores contienen simultáneamente un catalizador metálico y una fuente de carbono requerida para el crecimiento de los nanotubos en una sola etapa.[2]

Sin embargo, estos compuestos presentan ciertas limitaciones como la insolubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos, costos elevados para su síntesis, producción a baja escala y difícil degradación. En consecuencia se ha propuesto diseñar sistemas nanohíbridos que permitan mitigar estos inconvenientes prácticos, proporcionándole propiedades muy específicas a los nanotubos de carbono y permitan su aplicación en medicina como transportadores de medicamentos o para generar efectos tóxicos en presencia de radiación electromagnética, principalmente del I.R.

La funcionalización de los NTC con moléculas como el ácido fólico (AF), es el tema de investigación del presente trabajo de grado. El AF conocido como vitamina D, ingresa al organismo de los seres vivos por medio de la dieta alimentaria. Este ácido ha

permitido aplicaciones novedosas en el campo de la medicina, debido a que la biomolécula de ácido fólico es reconocida por receptores de folato sobre expresados por células cancerígenas. La preparación de materiales con AF ha permitido diseñar procedimientos que permiten la detección selectiva y posterior muerte de las células enfermas.

En el presente trabajo de grado se estudió la funcionalización covalente de los NTC con la molécula de ácido fólico, como procedimiento alternativo al método de funcionalización no covalente desarrollado en el CICAT en el trabajo doctoral "*Diseño y Preparación de Nanocompuestos Funcionalizados con Ácido Fólico y sus Aplicaciones Biomédicas*". Adicionalmente, se midió el efecto del calentamiento de soluciones de NTC-AF al ser irradiadas con luz infrarroja. Se observó que los NTC funcionalizados covalentemente presentaron un mayor aumento de la temperatura, hecho que permite visionar una aplicación en células infectadas con parásitos, para generar su muerte por efecto térmicos.

1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la nanotecnología permite la creación de materiales útiles y funcionales mediante el control de la materia a escala nanométrica, aprovechando nuevas propiedades químicas y biológicas. Sin embargo, los NTC presentan muy poca aplicación a nivel químico y biológico, ya que no son solubles en disolventes orgánicos y pueden llegar a ser tóxicos dependiendo de su concentración y del método de preparación usado. A nivel biológico, presentan problemas de compatibilidad debido a que estas nanoestructuras son muy estables haciendo muy difícil su degradación.

En el presente trabajo se estudió la funcionalización NTC con Ácido Fólico, buscando preparar un sistema nanohíbrido que permita la internalización selectiva del NTC dentro de las células enfermas, utilizando el Ácido Fólico, el cual es reconocido por los receptores de folato facilitando su internalización celular. Esta investigación evaluó un método de funcionalización covalente NTC con Ácido Fólico y la medición del efecto térmico generado por este nanosistema al interactuar con la radiación IR.

En el centro de investigación de catálisis (CICAT) de la Universidad Industrial de Santander se ha estudiado la funcionalización no covalente del NTC, caracterizando la interacción del Nanotubo-Ácido Fólico por diferentes técnicas instrumentales, así como se ha evaluado su efecto térmico en células infectadas con leishmania. Bajo las condiciones de irradiación usadas en células infectadas, los efectos térmicos observados han sido muy leves. En consecuencia se requiere estudiar el efecto de la funcionalización del NTC así como el efecto de algunos parámetros sobre el calentamiento, tales como la fuente de radiación, la distancia lámpara – solución, el tipo de funcionalización covalente y no covalente del -nanotubo entre otras.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evindenciar la funcionalización covalentemente los Nanotubos de Carbono de Pared Simple funcionalizados con Ácido Fólico y estudiar el efecto térmico en una solución, generado por su interacción con la radiación infrarrojo cercano .

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Funcionalizar covalentemente Nanotubos de Carbono de Pared Simple con Ácido Fólico
- ❖ Caracterizar y Evaluar la funcionalización covalente de los Nanotubos de Carbono de Pared Simple por medio de técnicas espectroscópicas.
- ❖ Medir el efecto de la radiación infrarroja en soluciones acuosas de Nanotubos de Carbono de Pared Simple funcionalizados con Ácido Fólico.

3. FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1 NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología es una ciencia multidisciplinaria, basada en procesos realizados a escala nanométrica (1nm equivale a $1 \times 10^{-9} \text{m}$), es decir que su campo de acción está directamente relacionado con la modificación de átomos, moléculas y células. Esta nueva visión de la ciencia toma ventaja de los fenómenos físicos que están directamente ligados con efectos cuánticos que se presentan en la materia cuando se manipula en esta escala.[3]

La importancia de construir materiales a escalas nanométricas está relacionado con las propiedades únicas que presentan las partículas con tamaños inferiores a 100nm, debido a que se observan fenómenos químicos, físicos, ópticos, electrónicos y mecánicos totalmente diferentes a los que se presentan en la escala macroscópica por este mismo tipo de partículas. El éxito de la nanotecnología es poder manipular átomos y moléculas individuales de forma tal que se le puedan conferir propiedades específicas y únicas a los nuevos materiales que se sintetizan.

Aunque muchos de los aspectos que involucran la nanotecnología se encuentran en estudios rigurosos, existen tres ramas en las que se ha visto un mayor desarrollo de nanotecnología: la nanoelectrónica, nanomateriales y nanobiotecnología. En el campo de la nanoelectrónica se pretende generar dispositivos con una gran capacidad de almacenamiento y bajo costo, los cuales consten de moléculas individuales o de tan solo unas pocas agrupaciones de ellas. Desarrollando lo que se denomina, electrónica molecular.[4]

Los nanomateriales están enfocados en el control morfológico, en el que cada modificación nanoestructural realizada permita adquirir un material con nuevas propiedades (Figura 1).

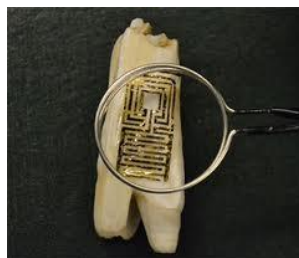
Figura 1. Imagen de los Polímeros que se autoensamblan para formar una cuerda a nanoescala.



Fuente: Laboratorio Nacional Lawrence Berkeley, 2011 [5]

Por otra parte, la nanobiotecnología ha permitido crear sensores biomédicos, o modificar sistemas vivos combinando la ingeniería a nivel nanoescalar y la biología molecular permitiendo un mejoramiento de las medicinas, implantes quirúrgicos o nanomáquinas con un campo de acción más específico y eficiente, figura 2 .[6]

Figura 2. Imagen de un Nanobiosensor de grafeno para detección de bacterias en un esmalte dental.

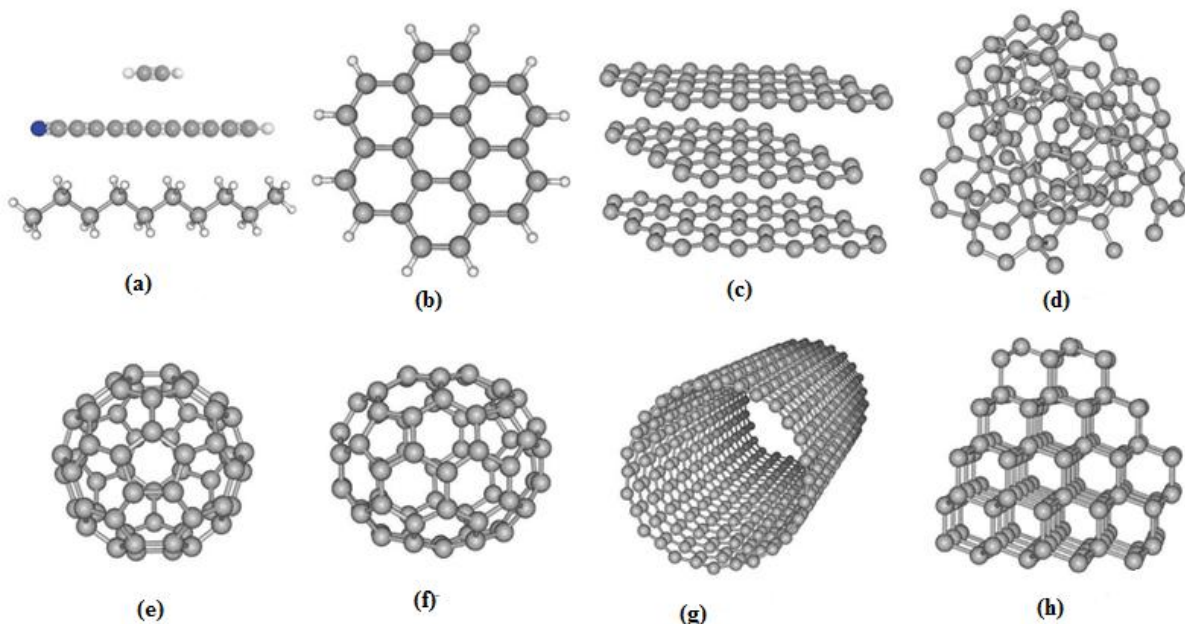


Fuente: (MANOOR, Manu y col 2011). [7]

3.2 NANOTUBOS DE CARBONO

El carbono es uno de los elementos más importantes en la naturaleza, cuya característica principal es su capacidad de lograr enlaces muy estables. Debido a su configuración electrónica tiene altas probabilidades de combinarse y formar números compuestos; dependiendo de las condiciones de formación y de su tipo de hibridación, se puede encontrar en diferentes formas alotrópicas (Figura 3).

Figura 3. Esquema de las formas alotrópicas del Carbono: (a) Cadenas de carbono, (b) Hidrocarburos aromáticos policíclicos, (c) Grafito, (d) Carbono amorfo, (e) C₆₀, (f) C₇₀, (g) Nanotubos de carbono y (h) Nanodiamante.



Fuente: (PASCALE Ehrenfreund, BERNARD H. Foing., (2010) [8]

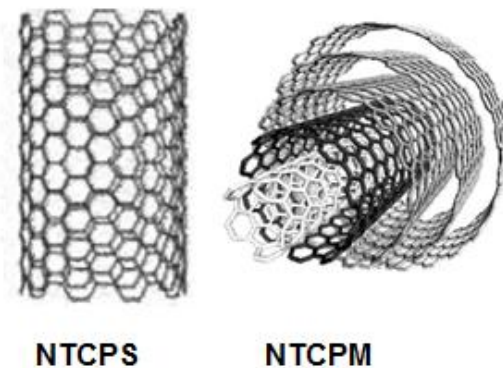
Los nanotubos de carbono son nanopartículas compuestas por múltiples anillos de átomos de carbono, presentan enlaces químicos de tipo sp^2 similares a los del grafito y

al ser sometidos a altas presiones pueden fusionarse modificando su tipo de enlace a sp^3 , confiriéndole fuerza y longitud ilimitada. Además tienen un amplio rango de propiedades estructurales, electrónicas y térmicas que permiten trabajar a escala molecular, realizar síntesis de nanoestructuras y auto ensamblado.

En 1991 el físico Sumio Iijima observó los primeros nanotubos empleando un sistema de evaporación con un arco eléctrico, evidenciando la formación de agujas que constaban de varias capas cilíndricas de hasta 1mm de longitud sobre el cátodo de grafito, figura 3[9].

3.2.1 Estructura de Nanotubos de carbono

Figura 4. Clasificación de los Nanotubos de Carbono según el número de capas



Fuente: ATIENZAR, C. Pedro 2007 [10].

La estructura de los nanotubos está formada por átomos de carbono que se encuentran unidos mediante enlaces π , considerado como un enrollamiento de una lámina de grafeno, el cual se puede clasificar en dos tipos dependiendo del número de capas presentes (Figura 4). Los nanotubos de pared simple (NTCPS) cuya capa es bidimensional formando un cilindro de diámetro nanométrico y los nanotubos de

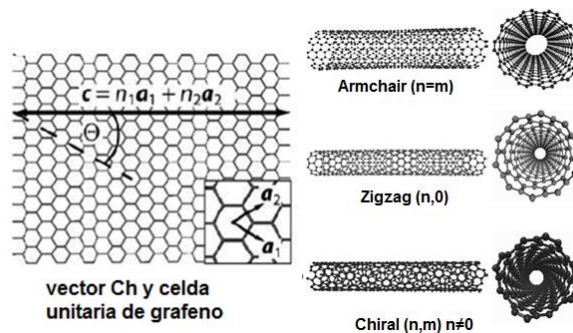
múltiples paredes (NTCPM) formados por varias capas concéntricas a una distancia similar a la distancia interplanar del grafito.

En 1993 (Bethune y col.; Iijima y Ichihashi [11]) descubrieron los NTC, quienes consideraron que dependiendo del tipo de plegamiento formado en los anillos (θ) se pueden clasificar como: brazo de silla (armchair) ($\theta=30^\circ$), zigzag ($\theta=0^\circ$ conductores) y quiral (chiral) ($0<\theta<30^\circ$ semiconductor), ver figura 5. Cada una de estas estructuras dependen del tipo de vector quiral (Ch), el cual se expresa como $Ch = na_1 + na_2$, que unen dos puntos cristalográficos equivalentes a partir de los vectores unitarios a_1 y a_2 en la red bidimensional del grafito. La magnitud de este vector está relacionada con el diámetro del nanotubo y el vector θ que determinan el acomodo de los átomos en la superficie, el diámetro del nanotubo se expresa términos de n y m , mediante la siguiente ecuación:

$$d_{\text{CNT}} = \frac{\sqrt{3}a_{\text{C-C}}}{\pi} (m^2 + mn + n^2)^{1/2} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

Y el Angulo chiral está definido por: $\theta = \tan^{-1}\left(\frac{3n}{2m+n}\right)$ [Ecuación 2]

Figura 5. Representación Gráfica de los Nanotubos de Pared Simple, según el plegamiento de una lámina de grafito.



Fuente: HENNRICH, Frank y col 2006 [12].

3.2.2 SINTESIS DE NANOTUBOS DE CARBONO

Existen diversos métodos de preparación de los nanotubos de carbono (NTC), basados en la formación de estructuras cilíndricas en fase gaseosa. Las unidades reactivas de carbono se pueden generar por descomposición térmica y catalítica de vapores orgánicos (Depósito Químico en fase vapor) o por evaporación de grafito (Descarga de Arco eléctrico, horno solar y Ablación con láser).

3.2.2.1 Método de Depósito Químico en Fase Vapor (CVD)

En 1890 el método CVD se utilizó por primera vez en la obtención de fibras de carbono, en la actualidad es usado ampliamente en la preparación de películas delgadas para la fabricación de dispositivos ópticos y los NTC. En el método CVD se realiza la reacción química de diferentes precursores orgánicos mediante una descomposición fisicoquímica en ausencia de oxígeno.

El reactor utilizado es generalmente un tubo en forma horizontal colocado en un horno, en el cual previamente se depositan los sustratos, como el silicio, hierro entre otros, capaces de resistir altas temperaturas y necesarios para el crecimiento de los NTC. En uno de sus extremos se encuentra: un recipiente que contiene los precursores orgánicos, los cuales son arrastrados por un flujo gaseoso hasta el extremo opuesto por donde salen los gases.

El procedimiento típico de preparación se inicia con la inyección del gas inerte sobre los precursores para limpiar la mayor cantidad de impurezas y humedad del ambiente. Luego, el horno se calienta entre 500 y 1200°C y se introduce una fuente de carbono con un metal utilizado como catalizador. La mezcla se descompone en el horno para formar nanopartículas de NTC. Cuando el proceso llega a la sobresaturación de carbono, los átomos se liberan en forma de cupula a lo largo del cilindro de carbono; si

se presenta una fuerte la interacción el sustrato y el catalizador, los NTC crecen ascendentemente, pero si la interacción es débil los NTC crecen en la punta.[13.14.15]

3.2.2.2 Método de Descarga de Arco Electrico (DA)

Este método inicialmente se usó para la producción de fullerenos y luego fue modificado para la producción a gran escala de NTC. El proceso de Descarga de Arco se define como la vaporización de un material entre dos electrodos al aplicar una diferencia de potencial. En este caso un electrodo contiene el metal usado como catalizador e inmerso en una atmósfera inerte y se encuentra separado del otro electrodo por una distancia muy corta.

En el proceso de debe controlar la presión (aproximadamente 500 Torr), posteriormente se aplica un voltaje aproximado de 20 V y una corriente entre 50 a 100 A a los electrodos de carbono, esta corriente produce una serie de descargas en el espacio entre los electrodos calentando la superficie para evaporar los átomos de carbono y el metal. La evaporación genera el flujo de electrones e iones conocido como plasma permitiendo la agrupación de los átomos metálicos de tamaño nanométrico. Los átomos de carbono que presentan menores energías en el plasma se diluyen en las nanopartículas y se agrupan para formar estructuras semi-estables de carbono, mientras que las estructuras de carbono que se enfrían, se condensan en las paredes formando carbono amorfo, nanopartículas de carbono y en una pequeña cantidad NTC. [13,14,16,17]

3.2.2.3 Método de Ablación Láser (AL)

Este método se basa en la evaporación de un material mediante su calentamiento con un láser, generando un plasma de carbono que posteriormente se deposita. El sistema consiste de un tubo de cuarzo que se coloca en un horno cilíndrico, en el cual en uno de

sus extremos hay una bomba de vacío y la entrada de gas, mientras que en el otro extremo esta además de una bomba de vacío, hay un recipiente para la recolección de los NTC en la superficie metálica (generalmente de cobre) que se enfría mediante un flujo continuo de agua.

El proceso de preparación se inicia con la inyección de un flujo de gas inerte por uno de los extremos del tubo alcanzando una presión de 500 Torr, que se calienta a una temperatura de 1200°C en el horno. Un haz de láser se incide sobre una zona muy pequeña del blanco, provocando la evaporación del material a nivel molecular y generando el plasma de carbono sobre el catalizador metálico. Posteriormente este plasma se enfría rápidamente para generar la condensación de ambos elementos. Al sublimarse los átomos de carbono se forman estructuras completas y semicompletas de fullerenos, mientras que al condensar el metal se producen las nanopartículas que se depositan en la superficie y sirven como semilla para el crecimiento de los NTC.

Sin embargo a pesar de existir diferentes métodos para la fabricación de NTC, cada uno de ellos requiere diversas configuraciones de equipo e instrumentación, repercutiendo en la calidad final de los NTC. Las longitudes y el porcentaje que se obtienen en los métodos para la fabricación de los NTC varían considerablemente, a diferencia del método de Ablación Laser, en el cual se puede obtener un rendimiento del 70% en peso y producir nanotubos de pared simple con diámetros uniformes que pueden ser controlados en su fabricación modificando la temperatura en el interior del reactor.

Para determinar las características de los NTC es necesario realizar una caracterización de los mismos. Las diferentes técnicas proporcionan información acerca de las propiedades de los NTC como la pureza, cristalinidad, dimensiones, estabilidad térmica y composición. La microscopía óptica o electrónica, proporciona información de la

presencia del NTC en la muestra, el tipo de nanotubo, su pureza, estructura y dimensión. [18]

Al aplicar el método termogravimétrico a los NTC en presencia de oxígeno, se obtiene información de procesos de sublimación, desorción y vaporización de los elementos presentes en los NTC y los perfiles de descomposición permitiendo estimar su pureza y estabilidad térmica. Además la técnica de espectroscopia Raman permite estimar la cristalinidad de las paredes de los NTC y su arreglo atómico, debido a la gran sensibilidad para detectar diversas estructuras de carbono. Esta técnica es utilizada para comparar diferentes muestras de NTC y evaluar la calidad de cada una de ellas. [19]

3.2.3. MÉTODOS DE FUNCIONALIZACIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SIMPLE

La funcionalización de los NTC permite nuevas aplicaciones al introducir grupos funcionales que responde a los estímulos externos de radiación electromagnética ó una reactividad, mediante la formación de complejos de transferencia de carga estable. En el caso de compuestos porfirinicos se establece que la asociación de éstas moléculas con los NTC se hace por interacciones π - π sin la formación de enlaces covalentes entre el NTC y la molécula funcionalizante. Por otra parte, cuando se usan las aminas, la modificación permite la formación de enlaces covalentes entre los NTC y las unidades modificadoras [20], ver figura 6.

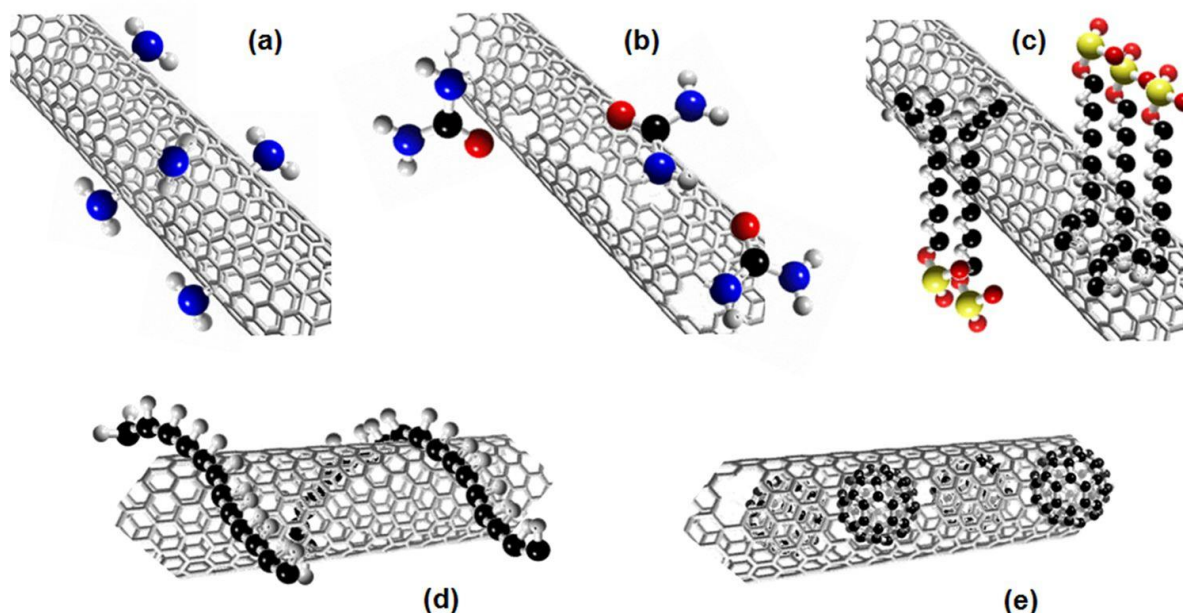
3.2.4.1 Funcionalización no Covalente

Este tipo de funcionalización es considerado como un método no destructivo y permite conservar las propiedades de los nanotubos de carbono. Se han empleado surfactantes, biomoléculas y ADN para lograr este tipo de funcionalización (ver figura

6cy 6d), debido a que estas moléculas se pueden adsorber sobre la superficie de los NTC por medio de interacciones electrostáticas (Sun, 2002). En el caso del ADN, se ha indicado que él puede envolver los nanotubos debido a su conformación helicoidal (Tsang et al., 1997).

Un ejemplo de funcionalización no covalente con derivados de pireno fueron estudiados por (Guldi, Prato y col;2006), preparandose un bisaducto de C_{60} funcionalizado con pireno. Debido a las interacciones π - π del pireno-NTC (mencionandose como los primeros híbridos supramoleculares) se pudo solubilizar el NTC en THF.

Figura N°6. Esquema de las estrategias de funcionalización de los SWCNT. a) Funcionalización covalente en las paredes, b) funcionalización covalente a través de defectos, c) funcionalización exoédrica, no covalente por surfactantes funcionalización exoédrica, no covalente con polímeros, e) funcionalización endoédrica (por ejemplo C_{60}).



Fuente: SUZUKI, Satoru 2003 [21]

3.2.4.2 Funcionalización Endoédrica

Los NTC presentan una cavidad interna que permite alojar diferentes especies como: metallocenos, haluros metálicos, óxidos metálicos, proteínas, fullerenos, entre otros. Esto ha permitido la introducción de C_{60} , calentando a temperaturas de 400°C - 600°C en vacío, en los extremos abiertos de los NTC. Mediante la microscopía electrónica, se observaron imágenes de la inclusión del C_{60} en el interior de los NTC (ver figura 6e).

3.2.4.3 Funcionalización Covalente

El anclaje de grupos funcionales a la superficie de los NTC por medio de enlaces covalentes ha permitido la preparación nanocompuestos con propiedades novedosas. La incorporación de un grupo funcional se realiza por medio de diferentes reacciones químicas secuenciales (derivación química-Sun, (2002)). Para lograr este tipo de funcionalización se requiere la ruptura de enlaces en las paredes o a través de defectos de los NTC en condiciones de reacción drásticas, mediante el uso de ácidos inorgánicos concentrados. Sin embargo, esto puede causar daño en la estructura del NTC y disminuir su desempeño en una aplicación particular (figura 6a y 6b).

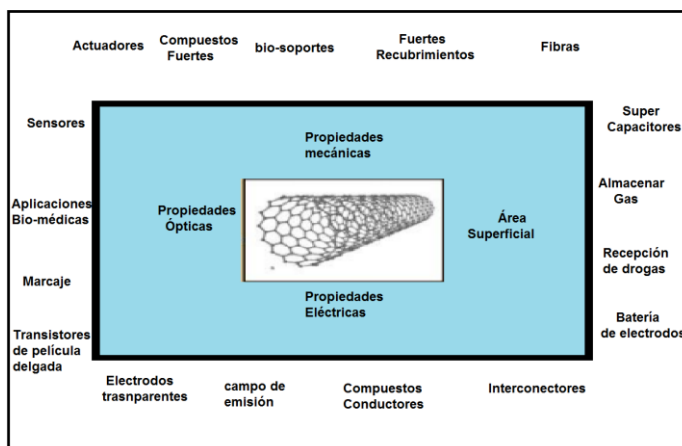
Actualmente se ha propuesto el estudio de los NTC funcionalizados covalentemente en sistemas biológicos, enfocándose en la internalización de los nanohíbridos sobre diferentes tipos de células. El principal problema observado en estos sistemas ha sido la biocompatibilidad y la solubilidad en soluciones acuosas. Científicos de la Universidad de Standford en el 2005 utilizaron NTC recubiertos con ácido fólico para destruir células cancerígenas, mediante su internalización en células CD22 y CD 25 [22] y luego irradiándolas con radiación infrarroja cercana. Esta interacción produce un calentamiento localizado que permite la destrucción de la célula que contiene el NTC.

Otra de las aplicaciones estudiadas de los NTC funcionalizados ha sido su uso como potenciales transportadores de medicamentos ó moléculas biológicamente activas. Algunas demostraciones realizadas son la funcionalización NTC con amonio que se asocian con plásmidos a través de interacciones electroestáticas, estos NTC al interaccionar con células de mamíferos penetran en las membranas celulares e ingresan entregando ADN de manera eficiente [23].

3.2.4 APLICACIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO

Los NTC están catalogados como nuevos materiales y presentan numerosas aplicaciones, debido a sus propiedades mecánicas, químicas, biomédicas, eléctricas, ópticas y térmicas, entre otras. A continuación se indican algunas de las aplicaciones prometedoras de los NTC, ver figura 7.

Figura 7. Aplicaciones de los NTC según sus propiedades fisicoquímicas



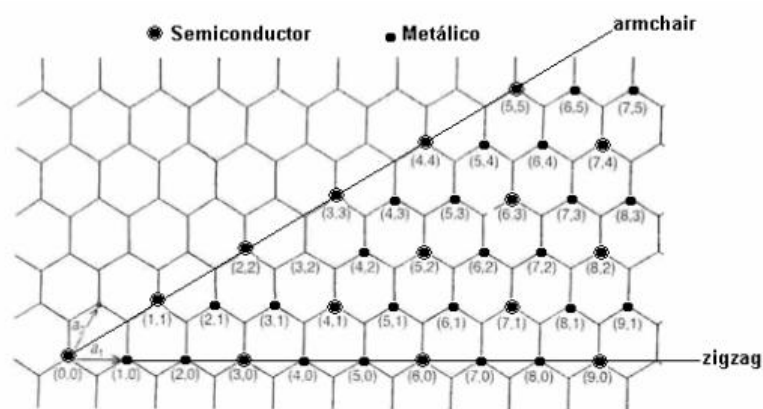
Fuente: RESASCO, Daniel 2011 [24]

3.2.4.1 Aplicaciones en Electrónica.

Las propiedades tanto metálicas como semiconductoras de los NTC los hacen aptos para ser utilizados en la electrónica. Estas propiedades se deben al enrollamiento de la lámina de grafito. El NTC con propiedades metálicas debe cumplirse que la diferencia entre los índices de Hamada ($n-m$) debe ser múltiplo de 3 de lo contrario sería un material semiconductor [25].

Las exigencias de los nuevos circuitos electrónicos se basan en miniaturizar los dispositivos para mejorar la presentación sin dejar a un lado el aumento en la velocidad, densidad y eficiencia. [26] Las tecnologías basadas en el silicio están llegando a su punto límite de acción, pues al reducir más el tamaño de los circuitos electrónicos, ya no se obtienen altas eficiencias. También se ha observado esta pérdida de funcionamiento en otros semiconductores a escalas moleculares. Sin embargo, los NTC debido a sus efectos cuánticos en la escala nanométrica permite el desarrollo de un dispositivo electrónico particular por la modificación de sus propiedades mecánicas y térmicas.

Figura 8. Tabla periódica de los nanotubos que permite determinar las propiedades electrónicas de los NTC.



Fuente. BUGALLO, Andres 2008 [27]

Los circuitos electrónicos que integran NTC garantizan mayor vida útil debido a una mayor resistencia mecánica, dureza, tenacidad, flexibilidad, elasticidad, alta conductividad del calor y estabilidad estructural a altas temperaturas. Sin embargo, para la producción de estos dispositivos a nivel industrial, es necesario realizar un avance en los métodos de crecimiento de los NTC sobre diferentes superficies, teniendo en cuenta el control del tamaño, la orientación y la forma.

3.2.5.2 Aplicaciones en Química.

Los NTC tienen una amplia aplicación en el área de la biotecnología y química, por las siguientes características:

3.2.5.2.1 Adsorción y absorción.

Los NTC poseen gran área superficial, aptos para filtrar sustancias líquidas y gaseosas, por su capacidad de adsorción. Su uso en aplicaciones medioambientales como filtros de aguas residuales o filtros de aire se ha propuesto [28].

La absorción de los NTC de diferentes compuestos o elementos ha permitido realizar reacciones químicas en su interior entre la sustancia absorbida y la que se encuentra dentro del NTC. Un ejemplo de esta interacción en el NTC es la reacción entre el galio (absorbido previamente) con vapores de cobre depositándose en el interior del NTC la aleación CuGa. Adicionalmente se tiene conocimiento que el galio tiende a formar aleaciones con metales como el mercurio y uranio, lo que permitiría su uso en la eliminación de sustancias radiactivas y tóxicas. [29]

3.2.5.2.2 Aplicaciones en Sensores Químicos.

Los sensores químicos se caracterizan por una selectividad, sensibilidad, tiempo de respuesta, tiempo de recuperación y saturación entre otras [30], que permite la detección selectiva de diferentes sustancias en un ambiente particular. Los sensores que involucran NTC basan su funcionamiento en el cambio de las propiedades eléctricas de estos, particularmente de la resistencia y su capacitancia. El mecanismo para detectar ciertas sustancias está basado en la modificación de la resistencia de los NTC de acuerdo con el número de cargas libres presentes en su interior, que a su vez se altera por la modificación de las fuerzas electrostáticas por las sustancias que interacciona el NTC. [31]

Unas de las ventajas de sensores químicos que involucran NTC son su rapidez de detección, su sensibilidad a temperatura ambiente y su tamaño pequeño, lo cual los hace aptos para ser usados en controles medioambientales.

3.2.4.5.3 Aplicaciones en Catálisis.

Los NTC pueden actuar directamente como catalizadores [32], debido a su funcionalización, o bien pueden hacerlo como soporte de catalizadores, debido a sus propiedades térmicas, su alta resistencia mecánica, su estructura porosa que permite que las reacciones ocurran en su interior y/o en la superficie.[33]

3.3 ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico (del latín folium “hoja”) se aisló a partir de las hojas de espinaca en el año de 1941 en la india, y se denominó factor de Wills. La molécula consta de tres componentes principales: ácido p-aminobenzoico, ácido glutámico y un derivado de la pteridina, ver figura 9. Se le conoce comúnmente como vitamina D y es un agente hematopoyético importante para regenerar, y permitir el correcto funcionamiento de elementos formadores de la sangre.

Su forma aniónica se conoce como folato y participa en reacciones de transferencia de átomo de carbono conocido como metilación, síntesis de ADN y juega un papel importante dentro de la división celular. Es sintetizado solamente por las bacterias y las plantas, lo que hace que el hombre requiera de una dieta para cubrir sus necesidades diarias

3.3.1 Estructura del Ácido Fólico

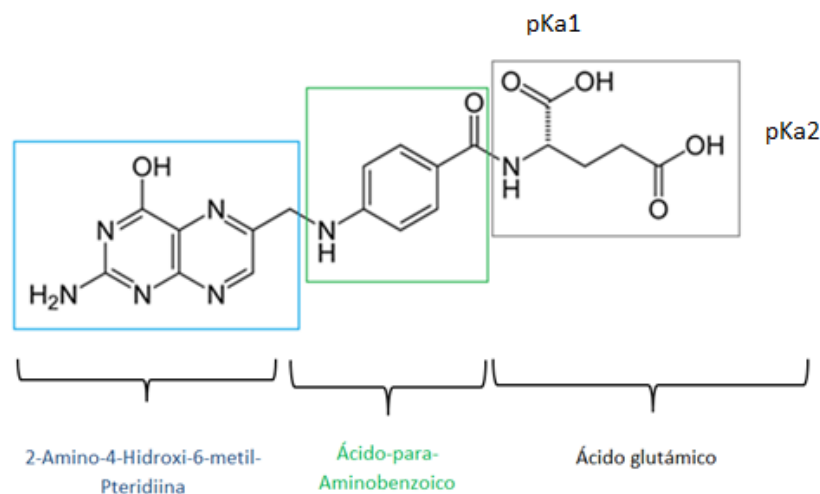
El Ácido fólico se puede considerar como una pterina, que consta de un doble anillo pterínico con un sustituyente en la posición 6. En este sustituyente se reconocen dos grupos funcionales: el ácido p-aminobenzoico y el ácido glutámico, un aminoácido natural, unidos entre sí mediante un enlace peptídico, donde el ácido p-aminobenzoico aporta el grupo carboxílico y el ácido glutámico el grupo amino (Figura 9).

El AF posee dos grupos carboxílicos en su porción de ácido glutámico. De acuerdo a los pKa que presentan en la molécula del aminoácido libre (pKa1=2,19; pKa2=4,25; Lehninger, 1985), estos grupos se encuentran ionizados en soluciones ligeramente ácidas, neutras o alcalinas. En estas condiciones, estas dos cargas adicionales, le confieren al ácido fólico una solubilidad muy alta en comparación con otras pterinas. Sin embargo, al disminuir el pH de las soluciones la solubilidad disminuye drásticamente. Este efecto se atribuye a la protonación de los grupos carboxilos, lo cual reduce la repulsión electrostática entre las moléculas de ácido fólico.

La molécula de AF tiene un grupo amino terminal el cual tiene su par electrónico comprometido en la aromaticidad de la pterina, por lo que el ataque nucleofílico es difícil, por no decir que imposible. Por lo tanto la funcionalización se hace viable mediante un ataque nucleofílico a uno de los ácidos carboxílicos presentes en la molécula. El ataque se da mayoritariamente sobre el ácido que tiene un menor pKa debido a que el medio en el que se llevó a cabo la reacción fue un medio ácido lo que

implica que el grupo carboxílico se encuentre protonado y con una mayor reactividad, además este grupo carboxílico se encuentra menos impedido estéricamente y menos comprometido en la molécula.

Figura 9. Estructura del Ácido Fólico



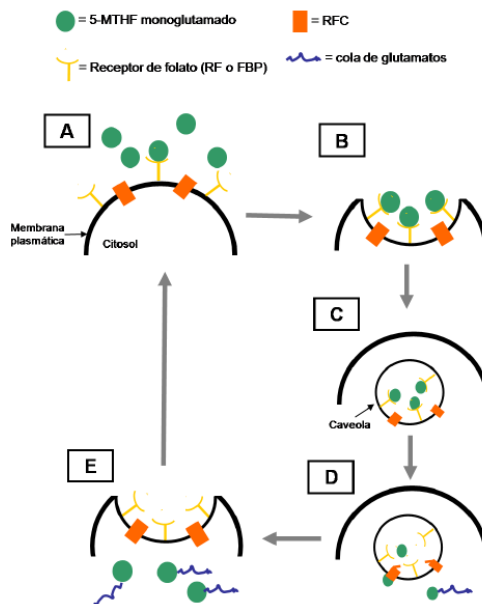
Graficado en ACD/ChemSkeetch version 11.0

3.3.2 Receptores de Folato

Los receptores de folato se expresan en varias células y su función principal es internalizar el folato o ácido fólico en la célula. Para lograr su internalización existen dos sistemas: el portador de folato reducido, el cual es empleado como sistema de mecanismo de intercambio aniónico bidireccional, y el sistema de receptor de folato. Existen tres tipos de receptores de folato α , β , γ ; el receptor de folato α puede estar presente en algunas células cancerígenas como las HELA y así como también se ha observado en algunas células que contienen el parásito de la Leishmania (Turk y col., 2002).

El receptor de folato alfa ($RF\alpha$), transporta el folato al interior de la célula por medio del mecanismo de la potocitosis, es un transportador de alta afinidad y trabaja cuando las concentraciones en la sangre son muy bajas, protegiendo a los órganos donde se expresa deficiencia de folato y se encuentran en las células de la retina y túbulo renal. En el proceso de la potocitosis los RF en humanos y FBP en roedores, se ubican en la membrana plasmática de las células junto con el RFC, que debido a la afinidad al THF o en forma de monoglutamato sufren invaginaciones, dando lugar a la formación de las caveolas para permitir que el folato se desprenda de su receptor y sea transportado hasta el citosol por el RFC. Posteriormente el folato en el citosol se convierte en poliglutamato para ser retenido en el citoplasma y volver a formar la parte de la membrana plasmática (ver figura 10).[34]

Figura 10. Esquema del proceso de potocitosis (receptores de folato)



Fuente: MALDONADO, Estela 2012 [35]

La funcionalización de los NTC con moléculas como el ácido fólico (AF), tema de investigación del presente trabajo de grado, ha permitido estudiar aplicaciones novedosas en el campo de la medicina, debido a que la biomolécula de ácido fólico es reconocida por receptores de folato que son sobre expresados por células cancerígenas (Turk y col., 2002). La preparación de nanomateriales con AF ha permitido diseñar compuestos híbridos que permiten la detección selectiva y el desarrollo de terapias térmicas para generar la muerte de las células enfermas que previamente han internalizado los NTC y en presencia de la radiación generan un calentamiento local.

3.4 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE NTC

Para identificar la funcionalización covalente de NTC de Pared Simple se han propuesto diversas técnicas de caracterización que han evidenciado el anclaje de los NTC con diferentes moléculas [36]. Se ha indicado el uso de las siguientes técnicas para la caracterización de los NTC funcionalizados: La presencia y confirmación de los precursores en los NTC funcionalizados se caracterizan por medio de la Espectroscopia infrarroja acoplada con Reflectancia Total Atenuada, observándose las bandas de estiramiento características del N-H en 3414 y 3478 cm^{-1} en la funcionalización de un complejo de NTC- Zn [37]. Difusión de luz Dinámica (DLS) utilizada en la determinación del tamaño de nanopartículas de oro funcionalizadas con ácido fólico, obteniendo como resultado un diámetro promedio de 27.9 ± 9.1 nm (Shiao-Wen Tsai, Jiunn-Woei Liaw y colaboradores).

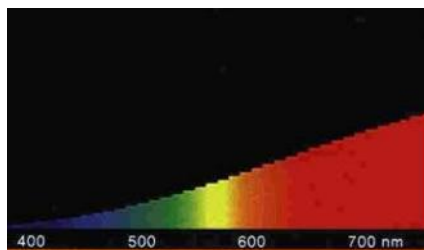
Ademas las técnicas de espectroscopia de ultravioleta y fluorescencia proporcionan información sobre el tipo de interacciones entre el NTC y los grupos funcionales, a incorporar diferentes grupos funcionales, un ejemplo específico es el pireno, el cual puede sufrir fenómenos de agregación que se manifiestan por emisiones características del excímero. Estas propiedades permiten que el pireno sea capaz de generar estados

excitados tripletes y fácilmente detectables; por lo tanto el pireno funcionalizado con NTC se puede caracterizar por espectroscopia ultravioleta, debido a que puede generar una transferencia electrónica por pérdida o ganancia de un electrón a partir del núcleo de pireno.[38]

3.5 DISTRIBUCIÓN ESPECTRAL DE LÁMPARAS INCANDESCENTES

Todos los cuerpos pueden emitir energía en forma de radiación electromagnética y al producirse un aumento en la temperatura, mayor es la energía emitida conocido como incandescencia. Las lámparas de filamentos se basan en este tipo de calentamiento para generar luz; en donde una corriente eléctrica pasa a través de un fino hilo de tungsteno, en el cual la temperatura puede elevarse hasta alcanzar de 2500 a 3200 K. Sin embargo existe un límite que se basa en la ley de Planck para el comportamiento de un radiador de cuerpo negro, con la cual, la distribución espectral de la energía aumenta a medida que aumenta la temperatura se produce aumento en la emisión de la radiación visible y la longitud de onda de la máxima energía se desplaza hacia la banda visible. Como consecuencia de estos desplazamientos espectrales se genera que la radiación desprendida no se emita en forma de luz sino en forma de calor en la región infrarroja. [39]

Figura 11. Distribución espectral de lámparas incandescentes



Fuente HUSSAIN, S y col 2011 [40]

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

Los NTC y NTC-COOH, se adquirieron comercialmente de Sigma Aldrich.

4.1 DISPERSIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SIMPLE (NTC)

En un tubo de Falcon se adicionaron 5 mg de NTC-COOH en 15 mL de acetonitrilo y se sonicaron durante 20 min a temperatura ambiente, en un Ultrasonic processor de Cole Parmer Instruments, modelo cpx 130 PB. Este procedimiento se repitió modificando el disolvente (DMF, Agua y Acetonitrilo). Además para cada funcionalización obtenida (NTC-EDA y NTC-AF) se realizó una dispersión en cada uno de los disolventes mencionados anteriormente.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NTC-COOH CON ÁCIDO FÓLICO.

4.2.1 Funcionalización covalente de NTC-COOH con Etilendiamina.

En un vaso de precipitado se mezclaron 20 mg de NTC-COOH y una solución acuosa de EDA. La Solución de EDA se preparó previamente, tomando 1.3 mL de EDA (1M) y aforando a 20 mL (pH 4.75) y 2 mg de EDAC (10mM), en un baño de hielo con agitación constante durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 14000 rpm, extrayendo el sobrenadante, lavando con agua destilada para eliminar el exceso de EDA que no reaccionó y finalmente el sólido obtenido se secó a temperatura ambiente.

4.2.2 Funcionalización covalente de NTC-EDA con Ácido Fólico.

En un vaso de precipitado se preparó una solución de AF (10 mg) en 22 mL de buffer fosfato (25 Mm; pH 4.75). Luego se adicionaron 42 mg (10 mM) de EDAC y 10 mg de

NTC-EDA, con agitación durante 1 hora. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 14000 rpm, extrayendo el sobrenadante y lavando con agua para eliminar el exceso de AF que no reaccionó. El sólido obtenido se secó a temperatura ambiente, figura 12.

Figura 12. Montaje experimental de la funcionalización covalente de NTC-EDA y NTC-AF.



4.3 CARACTERIZACIÓN DE NTC-AF

Las muestras de NTC funcionalizadas se caracterizaron por medio de diferentes técnicas instrumentales haciendo los respectivos tratamientos a las señales obtenidas, con el fin de verificar la funcionalización covalente de NTC-AF y su intermediario

4.3.1 Caracterización por Espectroscopía (IR/ATR)

Se tomaron pequeñas cantidades de NTC-COOH, NTC-EDA y NTC-AF (muestras sólidas) y se colocaron en el prisma del equipo de infrarrojo Bruker Tensor 27. Las condiciones del método de tratamiento de las muestras fue de: 32 scans, resolución 2.0, % de transmitancia y la región establecida se encontraba en el rango de 4000 cm^{-1}

- 400 cm^{-1} . Los espectros obtenidos fueron graficados utilizando el software OriginLab versión 8.0.

4.3.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

Para identificar el tamaño de partículas de los NTC se adicionaron 2 mL de los sobrenadantes obtenidos, después del lavado de cada funcionalización, en una celda de cuarzo. Posteriormente la celda se introdujo en el equipo de DLS (NanoZS90) y se emplearon las siguientes condiciones: solvente=agua, índice de refracción 1.330 y tiempo de estabilización de la muestra 60 s y una temperatura de 25°C. Las señales obtenidas fueron graficadas utilizando el software OriginLab versión 8.0.

4.3.3 Caracterización por Espectroscopía (UV-VIS)

Para evaluar las transiciones electrónicas de las muestras obtenidas y el máximo de absorción de estas, se caracterizó por Espectroscopía de Ultravioleta Visible utilizando un espectrofotómetro UV-VIS PC 2401 en un rango de 200 a 800 nm y se evaluaron dos tipos de soluciones: En la primera solución se tomaron las muestras sólidas obtenidas de la funcionalización de los CNT y se dispersaron en acetonitrilo y la segunda solución se tomó el precursor EDA y se solubilizo en agua. Los espectros obtenidos se graficaron con el software de gráficas y tratamiento de datos OriginLab versión 8.0.

4.3.4 Caracterización por Espectroscopía de Fluorescencia

Para evaluar la fluorescencia se utilizó un fluorímetro PTI, excitando el AF y el NTC-AF dispersos en acetonitrilo para la banda de máxima absorción del precursor Ácido Fólico, para NTC-EDA y EDA dispersos en agua excitando a la banda máxima de la EDA; tomando como referencia la máxima absorción espectros obtenidos mediante la técnica

de UV-Vis. Los espectros obtenidos fueron graficados utilizando el software OriginLab versión 8.0.

4.4 Funcionalización no covalente de NTC-AF

4.4.1 Solución de 100ppm.

En un recipiente de vidrio se colocaron cinco miligramos de NTC y se adicionaron a una solución pH 7 de AF (50 mL). La solución de AF se preparó pesando 13 mg de AF y adicionando unas gotas de NaOH diluida para solubilizar el AF y se llevó a 50 mL de volumen con agua mineral. La mezcla NTC-AF fue agitada durante 10 minutos y posteriormente fue sonicada durante 20 minutos en la que se obtuvo la funcionalización deseada.

4.4.2 Solución de 1000 ppm.

En un recipiente de vidrio de se colocaron cincuenta miligramos de NTC y se adicionaron a una solución pH 7 de AF (50 mL). La solución de AF se preparó pesando 13 mg de AF y adicionando unas gotas de NaOH diluido. Para solubilizar el AF (pH 7) y se aforó con agua mineral a 50 mL de volumen. La mezcla NTC-AF fue agitada durante 10 minutos y posteriormente fue sonicada durante 20 minutos en la que se obtuvo la funcionalización deseada.

4.5 APLICACIÓN PRELIMINAR DE LA FUNCIONALIZACIÓN NO COVALENTE NTC-AF

Control de la actividad larvicida

Se realizó un ensayo de aplicabilidad del efecto térmico de los NTC funcionalizados con AF en larvas de la familia de Aedes Aegypti y se midió la actividad larvica en el estado 3 y 4 de 10 larvas por recipiente, utilizando como fuente de alimentación una funcionalización no covalente de NTC-AF, en concentraciones de 100ppm y 1000ppm preparadas como se indica en la sección 4.4.1 y 4.4.2.

Para llevar a cabo el experimento se utilizó una bombilla de 40 watts de potencia a una altura de 20cm que garantizo una temperatura no mayor a los 35°C para que no se afectaran directamente las larvas estudiadas. Su utilizo un sistema cerrado para garantizar una temperatura constante durante el tiempo del experimento (ver figura 21). Para evidenciar la actividad larvica de los NTC-AF se usaron tres réplicas de una solución de NTC-AF con una concentración de 100ppm y tres réplicas con una concentración de 1000ppm. Se realizaron dos controles para cada concentración uno con AF y otro con NTC. Se midió la tasa de mortalidad de las larvas a 24 y 48 horas, luego de ser expuestas a los NTC-AF y de sus respectivos controles, de igual manera se llevó a cabo un control de la temperatura de cada recipiente.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

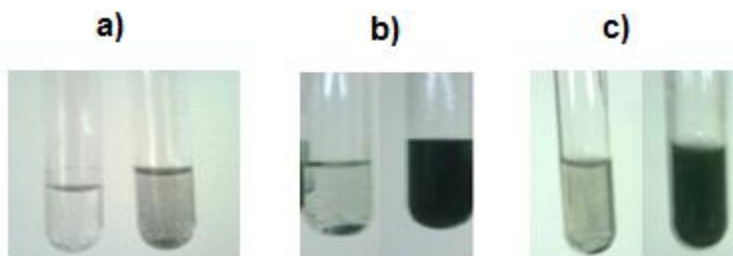
5.1 DISPERSIÓN DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED SIMPLE

El NTC-COOH y los sólidos obtenidos (NTC-EDA y NTC-AF) de la funcionalización covalente realizada se dispersaron en agua, DMF y Acetonitrilo para identificar el disolvente adecuado para llevar a cabo la caracterización por UV-VIS y Fluorescencia.

Los resultados obtenidos se observan en la figura 13, en donde se evidencia que los nanotubos carboxilados y los funcionalizados experimentalmente tienen muy poca dispersión con el agua, sin embargo en solventes orgánicos se observó una dispersión estable de los nanotubos. El disolvente escogido para realizar la respectiva

caracterización fue el acetonitrilo (reportado en la tesis doctoral de Pedro Atienzar 2007).

Figura 13. Imagen Dispersiones NTC-COOH en: a) Agua, b) DMF y c) Acetonitrilo



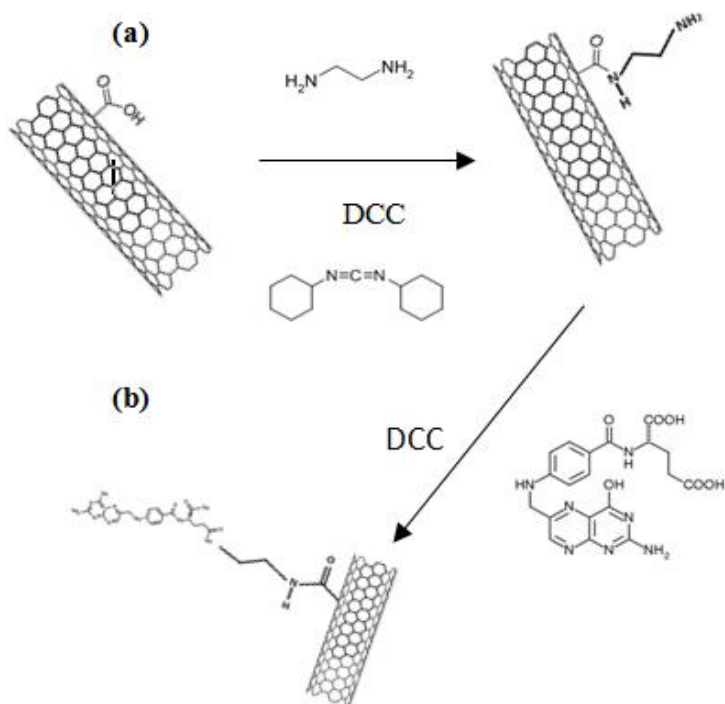
5.2 ESTUDIO DE LA FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE DE NTC-AF

5.2.1 Análisis de la funcionalización covalente de NTC-EDA y NTC-AF

La funcionalización covalente de NTC-EDA y NTC-AF se basó en un método desarrollado para la aminación de la lipasa B de la *Candida antarctica* [41], usando EDAC, como agente activante de los grupos carboxílicos presentes en la superficie de los NTC-COOH, permite el ataque nucleófilico de uno de los grupos amino de la EDA, formando un enlace amida y dejando libre un grupo amino primario para que actúe como nucleófilo y se facilite el ataque a uno de los grupos carbonilo del AF activados con EDAC, permitiendo así la funcionalización covalente del NTC[42], ver Fig. 14.

El anclaje del Ácido Fólico sobre el NTC-COOH no se realizó directamente por el grupo amino presente en el ácido, debido a que este grupo tiene su par electrónico comprometido en la aromaticidad de la pterina, haciéndolo menos reactivo y dificultando el ataque nucleófilico por parte de este grupo.

Figura 14. Esquema de: Funcionalización covalente (a) Intermediario NTC-EDA y (b) Producto final NTC-AF.



5.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN COVALENTE

5.1.1 Análisis Caracterización NTC por Espectroscopía (IR/ATR)

Los Nanotubos de Carbono de Pared Simple utilizados en la funcionalización covalente se caracterizaron por IR/ATR (Figura 15), en el cual se observan algunas bandas que presentan los compuestos con naturaleza aromática y las interacciones del C-C, C-H propias de los nanotubos (ver tabla 1).

Figura 15. Espectros IR del NTC

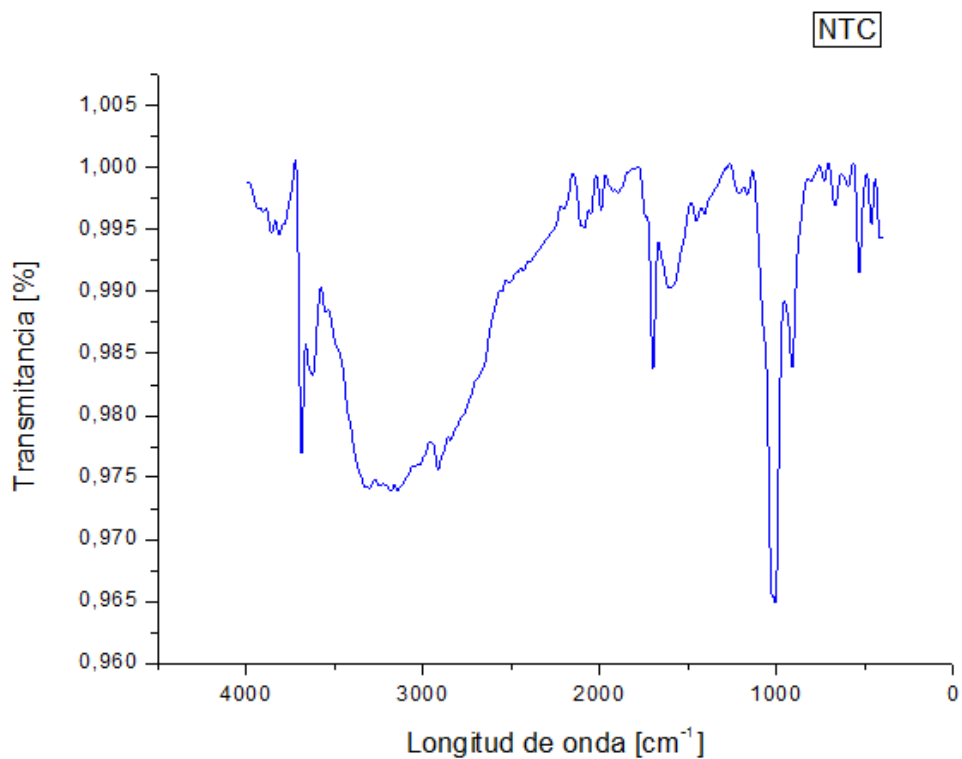
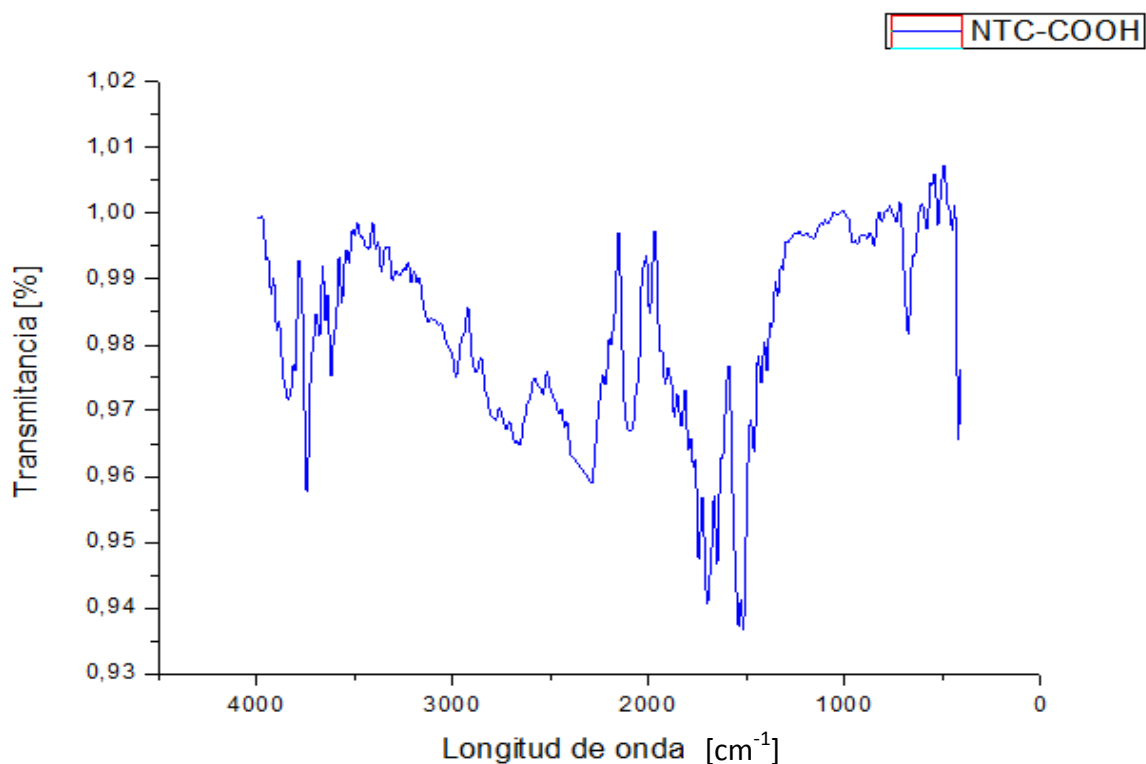


Tabla N°1. Bandas características del espectro IR del NTC

Banda	Región [cm ⁻¹]
Estiramiento del C-H	3859,33
Estiramiento del C-H	2981,80
Estiramiento del C-C	1519,61
Simétrica del CH ₂	1001,00
Flexión fuera del plano compuestos aromaticos	935,43 y 553,54

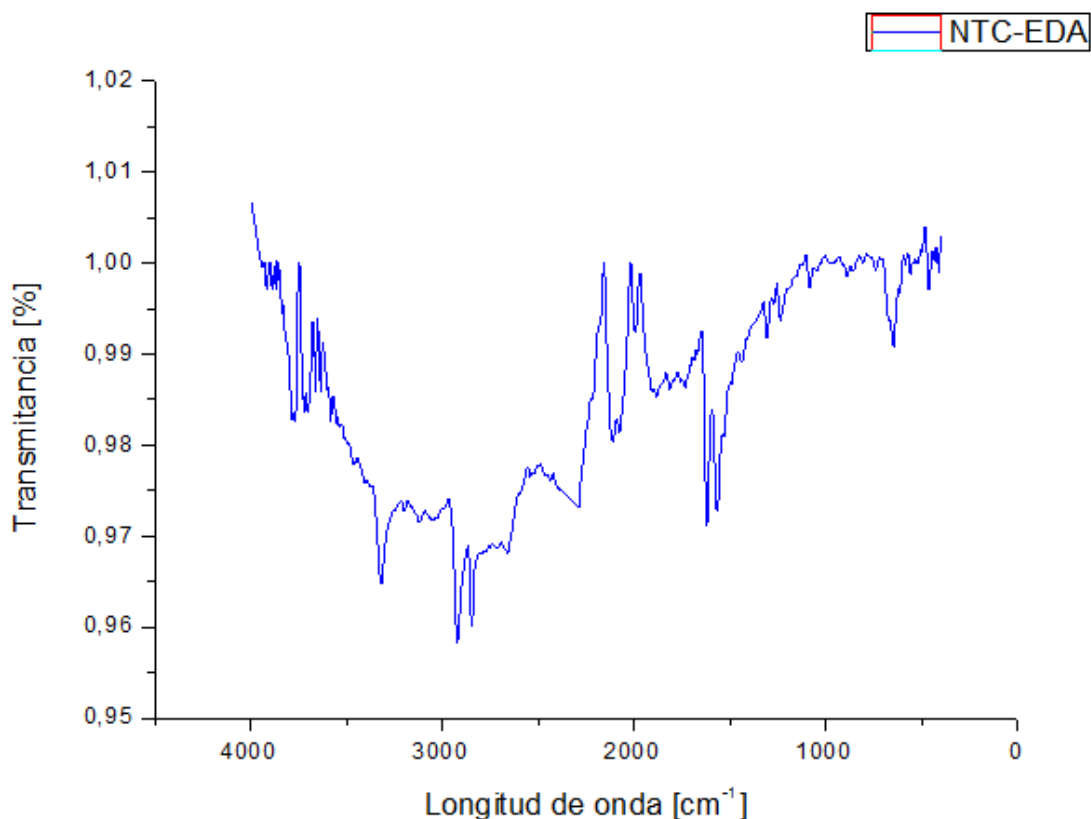
Figura 16. Espectro IR del NTC-COOH



En la figura 16 se observa el espectro IR del NTC-COOH, se observa la presencia del grupo COOH presente en el NTC, mediante la banda de estiramiento del OH libre en 3678.69 cm^{-1} , la banda en el plano del C-O-H en 1426.27 cm^{-1} , la banda de flexión del OH en 1396.42 cm^{-1} y la banda característica del C=O en 1700.20 cm^{-1} .

Además, se confirmó la presencia del NTC, que debido a su Naturaleza aromática presenta ciertas bandas características: la banda de sobretono de los compuestos aromáticos en 2097.99 cm^{-1} , el estiramiento del CH en la región en 2981.09 cm^{-1} y la banda fuera del plano de los compuestos aromáticos sustituidos en 420.04 cm^{-1} . Hacia longitudes de ondas altas se evidencia la banda de los grupos OH libres en 3838 cm^{-1} .

Figura 17. Espectro IR del NTC-EDA

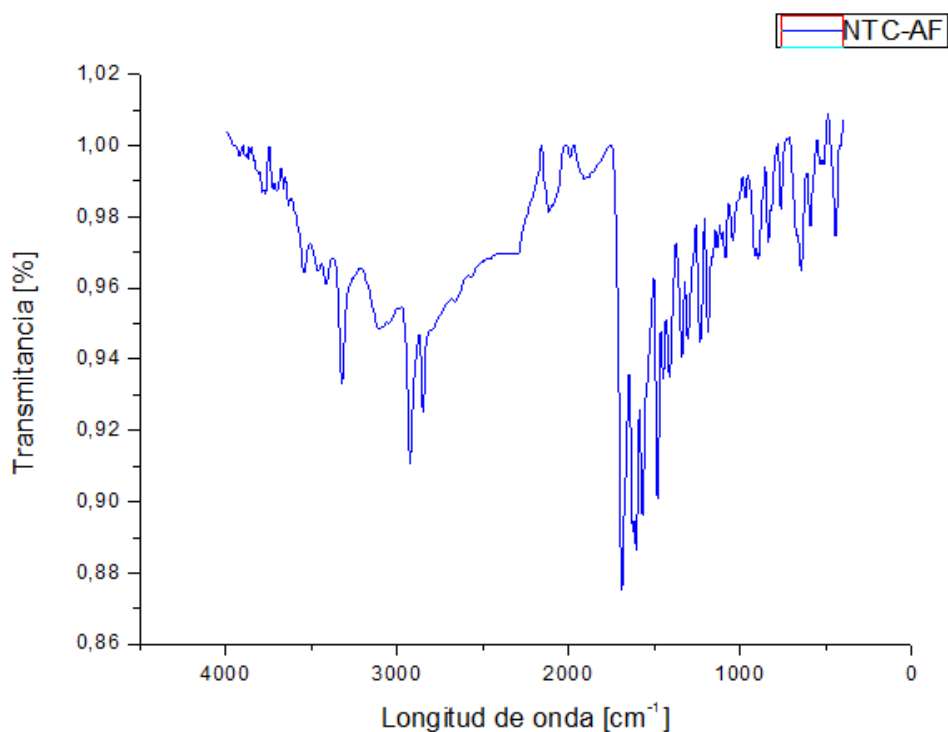


En la figura 17 se confirma la funcionalización del intermediario NTC-EDA, donde se observa la banda de tensión del N-H de una amida secundaria en 3321.00 cm^{-1} , además se observan las bandas de estiramiento del C-H en aminas alifáticas, la banda I de la amida del C=O en 1620.16 cm^{-1} y la banda II de la amida en 1568.39 cm^{-1} y se corrobora la presencia del grupo etilo de la amina por la presencia de las bandas asociadas al estiramiento del grupo CH_2 en 2921.17 cm^{-1} y 2846.34 cm^{-1} . También se confirma el enlace carbono-nitrógeno en la banda de estiramiento del CN en 1083.20 cm^{-1} y 1236.06 cm^{-1} , una banda débil resultado de la interacción entre la flexión del N-H y tensión de alargamiento del C-H. La banda fuera del plano del N-H se observa en la

región de 645.80 cm^{-1} y se conservan las bandas características de los nanotubos de carbono.

En el caso de la funcionalización covalente NTC-AF se evidencia en la figura 18 la presencia del Ácido Fólico por medio de las siguientes bandas: En 3320 cm^{-1} tensión del N-H, 1688.79 cm^{-1} la banda de estiramiento del C=O presente en el Ácido Fólico, una doble absorción del benceno conjugado en 1612.03 cm^{-1} , en 1570.34 cm^{-1} la banda II de la amida, las bandas simétricas y asimétricas del COO- en 1339.66 cm^{-1} y 1411.59 cm^{-1} y en 1481.70 cm^{-1} banda característica del hetero-anillo conjugado de doble enlace. Y se evidencian algunas bandas características del producto intermedio NTC-EDA y la presencia de los nanotubos de carbono con la aparición de dos bandas características del estiramiento del C-H en aminas alifáticas en 2923.82 cm^{-1} y 2848.36 cm^{-1} , se intensifica la banda de tensión del N-H en 3413.55 cm^{-1} y aparecen las bandas por encima de 3600 cm^{-1} del estiramiento C-H de los nanotubos de carbono.

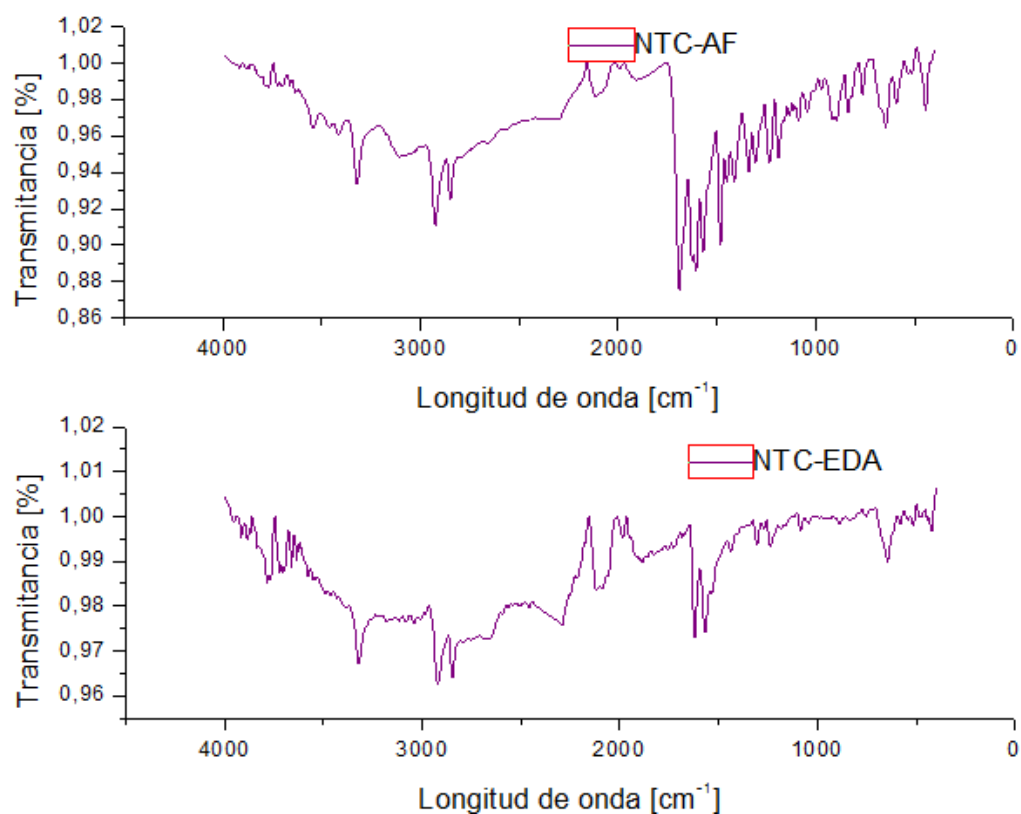
Figura 18. Espectro IR del NTC-AF



En los anexos 1 y 2 se muestran los espectros I.R de los precursores: etilendiamina y ácido fólico, al realizar una comparación de sus bandas entre ellos y los espectros de la figura 17 y 18 se puede identificar la presencia de estos precursores en los NTC y evidenciar el anclaje covalente mediante la identificación de las vibraciones características de los grupos funcionales incorporados.

Ademas la funcionalización covalente de NTC-EDA y NTC-AF, se pudo reproducir y caracterizar por IR/ATR, obteniendo los espectros que se observan en la figura 19 evidenciando el anclaje del nanotubo con las moléculas de interés.

Figura 19. Espectros IR de la reproducibilidad experimental del intermediario NTC-EDA y producto Final NTC-AF



5.1.2 Estudio de la distribución del tamaño de partícula

En la determinación del tamaño de las partículas mediante el equipo Nano ZS90, se puede observar diferencias de los tamaños medidos para precursores, intermediarios y productos al realizar su cálculo mediante el software zetasizer series v.6.20, ver figura 20.

En cada una de las gráficas se observa una concordancia de los valores de tamaño de a, b y c en función de la intensidad, observándose que la mayor cantidad de partículas presentan un tamaño alrededor de los 100nm. Sin embargo, cabe resaltar como se muestra en la tabla 2, que los valores de tamaño promedio medidos evidencian un aumento a medida que se adicionan los grupos en el NTC, resaltando un mayor tamaño promedio para la partícula de NTC-AF. Esto podría ser explicado teniendo en cuenta que el tamaño de la molécula AF es mayor con respecto a la de EDA ó el grupo COOH que se encuentran unidos de manera covalente a los NTC.

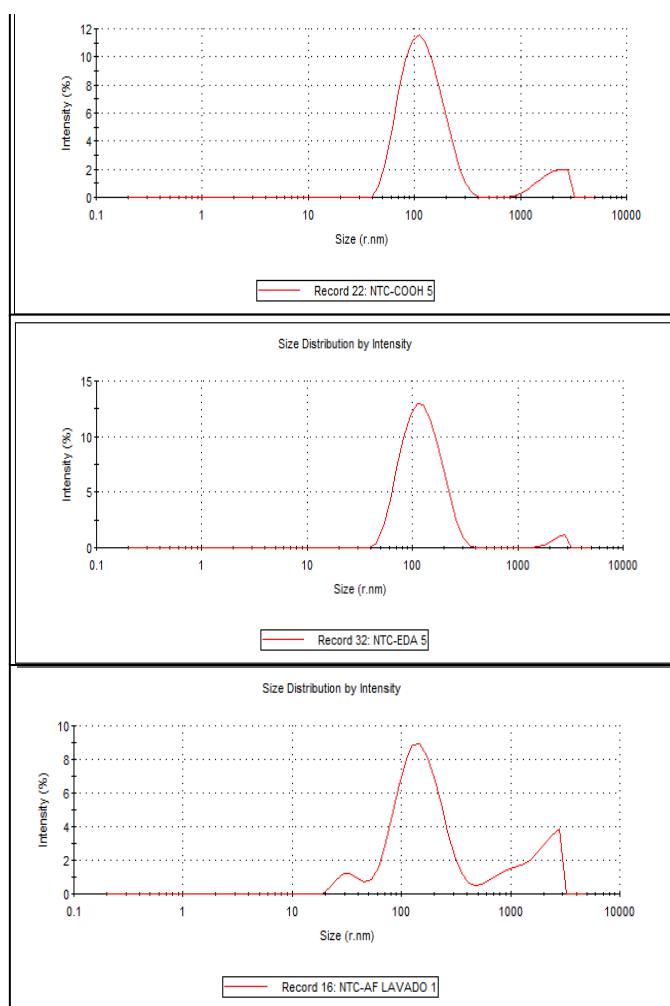
Teniendo en cuenta que la técnica de DLS supone que las partículas presentan una forma de esfera, se puede asumir que el valor del diámetro indicado en el cálculo como tamaño promedio de la esfera, en este caso corresponde a la longitud del NTC. Cabe resaltar que en la figura 20, se observan picos secundarios de menor intensidad y proporción, que están asociados a la presencia de dos o tres poblaciones de partículas en la muestra.

En la tabla 2. Se observa a su vez los índices de polidispersión (PDI), los cuales están asociados al tipo de dispersión de cada partícula; en este caso al estar cercanos a 0.1 se puede decir que son partículas monodispersas.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la caracterización del tamaño de partícula por DLS

Muestra	Tamaño promedio (nm)	PDI
NTC-COOH	120.8	0.318
NTC-EDA	122.0	0.255
NTC-AF	162.5	0.591

Figura 20. a) distribución de tamaño NTC-COOH b) distribución de tamaño NTC-EDA, c) Distribución de tamaño NTC-AF.



5.1.3 Análisis Caracterización NTC por Espectroscopía (UV-VIS)

En el análisis por espectroscopía ultravioleta visible, se utilizó como solvente el acetonitrilo. Sin embargo, en el caso del precursor de la etilendiamina fue necesario solubilizar en agua, ya que este precursor presentaba insolubilidad en acetonitrilo. En la figura (21 a) se muestran los espectros UV-VIS de los precursores, la etilendiamina presenta una banda de máxima absorción en 275 nm, característica de los pares electrónicos de los átomos dadores del nitrógeno y una transición $n-\sigma^*$ propia de los compuestos que contienen heteroátomos.

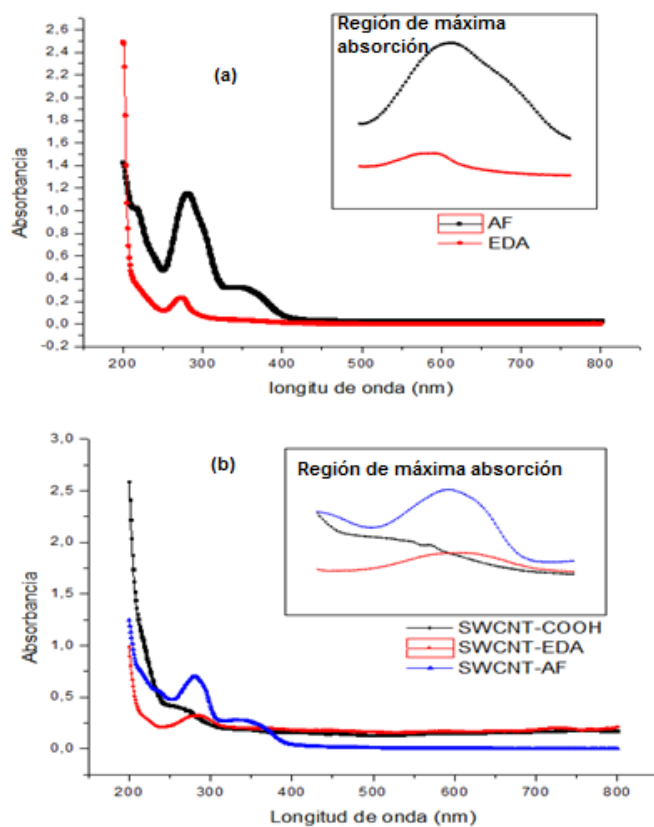
En el caso del Ácido Fólico se observa dos bandas de absorción en 281 nm y 345 nm respectivamente, la primera banda de absorción se debe a las transición $n-\pi^*$ propia del carbonilo (C=O) presentes en la molécula del Ácido Fólico. La banda de absorción de 345 nm se debe al efecto batocromico de los compuestos aromáticos disustituidos con transiciones electrónicas $n-\pi^*$ y $\pi-\pi^*$.

El espectro correspondiente al NTC-COOH, en color negro de la figura 16b, se evidencian algunas señales muy débiles en el rango de 500nm a 800 nm indicadas en la tabla 2. En el caso de los NTC se ha indicado que en esa región se observan las transiciones pertenecientes a las singularidades de Van Hove (750 nm) E_{11} (Ahmad y col., 2009). Además se observa en los espectros NTC-EDA (rojo) y NTC-AF (azul), las bandas de absorción de sus precursores y algunas señales débiles características de las singulares de Van Hove propias de los nanotubos. Sin embargo en los espectros del NTC-EDA y NTC-AF se evidencian pequeños corrimientos en comparación con las bandas observadas en los precursores debido a la presencia del grupo carbonilo del NTC.

Tabla 3. Bandas de Absorción de ultravioleta visible del NTC-COOH

N°	λ [nm]	ABSORBANCIA
1	784	0.433
2	678	0.428
3	656	0.428
4	554	0.422
5	508	0.420

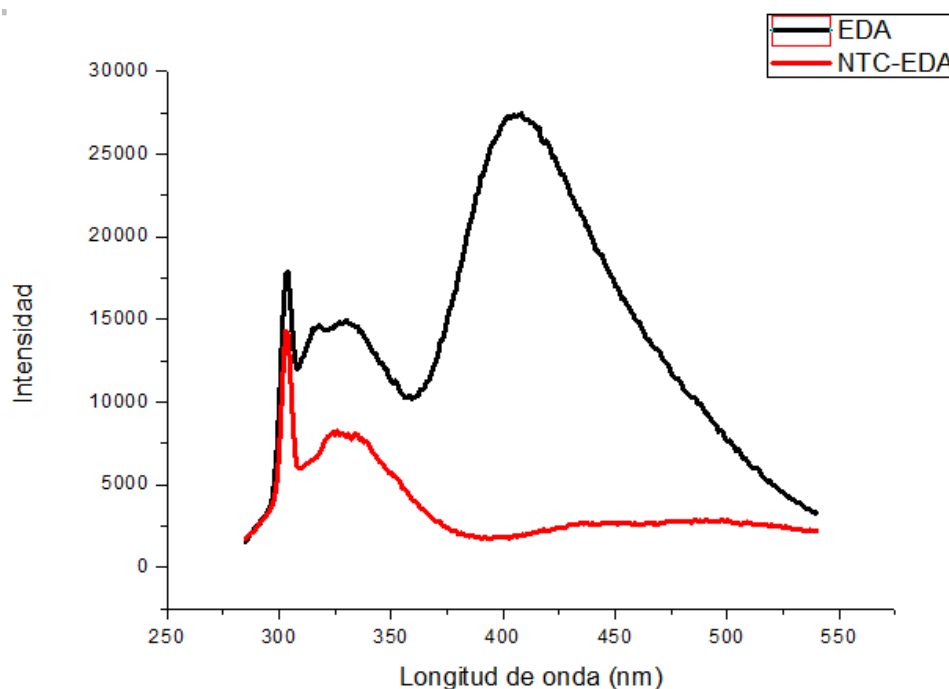
Figura 21. Espectros UV-VIS a) precursores EDA (disuelto en agua) y AF (disuelto en acetonitrilo) b) Intermediarios y productos de NTC dispersos en acetonitrilo.



5.1.4 Análisis Caracterización NTC por Espectroscopía de Fluorescencia

Para el análisis de fluorescencia del EDA y NTC-EDA se dispersaron en agua debido a la insolubilidad del precursor en acetonitrilo. En la figura 22 se indican los espectros de fluorescencia observándose una banda máxima de absorción en 275 nm para el NTPS-EDA; en el caso de la etilendiamina su máximo de absorbancia esta en el rango de 300 a 310 nm, debido a la insaturación del grupo carbonilo (C=O) y formación del grupo amida. Sin embargo, en el rango espectral 360-550 nm se observa un efecto de apagamiento de la fluorescencia, quizás generada por los NTC, ya que estos compuestos pueden ser considerados como agentes desactivadores de la fluorescencia, causados por la transferencia de energía, la formación de complejos y por colisiones moleculares[43].

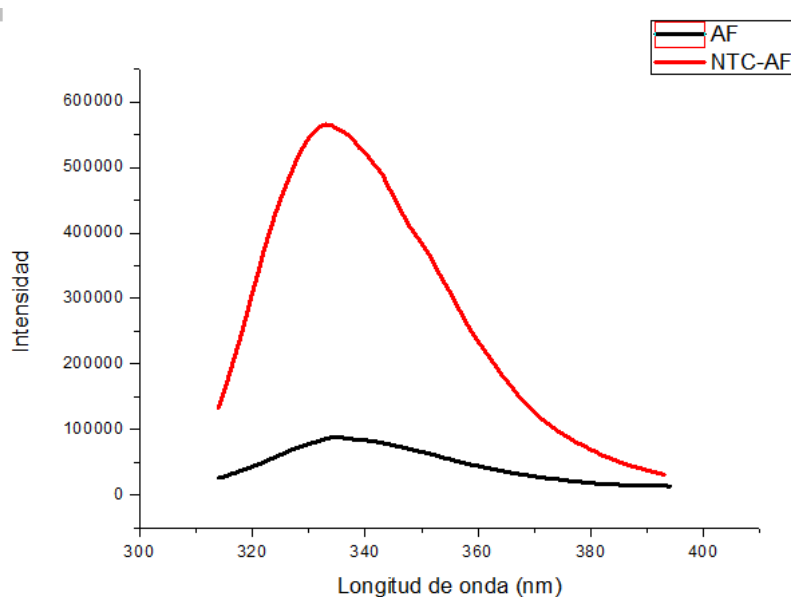
Figura 22. Espectros de Fluorescencia de la etilendiamina y el NTC-EDA dispersos en agua.



Sin embargo, al analizar la fluorescencia de NTC-AF a una longitud de onda de excitación de 281 nm, se observó un aumento en la fluorescencia en comparación con el precursor AF, efecto contrario a lo observado con el intermediario (NTC-EDA). Este efecto se puede asociar a que el NTC-AF funcionalizado de forma covalente presenta dos grupos carbonilo aumentando la fluorescencia del nanotubo. Además el efecto de apagamiento de los NTC reportados en la literatura, no se evidenció en el NTC-AF debido a que el ácido fólico no estaba anclado directamente al NTC (ver figura 23).

El efecto de apagamiento de la fluorescencia en los NTC no se observó en este caso al realizar una funcionalización covalente con ácido fólico, debido que el mecanismo de desactivación de la energía colisional o transferencia Dexter [44], es un fenómeno de corto alcance que disminuye con la distancia en relación $e^{-R(\lambda)}$ y depende del solapamiento espacial entre los orbitales moleculares de las dos especies (NTC y AF).

Figura 23. Espectros de Fluorescencia del Ácido Fólico y el NTC-AF dispersos en acetonitrilo.



Por lo tanto el aumento de la intensidad de la fluorescencia de la funcionalización covalente del NTC-AF, se pudo evidenciar indirectamente por medio de la espectroscopia de fluorescencia.

5.2 EVALUCION DEL EFECTO TÉRMICO DEL NTC-AF

Para medir el efecto de la radiación infrarroja sobre los NTC-AF funcionalizados de forma covalente y no covalente se utilizó una bombilla incandescente de 60 vatios. Este tipo de lámparas emite alrededor del 75% radiación infrarroja, un 15% luz visible y el 10% radiación ultravioleta.

Se evaluó el efecto térmico generado por una solución que contiene los NTC funcionalizados después de irradiarse con una lámpara incandescente. Se tomó como control 50 mL de agua mineral sin NTC. Se evaluaron tanto la potencia de la lámpara, la altura de la misma con respecto a la solución irradiada así como el tiempo de irradiación en un sistema cerrado. Las dispersiones usadas se prepararon con dos concentraciones de 100ppm y 1000ppm usando un volumen de 50 mL de agua, ver figura 23.

Figura 23. Montaje experimental efecto térmico en un sistema cerrado con lámpara incandescente de 60 watts.



Los datos obtenidos son indicados en las siguientes tablas:

Tabla 4. Temperaturas medidas del agua a una altura de 15 cm en un sistema cerrado con bombilla incandescente de potencia de 60 watts.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
15	28
30	30
45	32
60	33

Tabla 5. Temperaturas medidas de la solución acuosa (1000 ppm) de NTC-AF, donde el AF no está unido covalentemente, a una altura de 15cm con una bombilla incandescente de potencia de 60 watts en un sistema cerrado.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
15	32
30	40
45	46
60	50

Tabla 6. Temperaturas medidas de la solución acuosa (100 ppm) del NTC-AF, donde el AF no está unido covalentemente, a una altura de 15cm con una bombilla incandescente de potencia de 60 watts en un sistema cerrado.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
15	32
30	34
45	36
60	37

Tabla 7. Temperaturas medidas de la solución acuosa (1000 ppm) del NTC-AF covalente, donde el AF está unido covalentemente, a una altura de 15cm con una bombilla incandescente de potencia de 60 watts en un sistema cerrado.

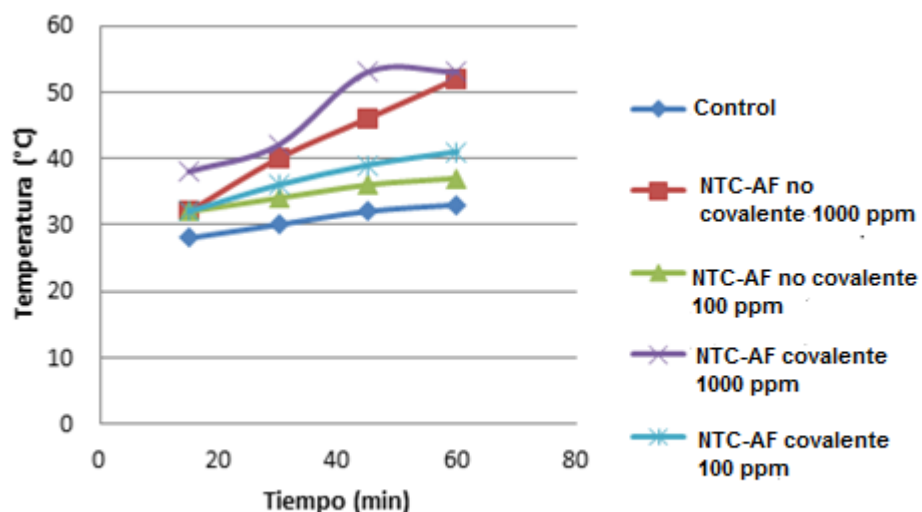
Tiempo (min)	Temperatura (°C)
15	38
30	42
45	53
60	53

Tabla 8. Temperaturas medidas de la solución acuosa (100 ppm) del NTC-AF covalente, donde el AF está unido covalentemente, a una altura de 15cm con una bombilla incandescente de potencia de 60 watts en un sistema cerrado.

Tiempo (min)	Temperatura (°C)
15	32
30	36
45	39
60	41

Después de analizar las temperaturas observadas en los diferentes sistemas indicados en las tablas 4-8, se puede concluir que hubo un aumento significativo de la temperatura en aquellas soluciones que contenían NTC-AF con respecto al control (ver tabla 4). Evidenciando de esta manera que los NTC funcionalizados presentan un aumento en la temperatura como consecuencia de su interacción con la radiación emitida por la lámpara incandescente, tal como se observa en la figura 25.

Figura 25. Efecto térmico sobre los NTC-AF funcionalizados de forma covalente y no covalente.



Se puede notar un aumento significativo de temperatura en el tiempo, de los NTC-AF enlazados covalentemente con respecto al AF unido no covalentemente y el cual es proporcional a la concentración. En la tabla 7 se observa que la temperatura máxima alcanzada entre 45 y 60 minutos fue de 53°C, 20 grados más que la temperatura medida para el control indicado en la tabla 4. Mientras que para la concentración de 100 ppm, tabla 8 se observó una temperatura máxima de 41°C, 8 grados más que la temperatura máxima del control tabla 4.

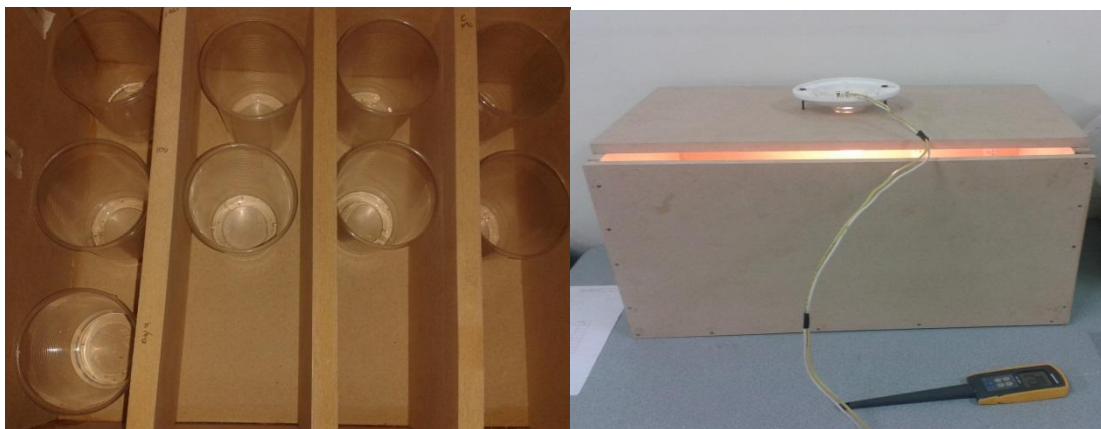
En resumen se observó que una mayor concentración de NTC permite un mayor aumento de la temperatura, pero además se observó que el tipo de funcionalización tiene un efecto sobre el aumento de temperatura, en este caso los NTC enlazados de manera covalente con el AF tuvieron un mayor efecto térmico, nuestras observaciones concuerdan por lo indicado en el trabajo de Hussain y cols[45].

5.3 ESTUDIO PRELIMINAR APLICACIÓN DE LA FUNCIONALIZACIÓN NO COVALENTE DE NTC-AF EN BIOACTIVIDAD LARVICIDA EN ESTADO 3 Y 4.

5.3.1 Control de la actividad larvicida

Adicionalmente a esto se realizó un ensayo de la actividad larvicida en estado 3 y 4 de la familia de Aedes Aegypti utilizando como fuente de alimentación una funcionalización no covalente de NTC-AF a diferentes concentraciones a su vez se realizó una estandarización del método experimental con bombillas incandescentes de potencias y se eligió la bombilla de 40 watts, la cual fue utilizada para evidenciar la mortalidad de las larvas a 24 y 48 horas, luego de ser expuestas a los NTC-AF a una altura de 20 cm. Esta altura y potencia de bombilla se escogieron teniendo en cuenta que una temperatura mayor a 35°C puede afectar directamente a las larvas estudiadas.

Figura 26. Montaje experimental para el estudio de actividad larvicida en estado tres y cuatro.



Los resultados obtenidos del efecto térmico de los NTC-AF sobre las larvas se muestran en las siguientes tablas.

Tabla 9. Control de la actividad larvicida a un tiempo de 24 horas.

CONCENTRACIÓN ppm	R1		R2		R3		TOTAL	
	V	M	V	M	V	M	V	M
100	3	7	9	1	9	1	21	9
1000	5	5	6	4	5	5	14	16
Control 100 ppm	AF 10	AF 0	NTC 9	NTC 1			19	1
Control 1000 ppm	10	0	8	2			18	2

Tabla 10. Control de temperatura a una altura de 20 cm con una bombilla incandescente a 40 watts a 24 horas del experimento.

CONCENTRACIÓN ppm	TEMPERATURA				
	R1	R2	R3	CONTROL NTC	CONTROL AF
100	31.4	32.1	30.9	31.6	29.2
1000	32.3	31.7	31.5	31.8	29.7

Tabla 11. Control de la actividad larvicida a un tiempo de 48 horas.

CONCENTRACIÓN ppm	R1		R2		R3		TOTAL	
	V	M	V	M	V	M	V	M
100	3	7	9	1	10	0	22	8
1000	5	5	6	4	3	7	16	14
Control 100 ppm	AF 10	AF 0	NTC 10	NTC 0			20	0
Control 1000 ppm	10	0	8	2			18	2

Tabla 12. Control de temperatura a una altura de 20 cm con una bombilla incandescente a 40 watts a 48 horas del experimento.

CONCENTRACIÓN ppm	TEMPERATURA				
	R1	R2	R3	CONTROL NTC	CONTROL AF
100	29.6	29.9	29.8	30.1	28.9
1000	31.1	31.3	30.7	31.4	30.5

Los resultados obtenidos que se reportan en las tablas 10-12 permiten evidenciar que a las 24 horas de haber realizado el experimento la temperatura máxima obtenida en las réplicas fue de 32.3°C y en el control de NTC fue de 31.8°C. En la concentración de 100 ppm se observó que en la réplica 1 el número de larvas muertas era alto, pero en las réplicas 2 Y 3 (ver tablas 10 y 12) no se observó lo mismo. La diferencia de actividad en las réplicas a una concentración de 100 ppm se debe a que la solución de NTC-AF de las réplicas 2 y 3 se diluyeron de una concentración de 600 ppm anteriormente preparada, y la cantidad de NTC presentes no era equivalente a la concentración deseada.

Sin embargo en las réplicas de concentración de 1000 ppm se observó una buena actividad larvicida con un número constante de muertes de las larvas estudiadas. En los controles de AF a concentraciones de 100 se observó un cambio de piel de las larvas y en ambos controles no hubo ninguna muerte de las larvas. Además en el control de NTC a una concentración de 1000 ppm se encontraron dos larvas muertas.

En el transcurso de 48 horas de haber iniciado el experimento se observó que en la concentración de 100 ppm la actividad larvicida fue constante, en el cual se presentó el mismo cambio de piel en las larvas presentes en el control de AF; pero en el control de NTC apareció una larva muerta. Por otra parte la concentración de 1000 ppm aumento su actividad evidenciándose mayor cantidad de muertes de larvas en las réplicas 3.

Figura 27. Larvas Aedes Aegypti durante el proceso de alimentación (27a) Larva sin alimentar, (27b) durante las primeras 2 horas de alimentación, (27c) transcurrido 24 horas de alimentación y (27d) a las 48 horas de alimentación.



En la figura 27 se observan los cambios en la coloración del abdomen de las larvas Aedes Aegypti a medida que se alimentan de NTC-AF. Su abdomen toma una coloración negra que se observa claramente en las imágenes, indicando que degradan de manera efectiva la solución estudiada.

6. CONCLUSIONES

Se logró evidenciar por técnicas espectroscópicas (IR/ATR, UV-VIS y fluorescencia) la funcionalización covalente de los Nanotubos de Carbono de Pared Simple con ácido fólico, mediante una metodología que permite el uso del EDAC para activar los grupos carboxílicos presentes en la superficie de NTC.

En la evaluación del efecto térmico del NTC por medio de una irradiación IR (lámpara incandescente con potencia de 60 vatios), se observó que el NTC funcionalizado covalentemente con el AF presentaba un mayor aumento de la temperatura (53°C) con respecto al NTC funcionalizado no covalente (50°C), el cual es proporcional a la concentración de la solución.

Se pudo evidenciar de manera indirecta la aplicabilidad de los NTC funcionalizados de forma no covalente con ácido Fólico para el tratamiento alternativo de control a las fuentes primarias causantes de enfermedades como el dengue.

7. RECOMENDACIONES

Los NTC-AF fueron funcionalizados de forma covalente y se llevó a cabo una buena caracterización, sin embargo se recomienda usar la técnica de resonancia magnética nuclear para confirmar con una mayor sensibilidad el tipo de funcionalización. También se recomienda usar una mayor cantidad de NTC-COOH en el protocolo de funcionalización para poder caracterizarlo por medio de la sonda de sólidos del RMN. A su vez se recomienda caracterizarlos por medio de Raman y microscopia electrónica, para obtener información más detallada.

Se recomienda estudiar la actividad larvicida con la funcionalización covalente de NTC-AF lograda y usar NTC-AF en sistemas biológicos tales como las células infectadas con Leishmania ó en sistemas como las larvas de mosquitos. Empleando un láser de radiación infrarroja específico que permite modificar la potencia de irradiación.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Liu, Zhuang. Biomedical applications of carbon nanotubes. Tesis de doctorado en filosofía. Stanford: Stanford University. Submitted to the department of chemistry, 2008. 6-11p.

[2] Ajayan, Pulickel., Zhou, Otto. Applications of carbón nanotubes. Springer link, 2001; 80: 391-400p.

[3] Ashby, Michael., Ferreira, Paulo., Schodek, Daniel. Nanomaterials nanotechnologies and design. Burlington, 2009; 1-10p.

[4] Goldhaber-Gordon, David., Montemerlo, M.S., LOVE, J.C., Opiteck, G.C., Ellenbogen, J.C. Overview of nanoelectronic devices. Virginia: Mitre corp, 1997; 85: 521-530p.

[5] Kaiser, Tiffany. Self Assembling Nanoescale Ropes Develop from Syntetic Pollymers.En : Science, 2011.

[6] Fortina, Palo., Kricka, Larry., Surrey, Saul., Grodzinski, Piotr. The promise and reality of new approaches to molecular recognition. Trends in biotechnology. Philadelphia: Thomas Jefferson University, 2005; 23: 168-173p.

[7] Mannoor, Manu., TAO, Hu., Sengupta, Amartya., Kaplan, David., Naik, Rajesh., VERMA, Naveen., OMenetto, Fiorenzo., McAlpine, Michael. Graphene-based wireless bacteria detection on tooth enamel. En: Nature Communications. 3 (763) 2011.

[8] Ehrenfreund, Pacale., Foing, H. Bernard. Los fullerenos y Cosmic Carbon. En Ciencia 2010, Vol 329, 1159-1160 p.

[9], [10], [11], Atienzar C. Pedro. Tesis Doctoral: Síntesis, Propiedades Fotofísicas y Aplicaciones de Nanotubos de Carbono de Pared Única Funcionalizados. España. 2007. 1-4p

[12] Hennrich, Frank., Chan, Candace., Moore, Valerie., Rolandi, Marco., Connel, Mike. Chapter One: The element carbon. Taylor & Francis Group, LLC 2006.1-18 p

[13] Grobert, Nicole. Carbon nanotubes-becoming clean. En: Material today, Vol, 10, 2007, 1-2 p

[14] Gogotsi, Yury. Carbon monomaterials. USA. Taylos &Francis. 2006.

[15] Musso, S. et al. Physical and mechanical properties of thick self-standing layers of multiwall carbon nanotubes. Diamond & Related Materials.2007. Vol 16. 1174-1178p.

[16] Robertson, Jhon. Realistic applications of CNTs. En: Materials today. 2004. 46-52 p

[17] Ando, Yoshinori., Zhao, Xinluo., Sugai, Toshiki., Kumar, Mukul. Growing carbon nanotubes. En: Materials today. 2004, Vol 7, num. 10, 22-29 p.

[18] Dervishi y et al. Carbon Nanotubes: Synthesis, Properties, and Applications Particulate Science and Technology. 2009, Vol 27, 107-125 p.

[19] A. Jorio., M, Pimenta., A. Souza., R. Salto., G. Dresselhaus. Characterizing Carbon Nanotube Samples whit Resonance Raman Scattering. En: New Journal of Physics. 2003, Vol 5, 139.1-139.17.

[20] Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., Prato, M. En: Chemical reviews. 2006, Vol 106, 1105-1136 p.

[21] Suzuki, Satoru. Nanotechnology and Nanomaterials. "Syntheses and Applications of Carbon Nanotubes and Their Composites". Intech. 2013. 978-953 p.

[22] Chakravarty, Pavitra., Marches, Radu., Zimmerman, Neil., Swafford, Austin., Bajaj. Pooja., Musselman, Inga., Pantano, Paul., Drapper, Rockford., Vietta, Ellen. Thermal Ablation of Tumor Cells with Antibody-Funcionalized Single-Wlled Carbon Nanotubes. En: PNAS. 2008, Vol 105, 8697-8702 p.

[23] Praskash, Satya., Kulamarva, Arun. Recent Advances in Drug Delivery: Potencial and Limitations of Carbon Nanotubes. En: BEentham Science Publishers. 2007, Vol 1, 214-221.

[24] Resasco, Daniel., Chair, Bourne., Lynn, George. Structure and Applications of Single-Walled Carbon Nanotubes (SWCNTs) Synthesized Using the CoMoCAT Method. University of Oklahoma 2011. 1-6 p.

[25] Fortina, Palo., Kricka, Larry., Surrey, Saul., Grodzinski, Piotr. The promise and reality of new approaches to molecular recognition. Trends in biotechnology. Philadelphia: Thomas Jefferson University, 2005; 23: 168-173p

[26], [28], [29] De-Volder, Michael., Tawfick, Sameh., Baughman, Ray., Hart, John. Science: Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. Science's compass. 2013; 339: 535-538p.

[27] Bugallo, Andres. Tesis magistral: Diseño, construcción y caracterización de un circuito formado por nanotubos de carbón mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). México. 2008. 11-12 p.

[30], [31] Baugman, Ray., Zakhidov, Anvar., De-Heer, Walt. Botany: Carbon Nanotubes- the route toward applications. Science's compass. 2002; 297: 789-790p.

[32], [33] Martínez, María., Ganzer, José., Huertas, María. Aplicaciones actuales y futuras de los nanotubos de carbono. Informe de vigilancia tecnológica. Madrid. 2007; 11: 21-65p.

[34] ACD/ChemSkeetch version 11.0

[35], [36] Maldonado, Estela. Tesis Doctoral: Papel del ácido fólico dietético en el desarrollo del paladar de ratón. Madrid. 2012. 24-26 p.

[37] Bahr, Jeffrey., Tour, James. Covalent Chemistry of Single-Wall Carbon Nanotubes. En: J. Mater Chem. 2012, Vol 12, 1952-1958 p.

[38] Wadzanai, C., y Tebello, N. Characterization of Amine-Functionalized Single-Walled Carbon Nanotube-Low Symmetry Phtalocyanine Conjugates. En: Carbon. 2010, Vol 48, 2831-2838 p.

[39] Banerjee, S., Hemraj- Benny, T., WONG, S. Covalent Surface Chemistry of Single-walled Carbon Nanotubes. En: Adv Matter. 2005, Vol 17, 17-29 p.

[40] Rosaleen, Anderson., Bemdell, David., Groundwater, Paul. Organic spectroscopic analysis. Cambridge. 2004; 22: 7-12p.

[41] Hussain, S., Dosser, L., Payne, S., Stacy, B., Schrandt, A. Applied Materials & Interfaces, 2011; 3: 3971-3980p.

[42] Galvis, M., Barbosa, O., Ruiz, M., Cruz, J., Ortiz, C., y Torres R. *Process Biochemistry*: 47(2012) 2373-2378.

[43] Wadzanai, C., y Tebello, N. En: Carbon. 2010, Vol 48, 2831-2838 p.

[44] Castillo, John., Novoa, Leidy., Ortega, Fernando., Escobar, Patricia. Carbón nanotubes- chitosan in HOS and THP-1 cells. Univ. Ind. Santander. 2011, vol. 43. 21-26p.

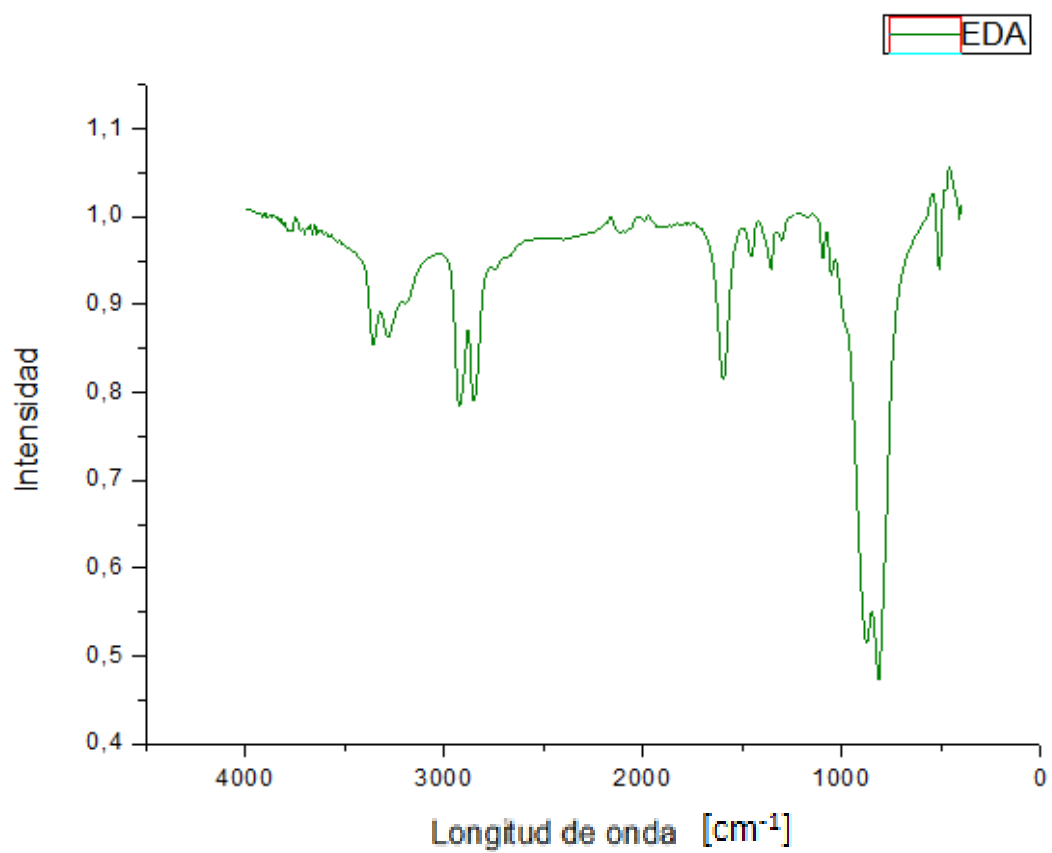
[45] Fisher J., Sarkar S., Buchanan C. Cancer Research, 2010; 70: 9855-9864.
Hussain S., Dosser L., Payne S., Stacy B., Schrandt A. Applied Materials & Interfaces, 2011;3: 3971-3980.

[46] Ya-Ping, S. Kefu, F., Yi, L y Weijie, H. Acc. Chem. Res: 35(2002)1096-1104.

[47] Castillo, J.J., Rindzevicius, T., Novoa, L., Svendsen, W., Rosloznik, N., Boisen, A., Escobar, P., Martínez, F., y Castillo, J., y Journal of Materials Chemistry: 2013 Vol, 1, 1475-1481 p.

[48] Castillo, J. "Diseño y Preparación de Nanocompuestos Funcionalizados con Ácido Fólico y sus Aplicaciones Biomédicas", Tesis Doctoral, Universidad Industrial de Santander, (2012).

ANEXOS A Espectro IR/ATR de la Etilendiamina



ANEXO B. Espectro IR/ATR del Ácido Fólico

